

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS LINFOCITOS
PERIFÉRICOS EN LECHONES AFECTADOS POR EL SÍNDROME DE
ADELGAZAMIENTO MULTISISTÉMICO POSTDESTETE (PMWS)”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTAN

**VERÓNICA PATRICIA DÍAZ VELÁZQUEZ
PEDRO JUÁREZ MORALES**

ASESOR

**DR. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE
COASESORES**

**MVZ JESÚS ARTURO SANDOVAL ROMERO
MVZ VÍCTOR QUINTERO RAMÍREZ**



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.



U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

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

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

Evaluación de la capacidad proliferativa de los linfocitos periféricos en lechones afectados por el síndrome de adelgazamiento multisistémico postdestete (PMWS).

Que presenta la pasante: **Verónica Patricia Díaz Velázquez**

Con número de cuenta: **40400666-6** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

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 ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Mayo de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MVZ. José Antonio Licea Vega	
VOCAL	Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate	
SECRETARIO	MVZ. Mario Alberto Velasco Jiménez	
1er SUPLENTE	MVZ. Edna Maribel Legaspi Nuevo	
2do SUPLENTE	MVZ. Saúl Rodríguez Zamora	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

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

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

Evaluación de la capacidad proliferativa de los linfocitos periféricos en lechones afectados por el síndrome de adelgazamiento multisistémico postdestete (PMWS).

Que presenta el pasante: **Pedro Juárez Morales**
 Con número de cuenta: **40401704-4** para obtener el Título de: **Médico Veterinario Zootecnista**

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 ESPÍRITU”
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Mayo de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MVZ. José Antonio Licea Vega	
VOCAL	Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate	
SECRETARIO	MVZ. Mario Alberto Velasco Jiménez	
1er SUPLENTE	MVZ. Edna Maribel Legaspi Nuevo	
2do SUPLENTE	MVZ. Saúl Rodríguez Zamora	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

Gracias Dios mío por darme la fortaleza, paciencia, cerebro, animo y todo lo que necesite día a día para terminar mi carrera. Gracias por llevarme por este camino lleno de retos, felicidad, tristezas y desvelos. Dios nunca apartes tú vista de mí, por que si no me sentiría perdida.

Mi carrera, mi tesis y mi vida entera se las dedico a ustedes mis pequeñas estrellitas, porque sin ustedes muchas cosas en mi vida no tendrían sentido. Muchos dicen que apresure las cosas, que deje de vivir otras, pero yo digo que solo obtuve el mejor regalo del mundo, nada se podrá nunca comparar con la ternura de un besito, el calor de sus abrazos y la melodía de escuchar "TE AMO MAMITA". Por eso se que a partir del 2006 no he sido la misma, mejor o peor, cuando estoy con ustedes simplemente soy FELIZ. Gracias hijos míos Gracias por ser Sofía Victoria y Pedro Mauricio.

Que puedo decirte Amor mío que no haya dicho ya antes, eres un todo en mi vida, y, representas mucho más que el hecho de estar junto a mí, es algo mucho más especial que con palabras se tornaría demasiado racional y perdería la magia y el sentido, por eso solo te digo que TE AMO y GRACIAS por que literalmente sin ti nunca hubiéramos pasado esta etapa en nuestras vidas. Pedro, te lo dije un día y te lo diré siempre, si volviera a nacer te escogería a ti, como mi pareja y padre de mis hijos. Este triunfo es tuyo.

Padres míos, todo lo que soy, se los debo a ustedes, ustedes me enseñaron todo lo que necesité y lo siguen haciendo. Me enseñaron que no hay nada más importante que la familia, que a pesar de todo, siempre hay que estar unidos así siempre será mucho más fácil. Me llevaron viajando toda mi infancia de estado a estado y no lo reprocho, lo agradezco fue de las mejores cosas en mi vida. Por eso y por muchas cosas quiero dedicarles este gran triunfo. LOS AMO.

Hermanos, tuve la bendición que Dios me pusiera en esta maravillosa familia y por ende de tenerlos a mi lado. Es increíble como veo nuestro pasado juntos y es maravilloso, el presente junto a ustedes es padrísimo y el futuro les aseguro que

será indescriptible. Nunca hay que perder esta gran unión que nuestros padres nos enseñaron. Ustedes fueron parte importante en este gran viaje. ¡Gracias!

A mi familia, Abuelos, Abuelas, Tías, Tíos, Primas, Primos, Sobrinos, a todos les agradezco en este pedazo de papel, todo lo que voluntaria o involuntariamente contribuyeron en mí para terminar este gran proyecto. Si a cada uno les agradeciera por separado, mis agradecimientos serían ¡más largos que mi tesis! Saben que amo a mi familia más que a mi propia alma. A los que siguen con nosotros y a los que ya se me adelantaron. ¡Gracias!

¡¡¡Doctor Nacho!!! Creo que ya me soñaba, gracias por todo y todo es literal. Su paciencia fue fundamental para mí. Gracias mi querido Doctor por su ayuda y consejos. Sientase dueño de esta tesis, por que lo es. Le deseo lo mejor hoy y siempre.

Que puedo decir de los amigos que me tope en la carrera, muchos pero muchos conocidos, pero ninguno como ustedes: Adriana, Luis, Mariana y Francisco. Gracias por estar siempre ahí cuando los necesité, padrísimos recuerdos sean buenos o malos fueron increíbles.

A mis Profesores a todos los que me aguantaron, regañaron y enseñaron, no por nombrarlos al último son menos importantes al contrario a ustedes le debo el resultado de esos 5 años de estudio. Son el pilar más importante de cada alumno para realizar su sueño.

A cada persona que me tope en este trayecto, cada uno contribuyo de cierta forma en mi formación. Gracias.

Verónica Patricia Díaz Velázquez.

A mis Hijos: Sofía y Mauricio, que fueron sin duda mi inspiración para que con dedicación y esfuerzo lograra cumplir este sueño, que hoy es una realidad, ¡Gracias hijos! Los AMO.

A mis Padres: Que han sido parte de mi formación , que siempre estuvieron apoyándome incondicionalmente y me motivaron cuando más lo necesité a lo largo de mi carrera. Gracias por todo. Los AMO.

A mi Esposa Verónica: Un pilar importante en mi vida, gracias por todos esos momentos y experiencias que pasamos juntos en la facultad por más de cuatro años, momentos difíciles e increíbles, fuiste mi apoyo incondicional en todo momento. Gracias por todo. Chaparra Te AMO.

A mi Hermanas: A lo largo de mi vida ustedes han sido mis cómplices, aliadas, rivales, y todo lo maravilloso que un hermano me ha podido enseñar, lo he aprendido de ustedes, gracias por aguantarme y ayudarme. Este triunfo también es de ustedes.

Al Doctor Nacho: Sin Duda una persona excepcional, gracias por compartir sus conocimientos y darnos la oportunidad de trabajar esto con usted. Siempre le estaré agradecido.

A la Facultad: por que sin sus instalaciones y profesores, que fueron parte de mi formación profesional esto no hubiese sido posible.

A cada uno de ustedes les dedico esta tesis. ¡GRACIAS!.

Pedro Juárez Morales

El presente trabajo fue apoyado por la cátedra de investigación NCONS-07 (Morfología veterinaria y biología celular) y de docencia DOC-03 (Mejoramiento de la enseñanza de la asignatura de Biología Celular para la carrera de MVZ) del programa PACIVE 2012 de la FES Cuautitlán.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	12
Material y métodos	13
Resultados	19
Discusión	26
Conclusiones	31
Bibliografía	32

RESUMEN

El Síndrome de adelgazamiento multisistémico post-destete (PMWS) está asociado al circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) que afecta a los cerdos de transición y engorda. En general se caracteriza por retraso en el crecimiento corporal, palidez, dificultad respiratoria, diarrea, ictericia y, finalmente, la muerte. Las lesiones microscópicas características están en los tejidos linfoides; se observa depleción de los folículos linfoides y de la región peri-folicular del tejido linfoide, con infiltración de macrófagos en las áreas vacías de linfocitos. Uno de los efectos más notables es la presencia de una linfopenia que involucra a ambas poblaciones de linfocitos (T y B). El objetivo de este trabajo fue determinar si la capacidad proliferativa de los linfocitos periféricos se ve afectada en cerdos con signos clínicos de PMWS. Para esto se utilizaron 29 lechones sintomáticos de PMWS que provenían de una granja comercial del Estado de Hidalgo y, como control negativo, se utilizaron 10 animales de una granja ubicada en Huixquilucan, en la que además, es importante señalar, nunca se han detectado animales con signos clínicos de PMWS. Los linfocitos fueron aislados de muestras de sangre periférica y fueron sembrados en una microplaca de 96 pozos, donde fueron estimulados con Concanavalina A (Con A), nitrógeno de *Phytolaca americana* (PWM) y lipopolisacáridos (LPS). Tanto en los cerdos sanos como en los sintomáticos siempre se obtuvo respuesta independientemente del mitógeno utilizado, asimismo, en todos los casos la respuesta a la estimulación produjo valores superiores en los cerdos sanos que en los sintomáticos. Los valores obtenidos con Con A fueron adecuados (0.414 UA para cerdos sanos y 0.119 UA para los sintomáticos), mientras que con LPS y PWM los valores obtenidos fueron relativamente bajos, este hecho se debe interpretar en base al hecho de que en este ensayo cada 0.01 UA equivale a 12,000 células aproximadamente. El valor más bajo se obtuvo al estimular con LPS por lo que se puede señalar que los linfocitos B fueron las células con la menor respuesta. Al realizar el conteo de leucocitos; se encontró en los cerdos sanos un valor promedio de 23,090 células/ μ l, mientras que en los cerdos sintomáticos fue de 28,940 células/ μ l, por lo que se corroboró que los cerdos clínicamente afectados presentan un aumento en el número de leucocitos en sangre periférica. A pesar de todo, resulta un tanto incierto señalar que el aumento en el número de leucocitos es un signo clínico importante de la PMWS por el rango tan amplio que normalmente muestran los cerdos clínicamente sanos. Con el fin de explicar los resultados encontrados en este trabajo, se pueden señalar dos eventos que están ocurriendo en los cerdos sintomáticos; por un lado, un menor número de linfocitos T y B en sangre periférica, aunado a una disminución en la sensibilidad para responder a los mitógenos (en especial de los linfocitos B) y, por otra parte, un aumento de células del linaje monocitos/macrófagos en sangre periférica. El PMWS representa un problema importante en la producción porcina de nuestro país, por lo que será necesario realizar más estudios que permitan alcanzar un conocimiento más amplio de los múltiples aspectos que conforman a este síndrome.

INTRODUCCION

En 1991, el Dr. John Harding y un patólogo, el Dr. Edward Clark, detectaron una enfermedad muy curiosa en una granja del Oeste del Canadá. Esta enfermedad se caracterizaba por un incremento en el número de cerdos retrasados en el crecimiento y de la mortalidad en la etapa post-destete, junto con lesiones microscópicas específicas del sistema linfoide. Su interés investigador les permitió presentar en 1996 una nueva enfermedad que, desde un punto de vista clínico-patológico, bautizaron como síndrome multisistémico del desmedro post-destete (del inglés, postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) (Sánchez-Vizcaíno 2003).

El primer caso de PMWS fue diagnosticado en España en 1997, desde entonces, el número de casos ha ido aumentando. Es una enfermedad que afecta a lechones en la fase de post-destete de 5 a 12 semanas de edad caracterizándose por pérdida de condición corporal y por una mortalidad elevada de los animales afectados (Morilla 2004).

El debilitamiento o desmedro es un signo importante, así como la palidez cutánea, respiración dificultosa, diarrea y a veces ictericia (Quintana 2001, Segalés 2002). Las lesiones macroscópicas observadas en cerdos con PMWS pueden ser bastante variables y, desafortunadamente, no son suficientes para realizar un diagnóstico. Como un acuerdo general, el diagnóstico final del PMWS se establece en base a tres criterios:

- 1.- Presencia de un cuadro clínico compatible con PMWS.
- 2.- Presencia de lesiones histopatológicas características.
- 3.- Detección del PCV2 dentro de las lesiones de los tejidos afectados (Morilla 2004).

En la necropsia, las lesiones más notables son los pulmones edematizados no colapsados y el aumento de tamaño de los linfonodos (principalmente inguinal superficial, mandibular, mesentéricos y mediastínicos). En una pequeña proporción, los linfonodos pueden presentar áreas focales de necrosis que son visibles macroscópicamente (Quintana 2001, Segalés 2002, Perfumo 2003). El aumento en el tamaño de los linfonodos es probablemente una de las características más tempranas de los cerdos afectados por PMWS. Sin embargo estas lesiones no están siempre presentes y no pueden usarse como el único marcador de PMWS en una granja (Morilla 2004).

Se han descrito lesiones hepáticas como infiltración inflamatoria linfocítica-histiocítica en zonas portales y necrosis aislada de hepatocitos. Así como; infiltrado inflamatorio linfohistiocítico en riñón, páncreas, intestino y miocardio (Morilla 2004).

Las lesiones microscópicas más características de PMWS están localizadas en los tejidos linfoides. Se observa una depleción de los folículos linfoides y de la región peri-folicular del tejido linfoide, con infiltrados de macrófagos en las áreas vacías de linfocitos. Otro hallazgo clave es la presencia de inclusiones citoplasmática basófilas, esféricas y claramente demarcadas en las células histiocíticas (Morilla 2004).

El PCV2 es un factor causal necesario en el PMWS, pero no es suficiente. Puede tomar ventaja de circunstancias sinérgicas específicas presentes en ciertas granjas o bien en ciertos cerdos individuales. Ese momento concreto le permite proliferar masivamente y entonces dar lugar a la enfermedad. El PMWS parece afectar a un número relativamente limitado de granjas y sólo a algunos cerdos dentro de la granja. En las granjas con PMWS pueden encontrarse otras infecciones o enfermedades, pero es difícil establecer una relación directa con el síndrome. Entre ellas están la enfermedad de Aujeszky (pseudorrabia), el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), la enfermedad de Glässer, la meningitis estreptocócica, la salmonelosis, la colibacilosis postdestete, la diarrea

inespecífica, la hepatosis dietética y la bronconeumonía supurativa. La edad crítica de los cerdos para manifestar el PMWS es de 8 a 13 semanas, aunque pueden presentarse signos clínicos y muertes fuera de estos límites (Sánchez-Vizcaíno 2003).

El virus del circovirus porcino (PCV) se reconoció por primera vez como un contaminante no citopático de la línea celular de riñón de cerdo PK-15 (Segalés 2002). En la actualidad, el Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) se considera un importante patógeno emergente asociado a un número de diferentes síndromes y enfermedades en los cerdos. Dos tipos de PCV se han caracterizado, el Circovirus tipo 1 (PCV1) que fue descrito como un contaminante de la línea celular PK-15 y el Circovirus tipo 2 (PCV2) que es identificado como un virulento patógeno porcino antigénica y genéticamente distinto (Chun 2008).

El PCV2 se considera un virus ubicuo, de manera que ha sido hallado en cerdos de todos los países del mundo donde se ha buscado. En relación a la distribución de la circovirus porcina, dado que el virus se encuentra en todo el mundo, podría también tener una distribución mundial. Y ello, desde el punto de vista geográfico es cierto ya que se ha descrito la enfermedad en todos los continentes. No obstante, existen países donde el proceso clínico no ha sido descrito aún, ya sea porque efectivamente no se encuentra (ello implicaría que su búsqueda proactiva ha dado resultados negativos) o bien porque no se ha estudiado (Sánchez-Vizcaíno 2003).

El PCV2 es un virus pequeño no envuelto e icosaédrico, de aproximadamente 15 a 16 nm de diámetro, miembro de la familia Circoviridae, género Circovirus (Segales 2002). El PCV tiene un genoma circular de ADN de cadena simple que contiene dos marcos de lectura abierta (ORF). El ORF1 que codifica proteínas asociadas a la replicación viral y ORF2 que codifica para las proteínas estructurales principales (Chun 2008).

Inmunosupresión en PMWS

Uno de los efectos más notables del PCV-2 sobre el sistema inmune es la presencia de una linfopenia que involucra a ambas poblaciones de linfocitos (T y B). Sin embargo, es importante notar que dicha linfopenia sólo se desarrolla del día 7 al 28 post-infección (pi), alcanzando su máximo alrededor del día 14 (pi). De tal forma que la linfopenia no es suficiente para explicar el estado de inmunosupresión en el que suelen caer los animales infectados (Rodríguez 2009, Schwarts 2004).

Las lesiones microscópicas que han sido descritas en tejidos linfoides en cerdos afectados severamente por PMWS, incluyen la depleción de linfocitos con pérdida de folículos linfoides (principalmente áreas dependientes de linfocitos B), además de que el número de células también se ve reducida en las áreas foliculares dependientes de linfocitos T. En esta etapa también hay infiltración de macrófagos y células gigantes multinucleadas. En estadios avanzados hay atrofia de órganos linfoides, principalmente en los nódulos linfáticos, que coincide microscópicamente con una depleción generalizada de las células linfoides. Zonas antes ocupadas por folículos linfoides se encuentran vacías, en su lugar hay un infiltrado de macrófagos y a menudo muestran gran cantidad de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Segalés 2004).

Una cantidad muy alta de ácido nucleico de PCV2 y proteínas virales (antígenos) suelen estar presentes dentro de las lesiones histopatológicas. Se ha mostrado que células del sistema inmune, (células mononucleares, macrófagos y células presentadoras de antígeno) presentan en su citoplasma y, esporádicamente, dentro de sus núcleos PCV2 (Segalés 2004).

Las células diana de la infección por circovirus porcino tipo 2 (PCV2) parecen ser los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas. No obstante, estas células no son los lugares preferidos para la replicación viral masiva; se considera más

probable que las principales células que soportan la replicación viral sean las células endoteliales, epiteliales y células en división. No obstante la infección de los macrófagos y de las células dendríticas es el factor clave que aparentemente determina el curso de los procesos de enfermedad inducidos por PCV2 (Kenneth 2008).

Esta presencia anormal y prolongada del virus en las células dendríticas constituye un problema importante para el sistema inmune, debido al papel crítico que desempeñan dichas células como piezas centrales en el desarrollo y regulación de la defensa inmunitaria. Por un lado, las células dendríticas son importantes para la defensa inmune innata, en su papel de vigilantes de las superficies mucosas del hospedador. Donde pueden responder a los patógenos, alérgenos y otras “señales de peligro”, que podrían suponer una amenaza para el huésped. Además, las células dendríticas controlan el desarrollo de respuestas antígeno-específicas, que ofrecen al hospedador protección prolongada contra un patógeno en concreto, como ocurre después de una vacunación eficaz. Por esta última razón, se alude a ellas como células presentadoras de antígeno “profesionales”. Dichas células también están implicadas en el control de la supervivencia y el funcionamiento de los linfocitos en el cuerpo (Kenneth 2008).

Cuando los patógenos modifican la función de las células dendríticas, se da lugar a que el reconocimiento del “peligro” este alterado. Esto debilita la defensa inicial contra el ataque de patógenos, así como la capacidad de las células dendríticas para controlar actividades inmunológicas. La interferencia con éstas últimas conducirá a respuestas inflamatorias excesivas, sobreactivación de linfocitos o alteración de la homeostasis. Por las razones descritas, la presencia de PCV2 en las células dendríticas supone una amenaza a la capacidad del huésped a la respuesta y resistencia ante muchos patógenos, así como ante otros “peligros” a los que se enfrenta regularmente. Además, todos los animales infectados con PCV2 presentan antígenos virales en macrófagos y células dendríticas, células que a pesar de la infección permanecen viables, lo que implica una persistencia

del virus en estas células, así como en el huésped en general (Darwich 2004, Rosell 1999).

El PCV2 no induce la muerte celular en las células dendríticas que infecta, ni tampoco en los linfocitos asociados (Vicent 2003). De acuerdo con esto, la linfopenia observada *in vivo* probablemente sea un efecto indirecto de la infección por PCV2. Por inferencia respecto a otros virus monocitotrópicos, esta asociación de PCV2 con células monocíticas podría explicar la leucopenia, debido a una emisión de señales aberrantes que parte de las células infectadas y que interfiere con la homeostasis. Sin embargo, la presencia del virus en las células dendríticas no perjudica su interacción inmunobiológica con los linfocitos (Vincent 2005); no obstante, el mantenimiento de cantidades relativamente altas de antígeno de PCV2 y ADN viral en dichas estructuras, y la retención de PCV2 infeccioso durante varias semanas no puede dejar de tener consecuencias (Kenneth 2008).

Las lesiones histopatológicas mencionadas se han caracterizado mediante métodos inmunohistoquímicos. Estas lesiones consisten en reducción o pérdida de las células B, disminución de los linfocitos T, aumento de los macrófagos, pérdida parcial y redistribución de las células presentadoras de antígeno a través de los tejidos linfoides. La severidad de estos cambios fueron fuertemente correlacionados con la gravedad de las lesiones histológicas de PMWS y la mayor cantidad de antígeno y/o ácido nucleico de PCV2 (Segalés 2004).

El mecanismo por el cual se produce la depleción linfoide en PMWS no ha sido aclarado todavía. Se ha sugerido que la depleción de linfocitos se puede producir por una vía indirecta en la que la apoptosis, el desequilibrio de citocinas y la alteración de las vías de migración pueden estar implicados. Esta hipótesis proviene del hecho de que un bajo número de linfocitos están infectados por el PCV2 cuando se mide mediante hibridación *in situ* o por inmunohistoquímica, mientras que un elevado número de apoptosis de linfocitos B se observan en los tejidos linfoides de cerdos afectados gravemente por PMWS (Segalés 2004).

Estimulación blástica o Ensayos de proliferación

La estimulación blástica o ensayo de proliferación es actualmente una de las técnicas más precisas y difundidas para el estudio de la capacidad de estimulación específica e inespecífica de los linfocitos *in vitro*. Esta técnica se basa en la capacidad que los linfocitos tienen para responder frente a un antígeno (respuesta específica) que por vacunación o por sufrir una infección, ha inducido linfocitos de memoria. Estos linfocitos al estar nuevamente en contacto con el antígeno inducen una transformación blástica. Esta estimulación blástica también puede ser inducida de forma inespecífica gracias a la capacidad de los linfocitos para reaccionar con diferentes tipos de lectinas o mitógenos. Las lectinas inducen una estimulación blástica de tipo inespecífico tanto en los linfocitos B como en los T (Hernández 2007).

Lectinas

Son sustancias de carácter proteico derivadas de plantas y bacterias. Actúan a través de los determinantes de hidratos de carbono de la membrana celular de los linfocitos produciéndoles un fenómeno de activación linfocítica (división de los linfocitos). El método de la blastogénesis consiste en cultivar los linfocitos de un animal junto con antígenos conocidos y con varios mitógenos, que se utilizan como control de la inmunoproliferación (estimulación no específica). La transformación blástica específica se mide por la capacidad que tiene el antígeno de inducir inmunoproliferación (Coligan 2005).

Las lectinas se encuentran distribuidas en la naturaleza, en diferentes organismos como: hongos, animales y plantas. En las plantas, la mayoría de estas moléculas están presentes en los cotiledones y endospermos de las semillas y constituyen de 2 a 10% del total de proteína (Hernández 1999). Se sugiere que dentro de la planta, estas proteínas pueden tener diferentes funciones como: regulación

fisiológica, defensa mecánica contra el ataque de microorganismos, almacenamiento de proteínas, transporte de carbohidratos, estimulación mitogénica, reconocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* y otras más (Pusztai 1991).

La gran importancia de las lectinas se debe fundamentalmente a sus propiedades biológicas: interacción con grupos sanguíneos específicos, aglutinación de linfocitos, eritrocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias, células tumorales e inducción de mitosis en el linfocito (Sharon 2004, Sumner 1989). Algunas de sus aplicaciones son: análisis de funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células mononucleares causadas por algunas drogas, detección de anomalías cromosómicas, como marcadores fluorescentes para estudiar cambios estructurales en los glicoconjugados presentes en las superficies celulares y la detección de transformaciones malignas en las células, entre otras (Hernández 1999).

Las más conocidas son: Fitohemaglutina (PHA) y Concanavalina A (Con A) que estimulan a los linfocitos T, los lipopolisacáridos (LPS) que estimulan a los linfocitos B y la lectina de *Phytolacca americana* (PWM) que estimula a ambas poblaciones linfocitarias (Coligan 2005).

La concanavalina A (Con A) es una proteína globular de origen vegetal, se obtiene a partir del frijol *Canavalia ensiformis*, su contenido varía entre 1 y 3% de su peso. Debido a sus propiedades bioquímicas, la Con A fue clasificada en 1936 como una lectina. (Sharon 2004). Los estudios realizados demuestran que la Con A es un excelente inductor de mitosis para los linfocitos T. (Sharon 1995)

El lipopolisacárido (LPS) o endotoxina es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, desempeña una función importante en la activación del sistema inmune al constituir el antígeno superficial más importante de este tipo de bacterias. El LPS contiene tanto lípidos como hidratos de carbono está compuesto por tres partes: una región de lípido A que contiene dos derivados

del azúcar glucosamina, que es a menudo tóxico, un polisacárido central denominado *core*, unido al lípido A y un tercero, una cadena lateral O ó antígeno O la cual varía su composición según la cepa bacteriana, lo que hace de esta molécula uno de los factores de virulencia más complejos de comprender (Sharon 1995).

A partir de la raíz de la *Phytolacca americana* han sido purificados cinco mitógenos designados de Pa-1 a Pa-5. A la fecha, solo Pa-1 ha sido descrito como mitógeno para los linfocitos B y T murinos; los otros mitógenos (Pa-2 a Pa-5) sólo tienen actividad sobre las células T. Se ha encontrado que los linfocitos B murinos tienen más receptores para el mitógeno Pa-1 que para Pa-2, mientras que las células T murinas tienen más receptores para Pa-2 que para Pa-1 (Yokoyama 1976).

Los linfocitos se encuentran diseminados por todo el organismo, constituyen una mezcla diversa de poblaciones celulares, cada una con propiedades y funciones características, se les reconoce de acuerdo con las proteínas presentes en su superficie, este patrón de expresión representa su inmunofenotipo. Cada proteína suele tener varios nombres comunes y una denominación específica (CD: cluster of differentiation). Hoy en día se conocen más de 166 de estas moléculas y cada una se designa con un número; por ejemplo, CD4, CD8, CD16 y así sucesivamente (Tizard 2009).

Los linfocitos son pequeñas células redondeadas que se encuentran en la sangre y en órganos linfoides como: timo, nodos linfáticos y bazo. En general las células T representan hasta un 80% de los linfocitos en sangre periférica. Las células B, se originan en la médula ósea, aunque maduran en las placas de Peyer o en la propia médula ósea antes de emigrar a los órganos linfoides secundarios y sólo una pequeña fracción de las células sanguíneas son B. Algunos linfocitos pertenecen a una tercera población denominada células asesinas naturales (NK), son grandes con citoplasma abundante y gránulos citoplásmicos, y están involucradas en la respuesta innata contra virus y bacterias intracelulares (Tizard 2009).

El CD3 es un complejo de proteínas que están conformando al receptor de las células T (TCR). Su función es generar una señal del receptor hacia el interior de la célula cuando el TCR se une a un antígeno. Por lo tanto, todos los linfocitos T portan CD3 en su superficie. Por otra parte, CD4, sólo existe en las células T que reconocen antígenos exógenos procesados, es decir, en los linfocitos T cooperadores, y actúa como un receptor para las moléculas MHC clase II. Mientras que CD8 sólo se encuentra en las células T que atacan y matan células alteradas o anormales, esto es, en los linfocitos T citotóxicos. El CD8 es un receptor para moléculas MHC clase I y es necesario para reconocer antígenos endógenos procesados (Tizard 2009).

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si la capacidad proliferativa de los linfocitos periféricos se ve afectada en cerdos con signos clínicos de síndrome de emaciación multisistémica postdestete (PMWS).

Objetivos particulares:

- a. Evaluar la capacidad de proliferación de los linfocitos periféricos al ser estimulados con tres diferentes mitógenos.
- b. Determinar la población linfocitaria más afectada de acuerdo con su respuesta a los mitógenos utilizados.
- c. Determinar el número de linfocitos sanguíneos presentes en los animales evaluados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y recolección de muestras

Se utilizaron 29 animales con signos clínicos de PMWS que provenían de una granja comercial del Estado de Hidalgo. Como control negativo se usaron 10 animales de una granja ubicada en Huixquilucan, Estado de México, que forma parte de un sistema de producción en el cual funciona como sitio 2 y de acuerdo con el médico veterinario responsable nunca se han detectado animales con signos clínicos de PMWS. La edad de los animales sanos y sintomáticos fluctuó entre los 30 y los 50 días. Se recolectaron 5 ml de sangre por cerdo en tubos estériles con EDTA.

Purificación de linfocitos

Se mezclaron 5 ml de sangre completa con una cantidad igual del medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). Esta mezcla se colocó con mucho cuidado sobre 5 ml de Ficoll (Histopaque, Sigma) (Figura 1) y se centrifugó a 1,750 rpm durante 30 minutos.

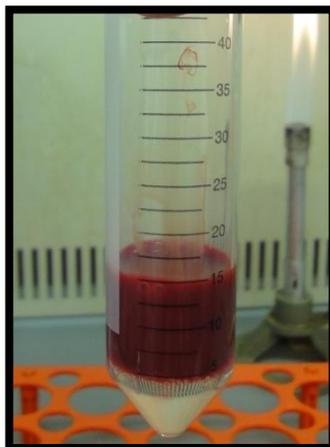


Figura 1. Muestra de sangre adicionada con RPMI al 5% sobre cinco mililitros de Ficoll.

Utilizando una pipeta Pasteur se retiró la fase intermedia, esta maniobra se debe realizar con mucho cuidado con el fin de evitar que se mezclen las capas (Figura

2-A). En la fase intermedia se encuentran las células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP, linfocitos y monocitos), las cuales fueron transferidas a un tubo Falcon de 15 ml estéril (Figura 2-B), al cual se le agregó un volumen igual al recuperado de RPMI 1640 suplementado con 5% de (SFB), el tubo se centrifugó a 1,250 rpm durante diez minutos (Figura 2-C).



A

B

C

Figura 2. **A)** Muestra de sangre donde se observa con claridad la fase intermedia. **B)** Recuperación de células sanguíneas mononucleares. **C)** Línea de sedimento de células sanguíneas mononucleares.

De manera accidental se pueden acarrear eritrocitos al momento de retirar la fase intermedia, para garantizar la eliminación total de estos eritrocitos se adicionaron 5 ml de buffer de lisis (NH_4Cl 160 mM; Tris 170 mM), la suspensión fue incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Después se agregaron 9 ml de RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, se agitó cuidadosamente y se centrifugó a 1,250 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y las células obtenidas fueron resuspendidas en 2 ml de RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB.

Una vez obtenidos los linfocitos se procedió a verificar su viabilidad, para ello; se tomó una gota de la suspensión de CSMP se mezcló con una gota de azul tripan

al 0.5% y se contaron 100 células en un hemocitometro, la viabilidad siempre fue mayor al 95%.

Conteo de linfocitos

Una vez obtenidos los linfocitos se realizó una dilución 1:3 con RPMI. Para realizar el conteo se utilizó una cámara Neubauer que se llenó por capilaridad con la dilución obtenida y se visualizaron en un microscopio óptico. Sólo se contaron las células presentes en los cuatro cuadros de las esquinas y en el cuadro central, se obtuvo el valor promedio y se multiplicó por 10^4 , el valor obtenido es el número de células por mililitro. Posteriormente se realizó la estandarización del contenido de células a 2×10^6 /ml.

Ensayos de Proliferación

Estos ensayos se realizaron por triplicado en una placa de 96 pozos, para ello se depositaron 50 μ l de la suspensión de células (2×10^6 células/ml) en cada uno de los pozos. Después se agregaron 50 μ l de cada uno de los siguientes mitógenos: Concanavalina A (Con A), Mitógeno de *Phytolacca americana* (PWM) y Lipopolisacáridos (LPS). Adicionalmente, se colocó una cuarta hilera de pozos que corresponde al grupo control y a los cuales sólo se agregó RPMI 1640. Los tres mitógenos fueron usados a la concentración de 10 mg/ml. La placa fue incubada por 72 horas a 37° C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Al cumplirse las 72 horas, se agregaron 10 μ l del reactivo MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma) a una concentración de 6 mg/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y se realizó una incubación adicional de 4 horas. Posteriormente, se retiró el contenido completo de cada uno de los pozos, se agregaron 100 μ l de DMSO (Dimetil Sulfoxido, amresco) y se incubó por 15 minutos en un lugar protegido de la luz. Finalmente, se realizó la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Los valores de las respuestas obtenidas con los linfocitos estimulados y los no estimulados están en unidades de absorbancia. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y se obtuvo el promedio de cada uno de los animales estudiados y, posteriormente, el promedio general de ambos grupos

(sanos y sintomáticos) para cada uno de los mitógenos. Con cada muestra se manejó un pozo control en el cual los linfocitos no fueron estimulados con ningún mitógeno (Figura 3).

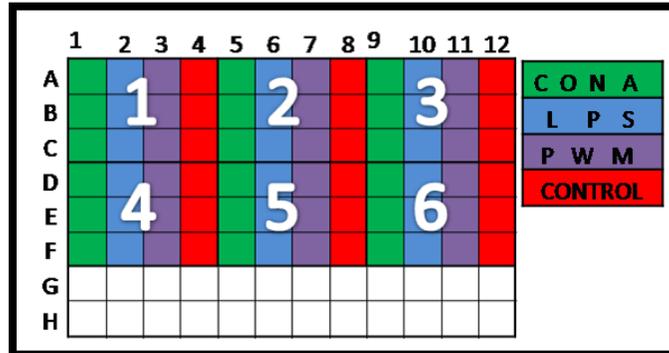


Figura 3. Distribución de muestras y de los diferentes mitógenos en una microplaca de 96 pozos. Los números en blanco colocados sobre la placa se refieren a la distribución que tuvieron las muestras de sangre de los animales estudiados.

Conteo de glóbulos blancos totales

Para realizar este conteo utilizamos una muestra de sangre sin coagular proveniente directamente del paciente, en nuestro caso fueron cerdos sanos y cerdos con síntomas clínicos de PMWS. Para realizar el conteo se mezclaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml 10 μ l de sangre con 190 μ l de ácido acético glacial al 2% (Figura 4), así las muestras se manejaron a una dilución de 1:20 (Voigt 2003).

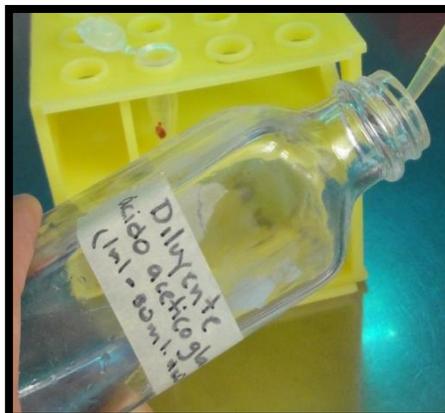


Figura 4. Aplicación de Ácido Acético Glacial a la muestra de sangre.

Para el conteo de los glóbulos blancos se depositaron 10 μl de dicha dilución en la cámara de Neubauer y sólo se contaron las células presentes en los cuadros de las esquinas (Voigt 2003).

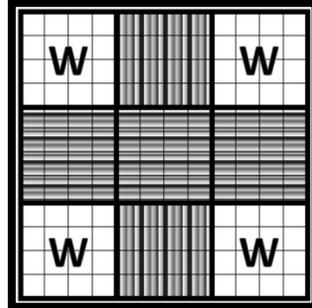


Figura 5. Cámara de Neubauer en la que se muestran las áreas que se utilizaron para realizar el conteo de glóbulos blancos. A partir de la muestra de sangre se realiza una dilución 1:20 en la que se realiza el conteo de los leucocitos presentes tomando en consideración sólo las áreas cuadradas de las esquinas.

El cómputo de los resultados obtenidos se realizó por la técnica Unopette de 1:20, el recuento se efectuó en 4mm^2 ($\times 1/4^a$), el espacio entre la cubierta de cristal y la cámara es de 0.1 mm ($\times 10^b$), y el factor de dilución es de 1:20 ($\times 20^c$). Utilizando la siguiente fórmula:

Nº de núcleos \times nº de cuadros \times profundidad de la cámara \times dilución (Voigt 2003).

$$\text{Nº de núcleos} \times (1/4^a \times 10^b \times 20^c) =$$

$$\text{Nº total de núcleos} \times \frac{(10 \times 20)}{4} =$$

4

Por Ejemplo:

$$146 \times (1/4 \times 10 \times 20)$$

$$146 \times 50 = 7,300 \text{ GB/mm}^3$$

Análisis estadístico

Se obtuvieron los valores promedios de las lecturas realizadas como producto del estímulo dado con los diferentes mitógenos tanto para los animales con signos clínicos de PMWS como con los animales clínicamente sanos. Con los valores promedio se realizó la prueba t de Student con el fin de determinar si las diferencias encontradas son estadísticamente significativas (Johnson 2008, Walpole 2002).

Resultados

Proliferación con mitógenos inespecíficos

Con el fin de evaluar la capacidad de proliferación de los linfocitos periféricos, las células obtenidas de las muestras de sangre, fueron aisladas y estimuladas con tres mitógenos inespecíficos (Con A, PWM y LPS). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

Por otra parte, también se procesaron 10 muestras de animales sanos y de edades correspondientes (30-50 días), estos linfocitos fueron procesados y estimulados de la misma manera y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

Respuesta obtenida a la estimulación con mitógenos inespecíficos

De manera general podemos comentar que la respuesta a los mitógenos inespecíficos fue menor en los lechones con síntomas de PMWS, en comparación con los lechones clínicamente sanos. A pesar de que la respuesta de los animales sintomáticos fue baja si fue posible detectar la presencia de proliferación de los linfocitos periféricos como respuesta al estímulo con las lectinas utilizadas.

El valor de la respuesta de los linfocitos a la estimulación (valor anotado en las tablas 1 y 2) resulta de la diferencia entre el valor promedio obtenido con los mitógenos inespecíficos y el valor promedio de los linfocitos no estimulados (pozos control).

Tabla 1. Valores de proliferación obtenidos de linfocitos estimulados con mitógenos inespecíficos en cerdos sintomáticos de PMWS

Lechón	Con A	LPS	PWM
1	0.001	0.011	-0.008
2	-0.012	-0.012	0.000
3	0.046	0.012	0.006
4	0.003	0.009	0.020
5	0.012	0.002	-0.006
6	-0.002	0.001	0.006
7	0.006	0.016	0.006
8	-0.001	-0.005	0.011
9	0.041	0.021	0.022
10	0.003	0.009	0.020
11	0.012	0.002	-0.006
12	0.016	0.016	0.013
13	0.003	0.003	0.024
14	0.011	0.003	0.001
15	-0.027	0.023	0.146
16	0.019	0.009	0.003
17	-0.001	-0.002	0.004
18	-0.016	-0.012	0.104
19	0.014	0.010	0.033
20	0.033	0.006	-0.008
21	0.041	0.000	0.006
22	-0.021	-0.025	-0.021
23	0.039	0.012	0.033
24	1.889	0.030	0.036
25	1.220	0.089	-0.002
26	-0.062	-0.072	-0.061
27	0.015	0.013	0.002
28	0.167	0.249	-0.012
29	0.003	-0.002	-0.006
Promedio ± DS	0.119 ± 0.4	0.013 ± 0.03	0.014 ± 0.05

Tabla 2. Valores de proliferación obtenidos de linfocitos estimulados con mitógenos inespecíficos en cerdos sanos.

Lechón	Con A	LPS	PWM
1	0.041	0.021	0.022
2	-0.001	-0.002	0.004
3	-0.016	-0.012	0.104
4	0.014	0.010	0.033
5	0.041	0.000	0.006
6	0.414	0.041	0.066
7	2.280	0.014	0.017
8	0.041	0.021	0.022
9	0.748	0.285	0.329
10	0.576	0.031	0.055
Promedio ±	0.414 ± 0.7	0.041 ± 0.08	0.066 ± 0.09

Respuesta a Concanavalina A (Con A)

La respuesta de los cerdos sanos se caracterizó por que en todas las muestras analizadas hubo una proliferación notoria, se puede apreciar que los valores son los mayores en comparación con los obtenidos con los otros mitógenos de tal suerte que se obtuvo un valor promedio de 0.414 UA. Por su parte, la respuesta de los cerdos sintomáticos también fue adecuada y con valores importantes, obteniendo un valor promedio de 0.119 UA.

Al comparar la respuesta a la estimulación con Con A de los linfocitos periféricos de cerdos sanos y sintomáticos, se encontró una diferencia de 0.295 UA a favor de los animales sanos, lo cual indica una menor tasa de proliferación en los cerdos sintomáticos.

Respuesta a los lipopolisacáridos (LPS)

Se puede apreciar que en ambos grupos de animales (sanos y sintomáticos) la respuesta inducida produjo valores bajos, a pesar de ser un mitógeno importante, de tal manera que la respuesta fue menor en comparación con los otros

mitógenos. En los animales sanos se obtuvo un valor promedio de 0.041 UA, mientras que en los animales sintomáticos fue de 0.013 UA.

La diferencia encontrada entre ambos grupos fue de 0.028 UA, el cual es el valor más bajo obtenido con los mitógenos utilizados. Es importante mencionar que aunque el valor de la respuesta es mínimo, éste se debe interpretar en base al hecho de que en este ensayo cada 0.01 UA equivale a 12,000 células aproximadamente.

Respuesta a la estimulación con la lectina de *Phytolacca americana* (PWM)

La PWM también indujo una respuesta con valores bajos pero superiores a los encontrados con LPS. El valor promedio de la respuesta obtenida con los animales sanos fue de 0.066 UA, mientras que para los animales sintomáticos fue de 0.014 UA. Al comparar los resultados obtenidos con los animales sanos y sintomáticos a partir de la estimulación con PWM se encontró una diferencia mayor (0.052 UA) a la obtenida con LPS.

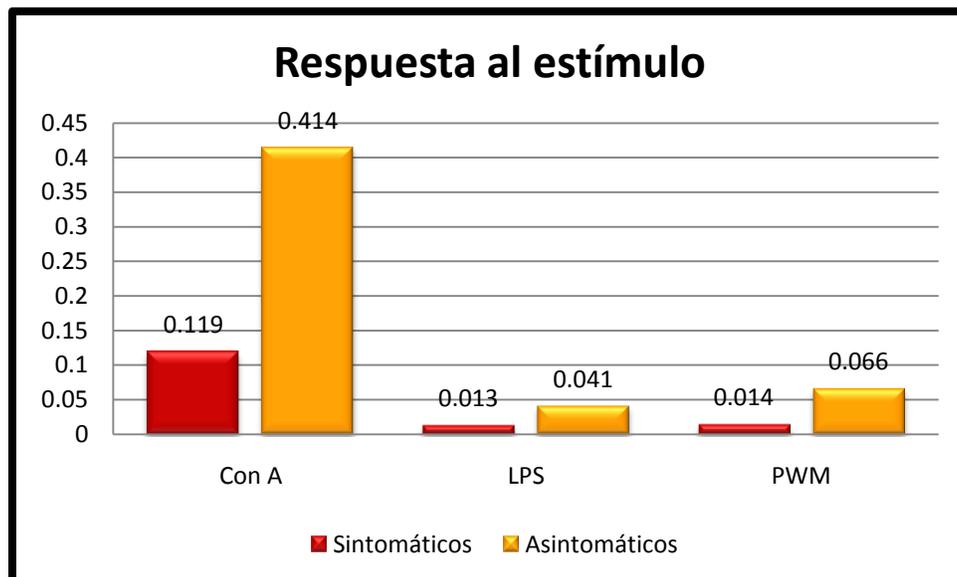


Figura 6. Respuesta obtenida de los linfocitos periféricos estimulados con los mitógenos inespecíficos en lechones de 30 a 50 días de edad.

Conteo de leucocitos

Estos conteos se realizaron con el fin de evaluar la cantidad de linfocitos periféricos circulantes en sangre de cerdos sintomáticos y cerdos sanos. La sangre se mezcló con ácido acético glacial y se contaron las células en una cámara de Neubauer.

Los valores de los cerdos sanos se encontraron en un rango de 13,000 – 28,000 células/ μl , con un valor promedio de 25,790 células/ μl . Mientras que para los cerdos sintomáticos, los valores obtenidos se encontraron por arriba de 20.000 células/ μl , siendo el valor máximo de 53,660 células/ μl , su valor promedio fue de 28,940 células/ μl .

Por otra parte, al comparar los promedios de los cerdos sintomáticos con los sanos, podemos observar que el número de leucocitos es mayor en los sintomáticos. Mientras que en números absolutos esta diferencia es de 5,850 células/ μl , en proporción equivale a un 25.33% más leucocitos circulantes en los animales sintomáticos que en los sanos.

Tabla 3. Recuento leucocitario de cerdos sintomáticos.

Muestra	Leucocitos/μl
1	22.120
2	43,000
3	21,330
4	53,330
5	46,660
6	53,660
7	32,000
8	24,000
9	23,000
10	14,000
11	35,000
12	28,000
13	23.700
14	24.700
15	26.700
16	25.550
17	49.700
18	28.880
19	41.770
20	36.220
21	22.660
22	13.330
23	13.550
24	23.550
25	21.000
26	18.000
27	23.330
28	24.330
29	26.330
Promedio	28.940
DS	11.42

Tabla 4. Recuento leucocitario de cerdos sanos.

No. Muestra	Leucocitos/μl
1	23,330
2	19,000
3	18,000
4	29,670
5	13,550
6	24,330
7	46,660
8	23,000
9	35,000
10	25,330
Promedio	25.790
DS	9.48

Discusión

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de proliferación de los linfocitos periféricos mediante la estimulación con mitógenos inespecíficos de 29 muestras de sangre de lechones sintomáticos de PMWS y 10 de lechones sanos, en ambos grupos los animales tenían de 30 a 50 días de edad. Con el propósito de evaluar ambas poblaciones de linfocitos (B y T) se utilizaron los siguientes mitógenos: Concanavalina A que estimula a los linfocitos T, lipopolisacáridos (LPS) que estimulan a los linfocitos B y la lectina de *Phytolacca americana* que estimula a ambas poblaciones (Coligan 2005).

En los ensayos de proliferación con Concanavalina A, la respuesta obtenida en los animales afectados por PMWS fue de 0.119 unidades de absorbancia (UA), en comparación a la obtenida en los lechones clínicamente sanos que fue de 0.414 UA, por lo que se puede señalar una diferencia importante (0.295 UA) entre ambos grupos. Esta diferencia es una evidencia clara de que los linfocitos T de los animales con signos clínicos de PMWS muestran una cierta incapacidad para responder a la estimulación.

Por otra parte, la respuesta al estimular con LPS ofreció valores bajos tanto en lechones clínicamente sanos (0.041) como en los sintomáticos (0.013), a pesar de lo cual, también es evidente una diferencia a favor de los animales sanos. Es importante señalar que a pesar de que LPS es un mitogeno importante, se obtuvo una respuesta muy baja. Esto mismo ocurrió en los ensayos de proliferación con PWM, donde se encontró un valor de 0.014 UA en los animales sintomáticos, mientras que en los animales sanos fue de 0.066 UA.

En el trabajo de Chun et al. (2008), se señala que la replicación de PCV2 en linfocitos activados o en linfoblastos en proliferación, puede resultar en daños a estas células con la consiguiente reducción en su capacidad de proliferación. Los resultados mostrados en dicho estudio señalan que, además de los monocitos y

linfocitos activados de sangre periférica, la población de linfocitos B muestra una sensibilidad mayor a PCV2 (Yu 2007). Esto puede explicar la respuesta obtenida en el grupo estimulado con LPS, en el cual se encontró una de las respuestas más bajas, como ya se mencionó posiblemente debido a la mayor sensibilidad de los linfocitos B a PCV2. Sin embargo, otra de las posibles explicaciones para dicho resultado es que sólo una pequeña fracción de los linfocitos sanguíneos periféricos son linfocitos B (Morilla 1989, Tizard 2009, Borghetti 2006).

Existen contradicciones con respecto a la respuesta inmunológica de los linfocitos periféricos desde el nacimiento hasta los 30 o 35 días de edad, Valpotic (1989) reportan respuestas limitadas en lechones menores de 4 semanas, mientras que Hoskinson (1990) reportan respuestas altas en cerdos de 0.5 a 6 semanas de edad.

En un trabajo realizado en el laboratorio de investigación en morfología veterinaria y biología celular, se evaluó la capacidad de proliferación de los linfocitos periféricos en lechones desde los 5 hasta los 60 días de edad, los resultados obtenidos muestran que al utilizar la concanavalina A, la respuesta se caracterizó por que en todos los grupos hubo una respuesta evidente, obteniendo una mayor proliferación en cerdos de entre 45 a 60 días de edad. Es importante señalar que, como en este trabajo, los valores fueron los más altos con respecto a los otros dos mitógenos. Con LPS la respuesta en edades de 2 a 5 días fue negativa, sin embargo, ésta fue aumentando obteniendo el valor más alto en edades de entre 15 a 35 días. Mientras que con PWM, los valores más altos correspondieron a los cerdos de 45 días de edad. Estos resultados indican que la edad tiene un efecto directo sobre la capacidad de respuesta de los linfocitos a los mitógenos inespecíficos utilizados. Desafortunadamente no se pudo conocer la edad exacta de los animales en estudio ya que sólo se señaló que estaban entre los 30 y los 50 días de edad, por lo que los valores obtenidos con LPS y PWM podrían deberse a que la mayoría de los animales en estudio se encontraban más cerca de los 30 que de los 50 días de edad. Sin embargo, lo importante es que los linfocitos

tuvieron la capacidad para responder a los ensayos de proliferación (Hernández 2007).

Otro detalle importante a resaltar es que al realizar la prueba de hipótesis utilizando los valores promedio obtenidos (t de Student), se encontró que para todos los tratamientos aplicados (Concanavalina A, LPS y PWM), la diferencia encontrada a favor de los animales sanos es estadísticamente significativa a un grado de confianza alto ($\alpha = 0.05$), lo cual confirma que los linfocitos periféricos de los animales sintomáticos muestran una menor capacidad de respuesta a la estimulación con mitógenos inespecíficos (Johnson 2008, Walpole 2002).

En el presente trabajo, también se realizó el conteo de leucocitos periféricos con el fin de explorar si había una diferencia entre los animales sanos y los sintomáticos. Al tratar de interpretar los resultados obtenidos se encontró que aún en referencias publicadas y acreditadas hay diferencias importantes y los rangos señalados llegan a ser bastante amplios para los animales sanos. Así tenemos que Walpole (2002) y Jubb (1979), señalan que los valores normales de los leucocitos periféricos es de 11,000 – 22,000 células/ μ l, mientras que el mismo Jubb, en una edición más reciente menciona que dicho rango se puede ampliar hasta un valor máximo de 30,000 células/ μ l (Jubb 2007).

En los cerdos clínicamente sanos sus valores se encontraron en un rango de 13,550 – 46,660 células/ μ l con un valor promedio de $25,790 \pm 9,480$ células/ μ l. Por su parte, los lechones con signos clínicos de PMWS tuvieron valores que se encontraron en un rango de 13,330 – 53,330 células/ml con un valor promedio de $28,940 \pm 11,420$ células/ μ l.

El valor promedio de los animales con signos clínicos fue ligeramente mayor (28,940) que en los animales sanos (25,790). Asimismo, la desviación estándar resultó considerablemente mayor evidenciando la presencia de una mayor dispersión en los valores obtenidos. Por otra parte y con el fin de valorar mejor la

diferencia existente entre los valores promedio, se obtuvo la diferencia relativa entre ambos valores y se puede señalar que dicha diferencia es de 12.2% a favor de los animales sintomáticos. A pesar de todo, resulta un tanto incierto señalar que el aumento en el número de leucocitos es un signo clínico importante de la PMWS por el rango tan amplio que normalmente muestran los cerdos clínicamente sanos, por lo que será necesario realizar más estudios al respecto y determinar los factores involucrados en esta variación.

Si se atiende a los valores obtenidos en este conteo se puede señalar la presencia de una leucocitosis en los animales sintomáticos de PMWS, la cual puede catalogarse desde ligera (28,940 células/ μ l) hasta severa (53,333 células/ μ l). Este hallazgo coincide con lo señalado por varios autores quienes mencionan que la depleción de linfocitos en áreas interfoliculares junto con la infiltración de macrófagos de los tejidos linfoides es la lesión característica y básica de los cerdos afectados por PMWS y, por lo tanto, puede inducir un aumento en la población de macrófagos, debido a la infiltración de estas células a órganos linfoides, como respuesta a la infección por PMWS (Clark 1997, Rosell 1999). Asimismo, diversos estudios demuestran que hay un aumento en el recuento total de los monocitos en los cerdos que sufren de PMWS, lo que sugiere que esta enfermedad induce la proliferación de células del linaje monocitos/macrófagos (Rosell 1999, Chianini 2003).

Así, en los animales sintomáticos del estudio se pueden señalar dos eventos que permiten explicar los resultados encontrados en este trabajo; por un lado, un menor número de linfocitos T y B en sangre periférica, junto con una disminución en la sensibilidad para responder a los mitógenos (en especial de los linfocitos B) y, por otra parte, un aumento de células del linaje monocitos/macrófagos en sangre periférica.

Es importante señalar que existen otros métodos para la identificación específica de células por medio de sus proteínas de superficie. Hoy en día el inmunofenotipo

de las poblaciones linfocíticas se analiza automáticamente en gran detalle y con gran eficacia utilizando un instrumento llamado citometría de flujo (Gómez – Lucía 2007). En este trabajo no se utilizó este método ya que en el laboratorio de investigación en morfología veterinaria y biología celular no se cuenta con este aparato.

Se requieren estudios adicionales de la epidemiología e inmunidad de estas infecciones para el mejor conocimiento y control de este síndrome, el PMWS es un problema importante en la producción porcina, y será necesario realizar estudios sobre nuevas técnicas de diagnóstico, patogenia, distribución geográfica, factores involucrados y métodos de control.

Conclusiones

- La capacidad de proliferación de los linfocitos periféricos está afectada en los cerdos con signos clínicos de síndrome de emaciación multisistémica postdestete (PMWS) independientemente del mitógeno utilizado.
- Al estimular a los linfocitos con Concanavalina A mostraron una respuesta evidente ya que se encontraron los valores más altos con respecto a los otros mitógenos utilizados, tanto en animales sintomáticos como sanos.
- El valor más bajo se obtuvo al estimular con LPS por lo que se puede señalar que los linfocitos B fueron las células con la menor respuesta proliferativa.
- Con los valores obtenidos al realizar el conteo de leucocitos se pudo determinar la presencia de leucocitosis en los animales sintomáticos de PMWS.

Bibliografía

1. Borghetti P, De Angelis E, Saleri R, Cavalli V, Cacchioli A, Corradi A, Mocchegiani E, Martelli P. Peripheral T lymphocyte changes in neonatal piglets: Relationship with growth hormone (GH), prolactin (PRL) and cortisol changes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2006 110:17–25.
2. Chung Ming Lin, Chian Ren Jeng, Hui Wen Chang, Ing Cherng Guo, Yu Liang Huang, Yi Chieh Tsai, Mi Yuan Chia, Victor Fei Pang. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in swine lymphocytes using mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from healthy PCV2-carrier pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008 124:355-366.
3. Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Shevach EM, Strober W (Eds) *Short protocols in immunology*. 1st edition, New Jersey, John Wiley & Sons, 2005.
4. Darwich L, Segales J, Mateu E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch Virol* 2004 149:857-874.
5. Gómez – Lucía Esperanza, Blanco Ma. del Mar, Damenech Ana. *Manual de Inmunología Veterinaria*. 3ª Edición. Pearson Educación, S.A. 2007.
6. Hernández DP, Martín GO, Rodríguez PV, Ganem BF. Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999; 15: 91-95.
7. Hernández Nalleli Zamudio, Cruz Silva Josué David. Análisis de la capacidad de proliferación de los linfocitos periféricos provenientes de lechones de 2 a 60 días de edad. 2007.

8. Hoskinson CD, Chew BP, Wong TS. Age-related changes in mitogen-induced lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function in the piglet. *J Anim Sci* 1990; 68:2471-2478.
9. Jubb, Kennedyan Palmers. *Pathology of domestic animals*. 5a Edition. M Grant Maxie. 2007.
10. Kenneth C. McCullough KC, Vincent IE, Summerfield A, Krakowka S, Elli JA, Segalés J, Allan GM. La inmunología de las infecciones causadas por circovirus porcino tipo 2. *Institute of Virology and Immunoprophylaxis* 2008 :14-20.
11. Morilla Antonio, Yong Jin Yoon K, Zimmerman Jeffrey J. Enfermedades víricas emergentes del cerdo. *Multimédica, Ediciones veterinarias, España* 2004, pp: 329-358.
12. Perfumo CJ, Cappuccio JA, Machuca MA, Quiroga MA, Massone AE, Idiart JR, Schwartz K, Janke BH. Estudios anatomopatológicos comparativos de las lesiones en los linfonódulos y bazo de cerdos con síndrome multisistémico de adelgazamiento postdestete y síndrome de dermatitis y nefropatía. VII Congreso Nacional de Producción Porcina y XIII Jornada de Actualización Porcina. Río Cuarto, Córdoba, República Argentina, 2003:17.
13. Pusztai AJ. *Plant lectins*. Cambridge, Cambridge University Press, 1991.
14. Quintana J, Segalés J, Rosell C, Calsamiglia M, Rodríguez-Arrijo GM, Chianini F, Folch JM, Maldonado J, Canal M, Plana-Duran J, Domingo M. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec* 2001 149: 357-361.

15. Rodriguez Cariño C, Sanchez Chardi A, Segales J. Subcellular immunolocalization of porcine circovirus type 2 (PCV2) in lymph nodes from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Comp. Path.* 2010 142:291-299.
16. Robert Johnson Estadística Elemental – Lo esencial. 10a. edición, 2008, Editorial Cengage Learning, México. pp 247-310.
17. Rosell C, Segalés J, Plana-Duran J, Balasch M, Rodriguez-Arriola GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M. Pathological, immunohistochemical and in-situ hybridization studies of natural cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 1999 120: 59-78.
18. Sánchez-Vizcaíno, J.M. Ed. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas. 2003. CDrom y [en línea] <http://www.sanidadanimal.info/curso>.
19. Schwartz KJ. Swine disease manual. Published by the American Association of Swine Veterinarians. 3rd edition, 2004 editorial y ciudad pp. 55-57.
20. Segalés J, Calsamiglia M, Rosell C, Soler M, Maldonado J, Martin M, Domingo M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Vet Microbiol* 2002 85: 23-30.
21. Segalés J, Domingo M, Chianini F, Majó N, Domínguez J, Darwich L, Mateu E. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs, *Veterinary Microbiology*. 2004 98:151–158.
22. Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004 14: 53-62.

23. Sharon N, Lis H. Lectins-proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays Biochem* 1995 30: 59-75.
24. Sumner JB, Howell SF. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with concanavalin. *AJ Bacteriol.* 1936 32:227-37.
25. Tizard I. *Inmunología Veterinaria*. 8ª edición. ElSevier, España. 2009.
26. Valpotic I, Gerencer M, Basic I. In vitro modulating effects of porcine immunoglobulin G on mitogen-induced lymphocyte response in precolostral, suckling and weaned piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 1989 113:22.
27. Vincent IE, Carrasco CP, Guzylack-Piriou L, Herrmann B, McNeilly B, Allan GM, Summerfield A, McCullough KC. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* 2005 115: 388-398.
28. Vincent IE, Carrasco CP, Herrmann B, Meehan BM, Allan GM, Summerfield A, McCullough KC. Dendritic cells harbour infectious PCV2 in the absence of apparent modulation of the cells or replication of the virus. *J Virol* 2003 77: 13288-13300.
29. Voigt LG. *Conceptos y técnicas hematológicas para técnicos veterinarios*. Acribia, España 2003.pp 39-69.
30. Walpole Roland, Myers Raymond, Ye Keying. *Probability and Statistics for Engineers and Scientists*. 9th Edition. Pearson Education. 2002.
31. Yokoyama KYO. Purification and biological activities of pokeweed (*Phytolacca americana*) mitogens. *Bioch Biophys Acta* 1976 427: 443-452.

32. Yu S., Vincent A., Opriessnig T., Carpenter S., Kitikoon P., Halbur P.G., Thacker E.. Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. *Veterinary Microbiology*. 2007 123:34–42.