



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE DE
ANTICUERPOS EN SUERO Y DE LINFOCITOS T EN
PULMÓN ANTE LA VACUNACIÓN Y DESAFÍO CON EL
VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY EN
CERDOS CONVENCIONALES DESTETADOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

IVÁN SALINAS ZACARÍAS

ASESOR: DR. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

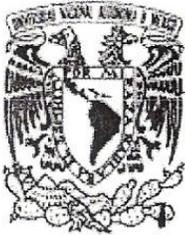


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

**DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**



ATN:L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

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

Análisis de la respuesta inmune de anticuerpos en suero y de linfocitos T en
pulmón ante la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky
en cerdos convencionales destetados.

Que presenta el pasante Iván Salinas Zacarías

Con número de cuenta: 303256047 para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cuautitlan Izcalli, Mex. a 11 de marzo de 2011

PRESIDENTE	<u>Dr. Marco Antonio Vega López</u>
VOCAL	<u>Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira</u>
SECRETARIO	<u>Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón</u>
1er SUPLENTE	<u>MVZ. Angel Germán Martínez Sosa</u>
2º SUPLENTE	<u>QFB. Ladislao Palomar Morales</u>

Susana E. Mendoza Elvira

Víctor Manuel Zendejas Buitrón

Angel Germán Martínez Sosa

Ladislao Palomar Morales

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) con el número de proyecto ICYTDF/267/2009, además el alumno Iván Salinas Zacarías recibió una beca de licenciatura para la realización del mismo.

Responsable del proyecto Dr. Marco Antonio Vega López.

“Intenta no volverte un hombre de éxito, sino volverte un hombre de valor.”

“Dos cosas son infinitas: el universo y la estupidez humana; y yo no estoy seguro sobre el universo.”

Albert Einstein

“Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento.”

“Os ruego que os intereséis por esos edificios sagrados llamados significativamente laboratorios. Pedid que sean multiplicados y completados. Son los templos del porvenir, de las riquezas y del bienestar.”

Louis Pasteur

DEDICATORIAS.

Este trabajo está dedicado:

A mis padres (Rosa y Pedro) con todo mi amor, cariño, respeto y admiración. A quienes debo lo que soy. Los amo.

A mis hermanas (Vero y Noemí "Chiquis") con todo mi amor para ustedes. Siempre estarán presentes en mi mente y corazón.

A mi sobrino (Diego) esperando alcances todas las metas que te propongas.

A Carolina con todo mi corazón. Eres la fuerza que me impulsa a seguir adelante.

A mi universidad la UNAM FES-Cuautitlán intentando regresar un poco de todo lo que me dio.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mis padres por todo el esfuerzo y los sacrificios que realizaron para que yo cumpliera, hasta ahora, la meta más importante en mi vida. Por guiarme y nunca dejarme solo. Espero algún día poderles regresar un poco de todo lo que han hecho por mí. Los amo.

A mis hermanas por todo su amor, cariño y apoyo. Gracias por estar ahí cuando las necesito, gracias por ser parte de mi vida.

A mi sobrino por iluminar mi vida con tu simpatía, sencillez e inocencia que son una gran pizca de alegría.

A Caro por todo tu apoyo, gracias por creer en mí. Pero sobre todo gracias por tu amor que es el motor que me impulsa a seguir adelante. Te amo.

A mis amigos Aldo, Xchel, Gus, Alan (Rigo), Gaby E. Carlos, Santino, Gaby, Lashi, Danira, Angy y Adrián (espero no falte nadie más) por el privilegio de conocerlos, por compartir una época llena de sorpresas, alegrías, tristezas, desveladas, por su apoyo y consejos. De igual manera un agradecimiento a mis amigos del CCH (Gerardo, Rubén, Úrsula, Oliver) y de la secundaria (Chucho, Morfín, Leticia, Araceli,) que a pesar del tiempo sigo contando con su apoyo y amistad. Se cambia de año, se cambia de sueños, se cambia de objetivos, se cambia de aspecto. Pero jamás, jamás se cambia de amigos. Espero que cada uno cumpla sus sueños.

Un agradecimiento especial al Dr. Marco Antonio Vega López, por confiar en mí y permitirme trabajar en su laboratorio, por su apoyo y por compartir sus conocimientos y, sobre todo, por sus sabios consejos para lograr una de tantas metas profesionales que tengo, es un ejemplo a seguir. También por su paciencia y dedicación para mejorar este trabajo. Por el aprendizaje y desarrollo que he recibido a través de su enseñanza, que en verdad es invaluable. Gracias Doc.

A la Biol. María del Carmen Ramírez Estudillo y al M.C. Ángel de Jesús Balam May por su asistencia técnica, sus consejos y por compartir conmigo sus conocimientos sin los cuales no habría sido posible realizar esta tesis, además de su amistad y compañerismo. De igual manera agradezco a cada uno de los miembros del laboratorio de Inmunobiología de las Mucosas del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN gracias por su compañerismo, amistad, consejos y agradables momentos que pasamos juntos, gracias: Emilio, Alicia, Nancy, Lupita, Edgar, Oscar, Irma y Víctor.

A la M.C. María Antonia Coba Ayala y a la M.V.Z.E.E.A. Laura Elena Zapata Salinas por proporcionar la vacuna y el antígeno purificado del VEA utilizados en esta investigación, además de facilitar las instalaciones de las del CENID-Microbiología INIFAP para la manutención de los animales, para el trabajo de laboratorio y sobre todo por la hospitalidad brindada, también al M.V.Z Enrique Chávez Castañeda por su asistencia técnica en el manejo y cuidado de los animales.

A la Dra. Susy, al Dr. Zendejas, al Profe Ángel y al Profe Ladislao por su paciencia y dedicación en la revisión de este trabajo, además por sus valiosas sugerencias y comentarios que contribuyeron a mejorar en mucho este escrito.

A la Universidad Nacional Autónoma de México pero sobre todo a mi adorada Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, a la que no solo le debo mi desarrollo profesional, si no, la gran cantidad de amigos que encontré y sobre todo el amor. Gracias por esta maravillosa época de mi vida.

A todos mis profesores por ser mis guías y formadores.

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE GENERAL.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Mecanismos inespecíficos de defensa del pulmón.....	2
2.2. Mecanismos específicos de defensa del pulmón.....	6
2.2.1. Inmunoglobulinas.....	6
2.2.2. Células linfoides.....	8
2.2.2.1. Linfocitos T.....	8
2.2.3. Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT).....	11
2.2.3.1. Sitios anatómicos individuales.....	13
2.2.3.1.1. Tonsilas orofaríngeas (palatinas).....	13
2.2.3.1.2. Tejido linfoide asociado a la nariz (NALT).....	14
2.2.3.1.3. Tejido linfoide asociado a laringe (LALT).....	16
2.2.3.1.4. Tejido linfoide asociado a bronquios (BALT).....	17
2.3. Inmunización.....	20
2.4. Virus respiratorios.....	22
2.4.1. Virus de la enfermedad de Aujeszky.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS.....	29
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	29
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	42
8. RESULTADOS.....	43
9. DISCUSIÓN.....	55
10. CONCLUSIONES.....	68
11. ANEXOS.....	69
12. BIBLIOGRAFÍA.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS.

°C	centígrado
μl	microlitro
ADN	ácido desoxirribonucleico
APC	célula presentadora de antígeno
BAL	lavado bronquioalveolar
BALT	tejido linfoide asociado a los bronquios
CD	<i>cluster of differentiation</i>
D	desafío
DC	célula dendrítica
DICC _{50%}	dosis infecciosa cultivo celular
DN	dobles negativas (CD4-CD8-)
DP	dobles positivas (CD4+CD8+)
ELISA	ensayo inmunoenzimático
FAE	epitelio asociado a folículo
g	gramo
GALT	tejido linfoide asociado al intestino
GLCV	ganglio linfático cervical
GLPT	ganglio linfático peritraqueal
HEV	vénula del endotelio alto
HRP	peroxidasa de rábano
HVP-I	herpesvirus porcino tipo I
ID	intradermorreacción
IFN	interferón
IgA	inmunoglobulina A
IgG	inmunoglobulina G
IL	interleucina

IM	intramuscular
IN	intranasal
IV	intravenosa
kg	kilogramo
LALT	tejido linfoide asociado a laringe
LP	lámina propia
M	muestreo
MALT	tejido linfoide asociado a mucosas
MBL	lectina de unión a manosa
mg	miligramo
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
min	minuto
ml	mililitro
NALT	tejido linfoide asociado a la nariz
ng	nanogramo
NK	célula asesina natural
nm	nanómetro
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	amortiguador salino de fosfatos
PMN	polimorfonucleares
PNPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
Prel	preinmunización
PRR	receptor de reconocimiento de patrones
S	sacrificio
SARS	síndrome respiratorio agudo severo
SC	subcutánea

SEM	error estándar de la media
T _C	linfocito T citotóxico
TCR	receptor de la célula T
T _H	linfocito T cooperador
TLR	receptor tipo <i>"Toll"</i>
TMB	3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina
TNF	factor de necrosis tumoral
TNK	célula T asesina natural
UI	unidad internacional
VEA	virus de la enfermedad de Aujeszky
VHS	virus del herpes simple
VPRRS	virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino
X g	gravedades

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura 1. Diferentes tipos de TLR, así como sus ligandos	4
Figura 2. Epitelio asociado a folículo	13
Figura 3. Sistema inmune común de las mucosas	15
Figura 4. Diagrama del patrón de llenado de la placa de ELISA	32
Figura 5. Ubicación de los lóbulos pulmonares	38
Figura 6. Diseño experimental	42
Figura 7. Diseño de la placa de ELISA cuantitativa	43
Figura 8. Ejemplos representativos de la curva estándar de la técnica de ELISA cuantitativa	44
Figura 9. Concentración sérica de IgG anti-VEA en cerdos destetados	46
Figura 10. Concentración sérica de IgA anti-VEA en cerdos destetados	47
Figura 11. Determinación de las poblaciones de linfocitos T	49
Figura 12. Valores relativos de linfocitos T CD4+ en sangre, GLPT, GLCV, BAL y parénquima pulmonar	51
Figura 13. Valores relativos de linfocitos T CD8+ en sangre, GLPT, GLCV, BAL y parénquima pulmonar	52
Figura 14. Valores relativos de linfocitos T DP (CD4+CD8+) en sangre, GLPT, GLCV, BAL y parénquima pulmonar	53
Figura 15. Valores relativos de linfocitos T DN (CD4-CD8-) en sangre, GLPT, GLCV, BAL y parénquima pulmonar	54

ÍNDICE DE TABLAS.

		Página
Tabla 1.	Principales virus causantes de enfermedades del tracto respiratorio	24
Tabla 2.	Anticuerpos primarios para el ensayo de citometría de flujo	40
Tabla 3.	Anticuerpos secundarios para el ensayo de citometría de flujo	40
Tabla 4.	Lectura de fluorescencia para citometría de flujo	41
Tabla 5.	Promedio de las concentraciones séricas de IgG anti-VEA (ng/ml) \pm el error estándar de la media	45
Tabla 6.	Promedio de las concentraciones séricas de IgA anti-VEA (ng/ml) \pm el error estándar de la media	45
Tabla 7.	Promedio de los valores relativos (% de células) \pm el error estándar de la media de las subpoblaciones de linfocitos T (CD3+)	50

1. RESUMEN

El pulmón se ha identificado como un importante órgano inmunológicamente activo, ya que está expuesto a una enorme cantidad de microorganismos. La integridad de las vías respiratorias depende, de modo decisivo, de un aparato de defensa del hospedero que está estrictamente regulado (Bienenstock, 1984; Katinger y cols., 1999).

En esta investigación se planteó evaluar la respuesta inmunitaria sérica y de linfocitos T pulmonares ante la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) en cerdos convencionales destetados utilizando dos métodos de vacunación: convencional (IM/IM/IM) y combinada (SC/SC/IN).

Para evaluar la respuesta inmunológica sérica porcina se cuantificó, mediante la técnica de ELISA, las concentraciones de IgG e IgA específicas contra el VEA a los diferentes días de inmunización, en la intradermorreacción (ID), en el desafío y en el sacrificio, observando la producción de respuesta inmune de IgG e IgA específicas contra VEA al mismo nivel entre los dos protocolos de inmunización.

Posteriormente para analizar la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T específicos contra VEA se utilizó la técnica de citometría de flujo, con lo cual se observó un aumento en el porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ y DP (CD4+CD8+) en el grupo de vacunación convencional (IM/IM/IM) lo cual podría provocar un mayor grado de inflamación y daño en los tejidos pulmonares. En contraste, se detectó una disminución de esas células en el grupo de vacunación combinada (SC/SC/IN) lo que indicaría que estas subpoblaciones actuaron rápidamente, al momento de la infección, para evitar la replicación viral sin atraer a más células al sitio de infección evitando el desarrollo de inflamación o también podría ser que la respuesta humoral fuera más efectiva evitando una infección masiva, sin embargo, se deben evaluar los parámetros patológicos y de diseminación viral en los pulmones de los cerdos de cada grupo para determinar el grado de protección conferido.

2. INTRODUCCIÓN

El pulmón es uno de los órganos que más contacto tiene con el medio; inhala aproximadamente 10,000 litros de aire al día, por lo que está expuesto a una enorme cantidad de microorganismos que la mayoría de las veces son incapaces de colonizarlo debido a una respuesta inmunológica innata efectiva (Rivas-Santiago y cols., 2005). La integridad de las vías respiratorias depende, de modo decisivo, de un aparato de defensa del hospedero que está estrictamente regulado. El sistema de inmunidad natural confiere una protección inicial frente a los microorganismos y estimula una respuesta inmunitaria adaptativa. Los componentes celulares del sistema inmunitario natural incluyen fagocitos como los neutrófilos o macrófagos, células asesinas naturales, basófilos, mastocitos, eosinófilos, y linfocitos TCR1, TNK. Los epitelios del cuerpo forman interfases entre el medio externo y el medio interno. En el caso de las vías respiratorias, la mucosa que las reviste es el primer punto de contacto entre las sustancias inhaladas, como los contaminantes medioambientales, el humo de cigarrillos, alérgenos transmitidos por el aire, y los microorganismos. En los últimos años se ha puesto de manifiesto que las células epiteliales de las vías respiratorias no sólo desempeñan una función pasiva de barrera, sino que también contribuyen activamente al sistema inmunitario natural (Bals y Hiemstra, 2004).

2.1. Mecanismos inespecíficos de defensa del pulmón

En el tracto respiratorio superior los cornetes nasales con forma espiral dividen la cavidad nasal en canales de conducción que crean turbulencias del aire inspirado, dando lugar al impacto de las partículas mayores de 10 μm . Tras ello las partículas depositadas son eliminadas del aparato respiratorio mediante el aparato mucociliar. A nivel bronquial otras turbulencias filtran las partículas de aire de 3 a 10 μm (Halliwell y Gorman, 1992).

En general todo el tracto respiratorio, y la mayoría de las mucosas, están recubiertos por una capa de moco. El moco es una sustancia pegajosa y flexible secretada por las células caliciformes. Las características del moco le confieren consistencia viscosa y densa. Los microorganismos envueltos por el moco no pueden adherirse al epitelio y son

expulsados en el flujo de moco conducido por el movimiento de los cilios epiteliales. La eficacia del flujo de moco en la eliminación de la infección se ilustra en personas con secreción defectuosa de moco o inhibición del movimiento ciliar. Estas personas desarrollan frecuentemente infecciones pulmonares causadas por las bacterias que colonizan la superficie epitelial (Janeway y cols., 2003). Esta limpieza puede ser aumentada con el reflejo tusígeno y se ha estimado que el 90% del material depositado en el árbol tráqueo-bronquial puede ser eliminado físicamente en una hora. Además, los microorganismos no patógenos tienden a formar colonias en las células epiteliales de las superficies mucosas, esta “flora normal” compite casi siempre con los patógenos por los sitios de fijación en la superficie de las células epiteliales y los nutrientes necesarios (Goldsby y cols., 2004).

Las células del sistema inmunitario natural, incluyendo los fagocitos, células dendríticas y células epiteliales, utilizan los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) para unirse a los patrones moleculares conservados que están presentes en los microorganismos (PAMPs). Los PRRs pueden estar presentes en las secreciones y en la circulación de forma soluble, como la lectina de unión a manosa (MBL), o pueden ser moléculas transmembranales que median en las respuestas celulares directas a la exposición microbiana. Los receptores tipo “*Toll*” (TLR) constituyen una familia de receptores PRR estudiada extensamente (hasta la fecha, se han reconocido 10 miembros de la familia humana), representada por diversos tipos en casi todas las células del organismo (figura 1). Su expresión se ha estudiado con especial interés en las células dendríticas, y en la actualidad se reconoce que dichos receptores contribuyen a modelar la respuesta inmunitaria adaptativa dirigiendo el modo en que las células dendríticas dan instrucciones a las células T. Las células del epitelio de las vías respiratorias también expresan una diversidad de TLR que puede ayudarlas a organizar una respuesta suficiente frente a la exposición microbiana (Bals y Hiemstra, 2004; Rivas-Santiago y cols., 2005).

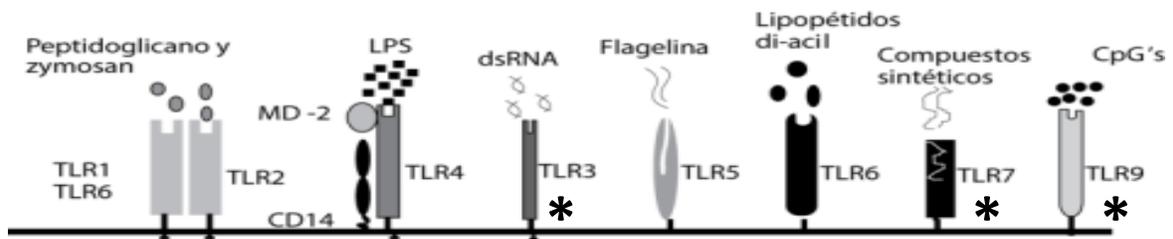


Figura 1. Muestra los diferentes tipos de TLR, así como sus ligandos * Intracelulares (modificado de Rivas-Santiago y cols., 2005).

También existen elementos celulares involucrados en la defensa inespecífica en el sistema inmunológico pulmonar como los eosinófilos, los macrófagos, neutrófilos, las células dendríticas (DC), NK y linfocitos.

La célula dendrítica (DC) adquirió su nombre porque tiene extensiones largas de la membrana que semejan las dendritas de las células nerviosas. Existen muchos tipos de DCs, aunque la mayor parte de las maduras tiene la misma función principal: presentación de antígeno a células T. Se conocen varios tipos de DC, aunque las más importantes son: de Langerhans, intersticiales, plasmocitoides, mieloides y linfoides. A pesar de sus diferencias, todas expresan de forma constitutiva concentraciones altas de moléculas MHC clase II y de miembros de la familia coestimuladora B7. Por esta razón son células presentadoras de antígeno (APC) más potentes que los macrófagos y las células B, ya que estas dos necesitan activarse antes que puedan funcionar como APC (Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004).

Los macrófagos maduran continuamente a partir de los monocitos circulantes que abandonan la circulación para migrar al interior de los tejidos de todo el cuerpo. Se encuentran en gran número, en especial en el tejido conectivo, asociados al tracto intestinal, en los pulmones (donde se encuentran tanto en el intersticio como en los alveolos), a lo largo de ciertos vasos sanguíneos del hígado ("células de Kupffer"), y por todo el bazo donde eliminan las células sanguíneas senescentes (Janeway y cols., 2003). Los macrófagos activados poseen más actividad fagocítica, mayor potencial para destruir microbios ingeridos, mayor secreción de mediadores inflamatorios y capacidad aumentada para activar células T, también expresan valores más altos de moléculas de

MHC clase II, que les permite funcionar con mayor efectividad como APC (Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004).

Los neutrófilos son células con núcleo multilobulado y un citoplasma granuloso que se tiñe con colorantes ácidos y básicos; con frecuencia se conocen como leucocitos polimorfonucleares neutrofílicos (PMN) por su núcleo multilobulado; son células de vida corta, abundantes en sangre. Al igual que los macrófagos, los neutrófilos son células fagocíticas activas y la fagocitosis es similar a la de los macrófagos, excepto porque las enzimas líticas y las sustancias bactericidas de los neutrófilos están incluidas dentro de gránulos primarios y secundarios (Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004).

Los eosinófilos tienen un núcleo bilobulado y un citoplasma granuloso que se tiñe con el colorante ácido rojo de eosina (de ahí su nombre). Son células móviles que pueden migrar de sangre hacia los espacios tisulares, su función fagocítica es menos importante que la de los neutrófilos y se piensa que poseen un papel de defensa contra parásitos (Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004).

Las células asesinas naturales (NK) tienen una función relevante en la defensa del hospedero, sea contra células tumorales o células infectadas por algunos virus, aunque no todos. Estas células no expresan las moléculas y receptores de membrana que se caracterizan en los linajes de los linfocitos T y B. Eliminan células infectadas y tumores mediante el reconocimiento de CD1 unido a carbohidratos/lípidos, o de antígenos presentes en la membrana de células infectadas, se activan por interferones e IL-2 (Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004).

Los linfocitos TCR1 ($\gamma\delta$) al parecer son la primera línea de defensa contra microorganismos en conjunto con las DC, pues ante la presencia de antígenos como el lipopolisacárido aumentan su actividad microbicida y dirigen la respuesta inmunitaria hacia una respuesta Th1; los linfocitos T $\gamma\delta$ al secretar IL-2, e IL-12. Estas células se pueden encontrar elevadas en los lavados broncoalveolares en enfermedades inflamatorias crónicas pulmonares. Sin embargo en el sistema inmunológico de las mucosas juegan un importante papel de regulación (Bienenstock y McDermott, 2005).

2.2. Mecanismos específicos de defensa del pulmón

2.2.1. Inmunoglobulinas

La respuesta humoral se caracteriza porque su componente efector son los anticuerpos, los cuales son específicos contra antígenos y son sintetizados por células plasmáticas diferenciadas a partir de linfocitos B. Los anticuerpos son glicoproteínas que poseen dos cadenas polipéptidicas pesadas idénticas y dos ligeras también idénticas. Cada cadena pesada está unida a una ligera por enlaces disulfuro adicionales. Los extremos amino terminales forman una hendidura dentro de la cual se unen antígenos. Las cadenas pesadas determinan la clase de ese anticuerpo: IgM (mu), IgG (gama), IgA (alfa), IgD (delta) o IgE (épsilon) (Halliwell y Gorman, 1992; Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004)

En el aparato respiratorio predominan las IgG e IgA pero la proporción entre ambas varía en los diferentes lugares del tracto respiratorio. Se ha comprobado que las IgA predominan en las vías respiratorias altas, mientras que la proporción de IgG aumenta en las zonas más distales y es más abundante en las secreciones broncoalveolares. La mayor parte de las IgA parece ser sintetizada localmente por las células plasmáticas distribuidas a lo largo del tracto. Por el contrario las IgG de las vías respiratorias altas derivan de la trasudación sérica, si bien en el tracto respiratorio inferior se producen localmente. La importancia de los altos niveles de anticuerpos fijadores del complemento sobre las mucosas puede tener relación con la relativa esterilidad del tracto respiratorio inferior (Halliwell y Gorman, 1992; Delventhal y cols., 1992).

La expresión de IgA difiere entre los dos compartimientos principales en los que se encuentra: sangre y secreciones mucosas. En la sangre, la IgA se encuentra principalmente en forma de monómero y la proporción de IgA1 frente a IgA2 es aproximadamente de 4:1. En las secreciones mucosas, la IgA se produce casi exclusivamente como dímero y la proporción de IgA1 frente a IgA2 es aproximadamente 3:2 (Janeway y cols., 2003).

La IgA secretoria tiene una función efectora relevante en las superficies mucosas, debido a que es polimérica, la IgA secretoria puede enlazar de forma transversal antígenos grandes con múltiples epítomos. La unión de IgA secretoria a los antígenos de superficie bacterianos y virales impide la fijación de los patógenos a las células mucosas e inhibe, en consecuencia, las infecciones virales y la formación de colonias bacterianas, conocido como arrastre inmunológico. Los complejos de IgA secretoria y antígenos quedan atrapados con facilidad en el moco y a continuación las células epiteliales ciliadas de las vías respiratorias los eliminan (Goldsby y cols., 2004).

La IgG es una inmunoglobulina biológicamente más activa que la IgA, capaz de activar al complemento en el plasma, de inducir la opsonización y de intervenir en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos y, por lo tanto, podría pensarse que produjese una mayor respuesta inflamatoria que la IgA sobre las mucosas. Se ha sugerido por ello que la IgG en esas circunstancias podría ser muy peligrosa y capaz de originar lesiones a la barrera epitelial, por lo cual se cree que los complejos antígeno-anticuerpo IgG podrían desencadenar la liberación de moco desde las células caliciformes e incrementar su actividad limpiadora (Halliwell y Gorman, 1992).

Durante el desarrollo del tejido linfóide asociado a bronquios (BALT) primero aparece una población de linfocitos B que pueden ser IgM+, IgA+ y en algunos casos IgG+; los linfocitos B se encuentran listos para ser estimulados por su antígeno, para entonces migrar a sitios efectores, previo paso por los ganglios linfáticos y circulación sanguínea general. Una vez en los sitios efectores se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos los cuales se unen a cadenas J lo que les permite ser secretados al espacio externo, una vez en este espacio reconocerán a su antígeno que puede estar en patógenos como bacterias o virus, las funciones que ejerzan los anticuerpos pueden ser principalmente de neutralización y opsonizantes (Bienenstock y McDermott, 2005).

2.2.2. Células linfoides

Los linfocitos son las células centrales del sistema inmunitario y tienen a su cargo la inmunidad adaptativa y los atributos inmunitarios de diversidad, especificidad, memoria y reconocimiento de lo propio y de lo extraño (Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004).

Los linfocitos constituyen 20 a 40% de los glóbulos blancos del cuerpo y 99% de las células de la linfa. Hay alrededor de 10^{11} linfocitos en el cuerpo humano. Estos linfocitos circulan de forma continua en la sangre y la linfa, y son capaces de migrar hacia espacios tisulares y tejidos linfoides; por consiguiente integran el sistema inmunitario a un grado elevado (Goldsby y cols., 2004).

En términos generales, los linfocitos pueden subdividirse en tres poblaciones:

- Linfocitos B.
- Linfocitos T.
- Células no T, no B o de la tercera población.

Dentro de estas últimas, las células asesinas naturales (NK) son linfocitos granulados y grandes que no expresan el grupo de marcadores de superficie característico de las células B o T. Los linfocitos B y T en reposo son células pequeñas móviles, no fagocíticas, que no es posible diferenciar a nivel morfológico (Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004).

Las diferentes etapas de maduración de los linfocitos pueden distinguirse por su expresión de moléculas de membrana reconocidas por anticuerpos monoclonales particulares (anticuerpos específicos de un epítipo aislado de un antígeno). Todos los anticuerpos monoclonales que reaccionan con una molécula de membrana particular pertenecen a un grupo de diferenciación (CD, del inglés *cluster of differentiation*) (Goldsby y cols., 2004; Roitt y cols., 2004).

2.2.2.1. Linfocitos T

Los linfocitos T derivan su nombre de su sitio de maduración en el timo. Estas células tienen receptores de membrana (TCR) que solo identifica al antígeno unido a una clase

particular de moléculas propias. Casi todos los linfocitos T reconocen al antígeno solo cuando está unido a una molécula propia codificada por genes dentro del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Con el fin de que lo reconozca la mayor parte de los linfocitos T, este antígeno debe mostrarse junto con las moléculas de MHC en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC) o células infectadas por virus, cancerosas o de injerto (Goldsby y cols., 2004).

Los linfocitos T expresan moléculas de membrana específicas. Todas las subpoblaciones de linfocitos T expresan el receptor de la célula T y un complejo de polipéptidos que están incluidos en el grupo CD3, y las subpoblaciones pueden diferenciarse por la presencia de una u otra de dos moléculas de membrana: CD4 y CD8.

Los linfocitos T que expresan la molécula de membrana CD4 están restringidas para reconocer el antígeno unido a moléculas de MHC clase II, en tanto que los linfocitos T que expresan CD8, una glicoproteína de membrana dimérica, se limitan a identificar un antígeno unido a moléculas de MHC clase I. En general, la expresión de CD4 y CD8 define asimismo dos subpoblaciones funcionales principales de linfocitos T. Las células T CD4+ suelen funcionar como linfocitos T cooperadores (T_H) y se restringen a la clase II; por lo general, las células T CD8+ actúan como linfocitos T citotóxicos (T_C) y se limita a la clase I (Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004; Roitt y cols., 2004).

Los linfocitos T_H se activan por el reconocimiento de un complejo antígeno-MHC clase II en una APC. Después de activarse, los linfocitos T_H comienzan a dividirse y crear una clona de células efectoras, cada una específica para el mismo complejo antígeno-MHC clase II (Zuckermann, 1999). Estos linfocitos T_H secretan varias citocinas, que juegan una función central en la activación de los linfocitos B, linfocitos T y otras células que participan en la reacción inmunitaria. Los cambios del patrón de citocinas ocasionados por el linfocito T_H pueden modificar el tipo de respuesta inmunitaria que se desarrolla entre otros leucocitos (Goldsby y cols., 2004). La respuesta T_H1 produce un perfil de citocinas (IL-2, IFN- γ y TNF- α) que interviene en la inflamación y activa en particular linfocitos T CD8 y macrófagos; en tanto que la respuesta T_H2 (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) activa sobre

todo linfocitos B y reacciones inmunitarias que dependen de anticuerpos (DeKruyff y cols., 1989; Mosmann y cols., 1996; Constant y Bottomly, 1997; Duramad y cols., 2004; Goldsby y cols., 2004). Los linfocitos T CD4⁺ estimulan su proliferación con IL-2, pero dependiendo del ambiente se diferenciarán a linfocitos cooperadores T_H1 o T_H2. En un ambiente en donde predomine la IL-12, proveniente de macrófagos y células dendríticas activadas, los linfocitos T CD4⁺ se diferenciarán a T_H1; si existe un ambiente en donde predomine la IL-4 los linfocitos se diferenciarán a T_H2. Los linfocitos T_H1 tendrán una expansión clonal y empezarán a producir IFN- γ el cual promoverá la activación de macrófagos que destruirán al antígeno endocitado e inducirá en los linfocitos B la producción de anticuerpos opsonizantes y que fijan el complemento, también secretarán TNF- α que promoverá la destrucción microbiana. Los linfocitos T_H2 secretarán IL-4 que promoverá la supresión de macrófagos e inducirá en los linfocitos B la producción de anticuerpos de clase IgG neutralizantes y anticuerpos de clase IgE que, en conjunto con los eosinófilos que fueron activados por la IL-5 secretada por los T_H2, promoverá la desgranulación de éstos y eliminará a los parásitos (Abbas y Litchman, 2004).

Los linfocitos T CD8, también llamados T citotóxicos (T_C) se activan cuando interactúan con un complejo antígeno-MHC clase I en la superficie de una célula propia alterada (p. ej., una célula infectada por un virus o una célula tumoral) en presencia de las citocinas apropiadas (Zuckermann, 1999). Esta activación, que tiene como resultado la proliferación, determina que el linfocito T_C se active en una célula efectora llamada linfocito citotóxico (LTC). En contraste con los linfocitos T_H, casi todos los LTC secretan unas cuantas citocinas y adquieren la capacidad para reconocer y eliminar células propias alteradas (Harty y Badovinac, 2002; Abbas y Litchman, 2004; Goldsby y cols., 2004).

Una vez que los linfocitos T CD8⁺ son estimulados mediante la presentación de antígeno específico y por acción de citocinas como el IFN- γ , la IL-2 y el TNF- α , migran a los sitios efectores, y actúan sobre las células infectadas generalmente por virus o bacterias intracelulares y las eliminan (Harty y Badovinac, 2002).

2.2.3. Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

Las mucosas que recubren los sistemas digestivo, respiratorio y urogenital tienen un área de superficie combinada de unos 400 m² (casi el tamaño de una cancha de basquetbol) y son los principales sitios de entrada de la mayor parte de los agentes patógenos (Goldsby y cols, 2004; Fainboim y Geffner, 2005). Después del aparato gastrointestinal, el aparato respiratorio es la mayor superficie mucosa continuamente expuesta a gran número y tipos de microbios y agentes tóxicos del medio ambiente (Hensel y cols., 1996; Debertain y cols., 2003).

Existen mecanismos humorales y celulares encargados de proteger el aparato respiratorio, el sistema IgA desempeña un papel importante en la parte superior e IgG para el aparato respiratorio inferior. El sistema inmune de la mucosa del tracto respiratorio está integrado en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) por el tráfico de células linfoides en este sitio (Delventhal y cols., 1992).

El tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) ofrece una distinta línea morfológica y funcional de la protección de las superficies mucosas y está compuesto de linfocitos y agregados linfoides en la lámina propia y en la submucosa. El MALT está representado en el aparato respiratorio inferior de los roedores por el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT), mientras que en el aparato respiratorio superior, el órgano involucrado en la respuesta inmunológica es una estructura linfoide llamada tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT) (Sosa y cols., 2008).

Los tejidos linfoides mucosos están anatómicamente muy extendidos y comunes en la mayoría de los mamíferos. Sus componentes individuales incluyen: (i) un anillo de estructuras linfoides que rodean la faringe (anillo de Waldeyer), principalmente las amígdalas orofaríngea y nasofaríngea, y también incluyendo las amígdalas tubáricas y linguales en algunas especies, (ii) tejido linfoide asociado a laringe (LALT); (iii) placas de Peyer intestinales, (iv) el apéndice, (v) agregados de nódulos linfáticos en el intestino grueso, (vi) folículos linfoides aislados en todo el tubo digestivo desde el esófago hasta el ano, (vii) el tejido linfoide asociado al bronquio (BALT), y (viii) el tejido linfoide asociado a

conjuntiva (CALT). Estos tejidos se concentran en los sitios de mayor exposición microbiana y desafío antigénico (Lugton, 1999).

Desde el punto de vista estructural, estos tejidos son variables, desde grupos laxos, apenas organizados de células linfoides en la lámina propia de vellosidades intestinales, hasta estructuras bien organizadas, como las amígdalas y el apéndice, y así mismo las placas de Peyer, que se encuentran dentro de la submucosa del recubrimiento intestinal (Goldsby y cols., 2004). En estos tejidos existen sitios especiales para la estimulación de la respuesta inmunitaria, llamados sitios inductores, y otros en donde se desarrolla la función inmunitaria, denominados sitios efectores (Neutra y Kozlowski, 2006; Vega-López, 2007). Existen cuatro compartimientos principales de estos tejidos: el epitelio, la membrana basal, la lámina propia (LP) y la submucosa. En el epitelio es posible detectar una gran cantidad de linfocitos, llamados por esta razón intraepiteliales; en la zona de la membrana basal se encuentran DC y linfocitos T CD8+ (citotóxicos); un poco más adentro en la lámina propia se encuentran linfocitos T CD4+ (cooperadores) que, al activarse con el antígeno presentado por las DC, secretan citocinas del perfil T_H2 (IL-4, IL-5, IL-10) para la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, que producen anticuerpos de isotipo IgA principalmente; en la LP también se encuentran numerosos mastocitos y eosinófilos, también se encuentra un gran número de células plasmáticas productoras de anticuerpos que son secretados a la luz de la mucosa; finalmente en la submucosa hay mastocitos y DC en número variable (Vega-López y cols., 1993; Vega-López, 2007).

Los tejidos linfoides asociados a mucosas se encuentran cubiertos de un epitelio asociado a folículo (FAE) que atrapa activamente macromoléculas y microorganismos. Asociados con el FAE y dentro de la lámina propia están los folículos linfoides secundarios que contienen centros germinales (figura 2). La presencia de un folículo linfoide mucosal influye, en el epitelio que le recubre, al inducir la diferenciación de un FAE. Las células M forman bolsas a las cuales los linfocitos intraepiteliales migran, y entregan muestras del material extraño por transporte vesicular de la luz de la mucosa hacia las células dendríticas adyacentes (Neutra y Kozlowski, 2006). La función básica del FAE es proporcionar un entorno favorable para el contacto entre los antígenos, los linfocitos y las

células presentadoras de antígeno (APC). Una vez que el contacto antigénico se ha hecho, el MALT tiene un papel doble que cumplir. En primer lugar, tiene que mantener una capacidad de reconocer patógenos y producir una adecuada respuesta inmunológica protectora. La segunda función es la de la supresión de hipersensibilidad local y periférica a sustancias inocuas en la superficie de la mucosa. Esto evita que las respuestas inadecuadas dañen los tejidos (Lugton, 1999).

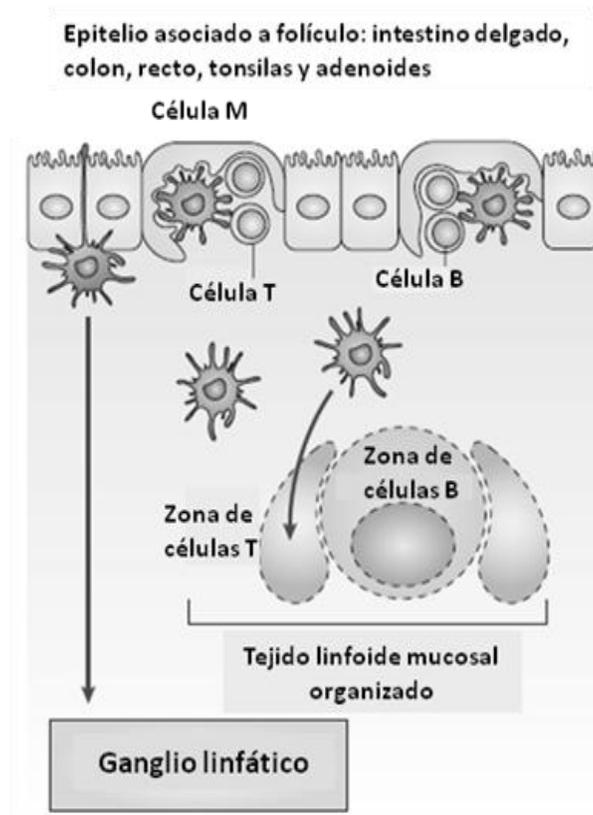


Figura 2. Epitelio asociado a folículo. Las células M en el FAE llevan antígenos a través de la barrera epitelial directamente a las células dendríticas (DC's) subepiteliales, las cuales presentan a nivel local en las áreas de células T adyacentes a la mucosa (modificado de Neutra y Kozlowski, 2006).

2.2.3.1. Sitios anatómicos individuales

2.2.3.1.1. Tonsilas orofaríngeas (palatinas)

Estas tonsilas normalmente se encuentran en la pared lateral de la orofaringe y en función de las especies varían de un montículo que sobresale del tejido por medio de

simples a complejas estructuras dentro de la pared faríngea. En algunas especies, un sistema de criptas aumenta la superficie del FAE (Perry y Whyte, 1998).

Algunos investigadores se han dado cuenta de la importancia de la tonsila en la adquisición de la infección bacteriana. Payne y Derbyshire han propuesto que la tonsila es un sitio ideal para muestrear las bacterias ingeridas con los alimentos (Perry y Whyte, 1998). La entrada de bacterias a los tejidos linfáticos es a través de las criptas y son transportadas por los fagocitos a través de los vasos linfáticos aferentes (Lugton, 1999).

2.2.3.1.2. Tejido linfoide asociado a la nariz (NALT)

El tejido linfoide asociado a la nariz (NALT), también conocido como tonsila nasofaríngea, tonsila faríngea o adenoides, se encuentra en el techo de la nasofaringe de los grandes mamíferos, en el extremo caudal del tabique faríngeo. En los roedores, los tejidos se emparejan y se encuentran a ambos lados de la superficie dorsal del paladar duro. El NALT es fácil de pasar por alto, ya que a menudo aparece macroscópicamente similar al epitelio que rodea la nasofaringe. En algunas especies, como las ovejas y ganado vacuno, el tejido se caracteriza por surcos, especialmente en animales jóvenes, mientras que en otras especies, sólo es reconocible a través de los folículos subyacentes que dan a la superficie un aspecto granular (Debertin y cols., 2003; Medaglini y cols., 2006).

Este órgano es el único sitio en el sistema respiratorio de ovejas y primates en el que el FAE atrapa partículas de antígenos para su presentación a inmunocitos subyacentes. El linfoepitelio del NALT contiene células M, similar a otros MALT. La tonsila nasofaríngea está estratégicamente situada, de manera que el material antigénico atrapado en la cavidad nasal es preferentemente barrido por la acción mucociliar sobre la superficie del órgano antes de ser tragado. El desarrollo avanzado en el feto, la ubicación estratégica, tamaño, superficie rugosa y abundante tejido linfoide sugieren que la tonsila nasofaríngea es el principal (y probablemente único) tejido mucoso linfoide de la cavidad nasal (Lugton, 1999).

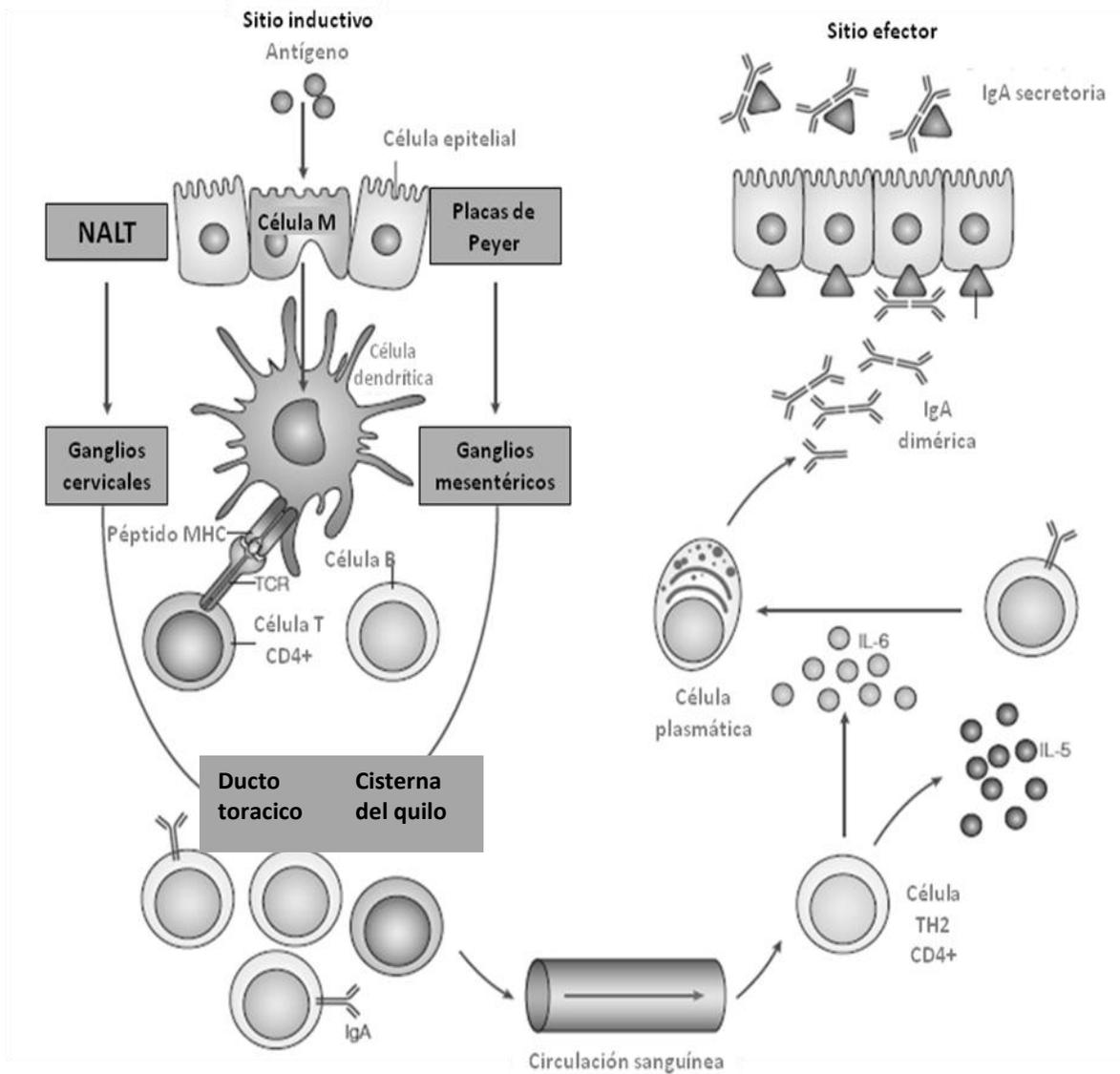


Figura 3. Sistema inmunológico común de las mucosas. Los antígenos luminales son transportados al tejido linfoide asociado a la nariz (NALT) y las placas de Peyer a través de las células M que están presentes en el epitelio que recubre al NALT y los folículos de las placas de Peyer. Las células dendríticas procesan y presentan los antígenos a las células T en estos tejidos linfoides. Los linfocitos T CD4+ estimulados preferentemente inducen el desarrollo de los linfocitos B IgA+ en el centro germinal del folículo linfoide. Después de cambiar a clase IgA y madurar la afinidad, los linfocitos B rápidamente emigran del NALT y de las PP a los ganglios linfáticos regionales del cuello y los ganglios linfáticos mesentéricos, respectivamente, a través de los vasos linfáticos eferentes. Por último los linfocitos T CD4+ y los linfocitos B IgA+ migran a los sitios efectores (como las fosas nasales y la lámina propia intestinal) a través del conducto torácico y la circulación sanguínea. Las células B IgA+ y plasmoblastos se diferencian en células plasmáticas productoras de IgA en la presencia de citocinas (tales como la IL-5 y la IL-6) que son producidas por linfocitos T cooperadores (TH2) y producen posteriormente las formas diméricas de IgA. Estas formas de IgA diméricas se convierten entonces en IgA secretora mediante la unión a receptores IgA poliméricos (que se convierten en el componente de secreción en el proceso de formación de IgA secretora) que se muestran en la monocapa de células epiteliales que recubren la mucosa. La IgA secretora se libera en las fosas nasales y el tracto intestinal (modificado de Kiyono y Fukuyama; 2004).

Hasta el momento en roedores se ha descrito el tejido linfoide asociado a nariz (NALT) como una pequeña agregación de tejido linfoide organizado que se encuentra situado en ambos lados dorsales del conducto nasofaríngeo por encima del paladar blando cartilaginoso y se encuentra al principio de la ontogenia del BALT, quizás debido a su posición estratégica, es el primer sitio de contacto con el aire inhalado cargado de antígenos y es considerado análogo al anillo de Waldeyer en el ser humano (Sabirov y cols., 2008). Se puede argumentar que en los humanos con sus palatinas, amígdalas linguales y amígdalas faríngeas el NALT sería superfluo (Lugton, 1999; Sabirov y cols., 2008).

El tejido linfoide nasal (NALT) también se ha caracterizado en las ovejas y se encontró que contiene folículos linfoides y células M, que fueron similares en composición y estructura a las del NALT humanos. La ultraestructura y la función de las células M en el NALT humano fue demostrada por Fujimura siendo similar a los encontrados en GALT y el tejido linfoide rectal, lo que sugiere que el NALT y el GALT pueden estar estrechamente relacionados (figura 3) (Kiyono y Fukuyama; 2004). Estudios similares en la especie ovina revelaron la presencia de células epiteliales especializadas ubicadas en la FAE, que muestra características de células M. Estas observaciones sugieren que la distribución de las células M y los folículos linfoides en la mucosa rectal y nasal de las especies animales de gran tamaño puede dictar la inducción y mantenimiento de la inmunidad específica después de la inmunización en estos sitios. Por lo tanto, puede ser necesario orientar las formulaciones de vacunas a los sitios del tejido mucoso de ganado donde las células M son más abundantes (Lugton, 1999; Sedgmen y cols., 2004).

2.2.3.1.3. Tejido linfoide asociado a laringe (LALT)

El tejido linfoide asociado a laringe ha sido descrito en la epiglotis, en el vestíbulo de la laringe y en el pliegue ariepiglótico de ganado, ovejas, cerdos y caballos. Las criptas linfáticas se encuentran en dos surcos profundos en la base de la epiglotis de cerdos y ovejas y forman la tonsila paraepiglótica. Las acumulaciones de nódulos linfoides vocales de ganado se denominan tonsila glótica (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006).

En los humanos el LALT es una estructura que se encuentra en la epiglotis encontrándose en mayor frecuencia en niños y adolescentes (2-20 años de edad) (Hiller y cols., 1998). Tiene un centro germinal recubierto por tejido epitelial, el cual puede tener células M y linfocitos intraepiteliales, en el folículo se pueden encontrar linfocitos B foliculares, y en el área parafolicular existen linfocitos T y B (Kracke y cols. 1997).

2.2.3.1.4. Tejido linfoide asociado a bronquios (BALT)

El tejido linfoide asociado a bronquios (BALT) forma parte del sistema inmunológico de las mucosas y se caracteriza por una acumulación de células linfoides. Estas agrupaciones se concentran en las estructuras foliculares y se componen de linfocitos B rodeadas por una región de linfocitos T parafoliculares. Los linfocitos entran en el BALT provenientes de la sangre a través de vénulas del endotelio alto (HEV) y salen a través de vasos linfáticos. La aparición del BALT difiere mucho entre especies, estando regularmente presente, por ejemplo, en conejos. En los seres humanos se ha observado, por el estudio de cadáveres, que el BALT no se encuentra en el nacimiento sino que surge en los niños y adolescentes (Tschernig y cols., 1995; Hiller y cols., 1998; Debertain y cols., 2003). En los adultos, el BALT está ausente en los individuos sanos, pero su desarrollo se induce en distintas enfermedades como panbronquiolitis y la neumonitis por hipersensibilidad (Delventhal y cols, 1990; Hensel y cols., 1994, Pabst y Tschernig, 1995; Hensel y cols., 1996; Debertain y cols., 2003). Por otra parte, el BALT se ha encontrado en los pulmones de los fumadores de cigarrillos y se ha demostrado que las ratas expuestas al humo del cigarrillo tienen el BALT ampliado, así como grandes áreas de epitelio bronquial que cubre el BALT (Richmond y cols., 1993), además se sabe que en las ratas el BALT está presente al nacer y con la edad se va desarrollando (Márquez y cols., 2000). En ratones, el BALT sólo ocasionalmente está presente pero las inhalaciones repetitivas de bacterias muertas por calor inducen el desarrollo de BALT en esta especie, lo que demuestra que el BALT es inducible por la infección o inflamación de forma parecida a los humanos (Kocks y cols., 2007).

El BALT porcino es inducido por la infección de los pulmones por *Mycoplasma hyopneumoniae*, se sabe que está integrado por DC, macrófagos, linfocitos T y B y células plasmáticas IgG+ e IgA+. Poco se sabe sobre la estructura y función de BALT, pero se cree que es igual a la de las placas de Peyer intestinales. En las placas de Peyer el antígeno es captado por los micropliegues de las células epiteliales especializadas (M) que cubren las placas de Peyer y luego es transportado a través de las células, por transcitosis, a las DC y los linfocitos subyacentes, permitiendo su interacción y la inducción de la respuesta inmunológica adquirida (Soerensen y cols., 2005).

La actividad de las células dendríticas de la mucosa puede compensar la falta de BALT funcional en muchas especies. Una densidad sorprendentemente elevada de estas células se ha documentado en el epitelio de las vías respiratorias de los seres humanos y roedores. Estas APC tienen un alto volumen de interacciones y migran a los ganglios linfáticos de drenaje, lo que sugiere una capacidad de realizar un papel similar al BALT (Goulding y cols., 2007; Kim y Braciale, 2009).

El pulmón se ha identificado como un importante órgano inmunológicamente activo (Bienenstock, 1984; Katinger y cols., 1999). Los linfocitos de pulmón se pueden encontrar en diferentes compartimentos como la poza intravascular, el intersticio pulmonar, el espacio alveolar y el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), que consiste principalmente de linfocitos T, donde los linfocitos citotóxicos CD8+ son más abundantes que los linfocitos T cooperadores CD4+ (Pabst y Tschernig, 1995; Tschernig y Pabst, 2009). En el epitelio bronquial de las personas sanas hay 18 linfocitos T por cada 100 células epiteliales, pero apenas se encuentran linfocitos B en este compartimiento. Estos linfocitos intraepiteliales son similares a las células intraepiteliales en la pared intestinal. En la lámina propia bronquial, en contraste con el epitelio, se encuentran más linfocitos T cooperadores que linfocitos T citotóxicos, y también un número considerable de linfocitos expresan inmunoglobulinas de superficie (linfocitos T alrededor del 10% y linfocitos B 70%). Se han aislado, cuantificado y caracterizado cuidadosamente linfocitos del intersticio del pulmón humano. Para el intersticio pulmonar se calculó un total de 10×10^9

linfocitos, lo que equivale al número de linfocitos circulantes en sangre en los humanos (Pabst y Tschernig, 1995).

La mayoría de las células obtenidas en un lavado broncoalveolar (LBA) son macrófagos, pero alrededor del 10% son linfocitos en el pulmón normal humano. El número total de linfocitos en el espacio broncoalveolar es aproximadamente 5×10^8 , lo que equivale a aproximadamente el 5% del total de linfocitos circulantes en los seres humanos. Como estos linfocitos son los más accesibles en el pulmón humano han sido caracterizados utilizando anticuerpos monoclonales. En adultos sanos los linfocitos T CD4+ son más numerosos que los linfocitos T CD8+ citotóxicos, que supone una proporción CD4+/CD8+ de 7:1 (Pabst y Tschernig, 1995, 1997). Además, en los cerdos se ha documentado que los linfocitos pueden migrar desde el espacio alveolar hasta el ganglio linfático del drenaje bronquial (Binns y cols. 1988; Binns y Pabst, 1994). Por lo tanto, estas células pueden volver al sistema linfático y poner en marcha o amplificar ciertas funciones inmunológicas.

El paradigma actual afirma que la expresión de las moléculas CD4 y CD8 por linfocitos maduros es mutuamente excluyente para TCR2 ($\alpha\beta$) y que sólo los linfocitos T inmaduros expresan estas proteínas simultáneamente en el timo (Zuckermann y Gaskins, 1996; Zuckermann y Husmann, 1996; Yang y Parkhouse, 1997; Zuckermann, 1999). Sin embargo, se ha reportado la presencia de una pequeña proporción de linfocitos CD4/CD8 dobles positivos (DP) en sangre periférica humana. Además, una proporción importante de células DP pueden encontrarse en sangre periférica y órganos linfoides secundarios de pollos, cerdos y monos. Se han encontrado proporciones bajas de linfocitos DP (<3%) en sangre periférica de individuos sanos (Zuckermann, 1999). Las células porcinas CD4/CD8 DP se encuentran normalmente presentes en la sangre periférica, el bazo, los ganglios linfáticos y las tonsilas de cerdos adultos (Zuckermann y Husmann, 1996). En la especie porcina esta población celular aumenta su proporción con la edad del animal (Zuckermann y Gaskins, 1996; Yang y Parkhouse, 1997; Zuckermann, 1999) y se postula que son células de memoria (Zuckermann y Gaskins, 1996; Zuckermann, 1999).

Además, estudios recientes sugieren la existencia de células DP en el pulmón normal de cerdo, aunque en proporciones bajas, 3.72% en lavado bronquioalveolar (BAL) y un poco menor en los lóbulos pulmonares (<3%) (Pabst y Tschernig, 1995). También se han estudiado las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos T en minicerdos vietnamita, encontrándose diferencias significativas entre los linfocitos CD3 presentes en sangre (65.26%), en lóbulos (<44%) y en BAL (52.08%), las proporciones de linfocitos CD4 también tuvieron diferencias significativas en sangre (22.1%), en lóbulos (>11%) y en BAL (11.28%). Los linfocitos CD8 no presentaron diferencias significativas entre sangre (19.93%) y lóbulos pulmonares (>20%), aunque si la hubo con el BAL (31.6%) (Vázquez-Pérez, 2009).

Actualmente se conoce la proporción de las poblaciones de linfocitos T en pulmones de cerdos convencionales (Zuckermann y Gaskins, 1996) y de minicerdos vietnamitas (Vázquez-Pérez, 2009), así como los cambios celulares después de una inmunización (Delventhal y cols., 1992) ; pero se han realizado muy pocos estudios sobre las diferencias que existen en la distribución celular posterior a un desafío antigénico y en un cultivo celular, lo cual se plantea en esta investigación, para de esta forma contribuir al entendimiento del papel que juegan estas células en la defensa del pulmón.

2.3. Inmunización

La inmunización sistémica asegura que cantidades adecuadas de antígeno lleguen a los tejidos linfoides periféricos para inducir protección contra agentes infecciosos, pero es, en gran medida, ineficaz para proporcionar inmunidad en las mucosas. Los anticuerpos protectores en el tejido de la mucosa, sitios que actúan como portales comunes de entrada para la mayoría de los organismos patógenos, son usualmente generados solo después de la inmunización de la mucosa (Delventhal y cols., 1992; Sedgmen y cols., 2004; Zanvit y cols., 2005; Vega-López y cols., 2005).

El desarrollo de vacunas menos invasivas y de fácil administración se ha convertido en una prioridad para los organismos de salud pública y la formulación de nuevas vacunas y tecnologías de administración han aparecido. Hay un gran interés en el uso de las

membranas mucosas para la administración de vacunas no invasivas. Sin embargo, la mayoría de las vacunas autorizadas para su uso en humanos y animales se inyecta por vía intramuscular o subcutánea, y la respuesta inmunitaria inducida en la mucosa es por lo general más débil, más variable, y de menor duración (Alcón y cols., 2005).

El hecho de que la mayoría de los agentes infecciosos usen las membranas mucosas como portales de entrada ha llevado a dedicar tiempo, dinero y esfuerzos para desarrollar vacunas y sistemas de liberación de antígenos que puedan inducir eficazmente la inmunidad de la mucosa. La inmunización de la mucosa ofrece muchos beneficios, como la reducción de los efectos secundarios asociados a la vacunación y el potencial para superar las barreras conocidas de la vacunación parenteral como: inmunidad preexistente de la vacunación sistémica anterior o la interferencia de la inmunidad materna (Alcón y cols., 2005).

La inmunización oral es una ruta comúnmente empleada para inducir una respuesta mucosal de IgA por la captación de antígenos en las placas de Peyer del intestino delgado. Sin embargo, este enfoque tiene sus limitaciones como la degradación enzimática y/o proteolítica del antígeno en el estómago que puede comprometer la inmunogenicidad de los antígenos ingeridos. Como consecuencia, la respuesta IgA antígeno-específica inducida en los sitios efectores se atenúa debido a la disminución de las cantidades de antígeno presentado a los sitios inductivos del sistema inmunológico mucosal. Un problema adicional, asociado con la vía oral es la posibilidad de desarrollar tolerancia a los antígenos, que se caracteriza por una respuesta inmunitaria menor al desafío posterior con el mismo antígeno. En consecuencia, otros tejidos de las mucosas, tales como el tracto respiratorio superior y el recto, se han explorado como sitios alternativos para el suministro de vacunas mucosales (Sedgmen y cols., 2004).

La mucosa nasal es un brazo importante del sistema inmune, ya que es a menudo el primer punto de contacto para los antígenos inhalados y representa una atractiva ruta, no invasiva, para la administración de antígenos (Alcón y cols., 2005).

En humanos, la inmunización intrarrectal e intranasal ha demostrado inducir respuesta inmunológica en los sitios efectores de los tejidos locales y distantes a través del sistema inmune mucosal común (Holmgren y Czerkinsky, 2005; Gerdtz y cols., 2006). Sin embargo, estos estudios también demuestran que, aunque la inmunización mucosal induce respuestas efectoras en los tejidos locales y distantes, mayores niveles de secreción de anticuerpos se producen en el lugar de la exposición local. Con base en los resultados de estos estudios de inmunización en rumiantes, parece que la inmunización en la mucosa nasal y rectal pueden ser alternativas adecuadas a la inmunización oral tradicional para la inducción de respuesta inmunitaria específica de las mucosas (Sedgmen y cols., 2004).

La ineficacia de la simple administración de antígenos solubles a las membranas mucosas para la inmunización ha estimulado amplios estudios de estrategias para sistemas de administración que (1) aumenten la absorción de antígenos, (2) prevengan su degradación, faciliten su absorción y el transporte a los tejidos linfoides para la presentación a las células inmunocompetentes, y (3) inducir el tipo apropiado de respuesta inmunitaria (linfocitos B contra linfocitos T; mucosal contra sistémica, protección contra tolerancia) (Alcón y cols., 2005).

El uso de rutas no invasivas para la administración de vacunas hace que la inmunización sea simple, indolora, y económicamente viable. La formulación de antígenos y adyuvantes en sistemas apropiados de administración puede ser un factor crítico en la inmunización de la mucosa (Delventhal y cols., 1992; Alcón y cols., 2005).

2.4. Virus respiratorios.

Las enfermedades respiratorias y gastrointestinales son dos de los principales problemas de salud humana y veterinaria. En 2009 se reportaron en nuestro sistema de salud más de 41 millones de casos de enfermedades respiratorias e intestinales agudas, de los cuales más de 30 millones fueron infecciones respiratorias (*Boletín de vigilancia epidemiológica*, semana 52, 27/dic./2009-2/ene/2010).

Los pulmones juegan un papel crítico en el suministro de oxígeno al cuerpo y en la eliminación de los residuos. Los pulmones están continuamente expuestos a la inhalación de gases, partículas y patógenos en el aire como consecuencia de la inhalación diaria de miles de litros de aire. A pesar de estas exposiciones, las vías respiratorias inferiores son capaces de permanecer estériles por los sistemas de defensa de la mucosa pulmonar (Huang, 2006, Goulding y cols., 2007).

Muchos virus pueden infectar el epitelio ciliado del tracto respiratorio (tabla 1). En la mayoría de los casos, la infección viral se limita a las vías respiratorias superiores, sin embargo, las infecciones de las vías respiratorias inferiores se producen en un número significativo de personas infectadas, muchas veces por microorganismos oportunistas. A nivel mundial, aproximadamente el 90% de los casos del "resfriado común" son causados por virus y la mayoría se ven en los meses de invierno. Estos virus se transmiten de persona a persona y normalmente durante el contacto de mano a mano. Por ello, es importante estudiar y desarrollar métodos para inducir respuesta inmunológica que protejan los sitios de entrada de estas zonas.

El cerdo ha sido un modelo animal importante en la investigación biomédica debido a su similitud anatómica y fisiológica con el humano (Rothkötter y cols. 2002; Sedgmen y cols., 2004), además los virus respiratorios que afectan al cerdo producen pérdidas económicas anuales muy importantes en la producción, en 2004 en EUA se estimó que la pérdida económica producida por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VPRRS) fue de 560.32 millones de dólares, mientras que la pérdida económica a consecuencia del virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) fue de 36.27 millones de dólares (Neumann y cols., 2005), de ahí la importancia de diseñar en medicina veterinaria rutas de inmunización que puedan generar una buena respuesta inmunológica protectora en la mucosa respiratoria.

Tabla 1. Principales virus causantes de enfermedades del tracto respiratorio (tomada de Huang, 2006).

Virus	Epidemiología	Síndrome clínico	Patogénesis	Diagnóstico	Tratamiento
Adenovirus	Infección primaria en los primeros 5 años de vida. Los patrones estacionales se producen en invierno, primavera y verano.	Bronquiolitis, neumonía, fiebre faringoconjuntiva, cistitis hemorrágica, diarrea, enfermedad del sistema nervioso central.	Lítica, latente o infección crónica, o la transformación oncogénica.	Identificación viral, detección de antígeno, PCR o serología.	Autolimitada.
Coronavirus incluyendo coronavirus asociado con SRAS (SARS-CoV)	Patrón estacional se produce en invierno y primavera. SARS-CoV se describió por primera vez en noviembre 2002 en Guangdong, China más de 8000 casos y 800 muertes.	Enfermedad en las vías respiratorias altas e inferiores, fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, secreción nasal mucopurulenta, dolor de garganta, tos, diarrea y síndromes neurológicos; SARS-CoV causa síntomas similares. SRAS-CoV tiene casos fatales 7-17% y hasta el 50% de las personas con enfermedad médica subyacente o la edad de 65 años.	SARS-CoV puede provocar la formación de la membrana hialina pulmonar, la infiltración intersticial y descamación de neumocitos.	Identificación viral, detección de antígeno, RT-PCR o serología.	Autolimitada; los esteroides pueden ser beneficios en pacientes infectados con SRAS-CoV).
Virus de la influenza	Un ataque promedio es de 10-20%, pero puede ser tan alto como 50% en jóvenes y ancianos, han ocurrido 31 pandemias. La pandemia de 1918-1919 resultó en 21 millones de muertes a nivel mundial.	Fiebre, escalofríos, dolores de cabeza, tos seca, dolor faríngeo, obstrucción nasal, ronquera, mialgias, malestar general, anorexia y síntomas oculares; miositis, complicaciones cardíacas, síndrome de shock tóxico, y pueden ocurrir complicaciones del sistema nervioso. Una infección bacteriana secundaria puede complicar la infección de influenza.	La hemaglutinina y la neuraminidasa son antígenos de superficie. M1 y M2 son proteínas integrales de membrana. El período de incubación es de 18 a 72 horas. Difusa inflamación de la mucosa respiratoria superior e inferior.	Identificación viral, cultivo en huevos embrionados, detección de antígeno, PCR o serología.	Inhibidores de M2 (amantadina, rimantadina) e inhibidores de neuraminidasa (zanamavir, oseltamivir) si se inicia dentro de 48 horas después del inicio de los síntomas.
Rinovirus	Infección primaria se lleva a cabo en los primeros años de vida. Los patrones estacionales se producen en otoño, primavera y verano.	Afecta nariz, faringe o tracto respiratorio inferior; la duración de los síntomas es de 7 días y hasta 2 semanas en el 25% de las personas infectadas.	El periodo de incubación es de 8-10 horas. Solo se producen daños leves en el epitelio de la mucosa.	Identificación viral usando cultivos celulares (cepas WI-38, MRC-5, células M-HeLA), PCR y serología.	Autolimitada.
Virus sincitial respiratorio	Infección primaria se lleva a cabo en los primeros años de vida. Los patrones estacionales se producen en invierno y primavera. Los factores de riesgo incluyen edad joven, sexo masculino y estado socioeconómico bajo.	Bronquiolitis, tos, traqueobronquitis y neumonía; síntomas cardiovasculares y nerviosos, y erupciones (poco comunes).	Las proteínas de superficie (F, G) son parte integral de la patogénesis. Filtración peribronqueal linfocítica, edema del epitelio bronquial.	Identificación viral, EIA (sensibilidad 60-70%, especificidad 90-95%), RT-PCR y serología.	De apoyo. El tratamiento de infantes con enfermedad severa puede beneficiarse con ribavirina, broncodilatadores, corticosteroides y RSV-IVIG o palivizumab.

EIA, inmunoensayo enzimático; SARS síndrome respiratorio severo agudo.

2.4.1. Virus de la enfermedad de Aujeszky

La enfermedad de Aujeszky es causada por un virus denominado Herpesvirus porcino tipo I (HVP-I), perteneciente a la familia *Herpesviridae* miembro de la subfamilia *Alphaherpervirinae*. Esta enfermedad es letal para los cerdos jóvenes y causa importantes pérdidas económicas (Chinsakchai y Molitor, 1992, 1994; Nauwynck, 1997; Mettenleiter, 1996, 2000; Pejsak y Truszczynski, 2006).

Las partículas del virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) tienen una forma casi esférica, con un diámetro total de 150 a 180 nm y consisten en un núcleo central rodeado por tres capas. El núcleo contiene la molécula de ADN lineal, de doble cadena de aproximadamente 140 kb y proteínas unidas. La cápside rodea el núcleo y tiene una simetría icosaédrica. La nucleocápside está rodeada por una bicapa de fosfolípidos de forma irregular en la que están ancladas las glicoproteínas. Estas glicoproteínas forman proyecciones en el exterior de la partícula del virus. En medio de la cápside y la envoltura están presentes proteínas envueltas como material amorfo (Nauwynck, 1997; Mettenleiter, 2000; Pejsak y Truszczynski, 2006).

El VEA puede infectar a un amplio rango de vertebrados (vacas, caballos, ovejas, conejos, caballos, perros, etc.), a excepción de los primates incluido el hombre. Aunque su reservorio natural es el cerdo, que es la única especie que puede sobrevivir de forma natural a la infección, el VEA es muy contagioso. Además, es uno de los pocos patógenos animales que puede transmitirse por el aire a varios kilómetros de distancia. La propagación de la infección entre cerdos se puede producir por todas las secreciones o excreciones, aunque la forma más habitual de contagio es a través de las secreciones respiratorias y por vía genital, a través del semen infectado, tanto en monta natural como en inseminación artificial (Pejsak y Truszczynski, 2006).

La vía de entrada habitual del virus es la respiratoria, el sitio principal de replicación se encuentra en la cavidad nasal, amígdalas, faringe y los pulmones. El grado de replicación en las diferentes localizaciones depende de la cantidad de virus en el

inóculo y de la ruta de inoculación. Después de la replicación en el epitelio el virus se propaga al tejido conectivo subyacente en un tiempo muy corto. En 24 horas, los antígenos virales ya se encuentran en la cavidad nasal en grupos de células epiteliales, fibrocitos y células nerviosas. En 48 horas, los antígenos virales se detectan en las grandes placas que se extienden sobre el epitelio y el tejido conectivo subyacente, incluyendo los nervios y las paredes endoteliales. Estas placas de replicación local del virus sufren necrosis extensa. Una expansión similar también se encuentra en las amígdalas y pulmones. El virus puede propagarse de los sitios primarios de replicación a sitios secundarios distantes por la linfa, la sangre y los nervios. La replicación de virus en los sitios secundarios, tales como los ganglios linfáticos, el bulbo olfatorio, la médula, el bazo, los riñones, los ovarios y el útero comienza a las 48 horas. Es menos extensa que en los sitios primarios y es claramente reducida con el inicio de la respuesta inmunitaria a partir de los 7 días. A pesar de la presencia de inmunidad humoral y celular, el virus puede ser aislado de las amígdalas hasta 18 días después de la infección y de hisopos nasales hasta 13 días después de la infección (Nauwynck, 1997; Pejsak y Trusczyński, 2006).

Varios mecanismos humorales del sistema inmunológico efector están involucrados en la protección de los cerdos contra la infección por VEA. Los anticuerpos neutralizantes del virus, los anticuerpos mediadores de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y los anticuerpos mediadores de lisis mediada por el complemento de las células diana. Los blancos principales de esta respuesta inmunológica humoral son las glicoproteínas virales gB, gC y gD. La protección conferida por la inmunidad mediada por células es poco conocida (Ober y cols., 1998; Pejsak y Trusczyński, 2006).

En los cerdos, hay una variación dependiente de la edad en la severidad de la enfermedad y los signos clínicos. En lechones, los síntomas nerviosos son más prominentes, y la infección a menudo conduce a la muerte. En animales de mayor edad, principalmente se observan los síntomas respiratorios, lo que resulta en la pérdida de apetito y por consiguiente las pérdidas para el poricultor. En la ganadería, la infección transplacentaria conduce al aborto o la momificación de los fetos (Mettenleiter, 1996). En 1987 se estimó en EUA el costo anual de pérdidas económicas producidas por el VEA

resultando en 21.25 millones de dólares, de los cuales 9.05 millones son atribuidos a la enfermedad clínica, 1.89 millones por exámenes de serología y 10.31 millones por la administración de vacunas; y en el 2004 las pérdidas económicas ascendieron a 36.27 millones de dólares (Neumann y cols., 2005).

Las estrategias de vacunación desempeñan un papel importante en la campaña para erradicar la enfermedad de Aujeszky en regiones con alta prevalencia del VEA. Los tipos de vacunas que han sido examinados incluyen virus vivos atenuados, inactivados y vacunas de subunidades (Mettenleiter, 1996; Zuckermann, 2000). Sin embargo se ha visto que estas vacunas, aunque son buenas para producir una respuesta inmunológica sistémica, no evitan la infección y solo reducen la mortalidad, pero no afectan la morbilidad y pueden inducir un estado de “portador sano” en el animal (Chinsakchai y Molitor, 1994; Mettenleiter, 1996; Bouma y cols., 1997; Zuckermann, 2000; Wong y Pamer, 2003; Cano y cols., 2007), de ahí la importancia de desarrollar vacunas mucosales que puedan inducir una respuesta protectora en la mucosa respiratoria.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios que se han realizado sobre el sistema inmunológico respiratorio son limitados. En la actualidad se han logrado realizar estudios descriptivos de las poblaciones de linfocitos T del sistema inmunitario del pulmón en roedores y, muy pocos, en cerdos, pero se sabe que el ratón y la rata tienen un sistema inmunitario en pulmón desarrollado al nacer; por el contrario, y más apegado a lo que sucede en humanos, el sistema inmunológico pulmonar del cerdo no es constitutivo al nacer y se desarrolla conforme a la edad y a ciertas afecciones respiratorias. Sumado a esto, muchos de los estudios que se realizan para evaluar las poblaciones de linfocitos T y la respuesta serológica después de una inmunización, no son seguidos por un desafío antigénico.

En esta investigación, se plantea evaluar la respuesta inmunitaria sérica porcina y de linfocitos T pulmonares después de la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky, el cual tiene en el cerdo su reservorio natural y es uno de los agentes patógenos que pueden transmitirse por el aire utilizando como vía de entrada al organismo el aparato respiratorio.

La evaluación de la respuesta inmunitaria sérica y los cambios de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T del sistema inmunológico del pulmón de cerdos inmunizados y desafiados antigénicamente puede servir para tener bases de mayor peso para diseñar y modificar vacunas mucosales.

4. HIPÓTESIS

La inmunización parenteral/mucosal con virus de la enfermedad de Aujeszky induce una mejor respuesta inmunológica sérica/mucosal en comparación con una inmunización exclusivamente parenteral, y dicha respuesta podrá evaluarse *in-vitro* en suero y en linfocitos de pulmón después del desafío experimental.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inducción de respuesta inmunológica sérica y de linfocitos T pulmonares ante la vacunación y desafío con el virus de Aujeszky en cerdos convencionales destetados.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluación de la respuesta inmune sérica de IgG e IgA, después de la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky en cerdos destetados.
- Análisis de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T provenientes de tejidos de cerdos inmunizados y desafiados con el virus de la enfermedad de Aujeszky activados *in vitro*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales

Para el ensayo se utilizaron 15 cerdos destetados de la raza Yorkshire X Hampshire de 3-4 semanas de edad a los cuales se les realizaron pruebas serológicas previas para comprobar que estaban libres del virus de la enfermedad de Aujeszky y sin ningún tipo de inmunización, provenientes de una granja ubicada en Tequisquiapan, Querétaro. Los animales se distribuyeron en tres grupos de 5 individuos cada uno: grupo control, grupo de vacunación convencional (IM/IM/IM) y grupo de vacunación combinada (SC/SC/IN). Estos animales se mantuvieron durante todo el proyecto en las unidades de aislamiento del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-Microbiología) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

6.2. Vacuna

La vacuna inactivada del virus de la enfermedad de Aujeszky fue proporcionada por la M.C. María Antonia Coba y la M.C. Laura Zapata del laboratorio de virología del CENID-Microbiología del INIFAP. El virus de la enfermedad de Aujeszky se reprodujo en células MDBK y posteriormente se inactivó por calor (60 °C/30 min). Después de comprobar la total inactivación del virus por cultivo celular, la vacuna se preparó con 1 ml del fluido viral inactivo (con un título viral de $10^{6.4}$ DICC_{50%}/ml, antes de la inactivación) más 50 µl del adyuvante oleoso comercial (*Vet-L07 Adyuvant*, GIBCO®) para las inmunizaciones intramusculares (IM) y subcutáneas (SC), para la inmunización intranasal se inoculó 2 ml del fluido viral inactivado y para el grupo control se inocularon 50 µl del adyuvante oleoso GIBCO® más 1 ml de PBS estéril.

6.3. Preparación del antígeno purificado

El antígeno VEA fue purificado en gradiente de sacarosa, para eliminar la mayoría de las proteínas contaminantes del cultivo celular y del suero fetal bovino en que se crecieron, en el laboratorio de virología del CENID-Microbiología del INIFAP por la M.C.

María Antonia Coba Ayala y la M.V.Z.E.E.A. Laura Elena Zapata Salinas quedando a una concentración final de proteína de 2.5 mg/ml.

6.4. Inmunización, intradermorreacción y toma de muestras

Primeramente se realizó una pre-inmunización de los grupos, al grupo control se le inoculó con 50 µl del adyuvante oleoso en 1 ml de PBS por vía intramuscular, al grupo de vacunación convencional y al grupo de vacunación combinada se les inoculó 1 ml por vía intramuscular y subcutánea, respectivamente, de una vacuna diluida del virus de la enfermedad de Aujeszky (1:3 del fluido viral inactivo en PBS y 50 µl del adyuvante oleoso). Posteriormente, a los 10 días, se realizaron 3 inmunizaciones con 7 días de diferencia cada una; al grupo control se le inoculó con 50 µl del adyuvante oleoso en 1 ml de PBS por vía intramuscular, al grupo de vacunación convencional se le inoculó con 3 dosis por vía intramuscular (IM) del virus de la enfermedad de Aujeszky inactivado, y el grupo de vacunación combinada recibió 2 inoculaciones por vía subcutánea (SC) del virus de la enfermedad de Aujeszky inactivado ($10^{6.4}$ DICC_{50%}/ml) y la última por vía intranasal (IN). La Intradermorreacción (ID) se realizó 7 días después de la última inmunización por vía subcutánea administrando 100 µl del virus de la enfermedad de Aujeszky inactivado ($10^{6.4}$ DICC_{50%}/ml), en medio de la primera y la segunda tetilla del lado izquierdo y de igual manera, del lado derecho se inocularon 100 µl de PBS, posteriormente a las 24, 48 y 72 horas se buscó la formación de eritema e induración en los sitios de inoculación. Además, a todos los grupos se les tomaron muestras de suero en los días de inmunización, en la intradermorreacción, en el desafío y en el sacrificio.

6.5. Desafío

El desafío se llevó a cabo a los 7 días posteriores a la intradermorreacción, los animales se encontraban en las unidades de aislamiento del CENID-Microbiología del INIFAP. Se inoculó 1 ml por vía intramuscular y 3 ml por vía intranasal de la cepa Shope viva (10^6 DICT_{50%}/ml) del virus de la enfermedad de Aujeszky, proporcionada por el laboratorio de virología del CENID-Microbiología del INIFAP.

6.6. ELISA indirecta de un paso cuantitativa para IgG

Primeramente se sensibilizó la placa de ELISA de 96 pozos (No. Cat. 3366 *Costar*[®], *Corning Incorporated Corning*, NY) diluyendo el antígeno de VEA a una concentración de 2 µg/ml en amortiguador de carbonatos (0.05 M carbonato-bicarbonato, pH 9.6), se colocaron 100 µl por pozo (en los pozos correspondientes a las muestras y sus respectivos blancos). Se tapó la placa y se dejó a 4 °C 12 horas (figura 4). Pasado este tiempo se colocaron en los pozos correspondientes de la curva estándar y a su blanco 100 µl del anticuerpo de captura (*Goat anti-Pig IgG affinity purified* Bethyl Laboratories Inc.) a una dilución 1:100 en amortiguador de carbonatos y se incubó 1 hora a temperatura ambiente.

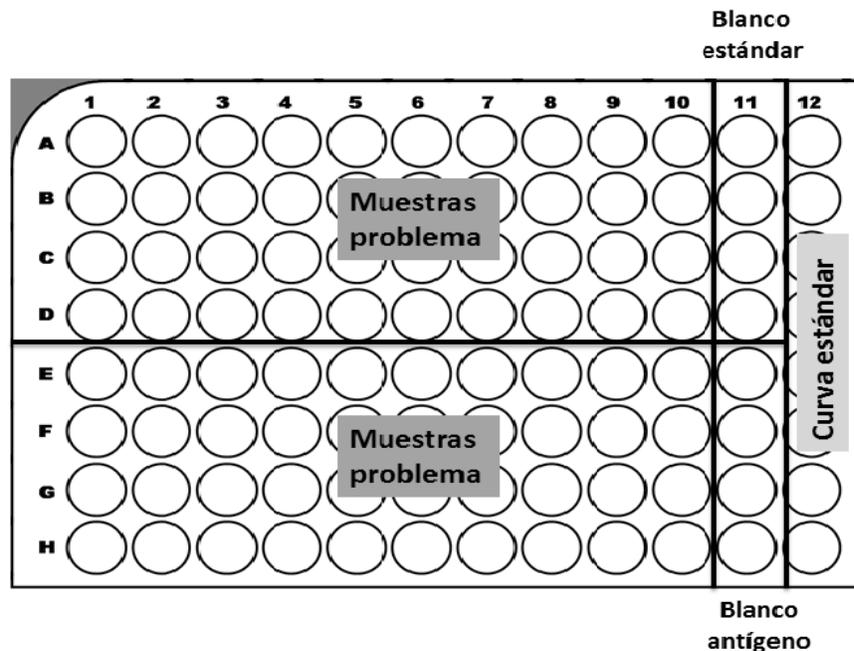


Figura 4. Diagrama del patrón de llenado de la placa de ELISA. Se muestra la ubicación de los blancos, la curva estándar y las muestras problema dentro de la placa de ELISA cuantitativa para IgG e IgA.

Posteriormente se realizaron tres lavados con solución de lavado (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05 % Tween 20, pH 8.0) para retirar el exceso de anticuerpo de captura y de antígeno, se retiró el exceso de solución de lavado y se colocaron en todos los pozos 150 µl de solución de bloqueo (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, pH 8.0), se dejó incubando en agitación suave 1 hora a 37 °C.

Después de la incubación se realizaron tres lavados con la solución de lavado para retirar el exceso de solución de bloqueo y se retiró el exceso de solución. Se realizó una curva patrón de IgG, 1 µg/ml en solución amortiguadora de dilución (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1 % BSA, 0.05 % Tween 20, pH 8.0) utilizando un suero de referencia porcino (16.5 mg/ml de IgG) (*Pig reference serum*, Bethyl Laboratories Inc.), se realizaron diluciones dobles seriadas y se colocaron 100 µl en los pozos correspondientes a cada punto de la curva, mientras que en los pozos correspondientes a los blancos del estándar se colocaron 100 µl del amortiguador de dilución. En los pozos correspondientes se colocaron las muestras problema, partiendo de una dilución 1:50 y haciendo 3 diluciones triples seriadas, mientras que en los pozos correspondientes a los blancos del antígeno se colocaron 100 µl del amortiguador de dilución. Se dejó incubando la placa 1 hora a 37 °C con agitación suave.

Pasado el tiempo de incubación se realizaron 5 lavados para retirar la muestra y el suero de referencia, y se eliminó el exceso de solución. Se realizó una dilución 1:200 000 del anticuerpo secundario conjugado con HRP en amortiguador de dilución (*Goat anti-pig-HRP conjugate*, Bethyl Laboratories Inc.) y se colocaron 100 µl en todos los pozos de la placa, se dejó incubando 1 hora a 37 °C con agitación suave.

Se lavó 3 veces con solución de lavado para quitar el anticuerpo conjugado con HRP, y después se eliminó el exceso de solución de lavado. Se preparó la solución de sustrato utilizando 1 ml de TMB (1 mg TMB/ml DMSO) en 10 ml de amortiguador de citratos (0.1 M citrato-cítrico, pH 5.0) y 2 µl de H₂O₂, 30%. Se colocaron 100 µl del sustrato en todos los pozos y se realizaron lecturas frecuentes a una longitud de onda de 650 nm utilizando el lector de ELISA (*Multiskan EX 100-120V*, Thermo Electron Corporation) para monitorear el desarrollo de la placa. Cuando el punto más concentrado de la curva alcanzó una densidad óptica de 0.8 nm se detuvo la reacción adicionando 100 µl de H₂SO₄, 2 M. Utilizando el lector de ELISA se leyó la placa a una longitud de onda de 450 nm.

Se calculó el punto de corte tanto para la curva estándar como para las muestras calculando el promedio de los blancos correspondientes más 3 desviaciones estándar,

este valor se restó a las absorbancias de la curva para obtener las absorbancias netas de la curva y este punto de corte se resta a su vez a las absorbancias de las muestras obtenidas para tener los valores de absorbancia neta de los problemas.

Con los valores de concentración conocida y sus respectivas absorbancias netas se construyó una gráfica de absorbancia vs concentración, se realizó la regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la curva, donde se sustituyeron los valores de las absorbancias de los problemas para obtener las concentraciones para cada dilución de cada muestra, posteriormente estos valores se multiplicaron por el factor de dilución, se promediaron los valores más cercanos entre sí de las cuatro diluciones de cada muestra y se obtuvo la concentración final de las mismas.

6.7. ELISA indirecta de dos pasos cuantitativa para IgA

Primeramente se sensibilizó la placa de ELISA de 96 pozos (No. Cat. 3366 *Costar*[®], *Corning Incorporated Corning*, NY) diluyendo el antígeno de VEA a una concentración de 2 µg/ml en amortiguador de carbonatos (0.05 M carbonato-bicarbonato, pH 9.6), se colocaron 100 µl por pozo (en los pozos correspondientes a las muestras y sus respectivos blancos). Se tapó la placa y se dejó a 4 °C 12 horas (figura 4). Pasado este tiempo se colocaron en los pozos correspondientes de la curva estándar y a su blanco 100 µl del anticuerpo de captura (*Goat anti-Pig IgA affinity purified* Bethyl Laboratories Inc.) a una dilución 1:100 en amortiguador de carbonatos y se dejó 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-Tween (PBS, 0.05% Tween 20, pH 7.4) para retirar el exceso de anticuerpo de captura y de antígeno, se eliminó el exceso de solución y se colocaron en todos los pozos 150 µl de PBS-Tween para bloquear, se dejó incubando en agitación suave 1 hora a 37 °C.

Después de la incubación se realizaron tres lavados con PBS-Tween para eliminar el exceso de solución de bloqueo y se retiró el exceso de solución. Se realizó una curva patrón de IgA, 100 ng/ml en PBS-Tween utilizando un suero de referencia porcino (0.65 mg/ml de IgA) (*Pig reference serum*, Bethyl Laboratories Inc.), se realizaron diluciones

dobles seriadas y se colocaron 100 µl en los pozos correspondientes a cada punto de la curva, mientras que en los pozos correspondientes a los blancos del estándar se colocaron 100 µl de PBS-Tween. En los pozos correspondientes a las muestras se colocaron las muestras problema, partiendo de una dilución 1:5 y haciendo 3 diluciones dobles seriadas, mientras que en los pozos correspondientes a los blancos del antígeno se colocaron 100 µl de PBS-Tween. Se dejó incubando la placa 1 hora a 37 °C con agitación suave.

Pasado el tiempo de incubación se realizaron 5 lavados con PBS-Tween para retirar la muestra y el suero de referencia, y se eliminó el exceso de solución. Se realizó una dilución 1:250 del anticuerpo anti-cerdo IgA en PBS-Tween (*Mouse Anti-Porcine*, Serotec.) y se colocaron 100 µl en todos los pozos de la placa, se incubó 1 hora a 37 °C con agitación suave.

Se lavó 3 veces con PBS-Tween para quitar el anticuerpo anti-cerdo IgA, y después se quitó el exceso de solución. Se realizó una dilución 1:5000 del anticuerpo conjugado biotinilado (*Goat anti-Mouse IgG (H+L) Biotin Conjugate*, Zymax™) en PBS-Tween y se colocaron 100 µl en todos los pozos de la placa, se incubaron 1 hora a 37 °C con agitación suave.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween para eliminar el exceso del anticuerpo biotinilado, y se retiró el exceso de solución. Se preparó la enzima colocando la estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (*Alkaline Phosphatase-conjugated Streptavidin*, Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1:5000 en PBS-Tween, se incubó 1 hora a 37 °C con agitación suave y posteriormente se lavó 3 veces con PBS-Tween, para revelar se utilizó una solución de 100 µl de *p*-nitrofenil fosfato (PNPP, Sigma®), a una concentración de 1 mg/10 µl, en 10 ml de dietanolamina y se colocaron 100 µl en todos los pozos de la placa, se dejó 1 hora a temperatura ambiente para que desarrollara el color, se realizaron lecturas frecuentes a una longitud de onda de 405 nm utilizando el lector de ELISA (*Multiskan EX 100-120V*, Thermo Electron Corporation) para monitorear el desarrollo de la placa y cuando el punto más concentrado de la curva se encontraba entre 1.5 y 1.7 de absorbancia se detuvo la reacción con EDTA 0.5 M. Posteriormente se

realizaron dos lecturas, primero a una longitud de onda de 405 nm y posteriormente a 492 nm . Y finalmente se restan las lecturas tomadas a 492 nm a las tomadas a 405 nm y la diferencia es la utilizada para el análisis.

Se calculó el punto de corte tanto para la curva estándar como para las muestras con el promedio de los blancos correspondientes más 3 desviaciones estándar, este valor se restó a las absorbancias de la curva para obtener las absorbancias netas y el punto de corte para las muestras se resta a su vez a las absorbancias de las muestras para tener los valores de absorbancias netas.

Con los valores de concentración conocida y sus respectivas absorbancias netas se construyó una gráfica de absorbancia vs concentración, se realizó la regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la curva, donde se sustituyeron los valores de absorbancias problema para obtener las concentraciones para cada dilución de cada muestra, posteriormente estos valores se multiplicaron por el factor de dilución, se promediaron los valores más cercanos entre sí de las cuatro diluciones de cada muestra y se obtuvo la concentración final de cada una.

6.8. Sacrificio y toma de muestra de los órganos

El sacrificio se llevó a cabo 7 días después del desafío (siguiendo las recomendaciones de la norma NOM-062-ZOO-1999), utilizando un protocolo aprobado por el Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del CINVESTAV (UPEAL-CINVESTAV). Los cerdos se sedaron con 2 mg/kg de Azaperona por vía IM (Sural® presentación de 40 mg/ml, Productos Farmacéuticos S.A. de C.V.), posteriormente se administraron 0.6 mg/kg de clorhidrato de Tiletamina y 0.6 mg/kg de clorhidrato de Zolazepam vía IV (Zoletil® 50, Virbac S.A.). Posteriormente se tomó la muestra sanguínea en tubos Vacutainer con heparina (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes NJ USA) por venopunción yugular y a continuación se realizó el sacrificio. El cerdo se desangró realizando incisiones en las venas axilares. Después de desangrarse por completo se abrió el tórax cortando los cartílagos esterno-costales exponiendo el corazón y el tracto respiratorio completo, se

ligaron las venas y arterias pulmonares, aorta y cavas y se extrajo el tracto respiratorio, vasos y corazón. Los órganos se colocaron en un recipiente estéril y a 4°C. Los ganglios linfáticos se obtuvieron en ambiente estéril de la zona cervical y peritraqueal del cerdo y se colocaron en cajas Petri estériles manteniéndose a 4 °C.

6.9. Separación de células

Se obtuvieron células mononucleares (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells* por sus siglas en inglés) a partir de la sangre recolectada. Se tomaron 10 ml de sangre, se diluyeron 1:2 en PBS (amortiguador salino de fosfatos) se dividieron en dos y se estratificaron 10 ml sobre un colchón de 2 ml de Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech AB) en tubos estériles de fondo cónico de 15 ml. Se centrifugaron a 450 x g por 30 min a temperatura ambiente. Las células de la interfase se recolectaron y lavaron 1 vez con PBS, se resuspendieron en solución amortiguadora de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 0.14 M, KHCO₃ 1 mM, EDTA 0.1 mM pH 8.0) y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min, se diluyó 1:3 con PBS y se centrifugaron nuevamente, se lavaron 2 veces con PBS y por último se resuspendieron en medio RPMI-1640 (SIGMA®) incompleto, manteniéndose a 4 °C.

Obtención de células de lavado broncoalveolar (BAL). Primeramente se retiró el tejido en exceso del órgano para trabajar lo más limpiamente posible, la tráquea se ligó en su extremo distal con hilo de algodón estéril, se realizó una pequeña incisión en el ventrículo izquierdo y se puncionó la arteria pulmonar con un Punzocat® (18 G x 1" 25 mm) en el sentido que va hacia los pulmones, con la ayuda de una jeringa de 60 ml se pasaron aproximadamente 2 litros de solución salina fisiológica (SSF) (NaCl al 0.9%) por la arteria pulmonar, pasando por los pulmones y saliendo por la incisión del ventrículo izquierdo, el objetivo fue eliminar toda la sangre contenida en los pulmones. Los pulmones deben tener una apariencia marmoleada de color rosa y la SSF debe salir incolora por el ventrículo. Una vez realizado el lavado se retiró el Punzocat® de la arteria pulmonar, y se puncionó la tráquea a la mitad de su longitud, con la ayuda de una jeringa de 60 ml se introdujeron 50 ml de PBS, se cargó nuevamente la jeringa con 50 ml de PBS y se volvió a

introducir por la tráquea, con ayuda de la jeringa se ejerció succión para recuperar el mayor volumen posible de PBS, para posteriormente volverlo a introducir logrando así un efecto de lavado que se repitió tres veces, en la última succión se tuvo especial cuidado de recuperar la mayor cantidad de PBS, este lavado se colocó en tubos de fondo cónico de polipropileno de 50 ml estériles y se mantuvieron a 4 °C, este procedimiento se repitió por tres ocasiones, para obtener un volumen final de lavado bronquial de aproximadamente 150 ml.

Obtención de células del parénquima pulmonar y ganglios linfáticos. En primer lugar se ubicaron los lóbulos craneales derecho e izquierdo, cardíacos derecho e izquierdo, caudales derecho e izquierdo y accesorio (figura 5). Se obtuvo muestra de cada sección de lóbulo (aprox. 15 g), una vez pesado se colocaron en cajas Petri estériles y se mantuvieron a 4 °C.

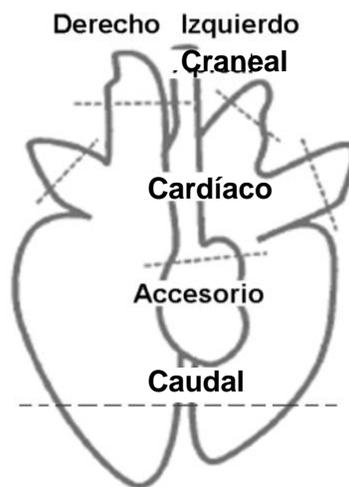


Figura 5. Ubicación de los lóbulos pulmonares y los segmentos que se tomaron (excepto accesorio).

A cada sección de lóbulo obtenida se le retiró cuidadosamente el árbol bronquial teniendo cuidado de no contaminar el parénquima con tejido epitelial del bronquio, para posteriormente seccionarlo en pequeños fragmentos, esto se realizó con ayuda de un bisturí, tijeras curvas y pinzas de disección a 4 °C y en ambiente estéril. Los ganglios linfáticos se limpiaron de tejido graso para posteriormente seccionarlos de igual forma que al parénquima pulmonar. Se tomaron 10 gramos de cada macerado los cuales se colocaron en 15 ml de medio RPMI-1640 incompleto con 150 UI/ml de collagenasa tipo IV

(Worthington Biochemical Corporation, USA). Se incubaron los tejidos a 37 °C con agitación constante por 60 min. Se recuperó la suspensión celular y se centrifugó a 450 x g durante 5 min a 4 °C, la pastilla se resuspendió en 5 ml de solución amortiguadora de lisis de eritrocitos y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, se diluyó 1:3 con PBS y se centrifugó nuevamente, la pastilla se resuspendió en medio RPMI-1640 incompleto, manteniéndose a 4 °C.

6.10. Conteo celular

Se realizó un conteo celular automatizado de cada muestra en el Contador *Countess™ automated cell counter* de Invitrogen™ con ayuda del Azul de tripano siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la viabilidad y el número total de células, que nunca fue menor al 90 %.

6.11. Cultivo celular

Se separaron 30 millones de células de cada tejido y se centrifugaron a 400 x g durante 5 min a 4 °C, posteriormente se quitó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 500 µl de PBS, se centrifugó a 400 x g por 5 min a 4 °C, el sobrenadante se eliminó y se resuspendió en 200 µl de medio completo frío, posteriormente se colocaron 100 µl de la suspensión en 2 pozos de la placa de cultivo de 24 pozos (No. Cat. 3473 Costar®, Corning *Incorporated*, Corning, NY) considerando que en los lavados se pierden aproximadamente 10 millones de células y al final en cada pozo quedan 10 millones de células, se cultivó en 2 ml de medio completo. Un pozo fue el control negativo al cual no se le agregó nada más. Y al último pozo se le adicionaron 7.3 µl del antígeno purificado del virus de la enfermedad de Aujeszky a una concentración de 2.6 mg/ml. La placa se dejó incubando a 37 °C durante 4 días y se adicionó un refuerzo del antígeno purificado a los dos días (7.3 µl del antígeno purificado), además en caso de que los pozos de cultivo presentaran acidificación se les adicionó medio de cultivo completo fresco.

6.12. Marcaje y lectura para citometría de flujo

Se colocaron 1×10^6 células por pozo, en placas de cultivo de 96 pozos (No. Cat. 3598 *Costar*[®], *Corning Incorporated Corning*, NY). Se realizaron tinciones triples para identificar las subpoblaciones de linfocitos T. Se consideraron controles de células solas y de isotipo. Se centrifugó la placa a $400 \times g$ a $4^\circ C$ por 6 min y se resuspendieron en Sol. A de citometría (PBS-5% de suero normal de cerdo), se incubó a $4^\circ C$ por 30 min para bloquear los receptores de inmunoglobulinas. Se lavaron las células 2 veces con Sol. A centrifugando a $400 \times g$ a $4^\circ C$ por 6 min. Se incubaron las células con mezcla triple de anticuerpos primarios o con control de isotipo según sea el caso (en la tabla 2 se resume los anticuerpos primarios empleados).

Tabla 2. Anticuerpos primarios para el ensayo de citometría de flujo

Anticuerpo anti-	Isotipo	Clona	Dilución	Casa comercial
Control de isotipo	Ratón isotipo		1:100	VMRD
CD3	IgG1	8E6	1:10	VMRD
CD4	IgG2b	MCA1749	1:10	Serotec
CD8	IgG2a	MIL-12	1:20	Donación, Universidad de Bristol, Inglaterra

Las células se lavaron 2 veces con Sol. A para eliminar el excedente de anticuerpos primarios centrifugando a $400 \times g$ a $4^\circ C$ por 6 min. Se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con los fluorocromos específicos contra los isotipos de los anticuerpos primarios utilizando una mezcla triple (en la tabla 3 se resume los anticuerpos secundarios usados).

Tabla 3. Anticuerpos secundarios para el ensayo de citometría de flujo

Anticuerpos anti-	Fluorocromo conjugado	No. Catalogo	Dilución	Casa comercial
IgG1	R-PE	115-115-205	1:40	Jackson ImmunoResearch.
IgG2a	APC	115-135-207	1:30	Jackson ImmunoResearch.
IgG2b	PerCP	115-125-206	1:30	Jackson ImmunoResearch.

Las células se lavaron 2 veces con sol. A para eliminar el excedente de anticuerpos secundarios centrifugando a $450 \times g$ a $4^\circ C$ por 5 min. y se fijaron con paraformaldehído al

1 %. Posteriormente se leyeron en el citómetro de flujo (FACScalibur de Beckton Dickinson), capturando 10,000 eventos por muestra. En la tabla 4 se resume el análisis de las lecturas realizadas.

Tabla 4. Lectura de fluorescencia para citometría de flujo

Fluorocromos	Anticuerpos anti-	Longitud de excitación	Longitud de emisión	Canal
R-PE	IgG1	488 nm	575 nm	FL-2
PerCP	IgG2a	468 nm	675 nm	FL-3
APC	IgG2b	600-650 nm	660 nm	FL-4

6.13. Análisis estadístico

Para el análisis de la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos se tomaron las concentraciones individuales de anticuerpos de los cerdos y se organizaron por fecha y grupo de inmunización, se obtuvieron los promedios. Se realizó una comparación de las diferentes concentraciones de anticuerpos por grupo de inmunización y se aplicó la prueba estadística de distribución *t* de Student con ayuda del software GraphPad Prism 5.0.

Para el análisis de las poblaciones celulares se utilizó el software FlowJo 7.6.1 y se fijó el marcador CD3, posteriormente se determinó la presencia de CD4 y CD8 en esa ventana. Se consideraron las poblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+, CD4+CD8+ (DP) y CD4-CD8- (DN). Finalmente se tomaron los porcentajes de las poblaciones celulares de cada animal y se promediaron. Se realizó una comparación de los porcentajes de las poblaciones entre tejidos y entre los grupos de inmunización y se aplicó la prueba estadística de distribución *t* de Student con ayuda del software GraphPad Prism 5.0.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para realizar el trabajo se siguió el siguiente diseño experimental (figura 6), en el cual se dividieron los cerdos en tres grupos (control, protocolo de vacunación convencional y protocolo de vacunación combinada) y posteriormente se siguió el esquema de vacunación planteado, se cuantificaron las concentraciones de IgG e IgA específicas contra VEA y por último se sacrificaron los cerdos para obtener las células pulmonares y, mediante la técnica de citometría de flujo, se evaluó la respuesta de los linfocitos T específicos contra VEA.

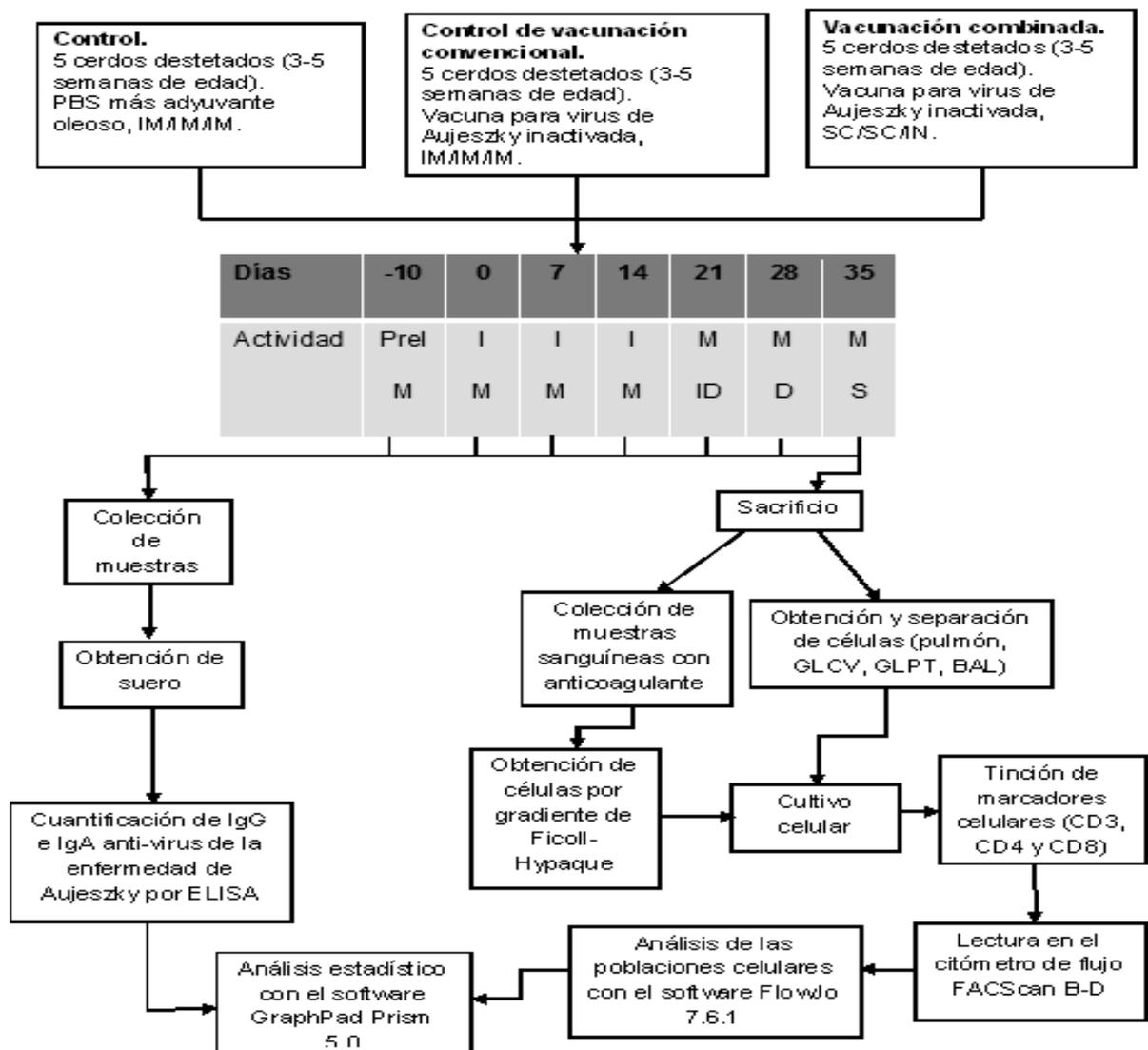


Figura 6. Diseño experimental. Se observa el esquema básico de las actividades que se realizaron para esta investigación. IM, intramuscular; SC, subcutáneo; IN, intranasal; Prel, preinmunización; I, inmunización; M, muestreo; ID, intradermorreacción; D, desafío; S, sacrificio; GLCV, ganglio linfático cervical; GLPT, ganglio linfático peritraqueal, BAL, lavado bronquioalveolar.

8. RESULTADOS

Respuesta inmunológica sérica porcina mediada por IgG e IgA después de la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky

Para el análisis de la respuesta inmunológica sérica se tomaron muestras de los cerdos de los distintos grupos de estudio, grupo control (n=5), vacunación convencional IM/IM/IM (n=5) y vacunación combinada SC/SC/IN (n=5) en los días de inmunización y posteriormente a los 7 (ID), 14 (desafío), 21 (sacrificio), días después de la última inmunización. La cuantificación de la concentración sérica de IgG e IgA se realizó mediante la técnica de ELISA cuantitativa estandarizada en el laboratorio de Inmunobiología de las Mucosas, departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN (figura 7), en la cual se utilizó una curva estándar para la cuantificación de las inmunoglobulinas anti-VEA específicas (figura 8).

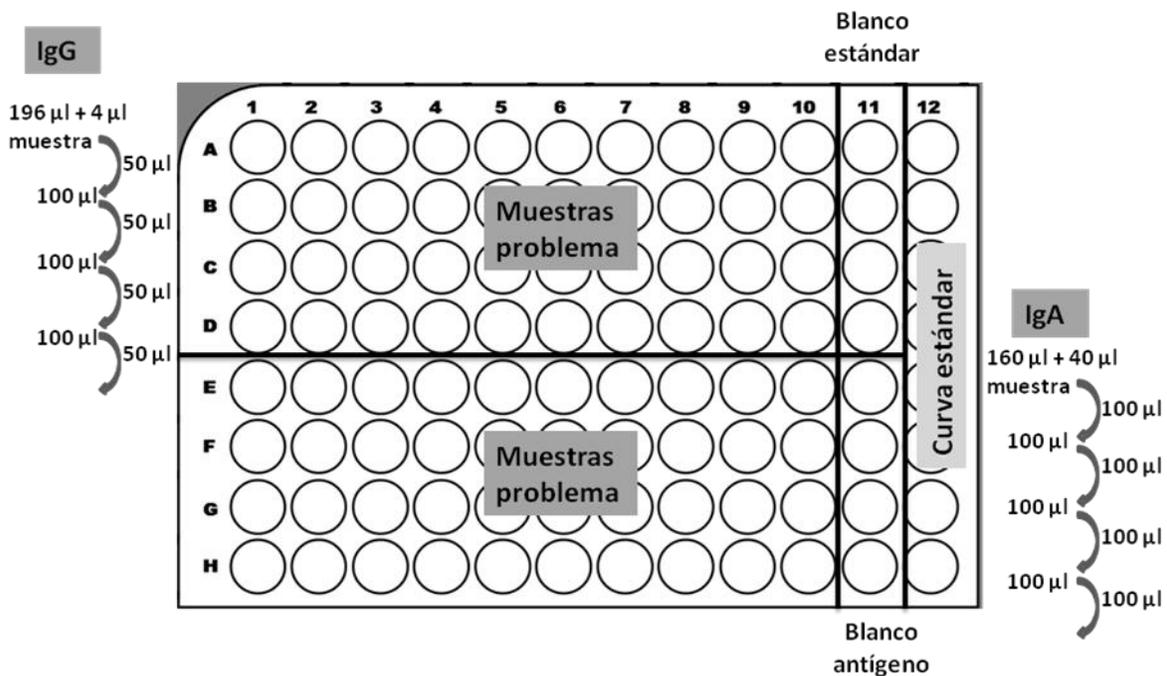


Figura 7. Diseño de la placa de ELISA cuantitativa. Se observa la forma en la que se organizan las muestras problema y las curvas estándar, así como los blancos del antígeno y los blancos del estándar, dentro de la placa de ELISA; para IgG las muestras parten de una dilución 1:50 y se realizan diluciones triples seriadas, y la curva parte de una concentración de 1 mg/ml de IgG y se realizan diluciones dobles seriadas; mientras que para IgA las muestras inician a una dilución 1:5 y se realizan diluciones dobles seriadas, y la curva inicia a una concentración de 100 ng/ml de IgA y se realizan diluciones dobles seriadas.

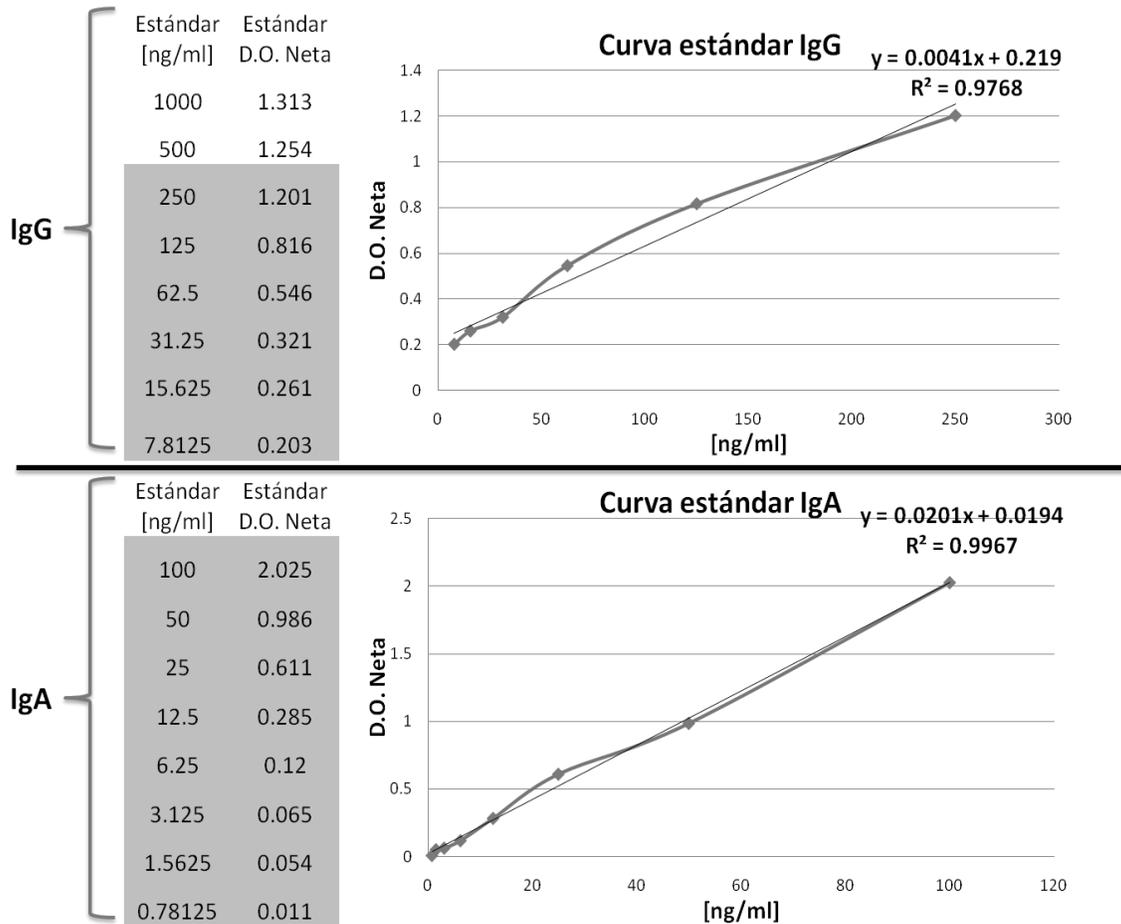


Figura 8. Ejemplos representativos de la curva estándar de la técnica de ELISA cuantitativa. Se pueden observar dos ejemplos representativos de la elaboración de las curvas estándar para la cuantificación de IgG e IgA anti-VEA. En la parte superior se observa la curva estándar para la cuantificación de IgG anti-VEA iniciando en una concentración de 1 mg/ml de IgG y realizando diluciones dobles seriadas y en la parte inferior se muestra la curva estándar para la cuantificación de IgA anti-VEA iniciando de una concentración de 100 ng/ml de IgA y realizando diluciones dobles seriadas, para posteriormente interpolar las D.O. netas de las muestras problemas y determinar la concentración de IgG o IgA específicas anti-VEA presente en estas. D.O, densidad óptica; VEA, virus de la enfermedad de Aujeszky.

Los valores obtenidos se agruparon por día y por grupo de inmunización, se promediaron y se obtuvo el error estándar de la media con ayuda del *software* GraphPad 5.0 (tablas 5 y 6). Posteriormente se realizaron las gráficas y se aplicó la prueba estadística *t* de Student para comparar la respuesta inmunológica entre los grupos de vacunación con el mismo *software*.

Tabla 5. Promedio de las concentraciones séricas de IgG anti-VEA (ng/ml) \pm el error estándar de la media (SEM) organizadas según fecha y grupo de vacunación en los sueros de cinco animales por grupo (control, IM/IM/IM, SC/SC/SC). -10 pre-inmunización y toma de muestra; 0, 7 y 14 días de inmunización y toma de muestra; 21 intradermorreacción (IDR) y toma de muestra; 28 desafío y toma de muestra; 35 sacrificio y toma de muestra.

Días inmunización post- vacunación	Control.		IM/IM/IM		SC/SC/IN	
	Promedio (ng/ml)	\pm SEM	Promedio (ng/ml)	\pm SEM	Promedio (ng/ml)	\pm SEM
-10 (Pre-Inm)	0	0	0	0	0	0
0	0	0	8286	4862	3580	1215
7	0	0	16549	8594	12191	4877
14	0	0	11669	2359	13038	3967
21 (ID)	0	0	19116	3747	16214	2608
28 (Desafío)	0	0	26018	6238	19027	2775
35 (sacrificio)	4433	1877	27625	6560	20434	2503

IM, intramuscular; SC, subcutánea; IN, intranasal; SEM, error estándar de la media; Pre-Inm, pre-inmunización; ID, intradermorreacción.

Tabla 6. Promedio de las concentraciones séricas de IgA anti-VEA (ng/ml) \pm el error estándar de la media (SEM) organizadas según fecha y grupo de vacunación en los sueros de cinco animales por grupo (control, IM/IM/IM, SC/SC/SC). -10 pre-inmunización y toma de muestra; 0, 7 y 14 días de inmunización y toma de muestra; 21 intradermorreacción (IDR) y toma de muestra; 28 desafío y toma de muestra; 35 sacrificio y toma de muestra.

Días inmunización post- vacunación	Control		IM/IM/IM		SC/SC/IN	
	Promedio (ng/ml)	\pm SEM	Promedio (ng/ml)	\pm SEM	Promedio (ng/ml)	\pm SEM
-10 (Pre-Inm)	2.94	2.94	7.25	7.25	12.53	5.76
0	2.05	2.05	30.91	17.74	22.56	7.75
7	0	0	58.79	17.68	48.59	11.14
14	0	0	65.70	12.37	92.08	16.78
21 (ID)	8.57	5.29	73.38	10.73	79.40	20.38
28 (Desafío)	12.38	4.06	86.87	9.09	77.73	14.58
35 (sacrificio)	20.14	7.40	75.94	6.43	93.46	11.89

IM, intramuscular; SC, subcutánea; IN, intranasal; SEM, error estándar de la media; Pre-Inm, pre-inmunización; ID, intradermorreacción.

Respuesta inmunológica sérica de IgG específica contra el virus de la enfermedad de Aujeszky

Al analizar los promedios de las concentraciones séricas de IgG anti-VEA de los distintos protocolos de vacunación se encontró que el grupo de vacunación convencional

(IM/IM/IM) tuvo concentraciones séricas de IgG anti-VEA superiores a las del grupo control ($P<0.01$) en el día 14 post-inmunización, y posteriormente en los días de IDR ($P<0.001$), desafío y sacrificio ($P<0.01$) (figura 9). Mientras que el grupo de vacunación combinada (SC/SC/IN) presento diferencias significativas contra el grupo control en la concentración sérica de IgG anti-VEA desde el día 0 ($P<0.05$) (1ª inmunización), en el día 7 ($P<0.05$) (2ª inmunización) y en el día 14 ($P<0.05$) (3ª inmunización) post-inmunización y posteriormente en la IDR ($P<0.001$), en el desafío ($P<0.001$) y en el sacrificio ($P<0.001$) (figura 9). No hubo diferencia significativa entre los protocolos de vacunación (figura 9).

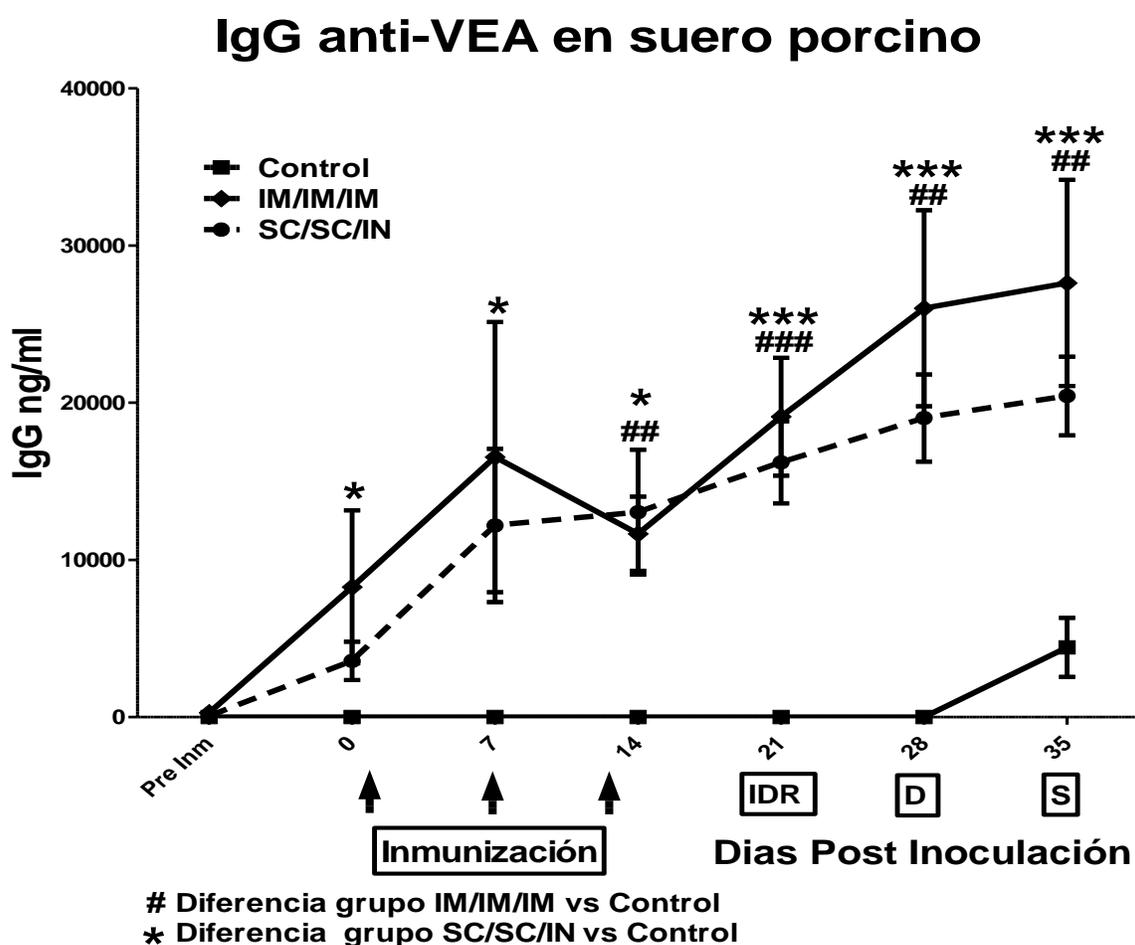


Figura 9. Concentración sérica de IgG anti-VEA en cerdos destetados. Los animales se distribuyeron en tres grupos de 5 individuos: grupo control, grupo de vacunación convencional (IM, IM, IM) y grupo de vacunación combinada (SC, SC, IN). Fueron inmunizados en tres ocasiones (flechas negras) y posteriormente se realizó una prueba de IDR (día 21). Después los animales fueron desafiados (día 28) y sacrificados (día 35). Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de la media. Diferencia significativa de $***P<0.001$, $**P<0.01$ y $*P<0.05$. Prueba estadística de distribución *t* de Student. IgG, inmunoglobulina G; VEA, virus de la enfermedad de Aujeszky; IM, intramuscular; SC, subcutánea; IDR, intradermorreacción.

Respuesta inmunológica sérica de IgA específica contra el virus de la enfermedad de Aujeszky

Al analizar los promedios de las concentraciones séricas de IgA anti-VEA, se observó que el grupo de vacunación convencional (IM/IM/IM) tuvo concentraciones séricas de IgA anti-VEA superiores a las del grupo control en los días 7 (2ª inmunización) y 14 (3ª inmunización) post-inmunización ($P<0.05$), y posteriormente en la IDR, en el desafío y en el sacrificio ($P<0.001$).

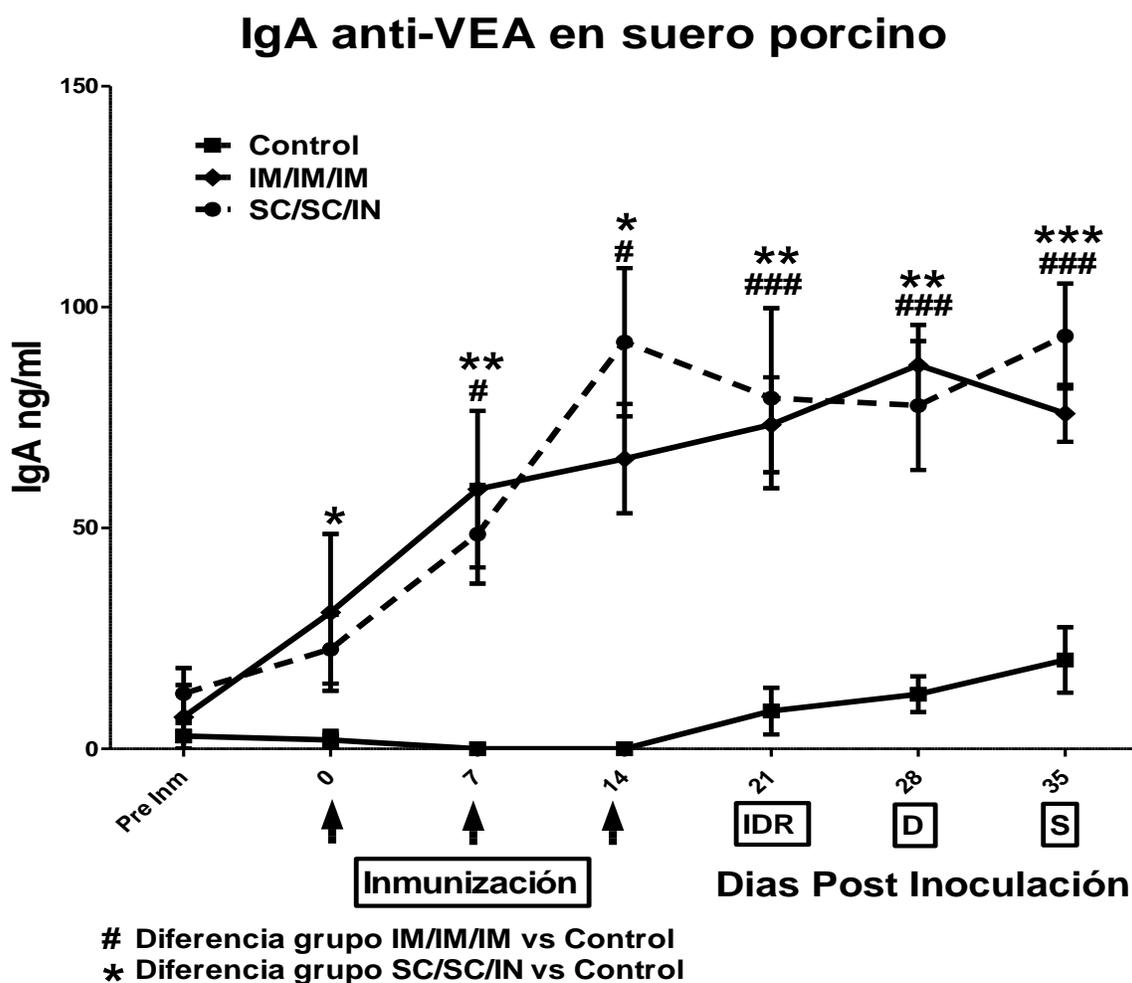


Figura 10. Concentración sérica de IgA anti-VEA en cerdos destetados. Los animales se distribuyeron en tres grupos de 5 individuos: grupo control, grupo de vacunación convencional (IM, IM, IM) y grupo de vacunación combinada (SC, SC, IN). Fueron inmunizados en tres ocasiones (flechas negras) y posteriormente se realizó una prueba de IDR (día 21). Después los animales fueron desafiados (día 28) y sacrificados (día 35). Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de la media. Diferencia significativa de *** $P<0.001$, ** $P<0.01$ y * $P<0.05$. Prueba estadística de distribución *t* de Student. IgG, inmunoglobulina G; VEA, virus de la enfermedad de Aujeszky; IM, intramuscular; SC, subcutánea; IDR, intradermorreacción.

Mientras que el grupo de vacunación combinada (SC/SC/IN) presentó diferencias significativas desde el día 0 ($P<0.05$) (1ª inmunización), en el día 7 post-inmunización (2ª inmunización) ($P<0.01$), en el día 14 post-inmunización (3ª inmunización) ($P<0.05$), y posteriormente en la IDR, el desafío ($P<0.01$) y en el sacrificio ($P<0.001$) (figura 10). No hubo diferencia significativa entre los protocolos de vacunación (figura 10).

Evaluación de la prueba de intradermorreacción de cerdos inmunizados con el virus de la enfermedad de Aujeszky

La prueba de intradermorreacción (ID) se realizó 7 días después de la última inmunización de los grupos y se aplicó a todo los cerdos. Se inoculó por vía subcutánea, entre la primera y segunda tetilla del lado izquierdo, el antígeno inactivado del virus de la enfermedad de Aujeszky y del otro lado solo se inoculó PBS. Posteriormente se realizaron lecturas a las 24, 48 y 72 horas buscando encontrar la formación de eritema o granuloma en la zona de inoculación con el antígeno inactivo del virus de la enfermedad de Aujeszky. Lo cual no se observó en ninguna lectura en ningún cerdo, de igual forma en la inoculación con PBS no se observó la formación de eritemas o granulomas.

Análisis de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T provenientes de tejidos de cerdos inmunizados y desafiados con el virus de la enfermedad de Aujeszky

Se realizó el sacrificio de cerdos pertenecientes a los grupos control (n=5), vacunación convencional IM/IM/IM (n=5) y vacunación combinada SC/SC/SC (n=5), se procedió a obtener tejidos y separar células. Las células obtenidas se cultivaron y se estimularon con 7.3 μ l del antígeno purificado del VEA a una concentración de 2.6 mg/ml, se dejaron incubando a 37°C durante 4 días y se adicionó un refuerzo del antígeno a los dos días (7.3 μ l del antígeno purificado). Posteriormente se realizaron tinciones de citometría de flujo para linfocitos T (CD3, CD4 y CD8). Para el análisis de linfocitos T se consideró la expresión de CD3 en las células de cada tejido, se escogieron estas células y se determinaron las células que expresaban CD4 y CD8 (figura 11) obteniendo los porcentajes de poblaciones

de células, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+ CD4+CD8+ (DP) y CD3+CD4-CD8- (DN) con ayuda del *software* FlowJo 7.6.1.

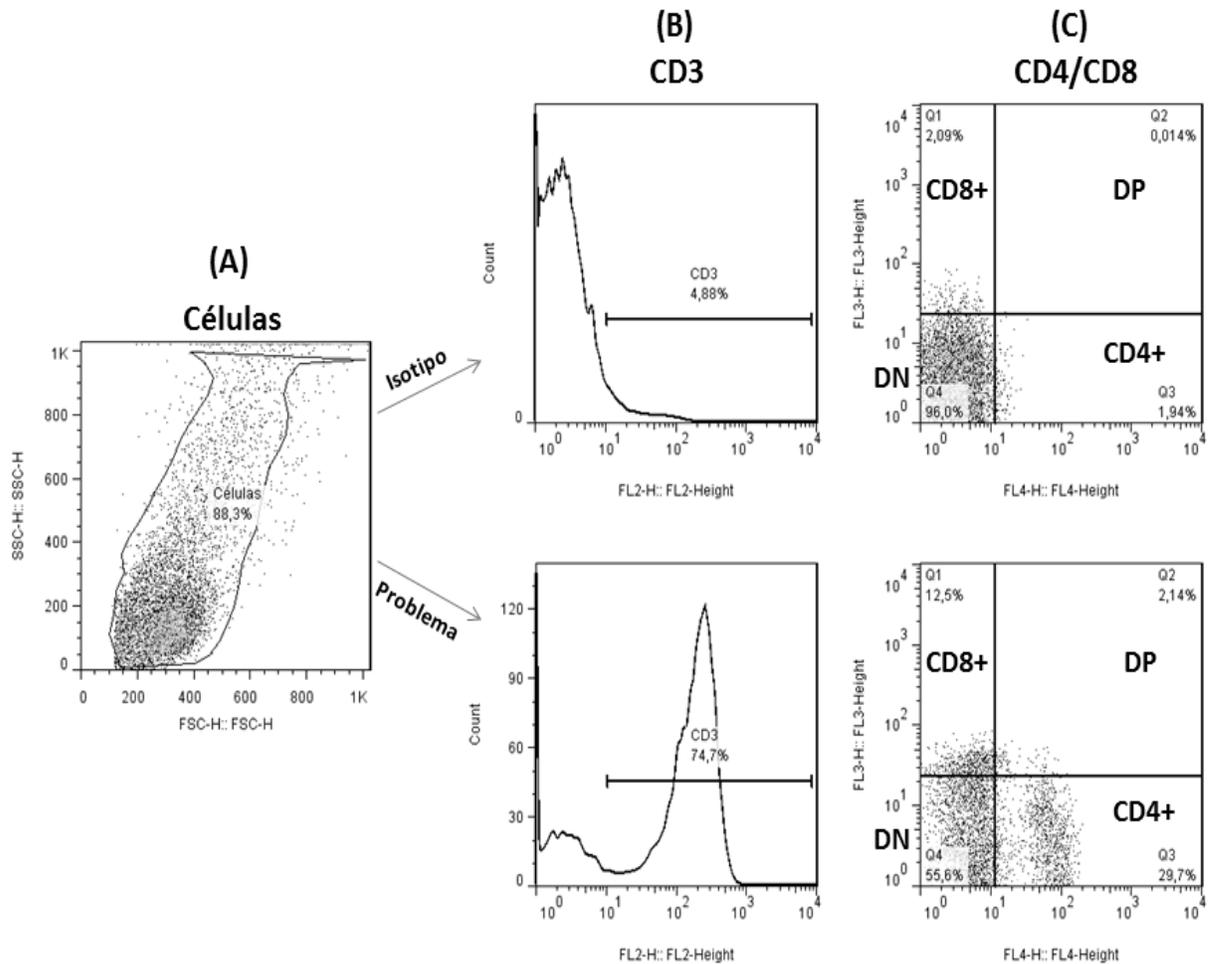


Figura 11. Determinación de las poblaciones de linfocitos T con el *software* FlowJo 7.6.1. Se muestran histogramas y *dot-plots* representativos. Se muestra el *dot-plot* de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) tomando solo la región de linfocitos T (A), después se presentan histogramas en donde se analiza la expresión de CD3 partir de la cual se toman las células positivas (B) y se determinan las poblaciones considerando la expresión de CD4 y CD8 en el *dot-plot* (C).

Posteriormente se realizó el análisis estadístico con ayuda del *software* GraphPad 5.0 obteniendo los promedios por grupo de inmunización y los SEM para todos los tejidos y comparándolos mediante la prueba *t* de Student (Tabla 7), para posteriormente realizar las gráficas correspondientes.

Tabla 7. Promedio de los valores relativos (% de células) \pm el error estándar de la media (SEM) de las subpoblaciones de linfocitos T (CD3+) de cinco animales por grupo de vacunación (control, vacunación convencional IM/IM/IM y vacunación combinada SC/SC/IN) en sangre, ganglio linfático peritraqueal (GLPT), ganglio linfático cervical (GLCV), lavado bronquioalveolar (BAL), y lóbulos apical, medio y diafragmático.

Marcador celular Tejido		CD4		CD8		DP		DN	
		Promedio (% células)	\pm SEM						
Sangre	Control	19.34	2.65	6.09	1.47	2.94	0.71	20.48	1.83
	IM/IM/IM	20.51	2.41	5.44	1.66	4.95	1.99	26.09	2.94
	SC/SC/IN	20.07	2.23	5.54	1.26	1.49	0.27	27.08	1.96
GLPT	Control	23.62	3.21	2.02	0.45	2.46	0.47	12.22	2.71
	IM/IM/IM	25.02	3.51	4.49	1.48	4.92	1.4	14.31	2.74
	SC/SC/IN	22.98	4.76	1.23	0.22	2.18	0.25	14.59	1.92
GLCV	Control	32.64	6.00	2.76	0.97	3.10	0.89	15.00	2.14
	IM/IM/IM	24.10	2.95	4.87	1.39	4.00	1.16	12.45	1.95
	SC/SC/IN	30.72	4.97	0.93	0.10	2.55	0.25	20.53	2.71
BAL	Control	3.34	1.10	2.84	0.88	1.98	1.48	8.31	1.17
	IM/IM/IM	3.03	0.42	3.57	1.06	0.60	0.08	7.38	0.80
	SC/SC/IN	3.84	1.20	1.89	0.37	0.52	0.18	10.11	0.87
Lóbulo craneal	Control	10.20	2.15	2.39	0.35	1.22	0.27	13.33	2.13
	IM/IM/IM	12.78	2.38	7.90	2.39	2.14	0.42	17.75	2.52
	SC/SC/IN	8.14	1.73	2.14	0.16	0.53	0.04	19.34	3.57
Lóbulo cardíaco	Control	7.76	1.29	2.29	0.45	1.24	0.17	12.08	2.32
	IM/IM/IM	8.84	1.44	4.75	0.77	1.31	0.13	16.44	2.99
	SC/SC/IN	8.09	1.86	1.71	0.24	0.68	0.14	18.95	3.62
Lóbulo caudal	Control	10.87	2.14	3.03	0.63	2.33	0.52	16.91	1.56
	IM/IM/IM	7.73	1.65	4.75	0.77	1.29	0.27	13.04	2.47
	SC/SC/IN	6.72	1.59	1.99	0.24	0.45	0.12	20.62	3.53

IM, intramuscular; SC, subcutáneo; IN, intranasal.

Linfocitos T CD4+ en tejidos porcinos

Al analizar los porcentajes de las células CD3+CD4+ se observó que no hubo diferencia significativa entre los protocolos de vacunación con respecto al control y entre ellos, en los diferentes tejidos de estudio (figura 12).

CD4+ en tejidos porcinos

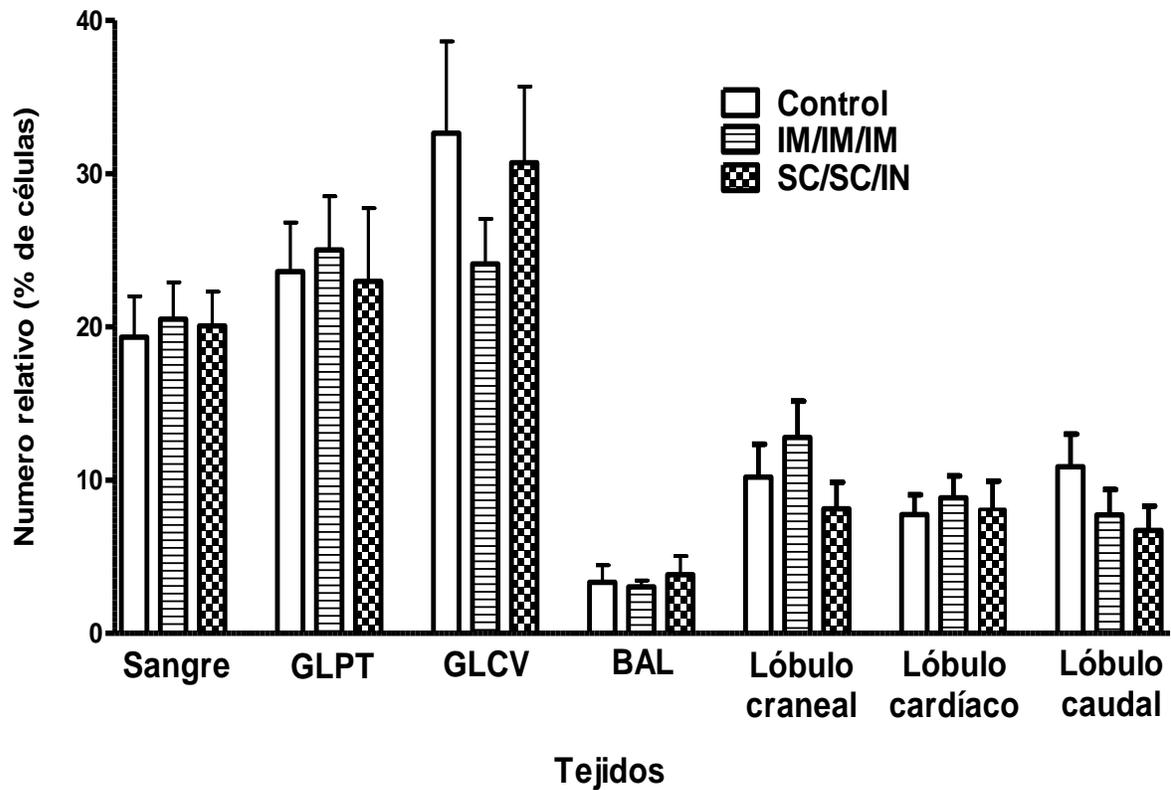


Figura 12. Valores relativos de linfocitos T CD4+ en sangre, GLPT, GLCV, BAL y parénquima pulmonar. Los animales se distribuyeron en tres grupos: grupo control (barras vacías), vacunación convencional (IM, IM, IM) (barras con líneas horizontales) y vacunación combinada (SC, SC, IN) (barras con cuadrícula). Se muestra la comparación de porcentajes entre grupos por cada tejido. Cada barra representa el promedio de 5 animales más el error estándar de la media. Diferencia significativa de *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. Prueba estadística *t* de Student. IM, intramuscular; SC, subcutánea; GLPT, ganglio linfático peritraqueal; GLCV, ganglio linfático cervical; BAL, lavado bronquioalveolar.

Linfocitos T CD8+ en tejidos porcinos

Para las células CD3+CD8+ se encontró que existe un mayor porcentaje de éstas en GLPT ($P < 0.05$), GLCV ($P < 0.01$), lóbulo caudal ($P < 0.01$) del grupo de vacunación convencional con respecto al grupo de vacunación combinada pero no hubo diferencia significativa con respecto al grupo control. En cambio el porcentaje de células CD8+ en el lóbulo cardíaco fue mayor con respecto al grupo control ($P < 0.05$) y al grupo de vacunación combinada ($P < 0.01$), de igual manera el porcentaje de células del lóbulo craneal fue mayor con respecto al grupo control y al grupo de vacunación combinada ($P < 0.05$). Sin

embargo, no se encontró diferencia significativa entre los tres grupos en sangre y BAL (figura 13).

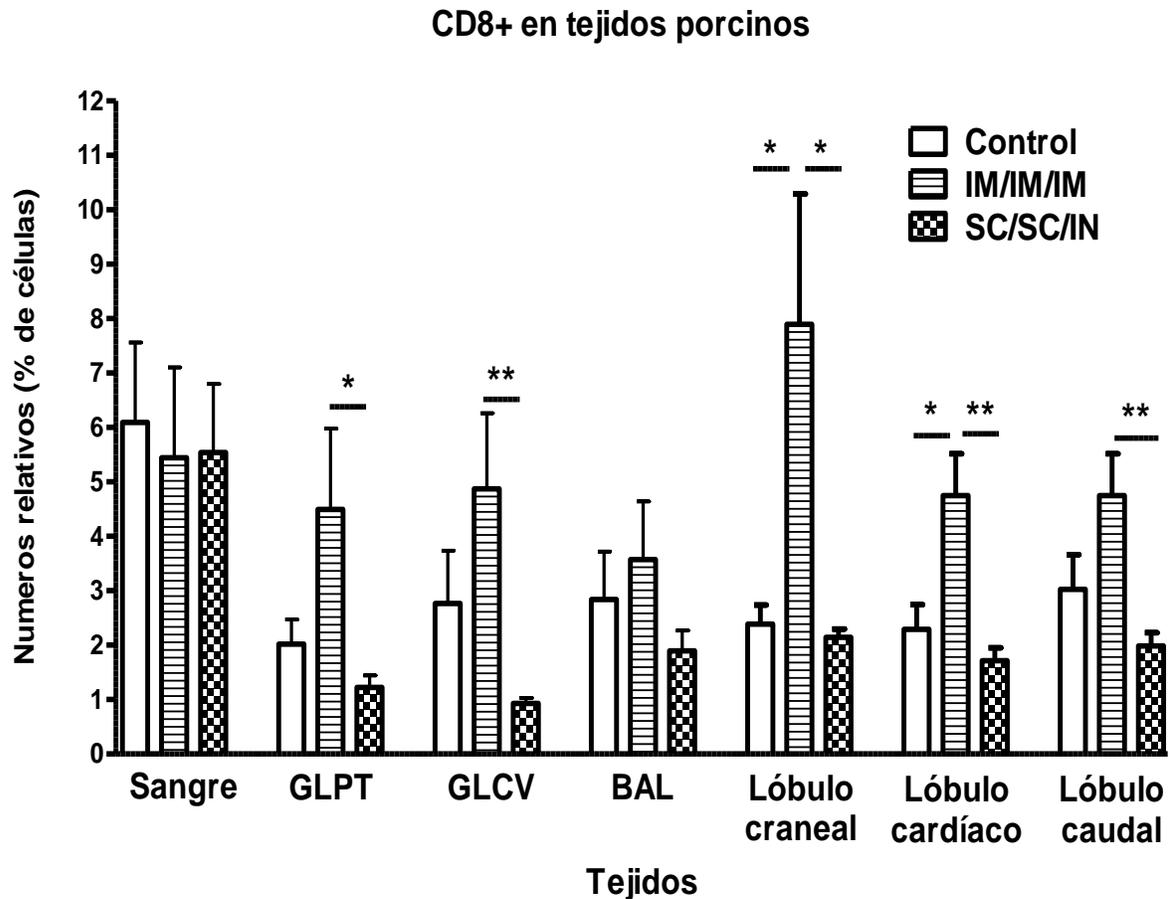


Figura 13. Valores relativos de linfocitos T CD8+ en sangre, GLPT, GLCV, BAL y parénquima pulmonar. Los animales se distribuyeron en tres grupos: grupo control (barras vacías), vacunación convencional (IM, IM, IM) (barras con líneas horizontales) y vacunación combinada (SC, SC, IN) (barras con cuadrícula). Se muestra la comparación de porcentajes entre grupos por cada tejido. Cada barra representa el promedio de 5 animales más el error estándar de la media. Diferencia significativa de *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. Prueba estadística *t* de Student. IM, intramuscular; SC, subcutánea; GLPT, ganglio linfático peritraqueal; GLCV, ganglio linfático cervical; BAL, lavado bronquioalveolar.

Linfocitos T DP (CD4+CD8+) en tejidos porcinos

Al analizar los porcentajes de las células DP (CD3+CD4+CD8+) se observó que en sangre, GLPT, GLCV y BAL no existieron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo en parénquima pulmonar se encontraron diferencias, se observó un mayor porcentaje de células DP en el lóbulo craneal del grupo de vacunación convencional ($P < 0.001$) con respecto al grupo de vacunación combinada pero no existió diferencia

contra el grupo control. En el lóbulo cardíaco se observó un mayor porcentaje de células DP ($P<0.05$) del grupo control con respecto al grupo de vacunación combinada, de igual manera se encontró una mayor cantidad de células del grupo de vacunación convencional ($P<0.01$) con respecto al grupo de vacunación combinada. Por último, en el lóbulo caudal se observó un mayor porcentaje de células DP del grupo control con respecto al de vacunación combinada ($P<0.001$) pero no se halló diferencia contra el grupo de vacunación convencional (figura 14).

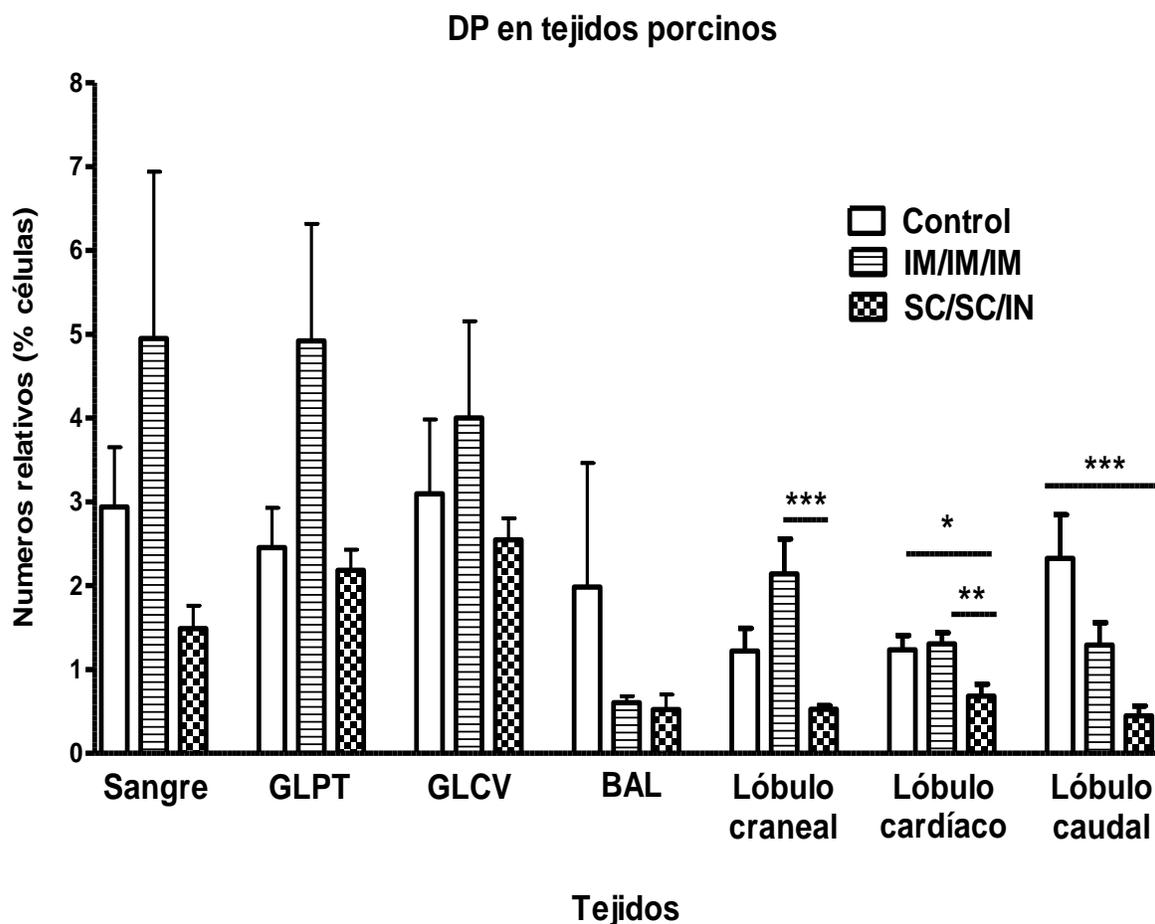


Figura 14. Valores relativos de linfocitos T DP (CD4+CD8+) en sangre, GLPT, GLCV, BAL y parénquima pulmonar. Los animales se distribuyeron en tres grupos: grupo control (barras vacías), vacunación convencional (IM, IM, IM) (barras con líneas horizontales) y vacunación combinada (SC, SC, IN) (barras con cuadrícula). Se muestra la comparación de porcentajes entre grupos por cada tejido. Cada barra representa el promedio de 5 animales más el error estándar de la media. Diferencia significativa de $***P<0.001$, $**P<0.01$ y $*P<0.05$. Prueba estadística *t* de Student. IM, intramuscular; SC, subcutánea; GLPT, ganglio linfático peritraqueal; GLCV, ganglio linfático cervical; BAL, lavado bronquioalveolar.

Linfocitos T DN (CD4-CD8-) en tejidos porcinos

Por último se analizaron los porcentajes de linfocitos T DN (CD3+CD4-CD8-), observando que no hubo diferencia significativa entre los grupos de vacunación con respecto al control y entre ellos en GLPT y parénquima pulmonar. Sin embargo se encontró un mayor porcentaje de células DN en el grupo de vacunación combinada en GLCV ($P<0.05$) y BAL ($P<0.05$) con respecto al grupo de vacunación convencional. Y en sangre se observó que el grupo de vacunación combinada tuvo un mayor porcentaje de células DN ($P<0.05$) con respecto al grupo control pero no hubo diferencia contra el grupo de vacunación convencional (figura 15).

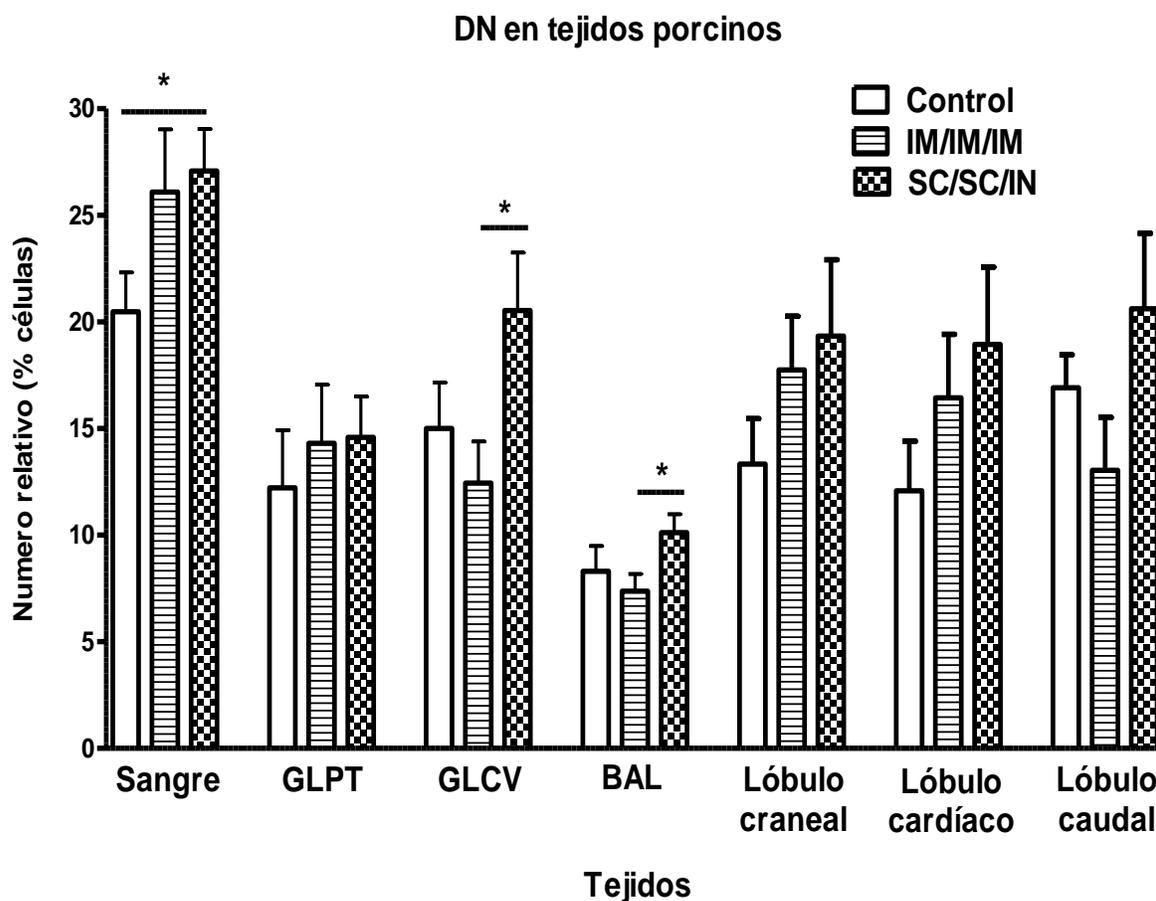


Figura 15. Valores relativos de linfocitos T DN (CD4-CD8-) en sangre, GLPT, GLCV, BAL y parénquima pulmonar. Los animales se distribuyeron en tres grupos: grupo control (barras vacías), vacunación convencional (IM, IM, IM) (barras con líneas horizontales) y vacunación combinada (SC, SC, IN) (barras con cuadrícula). Se muestra la comparación de porcentajes entre grupos por cada tejido. Cada barra representa el promedio de 5 animales más el error estándar de la media. Diferencia significativa de *** $P<0.001$, ** $P<0.01$ y * $P<0.05$. Prueba estadística *t* de Student. IM, intramuscular; SC, subcutánea; GLPT, ganglio linfático peritraqueal; GLCV, ganglio linfático cervical; BAL, lavado bronquioalveolar.

9. DISCUSIÓN

El pulmón es un órgano involucrado directamente con el intercambio gaseoso y posee estrategias de defensa ante el posible desarrollo de infecciones y otras agresiones. Los mecanismos innatos de defensa actúan protegiendo las vías aéreas a través del reflejo tusígeno, eliminación mucociliar y las propiedades antimicrobianas de la superficie de la mucosa (Jiménez-Álvarez y cols., 2009).

Los estudios para analizar el desarrollo del sistema inmunológico pulmonar en humanos tienen muchas limitaciones, que incluyen cuestiones éticas que limitan la toma de muestras de un tejido sano, la extracción de un órgano o realizar un lavado bronquioalveolar (BAL), por lo que es difícil reunir muestras representativas para estudios *in vitro* e *in vivo*. Hasta el momento la mayoría de los estudios inmunohistoquímicos, biopsias y lavados bronquiales que se han realizado sobre el sistema inmunológico del aparato respiratorio en humanos se han hecho en cadáveres (Richmond y cols., 1993; Tschernig y cols., 1995; Kracke y cols., 1997; Hiller y cols., 1998; Debertain y cols., 2003), por lo cual existe la necesidad de usar modelos animales experimentales para estudiar el sistema inmunológico respiratorio. Se han realizado muchos estudios usando como modelo de experimentación a los roedores (Márquez y cols., 2000; Kocks y cols., 2007; Sabirov y cols., 2008; Sosa y cols., 2009), sin embargo, el sistema inmunológico de los seres humanos y su ontogenia es diferente, en muchos aspectos, al de los roedores, sumado al tamaño de estos animales, ya que se necesitan grandes cantidades de tejido para obtener suficientes células.

El cerdo es en la actualidad un modelo animal importante en la investigación biomédica debido a su similitud anatómica y fisiológica con el humano, ya que es un animal de hábitos semejantes a los de los humanos, su alimentación es omnívora, el tamaño total es equiparable al humano, tiene una distribución de órganos semejante, el crecimiento de los órganos es proporcional y el desarrollo se puede equiparar con el del hombre, además, la distribución, frecuencia, morfología, ontogenia, y desarrollo del tejido linfoide asociado a la mucosa respiratoria es similar al de los seres humanos (Rothkötter y cols. 2002; Sedgmen y cols., 2004; Padilla-Carlín y cols., 2008).

El aparato respiratorio inferior se refiere a menudo como parte del sistema inmunológico común de las mucosas cuando en realidad es completamente diferente de otros miembros comunes, especialmente el intestino. Los bronquiolos y alvéolos no tienen una flora microbiana comensal residente y el pulmón es esencialmente estéril debajo de la laringe (Halliwey y Gorman, 1992; Delventhal y cols., 1992).

Se ha observado que el problema en el tracto respiratorio corresponde a las respuestas inmunológicas primarias, no secundarias. Durante una respuesta primaria, la frecuencia de células específicas al antígeno es baja y como consecuencia los patógenos pueden reproducirse sin control durante un periodo significativo de tiempo. Esto hace que se presente daño tisular y liberación de altos niveles de citocinas y quimiocinas inflamatorias. La ola de células reclutadas, como consecuencia de ello, unido a la alta carga antigénica, causa la obstrucción de los espacios aéreos y la presencia de daños extensos. Durante una respuesta secundaria, sin embargo, los anticuerpos y los linfocitos T de memoria están preparados para reducir la carga de antígenos, se disminuyen las señales inflamatorias y se produce una menor carga antigénica resultando en una respuesta inmunológica más contenida y corta (Goulding y cols., 2007).

El virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) causa una infección natural en los cerdos similar a la del virus del herpes simple (VHS) en el hombre. El VEA es un virus neuroinvasivo con un amplio rango de hospederos que sólo excluye los primates. La gravedad de los datos clínicos resultantes de la infección con este virus está determinada por la edad y el estado inmunológico del animal, así como la virulencia y la dosis de exposición del virus (Zuckermann, 2000), los signos clínicos nerviosos se presentan en animales muy jóvenes mientras que en animales más grandes (después del destete) se observan signos respiratorios (Chinsakchai y Molitor, 1994; Mettenleiter, 1996; Bouma y cols., 1997; Zuckermann, 2000; Wong y Pamer, 2003; Cano y cols., 2007).

Análisis de la respuesta inmune de IgG e IgA sérica porcina después de la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky

A menudo los anticuerpos específicos para los antígenos de la superficie viral resultan cruciales para frenar la diseminación de un virus durante la infección aguda y para proteger contra la reinfección. Los anticuerpos tienen eficacia particular para proteger contra la infección si se localizan en el sitio de entrada del virus en el cuerpo. La mayor parte de los virus expresa moléculas receptoras en su superficie que les permite iniciar la infección al fijarse a moléculas membranales específicas de la célula hospedera. Si se produce un anticuerpo contra el antígeno viral, puede bloquear la infección y a la vez prevenir la fijación de las partículas virales a la célula hospedera. Las vías respiratorias se pueden dividir en la parte superior (nariz, faringe, laringe y tráquea), donde la IgA es la inmunoglobulina predominante, y la parte inferior que consiste en el pulmón, donde la IgG es más abundante que otras inmunoglobulinas (Halliwell y Gorman, 1992; Delventhal y cols. 1992; Pabst y Binns, 1994). El desarrollo de la inmunidad mucosal y la IgA secretoria son importantes en la defensa del hospedero contra los virus al bloquear la fijación viral a las células epiteliales de la mucosa (Halliwell y Gorman, 1992; Bailey y cols., 2005).

La evidencia de que la infección por el VEA provoca tanto la respuesta inmunitaria humoral y mediada por células es ampliamente reconocida (Zuckermann, 2000). Una respuesta inmunitaria humoral tras la infección experimental o la vacunación de cerdos con VEA se ha detectado que se compone de anticuerpos neutralizantes del virus, los anticuerpos capaces de mediar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y los anticuerpos capaces de mediar la lisis mediada por complemento de las células infectadas con VEA (Zuckermann y cols. 1990). Gran parte de la respuesta humoral neutralizante se dirige contra las glicoproteínas codificadas por el virus, en particular, contra la glicoproteína gIII (Zuckermann y cols. 1990, Ober y cols., 1998; Zuckermann, 2000; Pejsak y Truszczynski, 2006).

El presente estudio demuestra, en términos generales, que las concentraciones de anticuerpos IgG e IgA anti-VEA, en el suero, van en aumento conforme se dan las

inmunizaciones y son superiores con respecto al control después del desafío viral (figuras 9 y 10).

La IgG constituye alrededor del 80% del total de las inmunoglobulinas séricas, lo cual se observa en este trabajo ya que se encuentra en mayor cantidad en comparación que la IgA (figuras 9 y 10), y entre sus principales funciones está la opsonización de los agentes patógenos para que los fagocitos los endociten y activa el sistema del complemento ya que actúa principalmente en tejidos del cuerpo donde hay disponibilidad de células y moléculas accesorias, por lo mismo está presente en mayor cantidad en el aparato respiratorio inferior ya que proviene de la transudación sanguínea en ese lugar. Como se pudo observar en esta investigación la concentración de IgG anti-VEA específica aumento después de la pre-inmunización en el grupo de vacunación combinado (SC/SC/IN) respecto al testigo; mientras que el grupo de vacunación convencional (IM/IM/IM) después de la segunda inmunización (figura 9) y se puede suponer que esta elevación de la concentración de IgG anti-VEA específica también se da en el tracto respiratorio inferior donde también se encuentran los macrófagos alveolares que ayudan a eliminar los antígenos virales que lograron llegar a este sitio.

Pese a que la IgA solo constituye el 10% del total de las inmunoglobulinas séricas, encontrándose en menor proporción en comparación que la IgG (figuras 9 y 10), es la clase de inmunoglobulina que predomina en secreciones externas, como la leche materna, saliva, lágrimas y moco de las vías bronquiales, genitourinarias y digestivas. En el suero, la IgA existe sobre todo como un monómero, pero en ocasiones se observan formas poliméricas. En los mamíferos, una de las características que definen el sistema inmunitario de las mucosas es la producción de anticuerpos secretores de la clase IgA. Las peculiaridades de la IgA como Ig basal de la mucosa incluyen el transporte a través de las células epiteliales (mediada por el receptor de Ig poliméricas), resistencia a la actividad proteolítica y la unión al moco. Funcionalmente, la IgA no parece influir directamente en la composición de la microflora comensal, sin embargo, actúa para evitar la adherencia de las bacterias o toxinas a las células diana, y puede neutralizar los virus y las toxinas, entre otras características (Bailey y cols., 2005; Eng y cols., 2010). Y como se observó en esta

investigación, las concentraciones séricas de IgA anti-VEA específicas aumentaron después de la pre-inmunización en el protocolo de vacunación combinada (SC/SC/IN), mientras que en el grupo de vacunación convencional (IM/IM/IM) aumentan después de la primera inmunización y, ambos grupos, se mantuvieron elevados hasta después del desafío (figura 10) y esto puede ser un reflejo de lo que sucede en la superficie mucosal.

La eficacia de una vacuna anti-VEA depende del programa de inmunización, la cepa del virus de la vacuna, el nivel de exposición al virus y el nivel de anticuerpos maternos en el momento de la vacunación (Zuckermann, 2000). La ruta de la vacunación también es importante. En contra de la intuición, varios trabajos han reportado que la vacunación intranasal no parece conferir un mayor nivel de inmunidad protectora que la vacuna parenteral contra VEA (Arellano y cols., 1992; Vilnis y cols., 1998; Labarque y cols., 1999; Zuckermann, 2000). Este efecto es más probable debido al hecho de que aunque la infección por VEA se inicia como una infección respiratoria, el virus se propaga rápidamente por vía sistémica y ataca el sistema nervioso central y el sistema reproductivo de las cerdas gestantes (Zuckermann, 2000).

Además el protocolo de inmunización combinada, utilizado en esta investigación, implica primeramente dar dos inmunizaciones parenterales (subcutáneas) y una mucosal (intranasal) a diferencia de los trabajos mencionados anteriormente donde solo utilizan la inmunización intranasal, por lo cual, hasta cierto punto, es normal que las concentraciones séricas de anticuerpos IgG e IgA anti-VEA específicos en los dos protocolos de inmunización sean muy parecidos entre sí, pero superiores al grupo control.

Sin embargo, el nivel de anticuerpos en los animales vacunados no siempre correlaciona con protección frente al desafío con el virus virulento, lo que indica que aunque los anticuerpos pueden proporcionar cierta resistencia a la infección, no pueden desempeñar un papel fundamental en la inmunidad protectora, ya que la vacunación tradicional (IM) no evita la infección con el VEA y solo puede reducir los síntomas en los animales y estos pueden ser portadores sanos (Chinsakchai y Molitor, 1994; Mettenleiter, 1996; Bouma y cols., 1997; Zuckermann, 2000; Wong y Pamer, 2003).

En este estudio se demostró que ambos protocolos de inmunización proveen al cerdo de una respuesta inmunológica sérica específica contra el VEA, pero para evaluar si esta respuesta es protectora se tienen que realizar otras pruebas como son la determinación de la diseminación y el aislamiento viral en diversos tejidos del cerdo, ganancia de peso, evaluación de los signos clínicos de los animales, etc.

Análisis de la prueba de intradermorreacción después de la inmunización con el virus de la enfermedad de Aujeszky

Cuando la subpoblación de células T_H1 activada se encuentra con ciertos tipos de antígenos, secreta citocinas que inducen una reacción inflamatoria localizada que se denomina de hipersensibilidad retardada, tardía o de tipo IV. El desarrollo de la reacción de hipersensibilidad tipo IV inicia con una primera fase de sensibilización con el antígeno donde las CPA presentan el antígeno a los linfocitos T, en general los linfocitos T que se activan durante la fase de sensibilización son $CD4+$, sobre todo del subtipo T_H1 (Goldsby y cols. 2004), pero se ha visto que después de la inmunización con el VEA la respuesta linfoproliferativa mediada por los linfocitos T $CD4+$ se da en menor grado (Zuckermann y cols. 1990; Summerfield y cols., 1996; Zuckermann y Husmann, 1996) y, como muestran los resultados obtenidos en esta investigación, los linfocitos T $CD4+$ contra el virus de la enfermedad de Aujeszky no presentan diferencias entre los grupos de inmunización en la proporción de estas células (figura 12). Posteriormente la exposición al antígeno induce que las células T_H1 secreten diversas citocinas que reclutan y activan macrófagos y otras células inespecíficas que se filtran en el sitio de inoculación del antígeno.

En los resultados obtenidos en este trabajo no hubo la presencia de lesión, induración o eritema cutáneo a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la realización de la prueba de ID esto tal vez se debe a que la inmunización con antígeno inactivado de VEA produce una respuesta específica, en menor grado, de los linfocitos T $CD4+$ contra el VEA y al momento de realizar la prueba de ID se reclutan muy pocos macrófagos al sitio de inoculación.

Además es importante recordar que se administra un antígeno inactivado (muerto), por lo cual la presentación de este va a ser de forma exógena lo cual va a favorecer una

respuesta T_H2, que no va a inducir la producción de IFN- γ necesaria para reclutar macrófagos hacia el sitio de inoculación.

También se sugiere aplicar la intradermorreacción después del desafío, ya que al presentar la infección se favorecerá la presentación del antígeno de VEA de forma endógena lo cual tal vez origine una respuesta T_H1 que, posteriormente, al exponerse al antígeno de VEA inactivo (intradermorreacción) las células T_H1 activadas por el virus vivo desencadenaran la producción de IFN- γ para de esta manera reclutar macrófagos hacia el sitio de inoculación.

Análisis de las subpoblaciones de linfocitos T después de la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky

Existen dos subpoblaciones de linfocitos T bien definidas: linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos, las cuales pueden diferenciarse entre sí por la presencia de las glicoproteínas de membrana CD4 o CD8, respectivamente, en su superficie. Pero es importante aclarar que estos marcadores no son exclusivos de las poblaciones de linfocitos T, ya que el marcador CD4 es una glicoproteína de 55 kDa expresada en la superficie de timocitos, linfocitos T cooperadores, macrófagos/monocitos y células progenitoras hematopoyéticas (Bowers y cols., 1997; Fournier y cols., 2010), mientras que CD8 es una glicoproteína transmembranal que actúa como un co-receptor para el receptor de células T (TCR), es predominantemente expresada en la superficie de los linfocitos T citotóxicos, timocitos, células NK y células dendríticas (Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004); por lo cual en esta investigación se analizó primeramente la expresión de CD3, ya que es un complejo expresado exclusivamente en los linfocitos T, compuesto por cuatro cadenas distintas. En los mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 γ , una cadena de CD3 δ , y dos cadenas CD3 ϵ . Estas cadenas se asocian el receptor de la célula T (TCR) y a la cadena ζ para generar una señal de activación de los linfocitos T. De esta manera se aseguró que para el análisis de las poblaciones celulares solo se tomaron linfocitos T, ya que en otros trabajos (Zuckermann y cols., 1990; Summerfield y cols., 1996; Zuckermann y Husmann, 1996; Zuckermann y Gaskins, 1996;

Obber y cols., 1998) solo se analizó la presencia de CD4 y CD8 que son marcadores que otras células, además de los linfocitos T, pueden expresar.

Evaluación de los linfocitos T CD4+ después de la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky

Los linfocitos T que expresan el marcador CD4, están restringidos para reconocer antígeno unido a moléculas de MHC clase II y suelen funcionar como linfocitos T cooperadores, los cuales dirigen la respuesta inmunológica mediante la secreción de citocinas que juegan una función central en la activación de los linfocitos B, linfocitos T y otras células que participan en la reacción inmunitaria. En algunos trabajos se ha demostrado que después de la inmunización con el VEA (Summerfield y cols., 1996; Zuckermann y cols. 1990; Zuckermann y Husmann, 1996) la respuesta linfoproliferativa mediada por los linfocitos T CD4+ se da en menor grado, respecto a la dada por los linfocitos T CD8+, lo cual es muy parecido a lo observado en esta investigación, ya que en ningún tejido hubo una diferencia significativa de los grupos de vacunación (IM/IM/IM y SC/SC/IN) con respecto al grupo control (figuras 12 y 13). Además, es importante remarcar que el grupo testigo también fue desafiado antigénicamente con el VEA y tal vez por eso se encuentran valores altos de linfocitos T CD4+ en los tejidos analizados de este grupo, ya que en el momento del sacrificio están cursando con la infección.

Evaluación de los linfocitos T CD8+ después de la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ son esenciales para la protección contra los virus, la infección por bacterias intracelulares y células tumorales. Las células T CD8+ reconocen péptidos derivados de agentes patógenos asociados al MHC clase I en la superficie de células infectadas. Los linfocitos T CD8 expresan una variedad de moléculas efectoras que median la defensa contra los patógenos, la citólisis directa de las células diana, mediada por la liberación de perforinas y Fas encabezan la lista. Los linfocitos T CD8 también secretan citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) e IFN- γ , que juegan un papel importante en la defensa antimicrobiana (Wong y Pamer, 2003), y como se ha

reportado (Zuckermann y cols., 1998) la producción de IFN- γ es esencial ante la estimulación *in-vitro* con el VEA. Los linfocitos T CD8+ desempeñan un papel importante en la inmunidad adaptativa, recién se les ha atribuido un papel en la inmunidad innata, donde independientemente de la unión del receptor de linfocitos T, los linfocitos T CD8 pueden desarrollar una respuesta contra patógenos secretando ciertas citocinas y eliminando directamente células tumorales (Jiménez-Álvarez y cols., 2009). A raíz de la infección por virus de la influenza, los linfocitos T CD8 eliminan el patógeno y proporcionan inmunidad a largo plazo contra la reinfección. Por el contrario, los herpes virus causan infecciones latentes y permanecen con el anfitrión para toda la vida, entonces son constantemente mantenidos a raya por los linfocitos T CD8 (Wong y Pamer, 2003). Varios reportes señalan que la inmunización con una vacuna VEA viva genera una robusta respuesta de los linfocitos T citotóxicos (Zuckermann y cols., 1990; Mettenleiter, 1996; Zuckermann, 2000) y como se muestra en este trabajo los linfocitos T citotóxicos presentaron un mayor porcentaje de células en los ganglios linfáticos de los cerdos del grupo de vacunación intramuscular con respecto al grupo de vacunación combinada (SC/SC/IN) (figura 13) al igual que en el parénquima pulmonar donde además también se observó un mayor porcentaje de linfocitos citotóxicos con respecto al grupo control. Pero también se debe aclarar que un alto número de linfocitos T CD8+, no necesariamente indica una mejor respuesta inmune, ya que un número elevado de estas células también puede provocar un alto grado de inflamación en los tejidos, lo cual podría ser perjudicial para el organismo.

Evaluación de los linfocitos T DP después de la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky

Los linfocitos T DP (CD4+CD8+) TCR2 ($\alpha\beta$) son considerados tradicionalmente como timocitos inmaduros, los cuales van a sufrir una selección tímica para convertirse en linfocitos CD4+ o linfocitos CD8+ inmaduros, pasando por una selección positiva y negativa para eliminar las células capaces de responder a antígenos propios y posteriormente salen al sistema circulatorio (Basson y Zamoyska, 2000; Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004). En cerdos adultos normales, una proporción importante (10-60%) de los linfocitos

periféricos puede coexpresar los receptores CD4 y CD8, aunque en la sangre periférica humana son poco frecuentes (<3 %). Debido a la abundancia de CD4/CD8 dobles positivos (DP) en sangre periférica porcina, es importante entender el significado biológico de esta población no convencional. Los estudios sobre la inmunidad contra el VEA han aportado pruebas clave para la demostración de que las células dobles positivas CD4/CD8 se componen principalmente de células T de memoria y tienen una función auxiliar (Obber y cols., 1998; Zuckermann y Husmann, 1996).

En los resultados de esta tesis podemos observar que solo en el parénquima pulmonar hay un aumento en el porcentaje de los linfocitos DP en el grupo control y el grupo de vacunación intramuscular con respecto al grupo de vacunación combinada (SC/SC/IN) (figura 14). Algunos estudios (Summerfield y cols., 1996; Zuckermann y Husmann, 1996) proponen que los linfocitos DP obtenidos de cerdos inmunizados con el VEA son los primeros en proliferar ante una estimulación *in-vitro* y aumentan en proporción de acuerdo con la edad del cerdo, de ahí que se crea que se compone en su mayoría por células de memoria. También se ha sugerido que el comportamiento de estas células aumenta en los sitios de inflamación y replicación viral, ya que los linfocitos con un fenotipo DP se destacaron entre las células T infiltrantes de lesiones consolidadas del pulmón de cerdos infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae* (Zuckermann, 1999) y en casos de infecciones virales estas células aumentan su proporción en los sitios de replicación (Nascimbeni y cols., 2004), por lo cual, de acuerdo a los datos obtenidos en esta investigación, se sugiere que en el grupo de inmunización convencional (IM/IM/IM), en el cual se observa un aumento en la proporción de linfocitos T DP en el pulmón (figura 15) y linfocitos T CD8+ (figura 13), tal vez exista un mayor grado de inflamación pulmonar, lo cual favorecería el infiltrado de estas células hacia el lóbulo craneal con respecto al grupo de vacunación combinada (SC/SC/IN) (figura 14). Además, se sabe que por la aireación el VEA llega primeramente a este lóbulo donde se replica y causa más daño, seguido por el lóbulo cardíaco, donde también se encuentra un mayor porcentaje de estas células en el grupo control y de vacunación convencional con respecto al de vacunación combinada, y por último el lóbulo caudal donde sólo en el grupo control se encuentra un

mayor porcentaje de estas células debido, tal vez, a que este grupo no estaba protegido y el virus pudo acceder fácilmente hasta este lugar, pero para determinar si efectivamente hubo un mayor grado de inflamación en los pulmones de los grupos control y de vacunación convencional con respecto al grupo de vacunación combinada es importante evaluar la presencia de lesiones, consolidaciones y diseminación viral en los pulmones de los cerdos de cada grupo.

Evaluación de los linfocitos T DN después de la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky

En el timo las células negativas a los marcadores CD4 y CD8, son denominadas timocitos dobles negativos (DN) los cuales posteriormente maduran a timocitos dobles positivos (Basson y Zamoyska, 2000; Janeway y cols., 2003; Goldsby y cols., 2004). Pero fuera del timo la población de linfocitos T DN (CD4-CD8-) está compuesta en su mayoría de células portadoras del TCR1 ($\gamma\delta$) y TNK. El papel de estas células es aún desconocido pero se relaciona con la respuesta inmunitaria innata a materiales extraños, además parecen ser el tipo de células T predominante en ciertos tejidos epiteliales, tales como la piel y el intestino (Vega-López y cols., 1993; 2001, Vega-López, 2007). Además, en ratones se ha visto que estas células podrían estar involucradas en la regulación de la respuesta inmunológica (Strober y cols., 1996; Zhang y cols., 2001) mediante la producción de TGF- β , IL-10 e IL-4. Y como muestran los resultados de esta investigación, el porcentaje de células DN fue predominante en todos los tejidos analizados y solo en el BAL y GLCV la cantidad de células DN del grupo de vacunación combinada (SC/SC/IN) fue mayor a la cantidad presente en el grupo de vacunación convencional (IM/IM/IM) (figura 15). Esto tal vez se deba, en el caso del GLCV a la cercanía de éstos con la zona de inoculación SC, detrás de la oreja, y en el BAL porque los animales del grupo de vacunación combinada recibieron una inmunización intranasal y estas células estuvieron en contacto con el antígeno antes del desafío antigénico por lo cual en el momento del desafío estas células actuaron rápidamente regulando la respuesta inmunitaria para enfrentar la infección viral evitando el desarrollo de inflamación y favoreciendo la respuesta inmunológica dada por anticuerpos, cabe aclarar que esto es solo una suposición ya que de estas células se

desconoce claramente su actividad y por lo mismo es importante seguir estudiando el papel que desempeñan en la respuesta inmunológica del organismo.

En sangre se encontraron niveles altos de estas células en el grupo de inmunización combinada con respecto al control (figura 15), que de acuerdo a Yang y Parkhouse, (1996) la sangre de cerdos sanos contiene hasta 19% de estas células y nuestro grupo control se encuentra en el límite, recordando que el grupo control al momento del sacrificio está cursando con la infección viral. Además, en los grupos inmunizados se observan porcentajes más altos de estas células en la circulación sanguínea, tal vez debido a las inmunizaciones parenterales que sufrieron estos cerdos (figura 9 y 10).

También en todas las poblaciones de linfocitos T presentes en los diversos tejidos analizados se observó una disminución en su porcentaje, a comparación de otros estudios descriptivos (Delventhal y cols., 1992; Zuckermann y Gaskins, 1996; Yang y Parkhouse, 1997), lo cual tal vez se deba a que existe evidencia clínica de que la infección por VEA natural y experimental es inmunosupresora (Chinsakchai y Molitor, 1992, 1994; Mettenleiter, 1996). La mayoría de los estudios que mostraron un marcado efecto inmunosupresor del VEA en las células inmunocompetentes se realizaron *in vitro*. En un experimento en el cual se infectaron monocitos de sangre periférica con VEA se observó que esto conduce a altos títulos de la progenie viral y la destrucción de las células infectadas por el virus (Chinsakchai y Molitor, 1992). En otro experimento se tomaron leucocitos circulantes y de igual manera se infectaron *in-vitro* con el VEA observándose una reducción de linfocitos CD4 y CD8 circulantes (Page y cols., 1992). Por lo mismo, para este trabajo, se decidió realizar el cultivo de las células obtenidas para ver si se encontraban efectos inmunosupresores en estas ya que provenían de animales infectados y probablemente en los cultivos había la presencia del virus de VEA.

Los datos de la respuesta de linfocitos T específicos contra el VEA obtenidos en esta investigación sugieren que la principal respuesta inmunológica mediada por células contra el virus en el protocolo de vacunación convencional (IM/IM/IM) se encuentra dada por los linfocitos T CD8+ y DP, lo cual podría resultar perjudicial en el pulmón ya que traería

consigo un alto reclutamiento celular en el sitio de la infección provocando un mayor grado de inflamación y daño en los tejidos pulmonares, mientras que en el grupo de vacunación combinada (SC/SC/IN) se observó un menor porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T pulmonares, lo cual podría deberse a que la protección en este sitio se originó desde la vacunación intranasal, y al momento de la infección, estas poblaciones actuaron rápidamente para evitar la replicación viral sin reclutar más células al sitio de infección evitando el desarrollo de inflamación. O también podría ser lo opuesto, que la alta cantidad de células citotóxicas protegería mejor y su ausencia permitiría una mayor replicación viral, de ahí la importancia de realizar pruebas histológicas o de diseminación viral para reforzar las postulaciones que se hacen en este trabajo. Además es importante seguir estudiando el papel de los linfocitos T CD4+ y DN en la respuesta inmunológica del hospedero en la infección con el VEA, ya que como se observó en este trabajo son las células que se encuentran en mayor número en los tejidos estudiados.

Este estudio puede ayudar a mejorar los protocolos de vacunación mucosal tanto en medicina veterinaria como en medicina humana ya que se demostró que las inmunizaciones combinadas (sistémica- mucosal) produce una buena respuesta inmunitaria contra el VEA, al mismo nivel que la vacunación convencional, sin embargo, es importante seguir estudiando y desarrollando técnicas que nos permitan evaluar la respuesta inmunológica celular, ya que muchas veces la respuesta inmunitaria sérica no protege a los animales sólo disminuye los signos clínicos de la enfermedad, que como consecuencia nos admitirá producir una respuesta inmunológica protectora en las mucosas, que son los sitios de entrada de los patógenos al organismo.

10. CONCLUSIONES

Tanto el protocolo de vacunación combinado (SC/SC/IN) como el de vacunación convencional (IM/IM/IM) con el virus inactivado de la enfermedad de Aujeszky, inducen respuestas humorales de IgG e IgA específicas contra el VEA en cerdos convencionales destetados, sin embargo, el estudio debe evaluar también los parámetros patológicos para determinar el grado de protección conferido.

Al analizar los datos de la respuesta inmunológica mediada por linfocitos T específicos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky se observó un aumento en el porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ y DP (CD4+CD8+) en el grupo de vacunación convencional (IM/IM/IM) lo cual podría provocar un mayor grado de inflamación y daño en los tejidos pulmonares. En contraste, se detectó una disminución de esas células en el grupo de vacunación combinada (SC/SC/IN) lo cual podría deberse a que estas subpoblaciones actuaron rápidamente, al momento de la infección, para evitar la replicación viral sin reclutar a más células al sitio de infección evitando el desarrollo de inflamación o también podría ser que la respuesta humoral fuera más efectiva evitando una infección masiva, pero para comprobar esto es importante realizar pruebas histológicas para evaluar la presencia de lesiones, consolidaciones, así como también evaluar la diseminación viral en los pulmones de los cerdos de cada grupo.

Además es importante seguir estudiando el papel que llevan a cabo los linfocitos T CD4+ y DN (CD4-CD8-) en la respuesta inmunológica del hospedero en la infección con el virus de la enfermedad de Aujeszky.

11. ANEXOS

Soluciones.

Solución salina fisiológica (SSF)

Cloruro de sodio (NaCl)..... 0.9 %

Agua destilada

Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2-7.4

Cloruro de sodio (NaCl)..... 137 mM

Cloruro de potasio (KCl)..... 2.7 mM

Fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄)..... 4.3 mM

Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄)..... 1.4 mM

Agua destilada

Amortiguador de lisis de eritrocitos

Cloruro de amonio (NH₄Cl)..... 0.14 M

Bicarbonato de potasio (KHCO₃)..... 1 mM

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (C₁₀H₁₆N₂O₈)..... 0.1 mM

Agua destilada

Medio RPMI-1640 incompleto

RPMI-1640 Medium (con L-glutamina y 25 mM HEPES, sin NaHCO₃) (Sigma-Aldrich® No. Catalogo R4130-10X1L)..... 1 frasco

Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)..... 2 g

Agua bidestilada..... c.b.p. 900 ml

Ajustar pH a 7.2 y esterilizar la solución por filtración en membrana de 0.22 µm. Realizar pruebas de esterilidad. Completar a un litro.

Medio RPMI-1640 completo

Glutamina (C₅H₁₀N₂O₃)..... 0.2 mM

Piruvato de sodio (C₃H₃NaO₃)..... 0.1 mM

Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanol sulfónico (HEPES) (C₈H₁₈N₂O₄S)..... 1 mM

β -mercaptoetanol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$)..... 0.1 μM
Gentamicina ($\text{C}_{21}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_7$)..... 40 mg/ml
Suero fetal bovino (SFB)..... 10 %

Medio RPMI-1640 incompleto

Esterilizar la solución por filtración en membrana de 0.22 μm . Realizar pruebas de esterilidad.

Solución con enzima (colagenasa)

Colagenasa tipo IV (Worthington Biochemical Corporation, USA)..... 150 UI/ml

Medio RPMI-1640 incompleto

Solución de azul de tripano

Azul de tripano..... 0.4 %

Solución salina fisiológica

Solución fijadora de *p*-formaldehído

p-formaldehído 1 %

Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS)

Solución A de citometría de flujo

Suero normal de cerdo (descomplementado)..... 5 %

Azida de sodio (NaN_3)..... 0.1 %

Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS)

Solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 0.5 M..... 2.5 ml

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0.5 M..... 7.5 ml

Agua destilada..... c.b.p. 100 ml

Solución general para la técnica de ELISA IgG pH 8.0

Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) [$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$]..... 50 mM

Cloruro de sodio (NaCl)..... 0.14 M

Agua destilada

Solución de lavado para la técnica de ELISA IgG

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris) [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂].....	50 mM
Cloruro de sodio (NaCl).....	0.14 M
Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆).....	0.05 %
Agua destilada	

Solución de bloqueo para la técnica de ELISA IgG

Tris (hidroximetil)aminometano (Tris) [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂].....	50 mM
Cloruro de sodio (NaCl).....	0.14 M
Albúmina sérica bovina (BSA).....	1 %
Agua destilada	

Solución de dilución para la técnica de ELISA IgG

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris) [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂].....	50 mM
Cloruro de sodio (NaCl).....	0.14 M
Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆).....	0.05 %
Albúmina sérica bovina (BSA).....	1 %
Agua destilada	

Solución amortiguadora de citratos pH 5.0

Citrato de sodio dihidratado (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2 H ₂ O).....	0.02 M
Ácido cítrico monohidratado (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O).....	0.01 M
Agua destilada	

Solución de 3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina

3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) (C ₁₆ H ₂₀ N ₂).....	1 mg/ml
Dimetilsulfóxido (DMSO) (CH ₃ SOCH ₃)	
Mantener a -20°C	

Solución de revelado para la técnica de ELISA IgG

3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) (C ₁₆ H ₂₀ N ₂) [1 mg/ml].....	1 ml
---	------

Peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (30%)..... 2 μ l
Solución amortiguadora de citratos pH 5.0..... 10 ml

Solución de paro para la técnica de ELISA IgG

Ácido sulfúrico (H_2SO_4)..... 2 M
Agua destilada

Solución general para la técnica de ELISA IgA (PBS-Tween) pH 7.4

Cloruro de sodio (NaCl)..... 137 mM
Cloruro de potasio (KCl)..... 2.7 mM
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)..... 4.3 mM
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)..... 1.4 mM
Polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20) ($C_{58}H_{114}O_{26}$)..... 0.05 %
Agua destilada

Solución amortiguadora de dietanolamina

Dietanolamina ($C_4H_{11}NO_2$)..... 1 mM
Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 0.5 M..... 1 ml
Agua destilada..... c.b.p. 1000 ml

Solución stock de *p*-nitrofenil fosfato (PNPP)

p-nitrofenilfosfato (PNPP)..... 1g/10 ml

Solución amortiguadora de dietanolamina

Mantener a $-20^\circ C$

Solución de revelado para la técnica de ELISA IgA

p-nitrofenilfosfato (PNPP) [1g/10 ml]..... 100 μ l
Solución amortiguadora de dietanolamina..... 10 ml

Solución de paro para la técnica de ELISA IgA

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)..... 0.5 M
Agua destilada

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, Abul K. y Lichtman, Andrew H. (2004) *Inmunología celular y molecular*. 5ª edición, Elsevier. Madrid, España. Pg. 563.
2. Alcón, V. L.; Baca-Estrada, M.; Vega-López, M. A; Willson, P.; Babiuk, L. A.; Kumar, P. and Foldvari, M. (2005) *Intranasal immunization using biphasic lipid vesicles as delivery systems for Oml A bacterial protein antigen and CpG oligonucleotides adjuvant in a mouse model*. J. Pharm. Pharmacol. 57: 955–961.
3. Alcón, Valeria; Baca-Estrada, María; Vega-López, Marco; Willson, Philip; Babiuk, Lorne A.; Kumar, Praveen; Hecker, Rolf and Foldvari, Marianna. (2005) *Mucosal Delivery of Bacterial Antigens and CpG Oligonucleotides Formulated in Biphasic Lipid Vesicles in Pigs*. The AAPS Journal. 7 (3) 566-571.
4. Arellano, Pablo E.; Morrison, Robert B.; Molitor, Thomas W.; Thawley, David G. (1992) *High- and low- challenge exposure doses used to compare intranasal and intramuscular administration of pseudorabies virus vaccine in passively immune pigs*. J Am Vet Med Assoc. 5: 685-691.
5. Bailey, M.; Haverson, K.; Inman, C.; Harris, C.; Jones, P.; Corfield, G.; Miller, B. and Stokes, C. (2005) *The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function*. Proc. Nutr. Soc. 64: 451–457.
6. Bals, R. y Hiemstra, P.S. (2004) *Inmunidad natural en el pulmón: cómo combaten las células epiteliales los patógenos respiratorios*. Eur. Respir. J. (edición española). 5(3): 163-170.
7. Basson, M. Albert and Zamoyska, Rose. (2000) *The CD4/CD8 lineage decision: integration of signalling pathways*. Immunology Today. 21(10): 509-514.
8. Bienenstock, J. and McDermott M. R., (2005) *Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues*. Immunol Rev. 206: 22-31.
9. Binns, R. M.; Pabst, R. & Licence, S. T. (1988) *Subpopulations of T lymphocytes emigrating in venous blood draining pig thymus labeled in vivo with fluorochrome*. Immunology. 63: 261-267.

10. Binns, R.M.; Pabst, R. (1994) *Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig*. Vet. Immunol. Immunopathol. 43: 79-87.
11. *Boletín de vigilancia epidemiológica*, semana 52, 27/dic./2009-2/ene/2010. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE)-Secretaría de Salud.
12. Bouma A.; Zwart R.J.; De Bruin M.G.M.; De Jong M.C.M.; Kimman T.G.; Bianchi A.T.J. (1997) Immunohistological characterization of the local cellular response directed against pseudorabies virus in pigs. Vet. Microbiol. 58: 145-154.
13. Bowers, Katherine; Pitcher, Carol; Marsh, Mark. (1997) *CD4: A Co-receptor in the Immune Response and HIV Infection*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 29(6): 871-875.
14. Cano, Jean Paul; Dee, Scott A.; Murtaugh, Michael P.; Trincado, Carlos A.; Pijoan, Carlos B. (2007) *Effect of vaccination with a modified-live reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 68(5): 565-571.
15. Chinsakchai, Sudarat and Molitor, Thomas W. (1992). *Replication and immunosuppressive effects of Pseudorabies virus on swine peripheral blood mononuclear cells*. Vet. Immunol. Immunopathol. 30: 247-260.
16. Chinsakchai, Sudarat; Molitor, Thomas W. (1994) *Immunobiology of pseudorabies virus infection in swine*. Vet. Immunol. Immunopathol. 43: 107-116.
17. Constant, Stephanie L. and Bottomly, Kim. (1997) *Induction of Th1 and Th2 CD4 T Cell Responses: The Alternative Approaches*. Annu. Rev. Immunol. 15: 297-322.
18. Debertin, A. S.; Tschernig, T.; Tönjes, H.; Kleemann, W. J.; Tröger, H. D. & Pabst, R. (2003) *Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children*. Clin Exp Immunol. 134: 503-507.
19. DeKruyff, R.H.; Ju, S.T.; Hunt, A.J.; Mosmann, T.R. & Umetsu, D.T. (1989) *Induction of antigen-specific antibody responses in primed and unprimed B cells. Functional heterogeneity among Th1 and Th2 T cell clones*. J. Immunol. 142: 2575-2582.

20. Delventhal, S.; Hensel, A.; Petzoldt, K. & Pabst, R. (1992) *Cellular changes in the bronchoalveolar lavage (BAL) of pigs, following immunization by the enteral or respiratory route*. Clin. Exp. Immunol. 90: 223-227.
21. Duramad, Paurene; McMahon, Christopher W.; Hubbard, Alan; Eskenazi, Brenda and Holland, Nina T. (2004) *Flow Cytometric Detection of Intracellular Th1/Th2 Cytokines Using Whole Blood: Validation of Immunologic Biomarker for Use in Epidemiologic Studies*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 13(9): 1452-1458.
22. Eng, Nelson F.; Garlapati, Srinivas; Gerdt, Volker; Babiuk, Lorne A.; Mutwiri, George K. (2010) PCEP enhances IgA mucosal immune responses in mice following different immunization routes with influenza virus antigens. Journal of Immune Based Therapies and Vaccines. 8(4): 1-11.
23. Fainboim, Leonardo y Geffner, Jorge. (2005) *Introducción a la inmunología humana*. 5ª edición, Editorial Medica Panamericana. México, México. Pg. 485.
24. Fournier, Margot; Peyrou, Marion; Bourgoin, Lucie; Maeder,Christine; Tchou, Isabelle; Foti, Michelangelo. (2010) *CD4 dimerization requires two cysteines in the cytoplasmic domain of the molecule and occurs in microdomains distinct from lipid rafts*. Mol. Immunol. 47: 2594-2603.
25. Gerdt, Volker; Mutwiri, George K.; Tikoo, Suresh K.; Babiuk, Lorne A. (2006) *Mucosal delivery of vaccines in domestic animals*. Vet. Res. 37: 487-510
26. Goldsby, Richard A.; Kindt, Thomas J.; Osborne, Barbara A.; Kuby, Janis. (2004) *Inmunología*. 5a edición. McGraw Hill. México, México. Pg. 665.
27. Goulding, John; Snelgrove, Robert; Saldana, José; Didierlaurent, Arnaud; Cavanagh, Mary; Gwyer, Emily; Wales, Jeremy; Wissinger, Erika L. and Hussell, Tracy. (2007) *Respiratory Infections: Do We Ever Recover?* Proceedings of the American Thoracic Society. 4: 618-625.
28. Halliwell, R. E. W. y Gorman N. T. (1992) *Inmunología clínica veterinaria*. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 173-206.
29. Harty, John T. and Badovinac, Vladimir P. (2002) *Influence of effector molecules on the CD8+ T cell response to infection*. Immunology. 14: 360-365.

30. Hensel, A.; Pabst, R.; Bunka, S. & Petzoldt, K. (1994) *Oral and aerosol immunization with viable or inactivated Actinobacillus pleuropneumoniae bacteria: antibody response to capsular polysaccharides in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) and sera of pigs*. Clin. Exp. Immunol. 96: 91-97.
31. Hensel, Andreas; van Leengoed, Leo A.M.G.; Szostak, Michael; Windt, Horst; Weissenbijck, Herbert; Stockhofe-Zurwieden, Norbert; Katinger, Astrid; Stadler, Maria; Ganter, Martin; Bunka, Sebastian; Pabst, Reinhard; Lubitz, Werner. (1996) *Induction of protective immunity by aerosol or oral application of candidate vaccines in a dose-controlled pig aerosol infection model*. J. Biotechnol. 44: 171-181.
32. Hiller, A.S.; Tschernig, T.; Kleemann, W. J.; Pabst, R. (1998) *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT) and Larynx-Associated Lymphoid Tissue (LALT) are found at Different Frequencies in Children, Adolescents and Adults*. Scand. J. Immunol. 47: 159-162.
33. Holmgren, Jan & Czerkinsky, Cecil. (2005) *Mucosal immunity and vaccines*. Nature Medicine Supplement. 11(4): 545-553.
34. Huang, David B. (2006) *Common Respiratory Viruses and Pulmonary Mucosal Immunology*. En: *Mucosal Immunology and Virology*. Tying, Stephen K. Springer-Verlag. Londres, Inglaterra. Pp. 157-177.
35. Janeway Jr., Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark; Sclomchik, Mark J. (2003) *Inmunobiología*. 2ª edición, Masson. Barcelona, España. Pg. 731.
36. Jiménez-Álvarez, Luis Armando; Zúñiga Ramos, Joaquín y Ramírez-Martínez, Gustavo. (2009) *Mecanismos moleculares y celulares de la respuesta inmune en el pulmón*. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 22 (4): 304-315.
37. Katinger, Astrid; Lubitz, Werner; Szostak, Michael P.; Stadler, Maria; Klein, Reinhard; Indra, Alexander; Huter, Veronika; Hensel, Andreas. (1999) *Pigs aerogenously immunized with genetically inactivated (ghosts) or irradiated Actinobacillus pleuropneumoniae are protected against a homologous aerosol*

- challenge despite differing in pulmonary cellular and antibody responses* J. Biotechnol. 73: 251–260.
38. Kim, Taeg S.; Braciale, Thomas J. (2009) *Respiratory Dendritic Cell Subsets Differ in Their Capacity to Support the Induction of Virus-Specific Cytotoxic CD8+ T Cell Response*. PLoS One. 4(1): 1-13.
39. Kiyono, Hiroshi and Fukuyama, Satoshi.(2004) *NALT- Versus Peyer's-Patch-Mediated Mucosal Immunity*. Nature. 4: 699-710.
40. Kocks, Jessica R.; Davalos-Mislitz, Ana Clara Marques; Hintzen, Gabriele; Ohl, Lars and Förster, Reinhold. (2007) *Regulatory T cells interfere with the development of bronchus-associated lymphoid tissue*. JEM. (204)4: 723-734.
41. Kracke, Anja; Hiller, Anette Solveig; Tschernig, Thomas; Kasper, Michael; Kleemann, Werner Johann; Tröger, Hans Dieter and Pabst, Reinhard. (1997) *Larynx-Associated Lymphoid Tissue (LALT) in Young Children*. Anat. Rec. 248: 413–420.
42. Labarque, G. G.; Nauwynck, H. J.; Maes, O. G. and Pensaert, M. B. (1999) *Protection of fattening pigs against challenge with Aujeszky's disease virus after a successive intranasal/intramuscular vaccination*. Vet. Quart. 21(3): 104-107.
43. Liebler-Tenorio, Elisabeth M.; Pabst, Reinhard. (2006) *MALT structure and function in farm animals*. Vet. Res. 37: 257–280.
44. Lugton, Iw. (1999) *Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria*. Immunol. Cell Biol. 77: 364–372.
45. Márquez, María G.; Sosa, Gustavo A.; Roux, María E. (2000) *Developmental study of immunocompetent cells in the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) from Wistar rats*. Dev. Comp. Immunol. 24: 683-689.
46. Medaglini, Donata; Ciabattini, Annalisa; Cuppone, Anna Maria; Costa, Caterina; Ricci, Susanna; Costalonga, Massimo and Pozzi, Gianni. (2006) *In Vivo Activation of Naive CD4- T Cells in Nasal Mucosa-Associated Lymphoid Tissue following*

- Intranasal Immunization with Recombinant Streptococcus gordonii*. Infect. Immun. 74 (5): 2760–2766.
47. Mestecky, J., et al. (2003) *Mucosal immunology*. 3a edición. Vol. 1, Elsevier. Londres, Inglaterra. Pp. 50-72.
48. Mettenleiter, Thomas C. (1996) *Immunobiology of pseudorabies Aujeszky's Disease*. Vet. Immunol. Immunopathol. 54: 221-229.
49. Mettenleiter, Thomas C. (2000) *Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis – State of the art, June 1999*. Vet. Res. 31: 99–115.
50. Mosmann, Tim R. and Sad, Subash. (1996) *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. Immunology Today. 17(3): 138-146.
51. Nascimbeni, Michelina; Shin, Eui-Cheol; Chiriboga, Luis; Kleiner, David E. and Rehermann, Barbara. (2004) *Peripheral CD4+CD8+ T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions*. Blood. 104(2): 478-486.
52. Nauwynck, H. J. (1997) *Functional aspects of Aujeszky's disease (pseudorabies) viral proteins with relation to invasion, virulence and immunogenicity*. Vet. Microbiol. 55: 3-11.
53. Neumann, Eric J.; Kliebenstein, James B.; Johnson, Colin D.; Mabry, John W.; Bush, Eric J.; Seitzinger, Ann; Green, Alice L. and Zimmerman, Jeffrey J. (2005) *Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227(3): 385-392.
54. Neutra, Marian R. and Kozlowski, Pamela A. (2006) *Mucosal vaccines: the promise and the challenge*. Nature. (6) 148-158.
55. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
56. Ober, Bertram T.; Summerfield, Artur; Mattlinger, Christina; Wiesmüller, Karl-Heinz; Jung, Günther; Pfaff, Eberhard; Saalmüller, Armin; Rziha, Hanns-Joachim. (1998) *Vaccine-Induced, Pseudorabies Virus-Specific, Extrathymic CD4+CD8+ Memory T-Helper Cells in Swine*. J. Virol. 72(6): 4866-4873.

57. Pabst R.; Tschernig T. (1995) *Lymphocytes in the lung: an often neglected cell: Numbers, characterization and compartmentalization*. Anat. Embryol. 192: 293-299.
58. Pabst R.; Tschernig T. (1997) *Lymphocyte dynamics: caution in interpreting BAL numbers* Thorax. 52: 1078–1080.
59. Pabst, R. y Binns, R.M. (1994). *The immune system of the respiratory tract in pigs*. Vet. Immunol. Immunopathol. 43: 151-156.
60. Padilla-Carlin, Danielle J.; McMurray, David N. and Hickey, Anthony J. (2008) *The Guinea Pig as a Model of Infectious Diseases*. Comparative Med. 58(4): 324-340.
61. Page, Gregory R. Wang, Fun-In and Hahn, Edwin C. (1992) *Interaction of pseudorabies virus with porcine peripheral blood lymphocytes*. Journal of Leukocyte Biology. 52: 441-448.
62. Pejsak, Z. K. y Truszczynski, Marian J. (2006) *Aujeszky's Disease (Pseudorabies)*. En: *Diseases of swine*. 9ª edición, Blackwell Publishing. Iowa, USA. Pp. 419-431.
63. Perry, Marta and Whyte, Anthony. (1998) *Immunology of the tonsils*. Immunology Today. (19)9: 414-421.
64. Richmond, I.; Pritchard, G. E.; Ashcroft, T.; Avery, A.; Corris, P. A.; Walters, E. H. (1993) *Bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in human lung: its distribution in smokers and non-smokers*. Thorax. 48: 1130-1134.
65. Rivas-Santiago, Tonatiuh, Bruno; Torres Rojas, Martha; Bobadilla Lozoya, Karen; Sada Díaz, Eduardo. (2005) *Papel de las células epiteliales en la respuesta inmune del pulmón*. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx. 18(4): 321-326.
66. Roitt, Ivan; Brostoff, Jonathan; Male, David. (2004) *Inmunología: Fundamentos*. 10ª edición, Editorial Medica Panamericana. México, México. Pg. 546.
67. Romagnani Sergio. (1996) *The Th1/Th2 paradigm*. Immunology Today. 18(6): 263-266.
68. Rothkötter, H. J.; Sowa, E. and Pabst, R. (2002) *The pig as a model of developmental immunology*. Hum. Exp. Toxicol. 21: 533-536.

69. Sabirov, Albert MD, and Metzger, Dennis W. (2008) *Intranasal Vaccination of Infant Mice Induces Protective Immunity in the Absence of Nasal-Associated Lymphoid Tissue*. *Vaccine*. 26 (12): 1566–1576.
70. Sedgmen, Bradley J.; Meeusen, Els N. T. and Lofthouse, Shari A. (2004) *Alternative routes of mucosal immunization in large animals*. *Immunol. Cell Biol.*82: 10–16.
71. Sinkora, Marek y Butler, John E. (2009) *The ontogeny of the porcine immune system*. *Developmental and Comparative Immunology* 33: 273–283
72. Soerensen, Charlotte M.; Holmskov, Uffe; Aalbaek, Bent; Boye, Mette; Heegaard, Peter M. and Nielsen, Ole L. (2005) *Pulmonary infections in swine induce altered porcine surfactant protein D expression and localization to dendritic cells in bronchial-associated lymphoid tissue*. *Immunology*. 115: 526–535.
73. Sosa, Gustavo Adolfo; Quiroga, María Florencia; Estela Roux, María. (2008) *Flow cytometric analysis of T-lymphocytes from nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) in a model of secondary immune deficiency in Wistar rats*. *Immunobiology*. 214: 384–391.
74. Strober, Samuel; Cheng, Lirong; Zeng, Defu; Palathumpat, Raju; Dejbakhsh-Jones, Sussan; Huie, Phillip; Sibley, Richard. (1996) *Double Negative ($CD4^-CD8^- \alpha\beta^+$) T Cells Which Promote Tolerance Induction and Regulate Autoimmunity*. *Immunological Reviews*. 149: 217-230.
75. Summerfield, Artur; Rziha, Hanns-Joachim and Saalmüller, Armin. (1996) *Functional Characterization of Porcine $CD4^+CD8^+$ Extrathymic T Lymphocytes*. *Cell. Immunol.* 168: 291–296.
76. Tschernig, T.; Kleemann, W. J.; Pabst, R. (1995) *Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in the lungs of children who had died from sudden infant death syndrome and other causes*. *Thorax*. 50: 658-660.
77. Tschernig, Thomas and Pabst, Reinhard. (2009) *What is the clinical relevance of different lung compartments?* *BMC Pulmonary Medicine*. 9(39): 1-4.

78. Vázquez-Pérez, Sandra Amelia. (2009) *Análisis de la distribución de linfocitos T en el pulmón de minicerdos vietnamita* (tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Químicas. Puebla, México.
79. Vega-López, M. A.; Bailey, M.; Telemo, E.; Stokes, C. R. (1995) *Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine*. Vet. Immunol. Immunopathol. 44: 319-327.
80. Vega-López, M. A.; Telemo, E.; Bailey, M.; Stevens, K. and Stokes, C. R. (1993) *Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria*. Vet. Immunol. Immunopathol. 37: 49-60.
81. Vega-López, M.A.; Arenas-Contreras, G.; Bailey, M.; González-Pozos, S.; Stokes, C.R.; Ortega, M.G. and Mondragón-Flores, R. (2001) *Development of Intraepithelial Cells in the Porcine Small Intestine*. Developmental Immunology. 8(2): 147-158.
82. Vega-López, Marco Antonio. (2007) *Inmunobiología de las mucosas, un nuevo enfoque de la protección y la adaptación al medio de nuestro organismo*. Revista CINVESTAV. 26(1): 54-59.
83. Vilnis, Aivars; Sussman, Michael D.; Thacker, Brad J.; Senn, Michael; Maes, Roger K. (1998) *Vaccine genotype and route of administration affect pseudorabies field virus latency load after challenge*. Vet. Microbiol. 62: 81-96.
84. Wong, Phillip and Pamer, Eric G. (2003) *CD8 T cell responses to infectious pathogens*. Annu. Rev. Immunol. 21: 29–70.
85. Yang, H. & R. Parkhouse, M. E. (1997) *Differential expression of CD8 epitopes amongst porcine CD8-positive functional lymphocyte subsets*. Immunology. 92: 45-52.
86. Zanvit, P.; Havlickova, M.; Tacner, J.; Jirkovska, M.; Petraskova, P.; Novotna, O.; Cechova, D.; Julak, J.; Sterzl, I.; Prokesova, L. (2005) *Immune response after adjuvant mucosal immunization of mice with inactivated influenza virus*. Immunol. Lett. 97: 251–259.

87. Zhang, Sheng; Zhang, Hongjun; Zhao, Jiandong. (2009) *The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 384: 405–408.
88. Zhang, Zhu Xu; Young, Kevin; Zhang, Li. (2001) *CD3+CD4–CD8– $\alpha\beta$ -TCR+ T cell as immune regulatory cell*. J. Mol. Med. 79: 419–427
89. Zuckermann, F. A. & Gaskins, H. R. (1996) *Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues*. Immunology. 87: 493-499.
90. Zuckermann, F. A. & Husmann, R. J. (1996) *Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells*. Immunology. 87: 500-512.
91. Zuckermann, Federico A. (1999) *Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells*. Vet. Immunol. Immunopathol. 72: 55-66.
92. Zuckermann, Federico A. (2000) *Aujeszky's disease virus: opportunities and challenges*. Vet. Res. 31: 121–131.
93. Zuckermann, Federico A.; Husmann, Robert J.; Schwartz, Rachel; Brandt, Julie; de Antonio, Enric Mateu; Martin, Stephen. (1998) *Interleukin-12 enhances the virus-specific interferon gamma response of pigs to an inactivated pseudorabies virus vaccine*. Vet. Immunol. Immunopathol. 63: 57–67.
94. Zuckermann, Federico A.; Zsak, Lazslo; Mettenleiter, Thomas C. and Ben-Porat, Tamar. (1990) *Pseudorabies Virus Glycoprotein gIII Is a Major Target Antigen for Murine and Swine Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes*. J. Virol. 64(2): 802-812.