



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA MUCOSA NASAL Y DEL NALTO  
DE CERDOS DE 15 Y 30 DÍAS, SU REACTIVIDAD A LAS LECTINAS MAA Y  
SNA Y LA CORRELACION CON LOS SITIOS DE UNIÓN DE RUBULAVIRUS  
PORCINO**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ENRIQUE AGUILAR MEJIA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. ARMANDO PEREZ TORRES (PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL)**

**COMITÉ TUTOR**

**DR. HUMBERTO RAMIREZ MENDOZA (PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL)**

**DR. EMILIANO TESORO CRUZ (PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL)**

**MÉXICO, D.F.**

**MARZO, 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA MUCOSA NASAL Y DEL NALTO  
DE CERDOS DE 15 Y 30 DÍAS, SU REACTIVIDAD A LAS LECTINAS MAA Y  
SNA Y LA CORRELACION CON LOS SITIOS DE UNIÓN DE RUBULAVIRUS  
PORCINO**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ENRIQUE AGUILAR MEJIA**

**Presidente: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO**  
**Vocal: DR. JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT**  
**Secretario DR. ARMANDO PÉREZ TORRES**  
**Suplente DRA. ROCÍO TIRADO MENDOZA**  
**Suplente: DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA**

**MÉXICO, D.F.**

**MARZO, 2015**

## DEDICATORIA

*A mis padres (Santiago Aguilar Camacho † y María Guadalupe Mejia Rodríguez †) y mi Hermano Santiago Aguilar Mejia †.*

*A mis hermanos Federico, María Isabel y María De La Luz.*

*A mis sobrinos: Marlene, karla, Danaé, Abigail, Oscar, Omar, Itzam, Maya, Nicté, Gié Bele, Esperanza y Fátima.*

*A mis Amigos durante la Maestría: Talivan, Claus Ingeborg, Jorge, Tere, Cesar, Felipe, Karla, Vianey, Eve, Estafania, Mariam, Ely, Anita.*

*A mis amigos de la Facultad: Zalatiel (Negro) y Katy, Eduardo (Lalin) y Soraida, Efra (Enano) y Chio, Didis, Carlos (Médico), Marco (Muñe), Erika, Luz María (Lechuza), Cecilia, Ana (perris), Mariana, Paco, Low, Zamarrón, Angelopolus, Kiyuyi y a todos los que se me olvidan GRACIAS  
A los twinkys: Raúl, Edgar, Jorge (Maicol).*

*A SAN ARMANDO DE PORRES: por salvar almas en pena, en desgracia, descarriadas, por enderezar jorobados y por muchas cosas más ÁNIMO.*

## AGRADECIMIENTOS

*A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, por quien tengo el corazón azul y la piel dorada... ¡Cómo no te voy a querer!*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca concedida durante el periodo de realización y apoyo de la Maestría.*

*A mi Tutor DR. Armando Pérez Torres: "En el laboratorio como en la vida Observar sin pensar es tan peligroso como pensar sin observar y donde Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas, porque "Más que escasez de medios, lo que hay es miseria de voluntad"*

*Tomado y modificado de*

*Santiago Ramón y Cajal*

*Al Dr. Germán Borbolla: por ser ejemplo de compromiso, dedicación, entrega, su gran apoyo GRACIAS.*

*A los integrantes de mi Comité Tutorial:*

*Dr. Humberto Ramírez Mendoza*

*Dr. Emiliano Tesoro Cruz*

*Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza por proporcionar las alícuotas de Rubulavirus porcino para este proyecto.*

*Al Dr. Edgar Zenteno Galindo y la Dra. Patricia Gorocica Rosete por proporcionar las lectinas para este proyecto.*

*Al Dr. José Iván Sánchez Betancourt por proporcionar el suero hiperinmune (RVP) para este proyecto.*

*Al Biólogo y candidato a Dr. Iván Emmanuel Ramos Martínez del Laboratorio 9 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.*

*A las Histotecnólogas Verónica Rodríguez Mata y Raquel Guerrero Alquicira y al laboratorista Ricardo Hernández Trujillo del Laboratorio de Técnicas Histológicas del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina.*

*Al Biol. Armando Zepeda Rodríguez y Francisco Pasos Nájera del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina.*

*A la Biol Ivonne Grisel Sánchez Cervantes del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina.*

*Al Dr. Roberto Martínez R del CEIEPP de la FMVZ-UNAM*

*Al Histotecnólogo Alfredo Amadeo Díaz Estrada del Departamento de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.*

*A Don Paulino que con sus visitas propicio pláticas emotivas que dieron como fruto tantas risas, enojos, preocupaciones y olvidos, que en resultado forjo grandes amistades.*

*A mí Querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por brindarme las herramientas para mi desarrollo profesional y humano.*

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>Introducción</b>	<b>5</b>
<b>Tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) y a la nariz (NALT)</b>	<b>6</b>
<b>Respuesta inmune asociada a mucosas hasta el destete</b>	<b>13</b>
<b>Receptores con ácido siálico en la mucosa nasal del cerdo</b>	<b>13</b>
<b>Enfermedad del ojo azul</b>	<b>15</b>
<b>Rubulavirus porcino (RVP) se une al ácido siálico a través de hemaglutinina</b>	<b>18</b>
<b>Justificación</b>	<b>20</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>20</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos particulares</b>	<b>21</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>22</b>
<b>Animales</b>	<b>22</b>
<b>Virus</b>	<b>23</b>
<b>Infección experimental</b>	<b>23</b>
<b>Técnica histológica ordinaria con descalcificación de la estructura nasal</b>	<b>24</b>
<b>Histoquímica con lectinas para microscopía de fluorescencia</b>	<b>25</b>
<b>Estudio de la especificidad de la lectina y de su actividad de hemaglutinación</b>	<b>27</b>
<b>Cinética para escindir ácido siálico (SA) con sialidasa</b>	<b>28</b>
<b>Inmunohistoquímica enzimática para RVP</b>	<b>29</b>
<b>Resultados</b>	<b>31</b>
<b>Diseción del macizo nasal</b>	<b>33</b>
<b>Código de colores de epitelios en la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad</b>	<b>35</b>
<b>Histoquímica con lectinas</b>	<b>44</b>
<b>Inmunohistoquímica para RVP</b>	<b>63</b>
<b>Discusión</b>	<b>70</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>77</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>79</b>
<b>Lista de Tablas</b>	<b>87</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>87</b>

## RESUMEN

Las infecciones virales de los cerdos se caracterizan por su rápida difusión y serias consecuencias económicas. La relevancia de las características epiteliales, celulares y moleculares de la mucosa nasal en la susceptibilidad a la infección por virus respiratorios durante las primeras semanas de la vida posnatal de los cerdos es en gran parte desconocida. En el presente trabajo se estudiaron e identificaron factores de la mucosa nasal de cerdos de 15 y 30 días de edad que pudieran ser relevante para estudiar la interacción *in vivo* con virus respiratorios. Para tal fin, se realizaron cortes transversales de toda la cavidad nasal, dividida en tres tercios: anterior, medio y posterior, y cada uno subdividido en segmentos de 1 cm. Quince segmentos en total fueron procesados para obtener cortes en parafina y teñirlos con H&E para estudiar la histología de la mucosa nasal, la histoquímica con lectinas *Sambucus nigra* (SNA) y *Maquía amurensis* (MAA) que reconocen glicoconjugados con ácido siálico  $\alpha 2,6\text{Gal}$  y  $\alpha 2,3\text{Gal}$  respectivamente, y que funcionan como receptores para virus como el virus de influenza y el rubulavirus porcino (RVP), y con inmunohistoquímica para demostrar la unión específica del RVP, 1 y 3 horas después de inocularlo intranasalmente. En cerdos de 15 días se observaron ocho tipos epiteliales, glándulas mucosas y seromucosas en diferentes estadios de desarrollo y escasas células ciliadas y células caliciformes en sitios donde el epitelio parece diferenciarse al típico epitelio respiratorio. En contraste, los cerdos de 30 días de edad presentaron una mucosa nasal bien diferenciada, reconociéndose tres regiones de acuerdo a la distribución de tres tipos de epitelio: escamoso estratificado sin estrato córneo que cubre el tercio anterior; columnar ciliado pseudoestratificado con células caliciformes o " epitelio respiratorio " en los tercios medio y posterior, y el epitelio olfativo en el techo del laberinto de la cavidad nasal. En el techo y paredes laterales del conducto nasofaríngeo fue identificado, por primera vez en los cerdos, el tejido linfoide asociado al conducto nasofaríngeo (NALT), similar al NALT de otros mamíferos, incluyendo la presencia de células dendríticas foliculares CD21 + en el interior de los nódulos linfáticos.

De acuerdo a la histoquímica de lectinas, únicamente MAA reconoció glicoconjugados con ácido siálico  $\alpha 2,3\text{Gal}$  en los conductos interlobulillares y excretorios de las glándulas seromucosas ubicadas principalmente en el tercio medio, en la superficie convexa de los cornetes superiores y en la mitad superior del tabique nasal. El tratamiento con sialidasa no eliminó los sitios de unión a MAA; por el contrario, la lectinofluorescencia se incrementó en los mismos lugares antes mencionados, además de desenmascarar sitios de unión a dicha lectina en las células caliciformes. En el NALT, las células linfoides internodulares, las que infiltran el epitelio respiratorio de revestimiento y, en menor grado, las de la periferia de los nódulos linfoides primarios y secundarios fueron positivas a MAA. La inmunotinción para identificar RVP después de 1 y 3 horas de ser inoculado intranasalmente demostró positividad en los cilios y en el endotelio de las arterias y venas de la mucosa nasal del tercio medio. Los sitios en los que MAA se une a glicoconjugados no fueron marcados con la inmunotinción a RVP. Nuestros resultados demuestran diferencias epiteliales entre cerdos de 15 y 30 días de edad, principalmente en que los primeros no han completado la diferenciación de la mucosa respiratoria del tercio medio de la cavidad nasal, lo que sugeriría una deficiencia en el sistema mucociliar, que es importante para el procesamiento del aire inspirado, particularmente en lo que respecta al depurado de partículas suspendidas, entre ellas patógenos que se unen a ácido siálico. En los cerdos de ambas edades hay una expresión de glicoconjugados con ácido siálico  $2,3\text{Gal}$  restringida a conductos glandulares



de uno de los segmentos del segundo tercio de la cavidad nasal y a las regiones T dependientes del NALT. Estas zonas MAA positivas no son las mismas que tuvieron inmunorreactividad al RVP inoculado intranasalmente.

## ABSTRACT

Viral infections of pigs are characterized by their rapid spread and serious economic consequences. The significance of epithelial, cellular and molecular characteristics of the nasal mucosae in susceptibility to infection by respiratory viruses during the first weeks of pig's postnatal life is largely unknown. In this work were studied and identified factors of the nasal mucosa of pigs from 15 and 30 days of age that might be relevant to study their interaction with respiratory viruses *in vivo*. For this purpose, cross-sections of all the nasal cavity, divided into anterior, middle and posterior thirds, and each one subdivided into segments of 1 cm. Fifteen segments in total were processed to obtain paraffin-embedded tissue sections which were stained them with H & E to study the histology of the nasal mucosa, with lectin histochemistry using *Sambucus nigra* (SNA) and *Maackia amurensis* (MAA) lectins which recognize glycoconjugates with sialic acid  $\alpha 2,6\text{Gal}$  and  $\alpha 2, 3\text{Gal}$  respectively. These glycoconjugates function as receptors for viruses such as influenza virus and porcine rubulavirus virus (RVP); and also were processed with immunohistochemistry to demonstrate nasal mucosae sites with RVP 1-3 hours after inoculating it intranasal. Nasal mucosa of fifteen days-old pigs has eight epithelia types, mucous and seromucous glands in different stages of development and few goblet cells and ciliated cells in sites where the epithelium seems to differentiate towards typical respiratory epithelium. In contrast, 30-day-old pigs showed a nasal mucosae se well differentiated, recognizing three regions according to the distribution of three types of epithelium: squamous stratified without stratum corneum that covers the anterior third; ciliated columnar pseudostratified with goblet cells or "respiratory epithelium" in the middle thirds, and the olfactory epithelium on the roof of the labyrinth of the nasal cavity. In the roof and side walls of the nasopharyngeal duct was identified, for the first time in pigs, the lymphoid tissue associated with nasopharyngeal duct (NALT), equivalent to NALT of other mammals, including the presence of CD21+ follicular dendritic cells inside the lymph nodules.

According to lectin histochemistry, only MAA recognized glycoconjugates with sialic acid  $\alpha 2,3\text{Gal}$  in the interlobular and excretory ducts of seromucous glands mainly located in the middle third, at the convex surface of upper turbinates and the upper half of the nasal septum. Sialidase treatment did not eliminate the MAA binding sites; on the other hand, lectinofluorescence was increased in the same places mentioned above, as well as unmask binding sites to this lectin in the goblet cells. In the NALT, internodules lymphoid cells, infiltrating the respiratory lining epithelium and, to a lesser extent, those on the periphery of the primary and secondary lymphoid nodules were positive to MAA. Immunostaining to identify RVP after 1-3 hours of being intranasal inoculated showed positivity in the cilia and the endothelium of arteries and veins of the nasal mucosa of the middle third. The sites where the MAA joins glycoconjugates were not marked with immunostaining to RVP. Our results demonstrate epithelial differences among 15 and 30 days-old pigs, mainly in that the former have not completed differentiation of the respiratory mucosa at the middle third of the nasal cavity. This finding suggest a deficiency in the mucociliary system, which is important for the processing of inspired air, particularly in regards to debugging of suspended particles, including pathogens that bind to sialic acid. In both studied ages pigs there is an expression of glycoconjugates with sialic acid 2,3Gal restricted to glandular ducts located in one segment of the second third of the nasal cavity and in T-dependent regions of the NALT. These MAA positive areas are not the same that had immunoreactivity to the intranasal inoculated RVP.

## INTRODUCCIÓN

### Mucosa Nasal

La cavidad nasal es la primera porción de las vías respiratorias superiores entre sus funciones esenciales conduce e inicia el procesamiento del aire inspirado. Las características anatomofuncionales de la cavidad nasal favorecen el calentamiento y humidificación del aire inspirado, además de depurarlo de partículas suspendidas. Otra función relevante de la cavidad nasal es la captación de infinidad de estímulos olfatorios. Por lo anterior, es fácil comprender que la cavidad nasal es el sitio de primer contacto o interacción con antígenos y patógenos inhalados. <sup>(1)</sup>

Sin embargo, hay pocos estudios en los que se describa la normalidad de la anatomía e histología de la cavidad nasal de cerdos, particularmente en el periodo posnatal de estos animales.

La descripción general de las características de la cavidad nasal, en diferentes especies, refiere que está formada por un esqueleto óseo y cartilaginosa, dividida en dos fosas nasales por un tabique, y revestida por una capa interna o mucosa en la que se distinguen tres regiones anatomofuncionales: vestibular, respiratoria y olfatoria. <sup>(2,3)</sup> La región vestibular es la porción rostral, continua con la piel y, por lo tanto, caracterizada por tener una mucosa con epitelio plano estratificado, ligeramente pigmentado, y una lámina propia papilar rica en glándulas serosas, formada por tejido conjuntivo resistente unido a una base osteocartilaginosa por una submucosa rica en vasos sanguíneos y nervios. <sup>(2, 3)</sup>

La mayor parte de la cavidad nasal corresponde a la región respiratoria, revestida por epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, con células caliciformes, también conocido como “epitelio respiratorio”. Como todo epitelio, éste se asienta sobre una membrana basal. La lámina propia está provista de numerosas fibras elásticas y pueden observarse nódulos linfocitocitarios dispersos. Contiene gran número de glándulas túbuloalveolares con terminales tortuosas y pueden formar adenómeros glomerulares, la mayoría de tipo seroso y en menor número de tipo mucoso y mixto. Estas glándulas seromucosas se encuentran a lo largo de toda la mucosa, y junto con las células caliciformes, forman una película supraepitelial de moco que reviste toda la superficie luminal de la mucosa. La submucosa es bastante rígida y de naturaleza conjuntiva, con vasos de mediano calibre y haces de fibras nerviosas. Otra característica destacable es la presencia de numerosos plexos venosos dilatados que confieren a la mucosa el aspecto de tejido cavernoso los cuales presentan varios ciclos diarios y alternados de ingurgitación y detumescencia. La submucosa se continúa directamente con el periostio de las paredes laterales y con el pericondrio que reviste la superficie del tabique nasal formado por tejido cartilaginosa hialino. <sup>(2, 3)</sup>

La región olfatoria presenta una mucosa que reviste la parte dorsocaudal de la cavidad nasal. Se caracteriza por la presencia de neuroepitelio de tipo cilíndrico pseudoestratificado ciliado con células bipolares modificadas o neuroepiteliales. Éstas, presentan una prolongación citoplásmica cuyo extremo apical luminal muestra un bulbo provisto de cilios atípicos, carentes del axoplasma microtubular característico de los cilios móviles. En la membrana de los cilios atípicos son captados los estímulos olfatorios. Del extremo basal de estas células bipolares emergen los axones amielínicos que atraviesan la lámina propia y la submucosa formando el nervio olfatorio, cuyos axones atraviesan la lámina cribosa del etmoides y hacen sinapsis con las neuronas del bulbo olfatorio. En la submucosa de la región olfatoria están las glándulas serosas de Bowman, cuya función es humedecer la superficie del epitelio y disolver las sustancias odoríferas para que interactúen con los receptores de la membrana los cilios modificados de las células olfatorias neurosensitivas.<sup>(2,3)</sup>

Las características histológicas de la mucosa nasal presentan variaciones regionales interespecies y de acuerdo a la edad.<sup>(2,3)</sup> En el cerdo, se conoce la anatomía macroscópica de la cavidad nasal pero hay poca información relativa al desarrollo estructural de la mucosa, de la distribución regional de los tipos de epitelios que la conforman y de la existencia de otras especializaciones de la mucosa como el órgano vomeronasal y el tejido linfoide asociado a la nariz (NALT, por sus siglas en inglés Nasal-Associated Lymphoid Tissue), representante local del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés Mucosa-Associated Lymphoid Tissue).

### **Tejido Linfoide asociado a la Mucosa (MALT)**

El MALT está constituido por nódulos linfoides solitarios o agregados, localizados en superficies mucosas, y forma parte de los órganos linfoides secundarios junto con los linfonodos o ganglios linfáticos y el bazo. Las amígdalas o tonsilas del anillo de Waldeyer y las placas de Peyer localizadas en el íleon son ejemplos distintivos del MALT. La función principal del MALT es producir y secretar IgA (e IgG, en algunos sitios) a través del epitelio superficial y glandular de la mucosa correspondiente, favoreciendo respuestas inmunológicas tipo Th2, aunque también se ha demostrado que puede haber respuesta Th1.<sup>(4,5)</sup> Los criterios morfofuncionales para que un tejido linfoide se clasifique como parte del MALT requieren que:<sup>(6,7)</sup>

El tejido linfoide esté en contacto con la superficie de la mucosa, el tejido linfoide se organice en una región B dependiente formada por cúmulos de nódulos o folículos de linfocitos B incrustados en una red de células dendríticas foliculares (FDC, por sus siglas en inglés Follicular Dendritic

Cells), y con algunos linfocitos T CD4+ y macrófagos, y zonas interfoliculares o región T dependiente formada de tejido linfoide difuso que predominantemente contienen linfocitos T CD4+, T CD8+ y células dendríticas (CD, por sus siglas en inglés Dendritic cells). Los nódulos linfoides se llaman primarios o no estimulados cuando tiene un aspecto celular densamente empaquetado; se les llama secundarios cuando presentan una parte central más clara de células B activadas (centroblasto y centrocitos) conocida como centro germinal. Puede haber nódulos linfoides aislados (ILF, por sus siglas en inglés de Isolated Lymphoid Nodules), que también están formados por células B y pueden ser primarios o secundarios. El epitelio suprayacente a los nódulos linfoides está infiltrado por linfocitos y por ello se le conoce como linfoepitelio (LE por sus siglas en inglés Lympho Epithelium). En éste, puede haber células M, células aplanadas con prolongaciones citoplásmicas que envuelven a los linfocitos subepiteliales y que reciben ese nombre por los micropliegues similares a microvellosidades pero mucho más pequeñas que éstas.

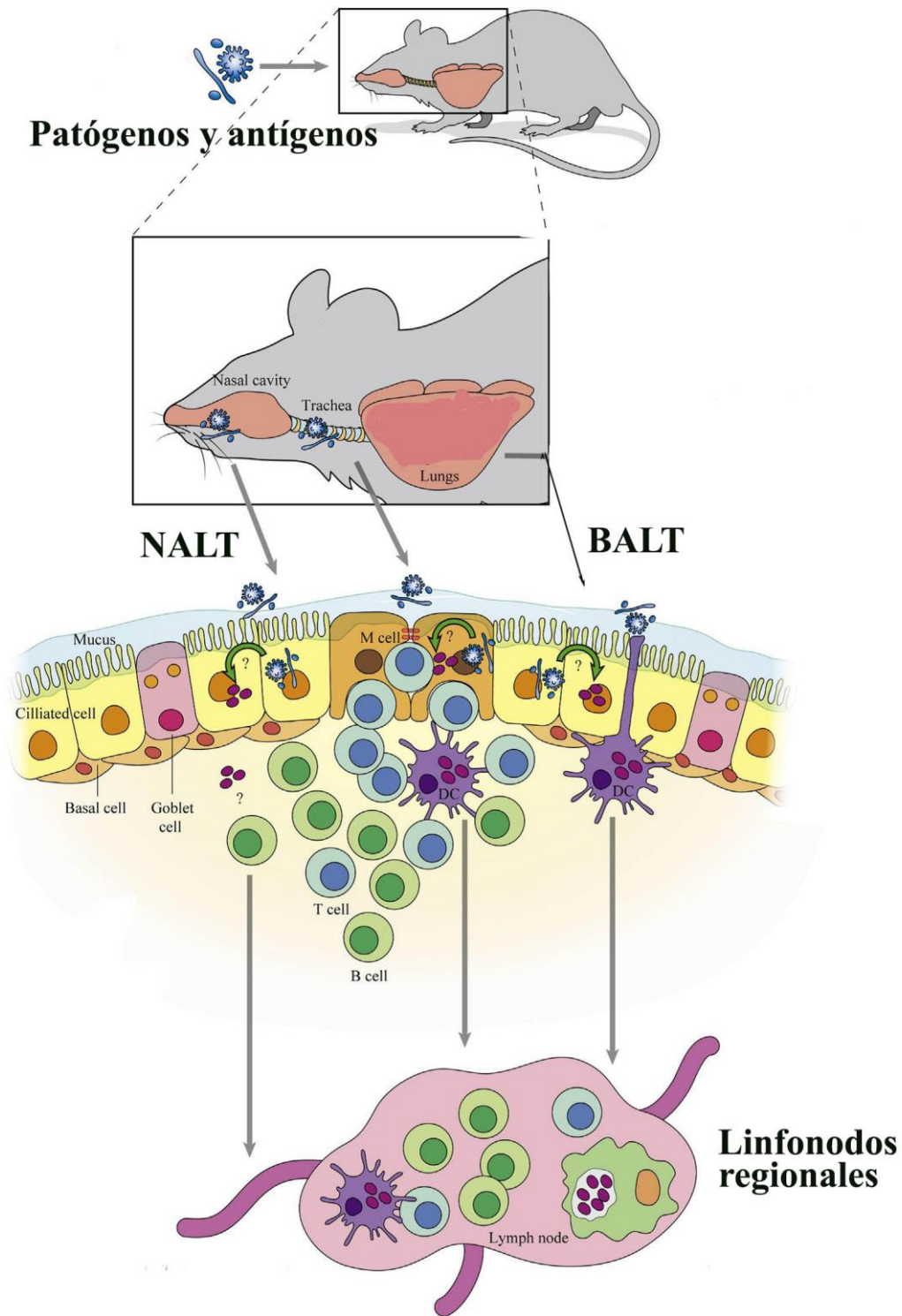
El muestreo y la transferencia de antígenos a través del LE lo realizan las células M y las CD cuyas prolongaciones citoplásmicas llegan hasta la superficie luminal del epitelio y pueden pinocitar/endocitar el moco que cubre la superficie epitelial. Por ello se les conoce como CD que muestrean moco. Algunos componentes del MALT son constitutivos de ciertas mucosas, como las amígdalas y las Placas de Peyer; otros componentes tales como el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT, por sus siglas en inglés Bronchus-Associated Lymphoid Tissue) y los ILF pueden ser inducidos en algunas especies de mamíferos luego de la exposición a antígenos o de inflamación repetitivas o crónicas. La recirculación de linfocitos en el MALT se da a través de las vénulas de endotelio alto (HEV, por sus siglas en inglés High Endothelial Venules) presentes en las áreas interfoliculares, cuyo endotelio expresa adhesinas que unen y regulan la transmigración al tejido linfoide de linfocitos que expresan L-selectinas. <sup>(7-11)</sup>

Los representantes mejor descritos del MALT, además del NALT y del BALT, son el tejido linfoide asociado a intestino (GALT), el tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT), el tejido linfoide asociado al conducto lagrimal (LDALT), el tejido linfoide asociado a la laringe (LALT) y el tejido linfoide asociado al conducto salival (DALT).<sup>(12, 13)</sup> El NALT se ha descrito en pequeños roedores de laboratorio,<sup>(14-16)</sup> en vacas,<sup>(17)</sup> monos,<sup>(18)</sup> caballos,<sup>(19, 20)</sup> aves,<sup>(21)</sup> perros,<sup>(22)</sup> murciélagos.<sup>(23)</sup> En humanos el NALT sólo es identificable durante los primeros años de vida.<sup>(24)</sup>

## **Tejido Linfoide Asociado a la Nariz (NALT)**

Anatómica e histológicamente el NALT ha sido estudiado en algunos roedores de laboratorio (Fig. 1).<sup>(15-29)</sup> El NALT está formado por dos agregados linfoides no encapsulados localizados en el piso de la cavidad nasal, uno a cada lado del tabique nasal y por arriba del paladar blando, a ambos lados del conducto de la nasofaringe, y se considera análogo al anillo de Waldeyer <sup>(27-38,39)</sup> en humanos.<sup>(40,41)</sup> La equivalencia funcional del NALT con otros órganos linfoides secundarios está fundamentada por la presencia de poblacionales de células T y B, de un epitelio respiratorio modificado asociado a los folículos (nódulos) o epitelio asociados a folículos (FAE, por sus siglas en inglés, Follicle-Associated Epithelium)<sup>(30)</sup> con células M<sup>(42)</sup>, a través de los cuales pueden entrar diferentes patógenos y antígenos presentes en el aire inspirado. La predominancia de linfocitos CD4+ Th0 sobre los CD8+ indica que en el NALT puede inducirse respuestas Th1 o Th2.<sup>(23)</sup>

Como en la mayoría de los órganos linfoides secundarios del MALT, el NALT carece de vasos linfáticos aferentes. La llegada de linfocitos T y B ocurre a través de las HEV. La migración de linfocitos T activados y células plasmáticas se da por los vasos linfáticos eferentes que desembocan en la circulación venosa o a otro ganglio linfático si se trata de una cadena ganglionar. Un esquema del MALT en roedores, en particular de los componentes del NALT y del BALT, se representa en la figura 1.



**Figura 1.** Tejido linfóide asociado a las mucosas de vías respiratorias como sitio de interacción inicial con patógenos y antígenos. (Modificada de Sahaza et al., 2014).<sup>(43)</sup>

## **Organización y localización del NALT en algunos mamíferos**

**Ratón** (Fig. 2A-D) y **rata** (Fig. 2E). El NALT (flechas) está situado en los ángulos basolateral de la cavidad nasal (NC) por encima del paladar. En un corte transversal del paladar aislado (B) se observa un folículo linfoide primario (flecha), mientras que en un corte horizontal del paladar aislado (C), la presencia y tamaño del NALT se ven claramente, así como algunas áreas de NALT ricas en vénulas de endotelio alto (D, puntas de flecha y círculo en blanco).

**Conejo** (Figs. 2F, G). Está organizado en grupos de nódulos linfoides separados por regiones internodulares, de 1 a 3.3 cm de largo, localizados medialmente a los meatos nasales ventrales. Caudalmente, el NALT se extiende en forma de una banda en la parte inferior del meato nasal ventral y es continuo con el tejido linfoide de las paredes laterales y del dorso del meato nasofaríngeo. Adicionalmente, los linfocitos intraepiteliales e ILF están presentes en posiciones aleatorias dentro de la mucosa de los cornetes nasales. El NALT más voluminoso del conejo se encuentra en el tercio medio de la cavidad nasal <sup>(44)</sup> y es más abundante en comparación con roedores de laboratorio. En la Fig. 2F se identifica el tabique nasal (1), el meato nasal dorsal (2), el meato nasal común (3), el meato medio nasal (3'), el meato nasal ventral (4), la concha dorsal nasal (5), la concha nasal ventral (6), en las láminas en espiral y en la lámina propia hay linfocitos intraepiteliales y pequeños ILF (7), paladar duro (8), cavidad oral (9), la raíz del incisivo superior (10) y el órgano vomeronasal (11). En la Fig. 2G se identifica (1) meato nasal dorsal (2), meato nasal medio (3), meato nasal ventral (4), concha nasal dorsal (5), cornete medio (6), cornete dorsal sinusal (7), seno maxilar (8), el conducto lagrimal con LDALT, (flechas) (9), el paladar duro (10) y la cavidad oral (11). (A) folículos linfoides secundarios (II fol) cubiertos por FAE en la parte inferior del meato nasal ventral. (B) folículo linfoide secundario (II fol) cubierto por el FAE en la pared del meato nasal medio. En la región interfolicular se señalan las HEV.

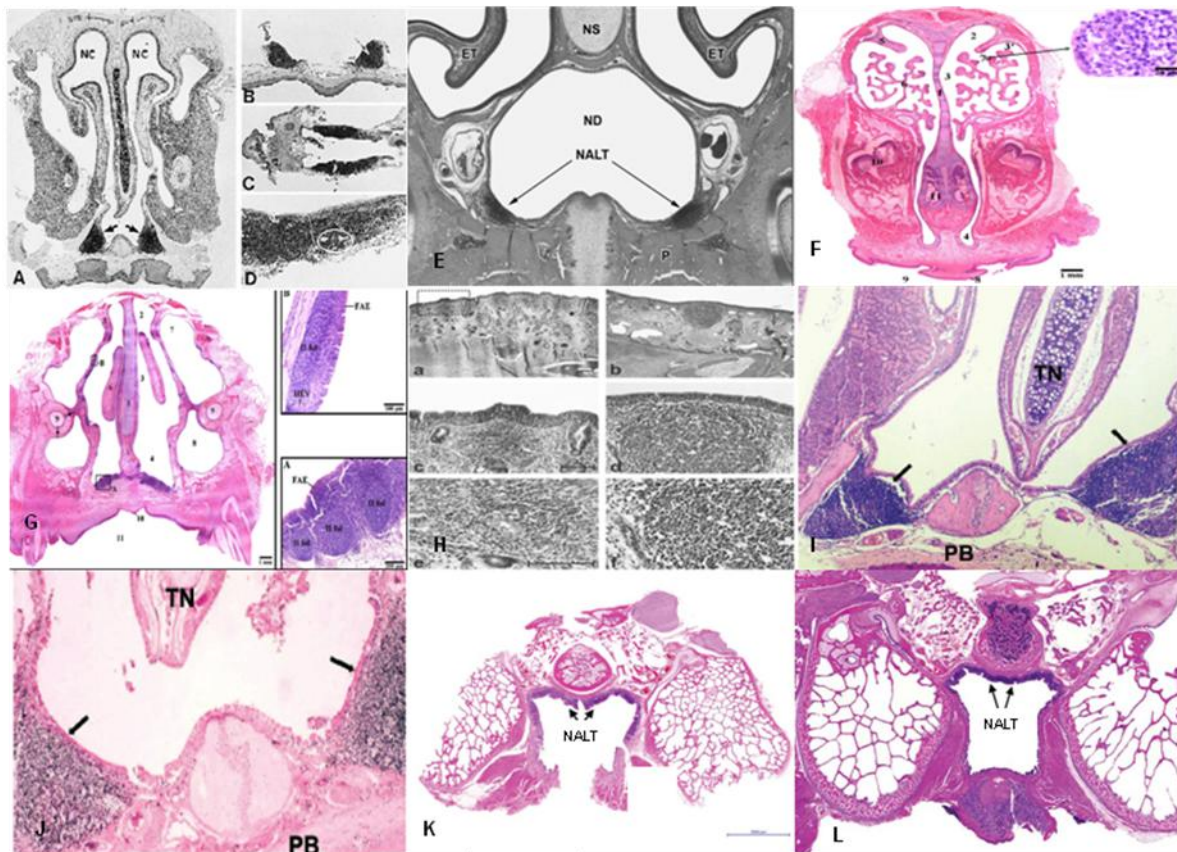
**Humano**. En los primeros 2 a 4 años de vida, el NALT puede encontrarse principalmente en las regiones anteriores de los cornetes (Fig. 2H). Posteriormente es difícil encontrar nódulos linfoides en casi toda la cavidad nasal. El NALT en humanos, se dice, “migra” hacia la parte posterior de las conchas y es identificado como la tonsila nasofaríngea o adenoides. <sup>(44)</sup> Éstas, junto con las tonsilas tubarias, las bandas linfoides faríngeas y las tonsilas lingual y palatinas, forman el anillo de Waldeyer.

**Murciélago**. El NALT está formado por dos agregados linfoides no encapsulados, localizados en el piso de la cavidad nasal, uno a cada lado del tabique nasal y por arriba del paladar blando <sup>(23)</sup> (Figs. 2I, J). Los nódulos linfoides están cubiertos por un epitelio cilíndrico simple pseudoestratificado con algunas células caliciformes.



**Minicerdos:** el NALT es un órgano impar, presente desde el primer día de edad, localizado en el techo del conducto nasofaríngeo, <sup>(46)</sup> organizado en nódulos linfoides no encapsulados cubiertos por LE bordeado por epitelio respiratorio (Figs. 2K, L). Desde el tercer día de edad se observa un incremento de su tamaño, con desarrollo prominente de centros germinales, lo que sugiere la activación de respuestas inmunes asociadas al NALT ante los retos antigénicos posnatales.

**Cerdos comerciales.** En la actualidad no se tiene información de la presencia del NALT en cerdos (*Sus scrofa domesticus*) comerciales o de producción intensiva. En lechones de 1 a 28 días de edad se ha hecho una descripción de los tipos de epitelio que revisten la cavidad nasal pero no se ha informado de la presencia de agregados linfoides. <sup>(47)</sup> Un reporte histológico de la mucosa nasal de cerdos describe la caracterización histoquímica de células caliciformes. <sup>(48)</sup>



**Figura 2.** Tejido Linfoide Asociado a la Nariz en diferentes especies. Ratón (a-d), rata (e) conejo (f, g), humano (h), murciélago (i, j) y minicerdo (k, l). NC: cavidad nasal. NS: septo nasal. TN: Tabique nasal. PB: paladar blando. P: paladar duro. FAE: epitelio asociado a folículos. ND: ducto nasofaríngeo. ET: turbina etmoidal. IIFol: Folículos secundarios., ILF: folículo linfoide aislados.

## **Células Dendríticas, Células Dendríticas Foliculares y Órganos Linfoides Secundarios**

Las células dendríticas (CD) son un grupo especializado y heterogéneo de células presentadoras de antígenos, que están presentes en los órganos linfoides secundarios. Se han descrito hasta 4 tipos de CD, que proporcionan estructura y estabilidad funcional para el microambiente de los ganglios linfáticos,<sup>(49)</sup> pero que difieren en su ubicación histológica, ultraestructura y función, estas incluyen: Células dendríticas foliculares (FDC), células dendríticas interdigitantes, células de Langerhans, y las células fibroblásticas/histiocitarias.<sup>(49,50)</sup> Por su relación con uno de los objetivos del presente trabajo, mencionaremos algunas características de las FDC.

Las FDCs fueron originalmente identificadas por su morfología y por su capacidad de atrapar complejos inmunes (ICs por sus siglas en inglés immune complexes) en los nódulos de las zonas B dependientes de los ganglios linfáticos, del tejido linfoide asociado a mucosas y del bazo. Estos ICs son retenidos durante meses o años en la malla tridimensional compleja de prolongaciones citoplásmicas o dendritas de las FDC.<sup>(51)</sup> Éstas no son un subtipo de CD convencionales (células dendríticas mieloides, células dendríticas plasmacitoides, células de Langerhans y células dendríticas interdigitantes) ni se originan de precursores presentes en la médula ósea. Las FDC son de origen estromal y se desarrollan a partir de células vasculares murales.<sup>(49)</sup> Funcionalmente, también difieren de las CD convencionales. Éstas captan y procesan antígenos para ser presentados, en el contexto de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), a las células T CD4 positivos vírgenes, mientras que las FDC presentan intacto los ICs en su superficie celular sin la necesidad del MHC.<sup>(52,53)</sup> Esta característica, junto con la provisión de quimiocinas, moléculas de adhesión, y factores tróficos, permiten que las FDC mantengan la formación y expansión en la respuesta de células B y moldeen el microambiente local.

Los zonas B dependientes de los órganos linfoides secundarios, funcional y estructuralmente, tienen una colaboración mutuamente dependiente de las células B y FDC: mientras que la FDC proporciona señales para retener y mantener a las células B en los nódulos, las células B son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la FDC, a través del factor de necrosis tumoral (TNF) y la linfo toxina (LT). Los órganos linfoides que carecen de células B o de cualquiera de estas citoquinas, carecen también de FDC.<sup>(50,51,54)</sup> Los ratones que carecen de estas citoquinas, de sus receptores respectivos, o factores esenciales para su señalización no sólo no desarrollan FDC, sino que también son incapaces de formar adecuadamente los nódulos de células B como parte de la estructura sofisticada linfoide. Esto sugiere que las FDC ejercen un papel fundamental en la retención de células B en los nódulos de los órganos linfoides secundarios.

La exposición de ICs en la superficie celular por largos periodo de tiempo, está relacionada con la expresión de diversos receptores como CD21, CD35, y para el Fc de IgE (CD23) y de IgG (CD32)

y del complemento. Junto con ciertas quimiocinas (Factor de necrosis tumoral y linfoxina), todos estos marcadores son esenciales para la supervivencia de las células B en el centro germinal, en asociación estrecha con las FDC. <sup>(55-57)</sup>

### **Respuesta inmune asociada a mucosas hasta el destete**

La inmunidad en el cerdo, como la de otros organismos, es compleja y enlaza defensas de tipo inespecífico con mecanismos específicos mediados por anticuerpos y por la inmunidad celular. <sup>(58, 59)</sup> Durante el desarrollo intrauterino, las inmunoglobulinas no cruzan la placenta por lo que los lechones son agamaglobulinémicos al nacimiento; <sup>(60)</sup> sin embargo, son competentes inmunológicamente <sup>(61,62)</sup> pero aun no pueden favorecer respuestas inmunes rápidas sistémicas y locales de la mucosa. La supervivencia depende directamente de la adquisición de la inmunidad materna a través del calostro y la leche <sup>(63,64)</sup>. La protección por la inmunidad materna es mediada por un número de factores, incluida la inmunidad humoral sistémica específica, que implica IgG e IgA maternas transferidas en calostro y absorbidas dentro de las primeras 36 h de vida <sup>(65,66)</sup>. El aumento en la calidad del calostro depende de la estimulación de la inmunidad sistémica. <sup>(67-69)</sup>

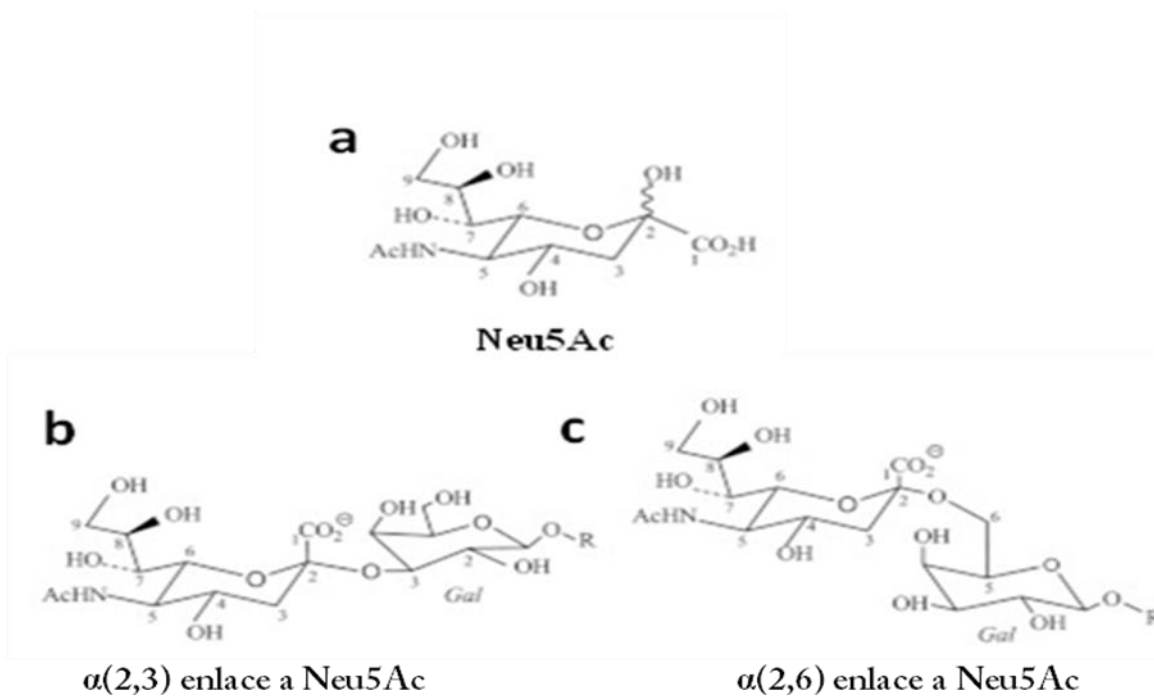
### **Receptores con ácido siálico en la mucosa nasal del cerdo**

Las moléculas de ácido siálico son monosacáridos, que se expresan en todas las células de los animales superiores (ver estructura más adelante). Se encuentran en complejos de carbohidratos (glicoproteínas y glicolípidos) y se localizan en las membranas celulares. Su diversidad estructural es alta cerca de 50 miembros. Estos monosacáridos participan directa o indirectamente en múltiples y diversos eventos celulares. También representan sitios de reconocimiento para varios receptores fisiológicos, así como para las toxinas y microorganismos, y de este modo permitir su colonización. Muchos virus utilizan como receptor de entrada moléculas de ácidos siálicos en la infección de células. Está bien establecido que el ciclo de replicación del Rubulavirus porcino (RVP, paramixovirus) <sup>(70)</sup> tiene lugar en el citoplasma de la célula hospedera. La adsorción del virus se produce en la superficie de la membrana de la célula hospedera. La proteína de unión del RVP (HN) reconoce y se une a moléculas que contienen ácido siálico <sup>(71)</sup>.

La expresión y distribución de ácido siálico (SA, por sus siglas en inglés sialic acid) en las células animales, parece estar regulada por el desarrollo y variación entre especies. <sup>(72-75)</sup> El reconocimiento del ácido siálico está dada por:

El tipo de residuo de ácido siálico, unión entre el residuo de ácido siálico (s) y la cadena de oligosacárido, secuencia de la cadena de oligosacárido, número de residuos de ácido siálico, disposición espacial de los residuos de ácido siálico.

Se ha demostrado la presencia de dos tipos de moléculas de ácido siálico (Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal y Neu5Ac $\alpha$ 2,6Gal) en el tracto respiratorio superior de los cerdos, los cuales también son reconocidos como receptores por el virus de Influenza de cerdos y aves <sup>(76-78)</sup>. En 2002 se identificó que la mayoría de los tejidos porcinos expresan ácidos siálicos  $\alpha$ -2,3 y  $\alpha$ -2,6 utilizando lectinas específicas como *Maackia amurensis* (MAA, Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal) y *Sambucus nigra* (SNA, Neu5Ac $\alpha$ 2,6Gal). <sup>(79)</sup> Leyva y cols. (2002) indican que la molécula Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal es el componente esencial del receptor celular de Rubulavirus porcino y que los cambios en su expresión determinan la susceptibilidad o resistencia a la infección viral. <sup>(80-82)</sup>



Estructura de los ácidos siálicos. **a:** ácido siálico común es el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). **b:** ácido N-acetilneuramínico unidos por enlace glicosídico alfa 2-3 a galactosa (NeuAca $\alpha$ 2,3Gal). **c:** ácido N-acetilneuramínico unidos por enlace glicosídico alfa 2-6 a galactosa (NeuAca $\alpha$ 2,6Gal). Tomado y modificado de <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/gang/index.htm>

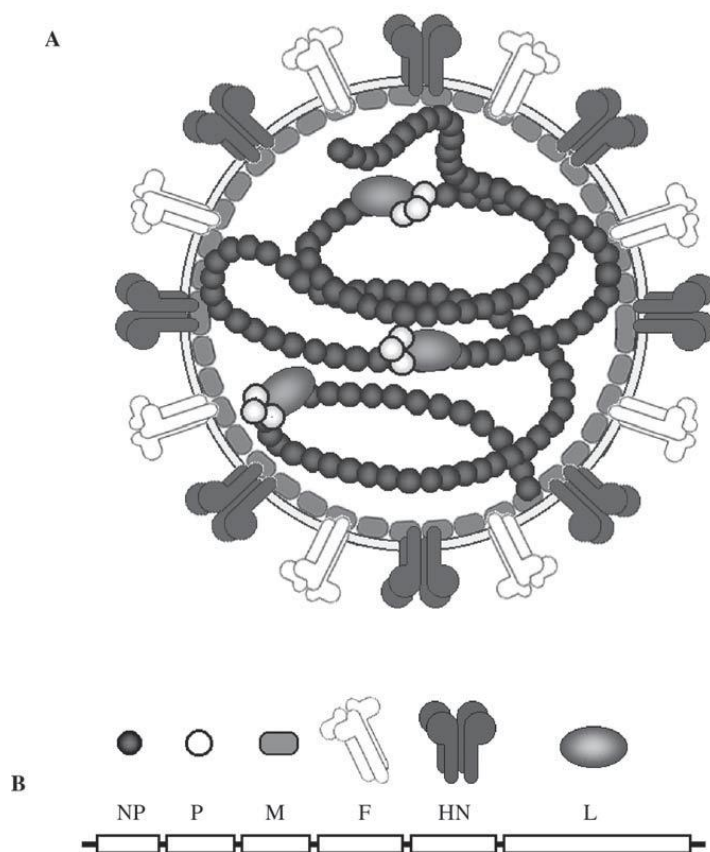
## Lectinas

Son proteínas de origen vegetal, animal, bacteriano o viral que reconocen específicamente carbohidratos. Existen lectinas con actividad aglutinante sobre eritrocitos (hemaglutininas), leucocitos (leucoaglutininas), con actividad mitogénica sobre diversas células (concanavalina A) o con actividad citotóxica (lectina de *Ricinus vulgaris*). La unión específica de las lectinas a determinados azúcares ha permitido utilizarlas (en forma similar a los anticuerpos) como reactivos de reconocimiento en técnicas histoquímicas. Todas las actividades biológicas reportadas para las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor oligosacarídico. <sup>(83-95)</sup>

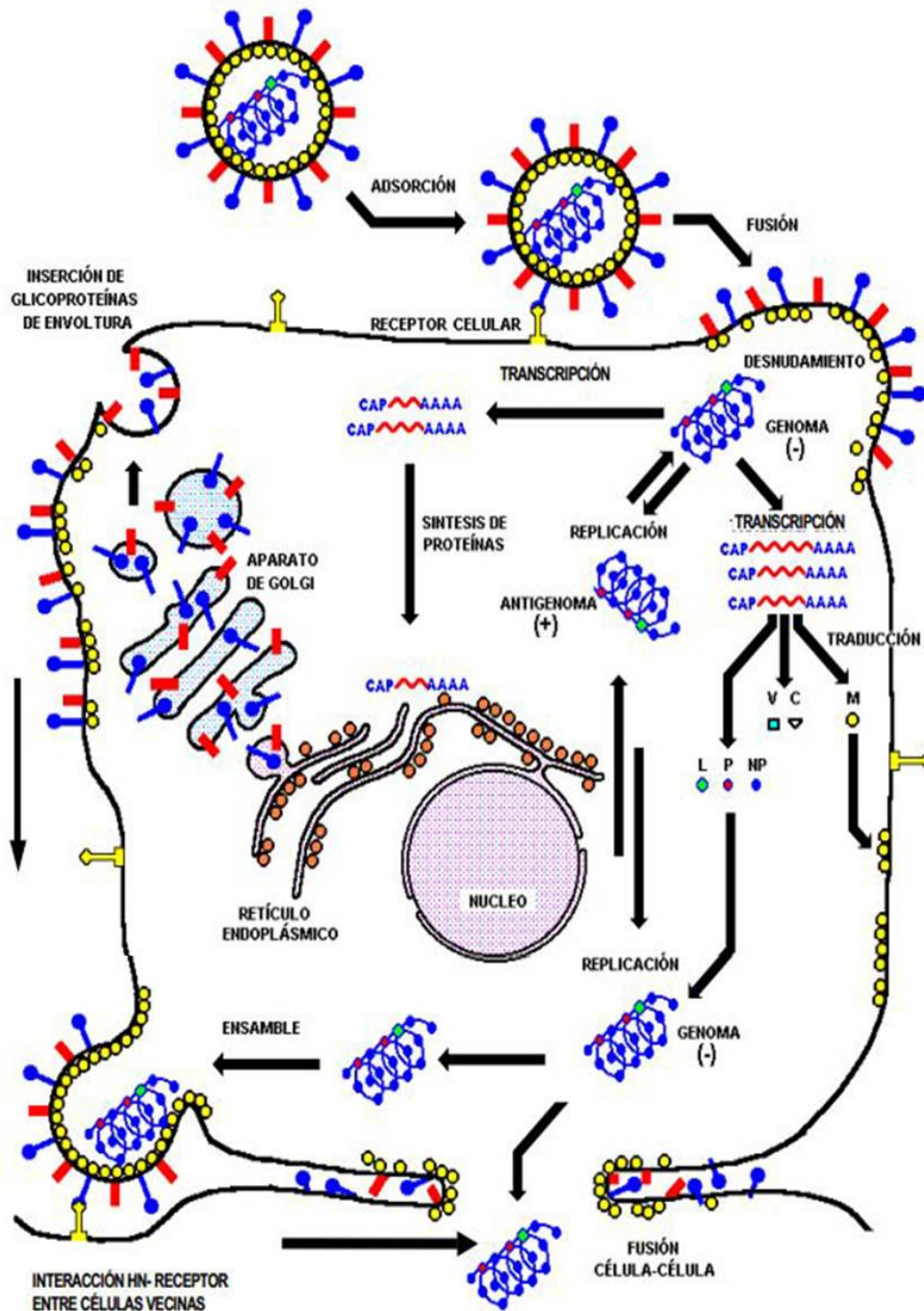
## Enfermedad del ojo azul

Rubulavirus porcino (RVP) es un virus emergente detectado en 1980 en La Piedad, Michoacán <sup>(96-99)</sup> México. Es el agente etiológico de la enfermedad del ojo azul, en todas las edades del cerdo. La enfermedad está caracterizada por alteraciones neurológicas, reproductivas, respiratorias y, ocasionalmente, opacidad de la córnea, de allí el nombre de enfermedad del ojo azul. <sup>(96-99)</sup> En la actualidad, México es el único país en el que se ha reconocido a esta enfermedad. <sup>(100,101)</sup> Debido a su similitud estructural, funcional y genética con los virus de la parotiditis humana, parainfluenza humana 2, 4 y parainfluenza símica 5, RVP fue clasificado en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Rubulavirus*, especie *Rubulavirus porcino*. <sup>(85,102-105)</sup>

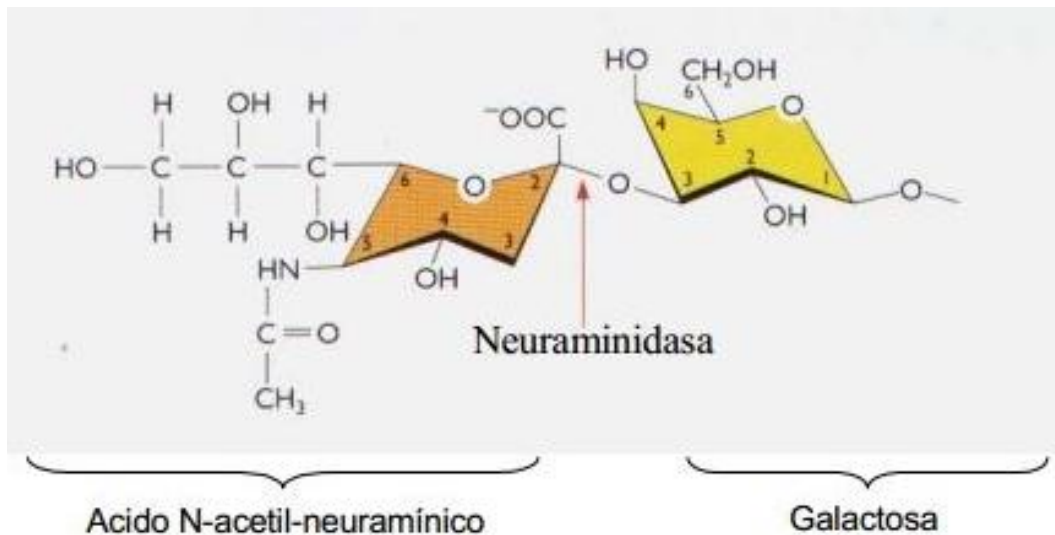
El RVP es un virus envuelto con genoma de ARN de polaridad negativa, pleomórfico, con un diámetro aproximado de  $135 \pm 360$  nm, formado por una cubierta lipídica con las glicoproteínas hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N), la proteína 66 kDa y la proteína F de 59 kDa. La transmisión del RVP es de un individuo a otro por vía aérea, por medio de microgotas inhaladas que contienen el virus. De acuerdo con diversas evidencias experimentales, la multiplicación inicial del RVP se lleva a cabo en la mucosa nasofaríngea y el tejido linfoide asociado; posteriormente el virus se disemina por las vías aéreas inferiores donde se replica abundantemente. El inicio de la infección por RVP está determinado por el reconocimiento y unión a moléculas glicosiladas con ácido siálico (Neu5Ac), expresadas en la membrana plasmática de las células epiteliales de la mucosa de vías respiratorias. <sup>(69, 100, 105)</sup>



**Figura 3.** a) Esquema del RVP. En la superficie de la membrana viral se encuentran las glicoproteínas transmembranales HN y F, en la parte interna de la misma se localiza la proteína de matriz M. Íntimamente ligada a la cadena de ARN se encuentran las nucleoproteínas (NP) que conforman la nucleocápside helicoidal y las proteínas P y L que forman el complejo con actividad polimerasa del virus. Tomada y modificada de Santos-López y cols., 2004. <sup>(84)</sup>



**Figura 4.** Ciclo de infección de Rubulavirus. Tomado de Leyva et al, 2002, con base a 1. Lamb RA, Kolakofsky D (1996). Paramyxoviridae: The viruses and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. (Eds). Fields Virology. Tercera Ed. Lippincott-Raven Publishers. Filadelfia-Nueva York, pp. 1177-1204



**Figura 5.** Estructura del disacárido sialil $\alpha$ 2,3-galactosa. Esta molécula está formada por un residuo de ácido N-acetil-neuramínico unido en enlace glicosídico alfa al carbono 3 de la galactosa. Se muestra el sitio de corte de la enzima neuraminidasa. Los estudios indican que esta molécula es componente del receptor celular del rubulavirus porcino. Tomado de Leyva et al, 2002.

### RVP se une al ácido siálico a través de Hemaglutinina

El genoma de RVP tiene seis genes (Fig.3). La nucleocápside está constituida por el ARN genómico y la nucleoproteína (NP), a la cual se asocian la fosfoproteína (P) y una proteína de alto peso molecular (L). En la envoltura viral se encuentran las proteínas de matriz (M), la de fusión (F) y la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) <sup>(84,102)</sup>. La HN es la principal proteína involucrada en el inicio de la infección (Fig. 4), reconoce al receptor en la membrana de la célula hospedera (actividad hemaglutinante, HA), que es un ácido neuramínico unido a glicoproteínas o glicolípidos en la membrana celular; coopera con la proteína F para fusionar las membranas celular y viral, paso importante para el ingreso del genoma viral en la célula. La HN tiene también actividad de neuraminidasa (NA)(Fig. 5), la cual consiste en la remoción de residuos de ácido siálico de la progenie viral.<sup>(105,106)</sup>

La proteína HN del RVP reconoce al receptor en la membrana de la célula a través del ácido siálico o ácido neuramínico  $\alpha$ 2,3 galactosa. De igual forma las lectinas son capaces de reconocer y de unirse a glúcidos terminales que forman parte de cadenas de oligosacáridos, ya sea de manera libre o formando parte de glicoproteínas, esto se lleva a cabo por el dominio de reconocimiento a carbohidratos. Así, la aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA), reconoce al ácido siálico  $\alpha$ 2,3 Gal y la aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) reconoce al ácido siálico  $\alpha$ 2,6 Gal o a Nacetil-



galactosamina. Leyva y cols. (2002)<sup>(81)</sup> demostraron que tanto MAA y RVP reconocen la molécula Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal, componente primordial del receptor celular de RVP.

## **JUSTIFICACIÓN**

La mucosa nasal es la puerta de entrada de numerosos patógenos y antígenos presentes en el aire inspirado. En los cerdos se le identifica como el sitio de interacción con patógenos de importancia veterinaria desde los primeros días de vida posnatal. Para el caso de RVP se ha destacado, *in vitro*, la relevancia de la expresión de glicoconjugados con ácido siálico  $\alpha 2,3\text{Gal}$  en la membrana de las células del hospedero. Hasta ahora no ha sido identificado *in vivo* e *in situ* la expresión de estos sialogluconjugados en la mucosa nasal de cerdos jóvenes, durante el primer mes de vida posnatal. Más aún, existen pocos antecedentes de las características histológicas o del estado de histodiferenciación de la mucosa nasal posnatal, circunstancia que podría estar relacionada con el establecimiento de mecanismos de inmunidad innata relevantes para la interacción con patógenos y antígenos. Asimismo, y dada la importancia del NALT como sitio de inducción de respuestas inmunológicas locales y sistémica, no hay evidencia de la identificación en cerdos comerciales de este representante de los órganos linfoides secundarios.

## **HIPÓTESIS**

Si la infección con RVP está asociada a la expresión celular de glicoconjugados con ácido siálico  $\alpha 2,3\text{Gal}$ , entonces RVP inoculado intranasalmente se localizará en los sitios de la mucosa nasal que expresen dichos glicoconjugados.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar las características histológicas de diferentes regiones de la mucosa nasal, incluyendo al NALT de cerdos jóvenes y la expresión de receptores  $\alpha$ 2,3Gal y  $\alpha$ 2,6Gal con histoquímica de lectinas, respectivamente, así como la interacción de RVP (Pac-3 La Piedad) con la mucosa nasal de cerdos de 15 y 30 días de edad, posterior a una inoculación intranasal experimental.

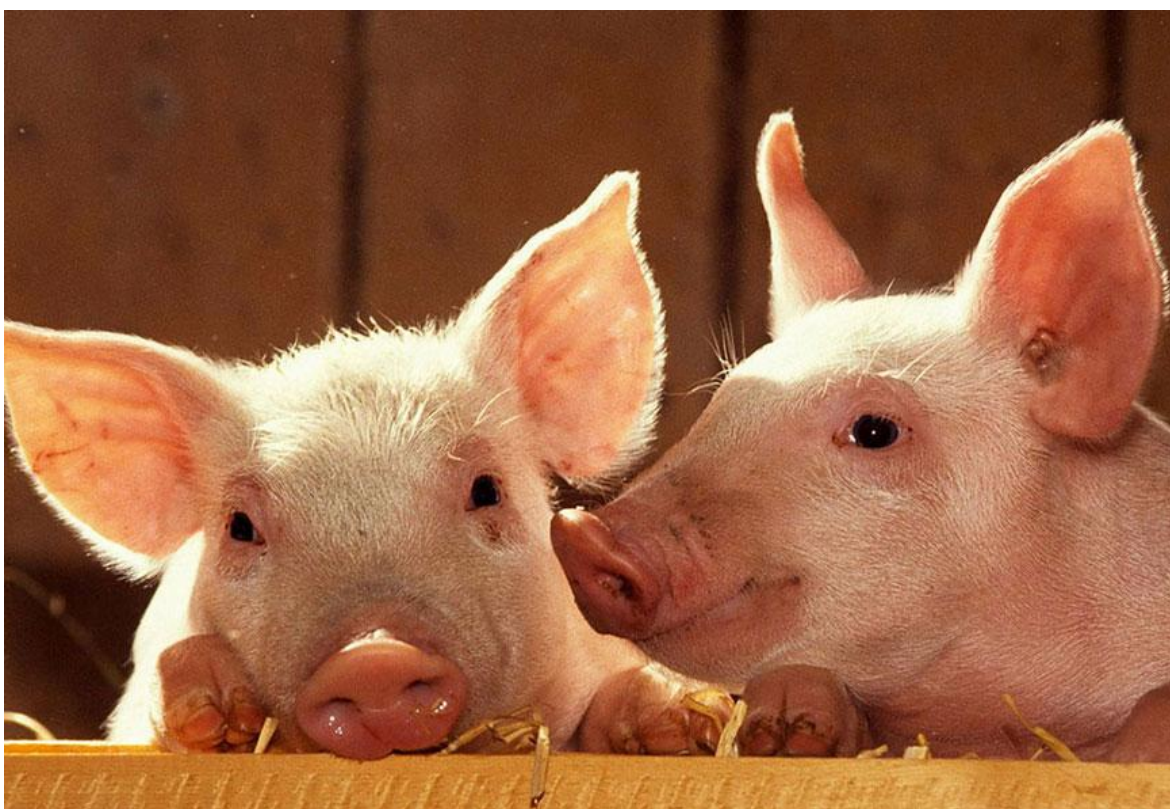
## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Identificar las características histológicas de la mucosa nasal común en los diferentes segmentos de la cavidad nasal y del NALT de cerdos de 15 y 30 días de edad.
- Identificar histoquímicamente con MAA y SNA la presencia y distribución de ácido siálico  $\alpha$ 2,3Gal y  $\alpha$ 2,6Gal, respectivamente, en la mucosa nasal de los diferentes segmentos de la cavidad nasal y del NALT de cerdos de 15 y 30 días de edad.
- Identificar inmunohistoquímicamente la localización de RVP con la mucosa nasal y en el NALT, 1 y 3 horas post-inoculación intranasal de cerdos de 15 y 30 días de edad.
- Correlacionar los sitios anatómicos e histológicos de la mucosa nasal de cerdos de 15 y 30 días de edad en los que se identifique la expresión de ácido siálico  $\alpha$ 2,3Gal y  $\alpha$ 2,6Gal, con la presencia del inmunorreactividad al RVP inoculado intranasalmente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se emplearon 28 cerdos machos híbridos York-Landrace de 15 y 30 días de edad (Fig. 6), divididos por edad en 2 grupos de 14 animales cada uno, castrados, provenientes de la granja del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los cerdos fueron trasladados al bioterio de la Facultad de Medicina (UNAM), el cual fue adaptado para el mantenimiento a corto plazo de los animales, donde fueron alimentados con una dieta comercial y agua *ad libitum*. Posterior a un periodo de adaptación de 2 días, los cerdos fueron asignados por edad y al azar a cada grupo experimental (Tabla 1). Todos los procedimientos y el protocolo experimental fueron aprobados de acuerdo a las recomendaciones del Comité de Usos y Cuidados de Animales de Laboratorio, con base en la Guía Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) <sup>(107)</sup>.



**Figura 6.** Cerdos machos híbridos York-Landrace de 15 y 30 días de edad.

## Virus

El Rubulavirus porcino (RVP) cepa PAC3 se propagó en cultivo de células de riñón canino (MDCK/127: *Madin-Darby Canine Kidney*), se determinó el título viral y se ajustó a  $1 \times 10^5$  DICC<sub>50</sub>/mL. La cepa PAC3 del RVP se caracteriza por provocar cuadros subclínicos en cerdos en crecimiento, originando daños leves a nivel del tracto respiratorio<sup>(81,108)</sup>. El virus fue proporcionado por el Dr. Humberto Ramírez Mendoza, jefe del laboratorio 3317-A de Virología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

## Diseño experimental

Diseño experimental				
Edad	Grupo 1		Grupo 2	
	15 días		30 días	
Tiempo	1 h	3 h	1 h	3 h
Controles	3	3	3	3
Experimentales	4	4	4	4

Tabla 1. Diseño experimental para la identificación e interacción del RVP con la mucosa nasal de cerdos, 1 y 3 horas post-inoculación por instilación intranasal.

## Infeción experimental

Se inocularon por vía nasal un total de 2ml del RVP, cepa PAC-3, a  $1 \times 10^5$  DICC<sub>50</sub>/mL a cada animal. El procedimiento se realizó sujetando al cerdo en decúbito dorsal, depositando 50  $\mu$ L cada 30 s en la narina del lado derecho. Después, se liberó al cerdo para permitir la libre ventilación y la interacción del inoculo con la mucosa nasal. Los animales controles fueron inoculados de la misma manera pero con solución salina estéril. Todos los animales fueron sacrificados de acuerdo al diseño experimental y de acuerdo a la NOM 062-ZOO-1999<sup>(107)</sup> administrando una sobredosis con pentobarbital sódico (1ml/5kg PV/IV).

## Lectinas

En la Tabla 2 están referidas las lectinas MAA y SNA utilizadas en el presente estudio y su especificidad por el ácido siálico correspondiente. Estas lectinas fueron seleccionadas porque su especificidad por sialoglucoconjugados es similar a la de la glucoproteína HN de RVP.

Lectina	Abreviación	Especificidad de carbohidrato	Dilución	Referencia
<i>Maackia amurensis</i>	MAA	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNA	1:100	Yamamoto et al., 1997 <sup>(109)</sup>
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal = NeuAc $\beta$ 2,6GalNA	1:100	Shibuya et al., 1987 <sup>(110)</sup>

Tabla 2. Lectinas utilizadas para identificar receptores en la mucosa nasal y NALT.

## Técnica Histológica Ordinaria con descalcificación del macizo óseo nasal

Después del sacrificio de los animales, se hizo pasar abundantemente por las narinas hasta el conducto nasofaríngeo una solución de formol al 10% amortiguado para fijar la mucosa nasal. La piel, mandíbula, bóveda craneana, tejidos blandos así como el exceso de hueso que rodea la cavidad nasal fueron retirados por disección (Figura 12) y el macizo óseo con cavidad nasal y conducto nasofaríngeo incluidos fueron fijados por inmersión (proporción espécimen/fijador 1:10) en formol al 10% durante 24 horas. Posteriormente, los especímenes nasales fueron lavados con agua corriente y solución salina fisiológica para retirar el exceso de fijador y luego fueron sumergidos en una solución acuosa de ácido fórmico al 5% durante 2 semanas <sup>(111,112)</sup>. Al concluir la descalcificación, las muestras se lavaron con agua corriente abundantemente.

El macizo óseo nasal fue seccionado en 15 segmentos de 1 cm de grosor, aproximadamente (Fig.10), y cada uno, perfectamente identificado en sentido anteroposterior, fue procesado para inclusión y corte en parafina. Para la histoquímica de lectinas y para la inmunohistoquímica, los cortes de 6  $\mu$ m de grosor, seriados, fueron adheridos en portaobjetos cargados Superfrost Plus (Shandon Inc. Pittsburg, PA USA). Algunos cortes dentro de la seriación fueron teñidos con hematoxilina-eosina y con la técnica de PAS, para el estudio histológico y para la identificación de componentes celulares y tisulares glicosilados, como glucocáliz, moco en glándulas seromucosas y mucosas y células caliciformes, respectivamente.

Los cortes histológicos adheridos a los portaobjetos fueron desparafinados y rehidratados con pasos decrecientes de concentraciones de solventes orgánicos desde xilol absoluto hasta alcohol al 70%. Se sumergieron en solución de hematoxilina de Gill por 3 min, fueron lavados con agua destilada y luego fueron teñidos durante 20 segundos en solución de eosina <sup>(112)</sup>. Después de la deshidratación en secuencia inversa a lo descrito arriba, desde etanol de gradación creciente hasta xilol absoluto, los cortes fueron montados con resina hidrofóbica Poly-mount (PolySciences, Warrington, PA, USA).

### **Histoquímica con lectinas para microscopía de fluorescencia**

Se realizó histoquímica <sup>(111,112)</sup> con las lectinas MAA y SNA, ambas biotiniladas, y como revelador de la unión a sialoconjugados se utilizó estreptavidina acoplada a fluoresceína. La observación y análisis de las preparaciones se realizó con los microscopios Leica DM 2000, adquiriendo las imágenes en una computadora con el programa FAST4. También se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 80i, ambos instrumentos equipados con epifluorescencia y cámara digital.

Los cortes fueron desparafinados en estufa a 56°C y por inmersión en xilol, rehidratados en etanol de gradación decreciente hasta agua y fueron enjuagados con PBS (pH 7.4) durante 5 min. Para la recuperación antigénica, los cortes fueron sumergidos en un vaso de Coplin con buffer de citrato de sodio (pH 6) y fueron colocados sobre una parrilla sumergida en 1-2cm de agua dentro de una olla de presión (vapor o express). La temperatura de reactivación fue a 130-140°C por 3 min. Después de dejar que los cortes tuvieran la temperatura ambiente (TA) fueron enjuagados en PBS, 3 veces de 5 min cada una. Los cortes fueron incubados a TA en albumina sérica bovina (BSA) libre de IgG al 2% y Tritón X-100 al 0.01% diluidos en PBS, durante 30 min. Posteriormente, se realizó el bloqueo de avidina y biotina endógenas (kit de bloqueo de Biocare Medical) durante 10 min cada uno y luego se enjuagó con PBS con CaCl<sub>2</sub> 1mM. La incubación con lectinas biotiniladas fue a 37°C por 2 h, MAA 1/100, y SNA 1/100 (ambas de Sigma) diluidas en PBS con BSA al 1%. Al término de la incubación, los cortes fueron enjuagados con PBS 2 veces de 5min cada una. Finalmente, los cortes fueron incubados en estreptavidina-FITC diluida en PBS a 37°C durante 1 h. Ya que los cortes en parafina de muestras fijadas con aldehídos presentan autofluorescencia emitiendo en verde y en rojo, los cortes fueron teñidos con Azul de Evans <sup>(113)</sup> (0.0018g en 10ml de agua destilada) durante 25 min, con la finalidad de virar toda la autofluorescencia a rojo (ver adelante), resaltando la emisión en verde de FITC. Para el montaje fue utilizado Vectashield-DAPI (Vector), 15µl por corte, a oscuras, y sellada con barniz de uñas alrededor del cubreobjetos.

Los cortes controles fueron procesados de la misma forma como se ha descrito pero se omitió la incubación en las lectinas, dejando los cortes cubiertos con PBS. Adicionalmente, para la

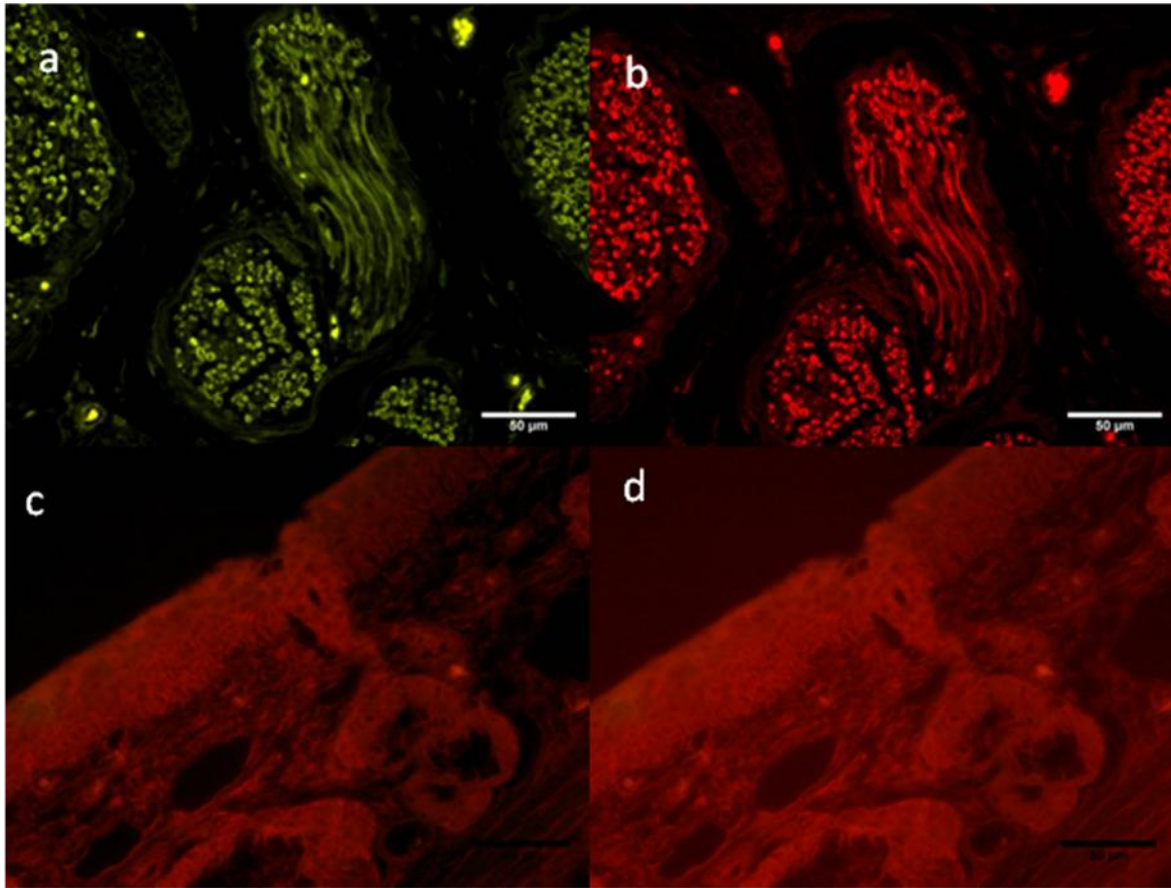
reproducibilidad de los resultados y como control técnico de la histoquímica con MAA y SNA, en algunos cortes se realizó una cinética de incubación con sialidasa (*Clostridium perfringens*, Sigma, St Louis, Mo, USA) para eliminar al ácido siálico específico (ver adelante).

### **Eliminación o virado de la autofluorescencia**

La autofluorescencia es un fenómeno común en muestras biológicas fijadas con aldehídos y, más aún, si son procesadas para inclusión y corte en parafina. Por lo anterior, previamente a la realización de histoquímica de lectinas biotiniladas y estreptavidina-FITC, llevamos a cabo varios procedimientos referidos como útiles para eliminar o virar la autofluorescencia, utilizando el azul de Evans,<sup>(113,114)</sup> amoníaco-etanol<sup>(115)</sup> y borohidruro de sodio.<sup>(116)</sup> De cada uno de los procedimientos, se realizó una cinética de tratamiento de cortes desparafinados y rehidratados, a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min, enjuagados con PBS y fueron montados con Vectashield-DAPI (Vector), 15µL por laminilla, a oscuras y sellados con barniz de uñas alrededor del cubreobjetos.

El mejor resultado se obtuvo con azul de Evans a los 25 min de tratamiento, virando el color verde de la autofluorescencia a un color rojo al ser excitado con la misma longitud de onda que excita a FITC (450-490 nm de longitud de onda) (Fig. 7). Es muy importante mencionar que los parámetros de contraste electrónico para la obtención de las fotomicrografías (tiempo de exposición, ganancia, factor gamma) se mantuvieron constantes para todas las muestras observadas. Asimismo, todas las fotomicrografías fueron procesadas con el programa Photoshop sólo para homogeneizar el fondo en negro de manera automática (niveles).

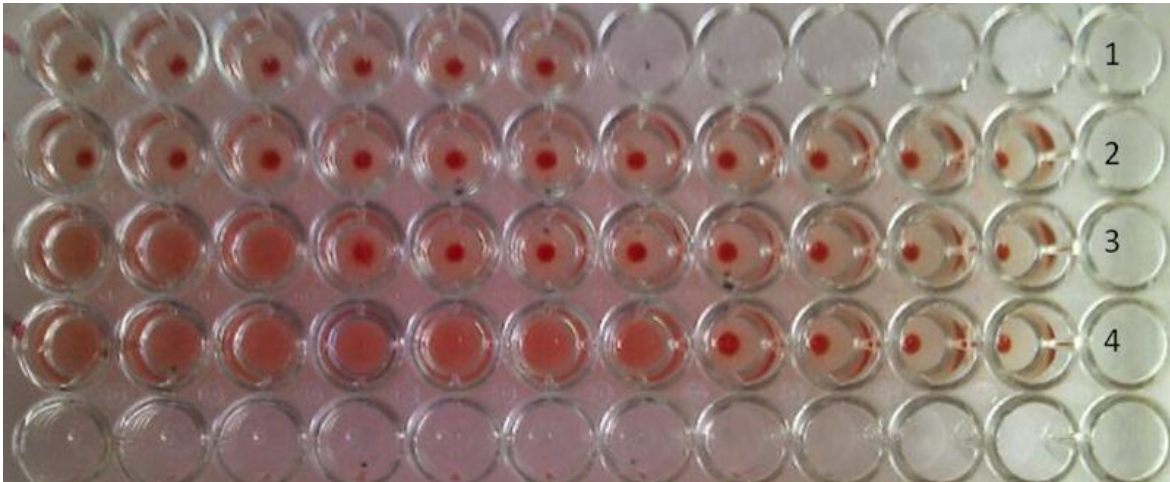




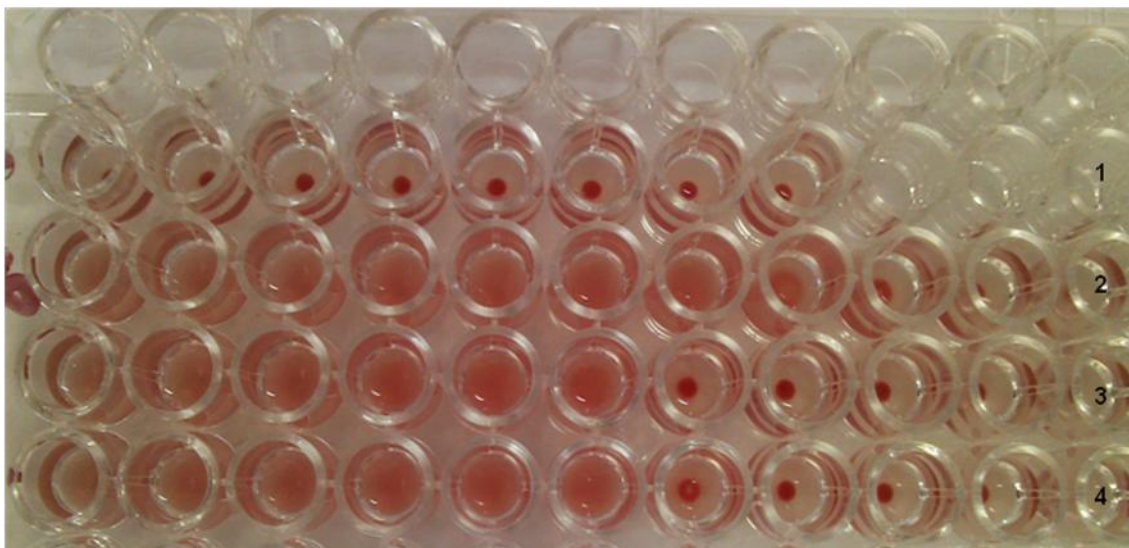
**Figura 7.** Corte seriados del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días. Se observa autofluorescencia en nervios excitados con longitudes de onda azul (a) y verde (b). La mucosa nasal tratada con azul de Evans y excitada con luz azul emite en rojo (d). La fotomicrografía de este corte fue editada con Photoshop, usando niveles en negro sólo para el fondo para eliminar el fondo y resaltar el virado de la autofluorescencia con azul de Evans (c). Nótese que la autofluorescencia en verde ha sido abatida.

### **Estudio de la especificidad de la lectina y de su actividad de hemaglutinación**

Se utilizaron eritrocitos de cerdos de 2 y 4 meses de edad ya que estas células expresan glicoconjugados de membrana ricos en ácido siálico. La actividad hemaglutinante de las lectinas fue evaluada por un ensayo de doble dilución seriada. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación de 96 pozos, los resultados se reportan como el inverso de la última dilución con actividad aglutinante:



**Figura 8.** Ensayo de hemaglutinación con las lectinas PNA (Peanut agglutinin), MAA y SNA. En el pozo: (1) control (PBS) y (2) con PNA no hubo hemaglutinación. (3) Con MAA hubo hemaglutinación el título es 8 y (4) con SNA es 128.



**Figura 9.** Ensayo de hemaglutinación con sialidasa con las lectinas PNA (Peanut agglutinin), MAA y SNA. En el pozo: (1) control (PBS) no hubo hemaglutinación. (2) con PNA el título es 256. (3) con MAA es 64 y (4) con SNA es 64.

### **Cinética de tratamiento con sialidasa de *Clostridium perfringens***

Los cortes utilizados en este ensayo fueron desparafinados, rehidratados, reactivados antigénicamente y bloqueados para avidina y biotina endógenas como se ha mencionado previamente. Para escindir los residuos de ácido siálico terminales unidos por enlaces  $\alpha(2-3)$  con una galactosa o por  $\alpha(2-6)$  a galactosa o a N-acetil-galactosamina, los cortes fueron incubados durante 2, 4, 6, 48 y 50h en cámara húmeda, a 37°C, con una sialidasa (neuraminidasa) de *Clostridium perfringens* (Sigma, St Louis, Mo, USA), 200  $\mu$ l de 1 unidad/ml, diluida en PBS,

renovando la enzima a las 12 h para los tiempos de 48 y 50h. Después de detener la actividad de la enzima con lavados en PBS, los cortes fueron procesados con el protocolo descrito para la histoquímica con lectinas biotiniladas y estreptavidina-FITC, virado al final con azul de Evans<sup>(113,114)</sup>, y análisis con microscopía de epifluorescencia.

### **Inmunohistoquímica enzimática para RVP**

Los cortes histológicos de las diferentes regiones y segmentos de la cavidad nasal de los cerdos inoculados por instilación del RVP fueron desparafinados, rehidratados, y reactivados antigénicamente como se mencionó anteriormente. Algunos de estos cortes fueron utilizados para hacer pruebas de bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 30%<sup>(112,113)</sup> en agua destilada por 10 min o peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 10 min o ácido periódico al 0.28% (0.0280 g en 10 ml de agua destilada) por 1 min. Después de enjuagar con PBS (pH 7.4) por 5 min, se hizo el revelado con 4.2 mg 3, 3'-diaminobencidina (DAB)<sup>(117)</sup> en 10 ml de Tris-HCl + 0.4 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % por 5 min. Los cortes fueron enjuagados con Tris-HCl y contrateñidos con hematoxilina de Harris por 30 s y lavados con agua corriente de la llave. Luego de deshidratarlos fueron montados con resina sintética.

Algunos cortes no fueron bloqueados de la peroxidasa endógena y fueron incubados en la solución de revelado (DAB/peróxido de hidrógeno) con el fin de saber la expresión de la enzima y comparar con los procedimientos de bloqueo ensayados.

Otro procedimiento estandarizado previamente fue el bloqueo de la unión inespecífica del anticuerpo secundario que se emplearía en inmunohistoquímica enzimática. Algunos cortes procesados como se ha descrito anteriormente y con el bloqueo de peroxidasa endógena que resultó mejor, fueron incubados con ASB al 1% y Tritón X-100 al 0.01% en Tris-HCl (solución de bloqueo de sitios de unión inespecíficos) durante 1h a 37°C. Después de escurrir y sin lavar los cortes, estos fueron cubiertos con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo hecho en cabra) acoplado a peroxidasa de raíz fuerte diluido 1/100 en Tris-HCl con BSA al 0.1% y Tritón X-100 al 0.01% durante 1h a 37°C. Finalmente, después de 3 lavados en Tris-HCl a TA, se realizó el revelado con 4.2 mg de 3, 3'-diaminobencidina (DAB) en 10 ml de Tris-HCl + 0.4 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % por 5 min<sup>(117)</sup>. Para analizar los resultados de los procedimientos, los cortes fueron contrateñidos con la hematoxilina de Harris por 30 s, lavados con agua de la llave, deshidratados en etanol de gradaciones crecientes y montados con resina sintética, utilizando cubreobjetos del número 1.

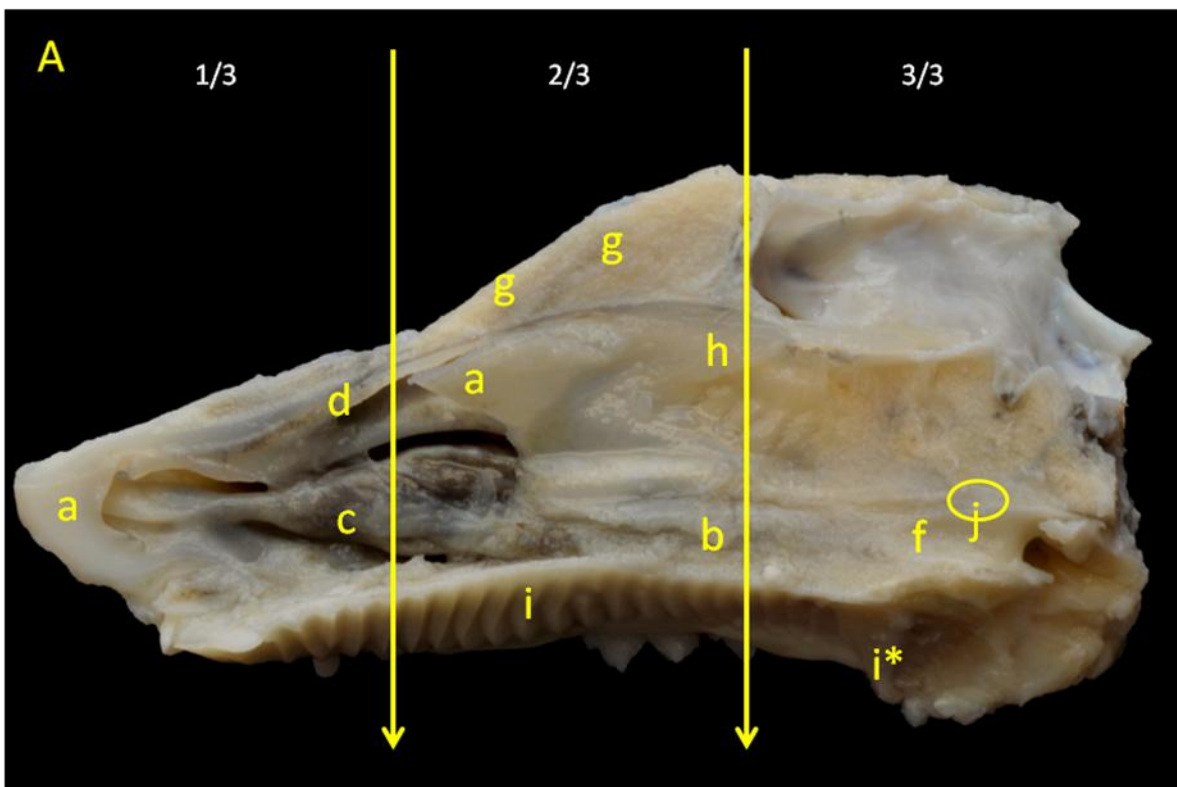
Algunos bloqueos de sitios de unión inespecífica fueron realizados adicionando suero normal del animal del que se obtuvo el anticuerpo secundario.

La última estandarización técnica fue probar varias diluciones del suero hiperinmune de conejo inmunizado con RVP, probado y donado por el Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, dirigido por el Dr. Iván Sánchez Betancourt. Brevemente, los cortes histológicos de las diferentes regiones y segmentos de la cavidad nasal de los cerdos inoculados por instilación del RVP (ver antes) fueron desparafinados, rehidratados, y reactivados antigénicamente como se mencionó anteriormente. El bloqueo de peroxidasa endógena fue realizado con peróxido de hidrógeno al 30% en agua destilada durante 10 min. Después de enjuagar en Tris-HCl, los cortes fueron incubados en BSA al 1% con Tritón X-100 al 0.01% durante 1 h a 37°C y luego de escurrir esta solución y sin enjuagar, los cortes fueron incubados en el suero hiperinmune de conejo inmunizado con RVP del cual se probaron varias diluciones: 1/50, 1/250 y 1/500 en ASB al 0.1% con Tritón X-100 al 0.01% en Tris-HCl, algunos durante 1h a 37°C y otros a 4°C durante toda la noche o de un día para otro. Posteriormente, los cortes fueron lavados 3 veces de 5 min cada una con Tris-HCl e incubados en el anticuerpo secundario diluido como en la estandarización de éste; finalmente, fueron lavados, contrateñidos y montados como se mencionó. El criterio para considerar positiva la inmunorreactividad al virus fue la observación de un color café oscuro en sitios histológicos claramente definidos.

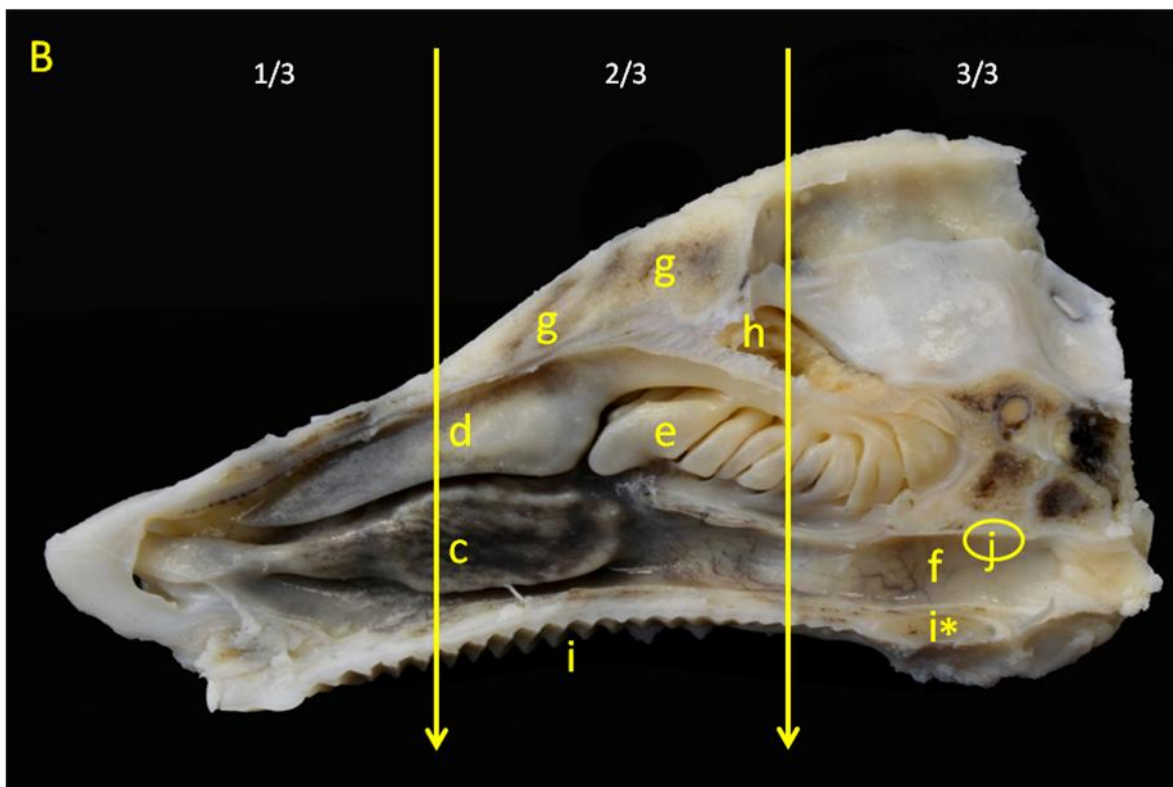
## RESULTADOS

La observación macroscópica de los macizos nasales de cerdos de 15 y 30 días de edad, no presentaron diferencias anatómicas significativas, solo se observó un incremento en el tamaño de las estructuras (cabeza) que integran la cavidad nasal, lo cual es congruente a las edades de los animales empleados en este estudio. Al no haber diferencias anatómicas, se emplearon los macizos nasales de 30 días, más grandes, para observar las estructuras nasales.

Las figuras 10 y 11, muestran un corte medial de la cavidad nasal de un cerdo de 30 días de edad antes (Fig. 10) y después (Fig. 11) de retirar el septo nasal. Fueron designados 3 tercios (anterior, medio y posterior) para la caracterización de las estructuras anatómicas normales de la cavidad nasal.



**Figura 10.** Corte medial de las fosas nasales de un cerdo de 30 días. Septo nasal removido parcialmente (a), septo nasofaríngeo (b), cornete inferior (c), cornete superior (d), huesos etmoidales (e), nasofaringe (f), seno frontal (g), bulbo olfatorio (h), paladar duro (i), zona de NALT (j).

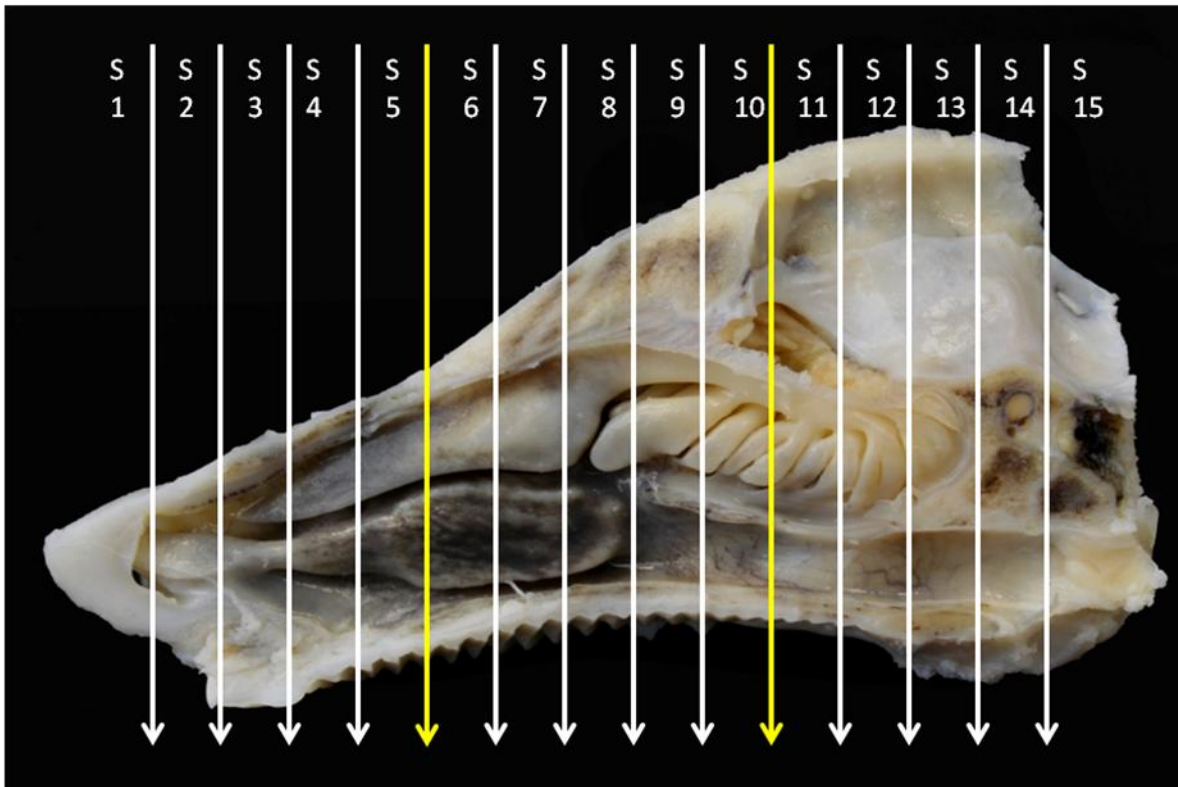


**Figura 11.** Corte sagital de las fosas nasales de un cerdo de 30 días después de eliminar el tabique nasal y el tabique nasofaríngeo. Se observa el cornete inferior (c), cornete superior (d), huesos etmoidales (e), nasofaringe (f), seno frontal (g), bulbo olfatorio (h), paladar duro (i) tonsila palatina (i\*), zona de NALT (j).

## Disección del macizo nasal



**Figura 12.** Disección del macizo óseo nasal para someterlo al procedimiento de descalcificación con ácido fórmico al 5% durante 2 semanas. Posteriormente, se obtuvieron 15 segmentos en corte coronal de 1 cm de grosor de cada espécimen.



**Figura 13.** Descalcificación y corte sagital de la cabeza de un cerdo de 30 días. Todos los macizos nasales se dividieron en 15 segmentos.

El primer tercio (anterior) del macizo nasal corresponde a los segmentos 1-5 (Figs. 14). El segmento 1 (S1) es el vestíbulo y está cubierto en la parte dorsal por un epitelio plano estratificado con estrato córneo y glándulas serosas, la pared medial (tabique nasal) y el piso del vestíbulo presentan epitelio plano estratificado sin estrato córneo aunque las células muestran queratinización sin llegar a formar un estrato córneo, en la lámina propia de la curvatura del piso se observan glándulas seromucosas (Fig. 14, color verde y rojo). El S2 corresponde a la parte rostral del cornete inferior, a la altura del diente incisivo, y está predominantemente cubierto por epitelio plano estratificado sin estrato córneo con algunas células caliciformes; la lámina propia está muy vascularizada e inervada, con gran cantidad de vasos linfáticos y glándulas mucoserosas. El espacio del diente incisivo está recubierto por epitelio cilíndrico estratificado con células basales espinosas aisladas o formando cúmulos dirigidos hacia la lámina propia (Fig. 14, color verde, rojo y azul). El S3 contiene epitelio plano estratificado sin estrato córneo con células superficiales mucosecretoras sin llegar a tener el aspecto caliciforme. En el techo el epitelio tiene células caliciformes. La concavidad del cornete inferior está recubierta de epitelio cilíndrico estratificado sin cilios y algunas células caliciformes (Fig. 14, color rojo, amarillo). En el S4 predomina un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con cilios y células caliciformes; el toro glandular está cubierto por un epitelio



pseudoestratificado bajo, la pared medial (tabique) con epitelio plano estratificado sin estrato córneo con algunas células caliciformes, a la pared lateral inferior y a la curvatura del piso los cubre un epitelio plano estratificado sin estrato córneo sin células caliciformes y células intraepiteliales mucosas (Fig. 14, color purpura y rojo). En S5 los cornetes superiores e inferiores y el toro glandular están cubiertos por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con cilios, la pared medial superior presenta epitelio plano estratificado sin estrato córneo con algunas caliciformes y una transición a un epitelio cilíndrico estratificado con cilios con glándulas y algunas células caliciformes grandes hasta la pared medial inferior, la curvatura del piso los cubre un epitelio cilíndrico pseudoestratificado sin cilios, en la curvatura convexa lateral de los cornetes superiores son cubiertos por un epitelio cilíndrico estratificado sin cilios y sin caliciformes (Fig. 15, colores purpura, rojo, naranja, negro, y amarillo).

---



---

**Código de colores de cada tipo de epitelio que se encuentran en la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad.**

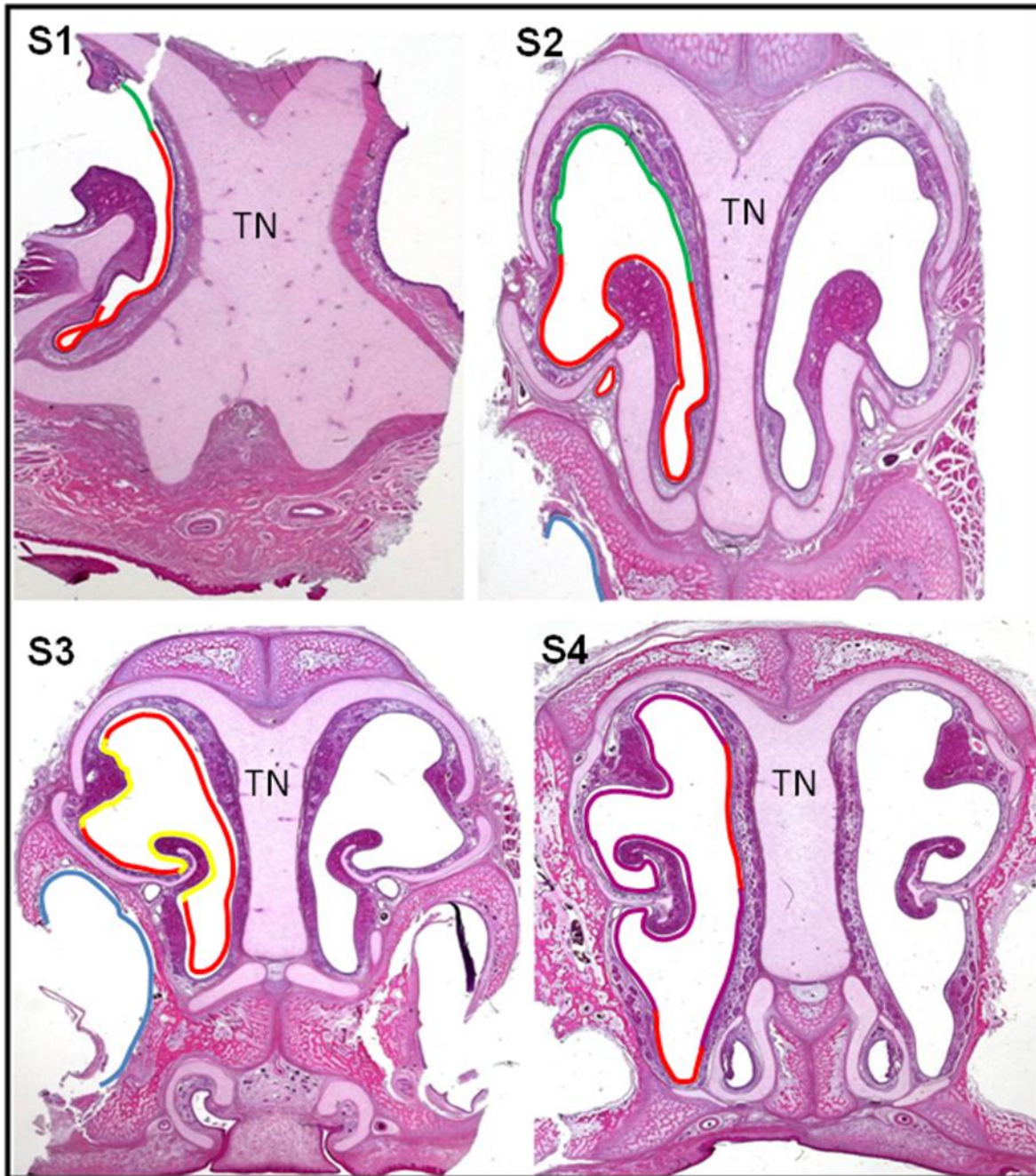
---

Rojo	Epitelio plano estratificado sin estrato corneo
Verde	Epitelio plano estratificado con estrato corneo
Azul	Epitelio cilíndrico estratificado
Amarillo	Epitelio cilíndrico estratificado sin cilios
Negro	Epitelio cilíndrico estratificado con cilios
Naranja	Epitelio cilíndrico pseudoestratificado sin cilios
Purpura	Epitelio cilíndrico pseudoestratificado con cilios
Verde azulado	Epitelio olfatorio

---



---

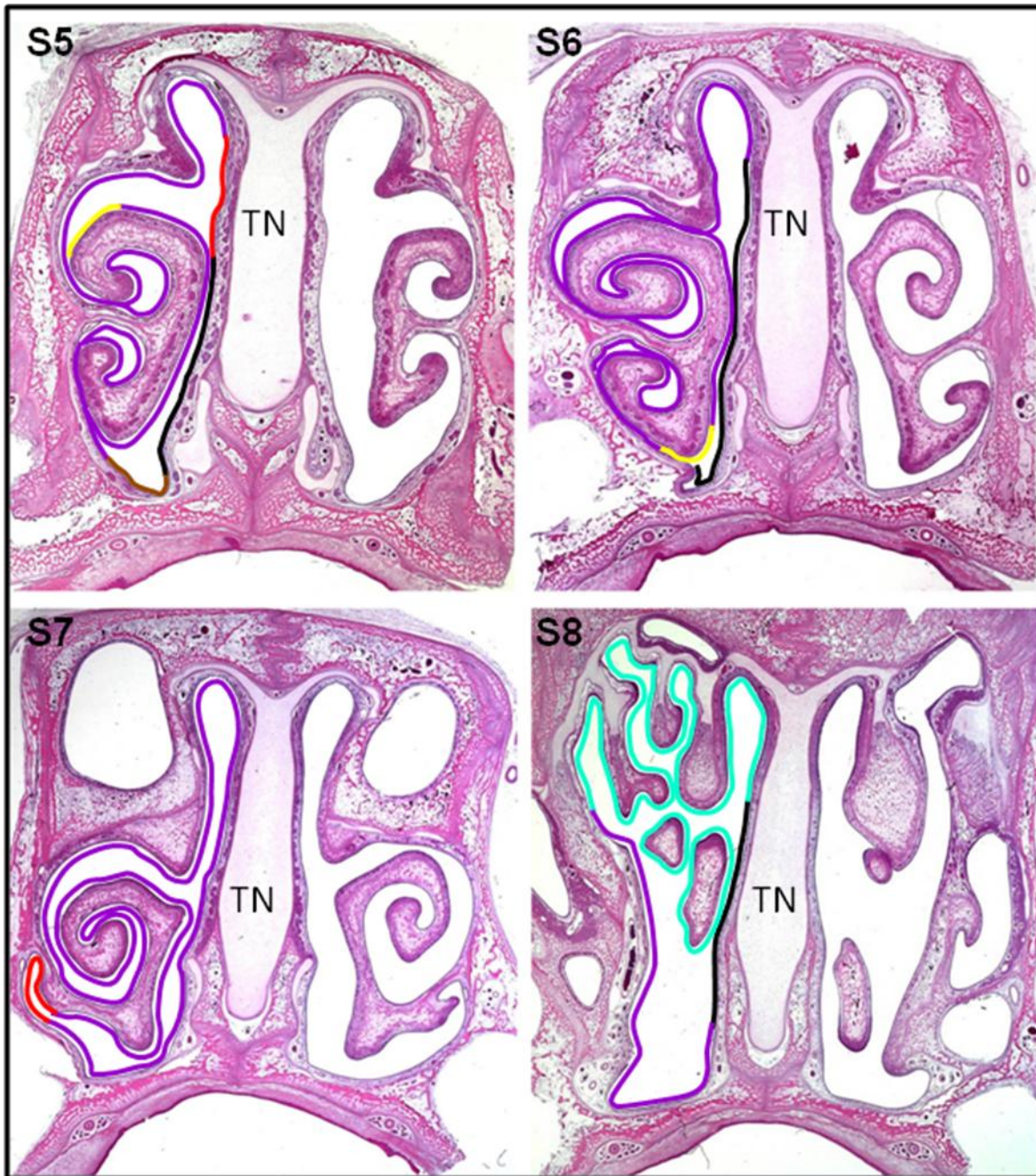


**Figura 14.** Cortes transversales de los segmentos anteriores de las cavidades nasales de cerdos de 15 días de edad. Identificación y distribución de los diferentes tipos de epitelios: Rojo: plano estratificado sin estrato córneo; verde: plano estratificado con estrato córneo; azul: cilíndrico estratificado; amarillo: cilíndrico estratificado sin cilios; púrpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios. TN: tabique nasal, H & E.

El segundo tercio (medio) corresponden a los segmentos 6-10 (Fig. 15). El S6 incluye a los cornetes nasales inferiores y superiores, al toro glandular y al techo sin caliciformes, todos cubiertos por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con cilios, glándulas mucosas y células caliciformes (Fig. 15

color, purpura). Este epitelio es de mayor grosor en el techo, en la curvatura cóncava y convexa medial de los cornetes inferiores y superiores presentan un mayor número de glándulas mucosas, las laminas espirales de los cornetes inferiores y superiores presentan pocas glándulas que en las curvaturas mediales pero en este sitio son muy prominentes, el epitelio presenta cilios pero pocas células caliciformes. La parte superior del tabique nasal hasta la curvatura del piso está recubierta por un epitelio cilíndrico estratificado con cilios y la curvatura convexa del cornete inferior se recubre por un epitelio cilíndrico estratificado sin cilios. En el S7 el epitelio cilíndrico pseudoestratificado con cilios cubre casi la totalidad de la mucosa y hay un aumento de las glándulas mucoserosas, en la curvatura del techo la cantidad de glándulas disminuye, en la curvatura lateral del meato ventral del cornete inferior presenta epitelio plano estratificado sin estrato córneo. En el S8, a nivel de los huesos etmoidales o también conocidos como etmoturbinas, hay epitelio olfatorio, las partes media e inferior del tabique nasal están cubiertas por un epitelio cilíndrico estratificado con cilios y células caliciformes, que en el piso y la pared lateral de la cavidad nasal hace transición a un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con cilios y células caliciformes. El techo presenta gran cantidad de glándulas serosas con algunas mucosas.

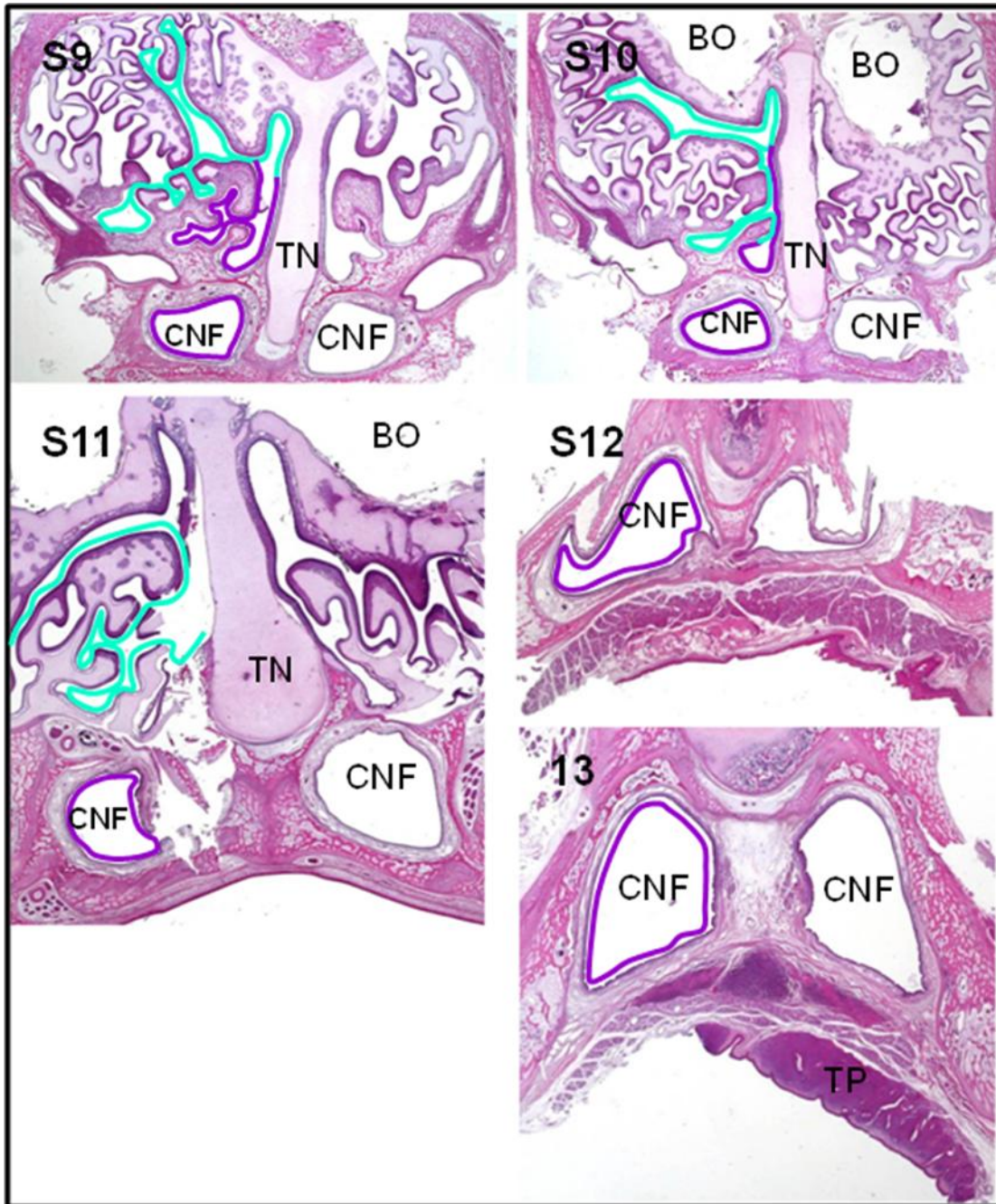
Los segmentos 9 y 10 presentan características histológicas similares. Los huesos etmoidales, cubiertos por un epitelio olfatorio, en la parte prominente de las curvaturas óseas presentan una gran inervación. Los conductos nasofaríngeos (CNF) están revestidos por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con gran cantidad de células caliciformes y una lámina propia con células mononucleares, probablemente linfoides, y adenomeros mixtos mucoserosas en la parte media en dirección dorsal.



**Figura 15.** Cortes transversales de los segmentos 5 al 8 del tercio medio de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad. Identificación y distribución de los diferentes tipos de epitelios: Rojo: plano estratificado sin estrato córneo; amarillo: cilíndrico estratificado sin cilios; púrpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios; negro: cilíndrico estratificado con cilios; anaranjado: cilíndrico pseudoestratificado sin cilios; verde azulado: epitelio olfatorio. TN: tabique nasal. H & E.

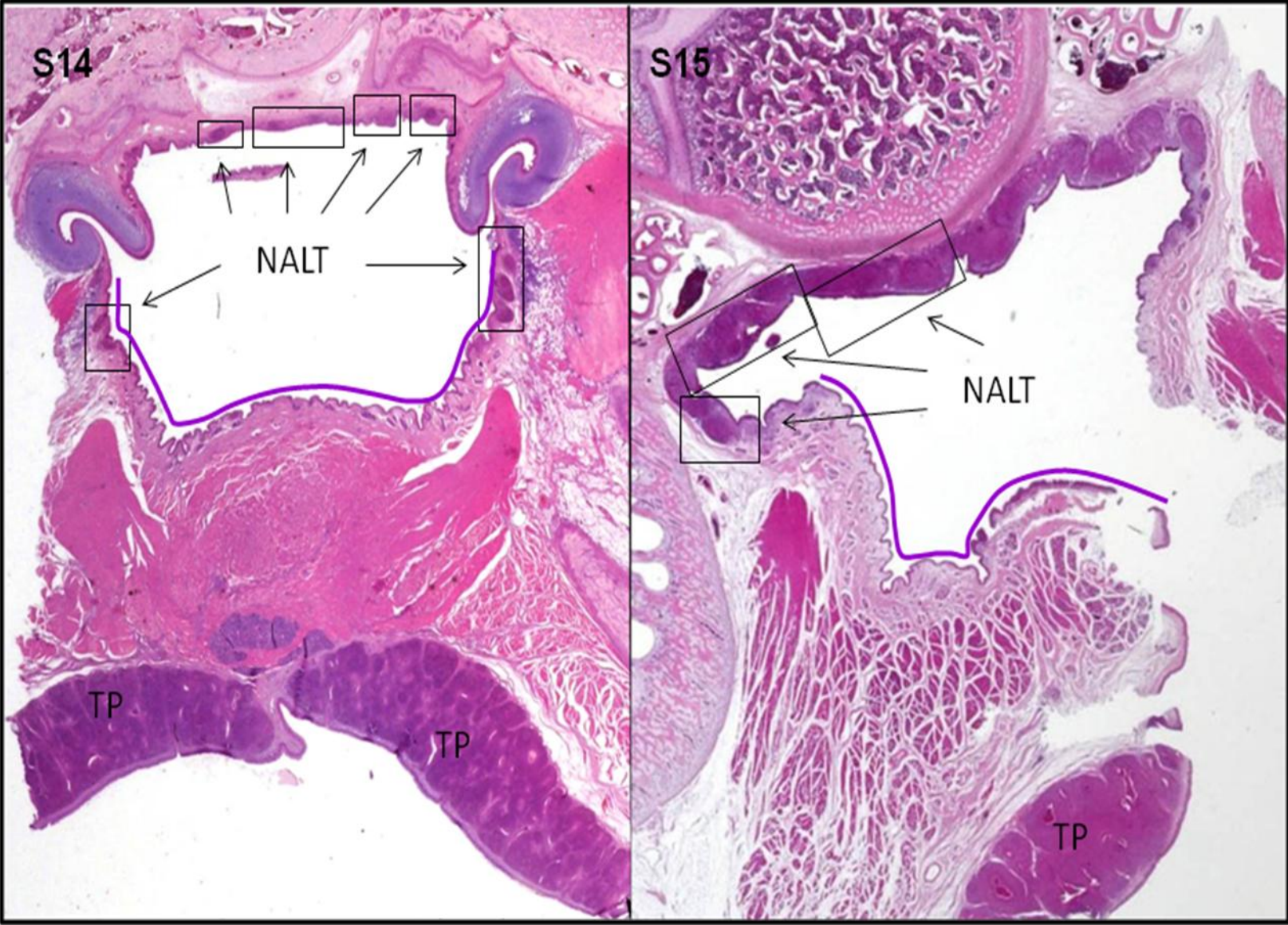
El tercer tercio (posterior o caudal) corresponden a los segmentos 11-15 (Fig. 16-17). En S11 predomina el laberinto etmoidal revestido por epitelio olfatorio y la lamina propia con numerosos vasos linfáticos y algunas vénulas de endotelio alto. Los CNF están revestidos por epitelio cilíndrico pseudoestratificado con cilios. En S12 y S13 este epitelio de los CNF si presenta células caliciformes y la lámina propia tiene glándulas seromucosas con células mononucleares difusas, sobre todo en el techo de los conductos; el piso presenta el epitelio es respiratorio, con glándulas seromucosas y semilunas serosas. A esta altura es posible observar cortes de la tonsila palatina.

El S14 comprende plenamente al conducto nasofaríngeo, posterior a los límites anatómicos de las coanas, que corresponde a la porción nasal de la faringe. El epitelio característico es cilíndrico pseudoestratificado con cilios y algunas células caliciformes. En el techo y en las paredes laterales se localiza el tejido linfoide asociados a la nasofaringe (NALT) organizado en nódulos primarios y secundarios y células linfoides internodulares que se extienden de esa forma hasta el piso. A la altura de este segmento del conducto nasofaríngeo se aprecia la desembocadura de ambas tubas auditivas, cuyo epitelio de revestimiento es respiratorio y también contiene tejido linfoide en nódulos y difuso. De hecho, la desembocadura de las tubas auditivas divide al NALT en una porción del techo y una de la pared lateral. El S15 presenta las mismas características que el S14 aunque el NALT es más prominente y los nódulos predominantes son secundarios con centro germinales bien definidos y zonas del manto y marginal típicamente orientadas con respecto al epitelio que puede ser cilíndrico pseudoestratificado alto, con cilios y células caliciformes. Hacia la extensión lateral del NALT hay una transición a epitelio plano estratificado sin estrato córneo con algunas células ciliadas y células caliciformes. Este epitelio pierde las células ciliadas y las células caliciformes cerca de la unión con el paladar blando y en la vecindad con la tonsila palatina.



**Figura 16,** Segmentos 11 al 13. Estos segmentos corresponden al inicio del tercio posterior o caudal de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad. Identificación y distribución de los diferentes tipos de epitelios: Púrpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios; verde azulado: olfatorio. BO: ubicación del bulbo olfatorio. TN: tabique nasal, CNF: conductos nasofaríngeos, separados por el tabique nasofaríngeo. TP: tonsila palatina. H & E.

**Figura 17.** Segmentos nasales 14 y 15. Son los más caudales del tercio posterior de cerdos de 15 días de edad. Se distinguen por el NALT más desarrollado, la desembocadura de las tubas auditivas y la transición del conducto nasofaríngeo a la faringe propiamente dicha. Por esta razón existen dos transiciones epiteliales (ver texto). Color púrpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios, NALT: tejido linfoide asociado a la nasofaringe. TP: tonsila palatina, H & E. (ver página 41)



---



---

**Resumen de los principales tipos y distribución  
de epitelios de la cavidad nasal de cerdos de 15 días**

---

Segmento Nasal	Tipo de epitelio y principal estructura
Segmento 1	<p>Verde: plano estratificado con estrato corneo y glándulas serosas.</p> <p>Rojo: plano estratificado sin estrato corneo y glándulas seromucosas.</p>
Segmento 2	<p>Rojo: plano estratificado sin estrato corneo con algunas caliciformes.</p> <p>Verde: plano estratificado con estrato corneo y glándulas serosas.</p> <p>Azul: cilíndrico estratificado y células basales espinosas.</p>
Segmento 3	<p>Rojo: plano estratificado sin estrato corneo con células mucosas y caliciformes.</p> <p>Amarillo: cilíndrico estratificado sin cilios y algunas caliciformes.</p>
Segmento 4	<p>Rojo: plano estratificado sin estrato corneo y con algunas células caliciformes y células intraepiteliales mucosas.</p> <p>Purpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios, células caliciformes y glándulas mucosas.</p>
Segmento 5	<p>Rojo: plano estratificado sin estrato corneo con algunas caliciformes.</p> <p>Negro: cilíndrico estratificado con cilios, glándulas mucosas y pocas caliciformes.</p> <p>Anaranjado: cilíndrico pseudoestratificado sin cilios.</p> <p>Purpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios y células caliciformes.</p> <p>Amarillo: cilíndrico estratificado sin cilios.</p>

---



---



---

Segmento 6	<p>Negro: cilíndrico estratificado con cilios.</p> <p>Amarillo: cilíndrico estratificado sin cilios.</p> <p>Purpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios, glándulas mucosas y células caliciformes.</p>
Segmento 7	<p>Purpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios, glándulas mucoserosas y células caliciformes.</p> <p>Rojo: plano estratificado sin estrato corneo.</p>
Segmento 8	<p>Verde azulado: olfatorio con glándulas serosas y algunas mucosas.</p> <p>Negro: cilíndrico estratificado con cilios y células caliciformes.</p> <p>Purpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios y caliciformes.</p>
Segmento 9, 10 y 11	<p>Verde azulado: olfatorio con glándulas serosas y mucosas, la lámina propia con muchos vasos linfáticos y con vénulas de endotelio alto.</p> <p>Purpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios y células caliciformes.</p>
Segmento 12 y 13	<p>Purpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios y células caliciformes, en la lámina propia células mononucleares linfoides y adenomeros mixtos mucoserosas, en el piso células de media clara seromucosas y la tonsila palatina.</p>
Segmento 14	<p>Purpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios y algunas células caliciformes. NALT: tejido linfoide asociado a la nasofaringe (arriba, bilateralmente, tubas auditivas).</p>
Segmento 15	<p>Purpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios.</p> <p>NALT: tejido linfoide asociado a la nasofaringe, nódulos secundarios (centros germinales).</p>

---

### **Histoquímica de lectinas**

La unión de MAA en la mucosa nasal se observó sólo en el segundo tercio (S6) de la cavidad nasal en cerdos de 15 días. La positividad a MAA estuvo restringida a la parte media y superior de la mucosa del tabique nasal, a la curvatura convexa del toro glandular y a la curvatura convexa del cornete superior. La lectinofluorescencia estuvo localizada en el borde apical de las células epiteliales de los conductos interlobulillares y de los conductos excretores de las glándulas seromucosas de los sitios mencionados (Fig. 18-20). El borde apical o luminal de las células epiteliales del conducto nasolagrinal también mostraron unión de MAA (Fig. 19 F).

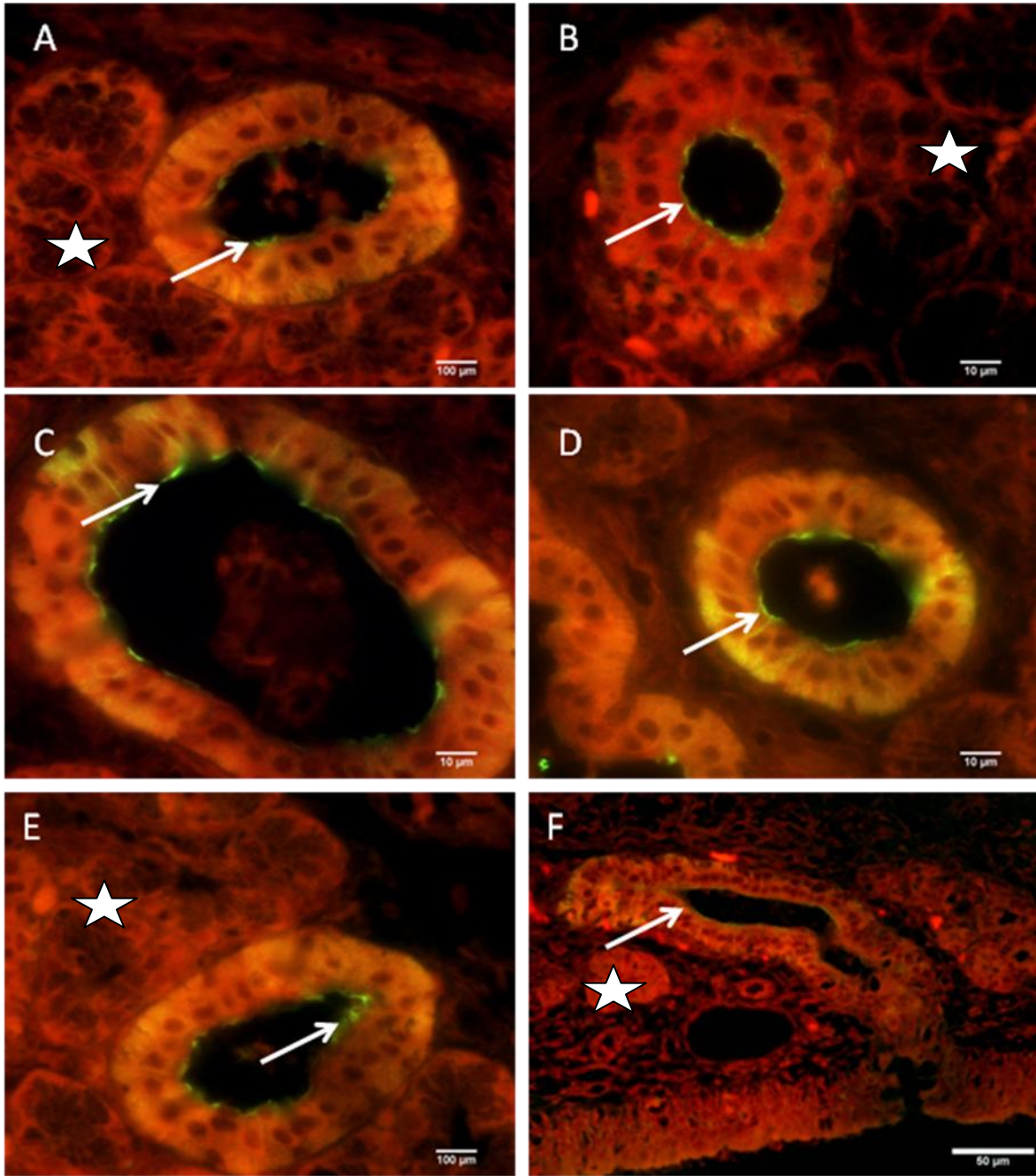
En el tercer tercio los sitios de unión de MAA correspondieron al tejido linfoide internodular del NALT, a células situadas en la periferia de los nódulos y a células linfoides que infiltran el epitelio respiratorio asociado a los nódulos linfoides (Figs. 21A-D).

### **Cinética del tratamiento de los cortes con sialidasa de *C. perfringens*.**

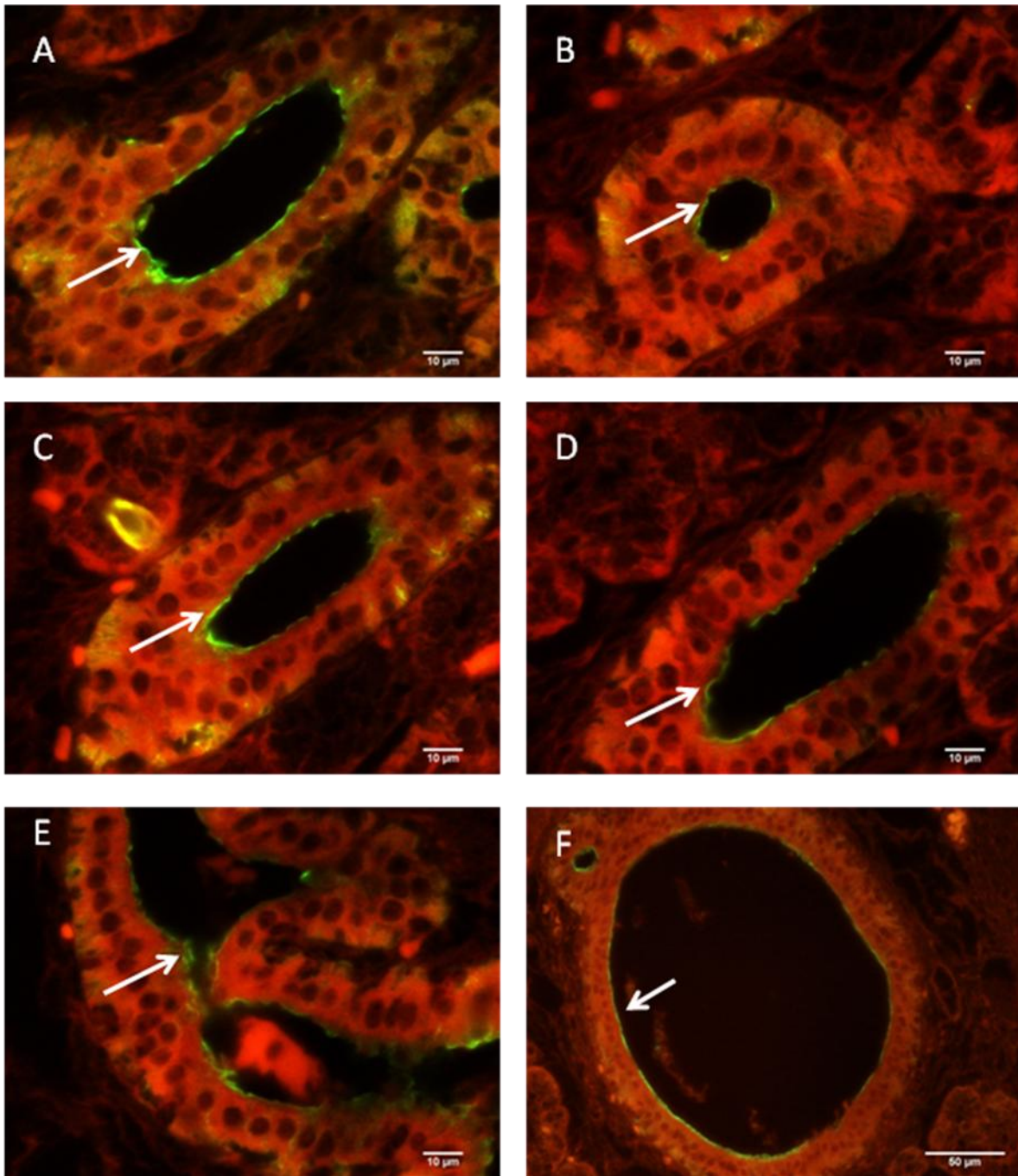
Para comprobar la especificidad y la naturaleza química de los sitios de unión a MAA (glicoconjugados con ácido siálico unido en posición  $\alpha$  2-3 a galactosa) observada en el segmento 6 del tercio medio de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad, se realizó una cinética enzimática pretratando los cortes con sialidasa durante 4 (Fig. 22), 6 (Figs. 23-25), 48 (Fig. 26-30) y 50 h (31-32). Los resultados demuestran que en ninguno de los tiempos explorados fue abolida la reactividad a MAA. Por el contrario, la intensidad de la fluorescencia en los sitios positivos a esta lectina aumentó, en una relación directa al tiempo de incubación en la enzima, siendo más intensa a las 50 h. A éste tiempo, el borde apical y el borde de la teca de numerosas células caliciformes fue intensamente positivo (Figs 31 A-F).

En la figura 33 se hacen dos reconstrucciones de la misma región de la cavidad nasal para observar el incremento de la intensidad de la fluorescencia en relación directa con el tiempo de pretratamiento con sialidasa y reactividad a MAA.

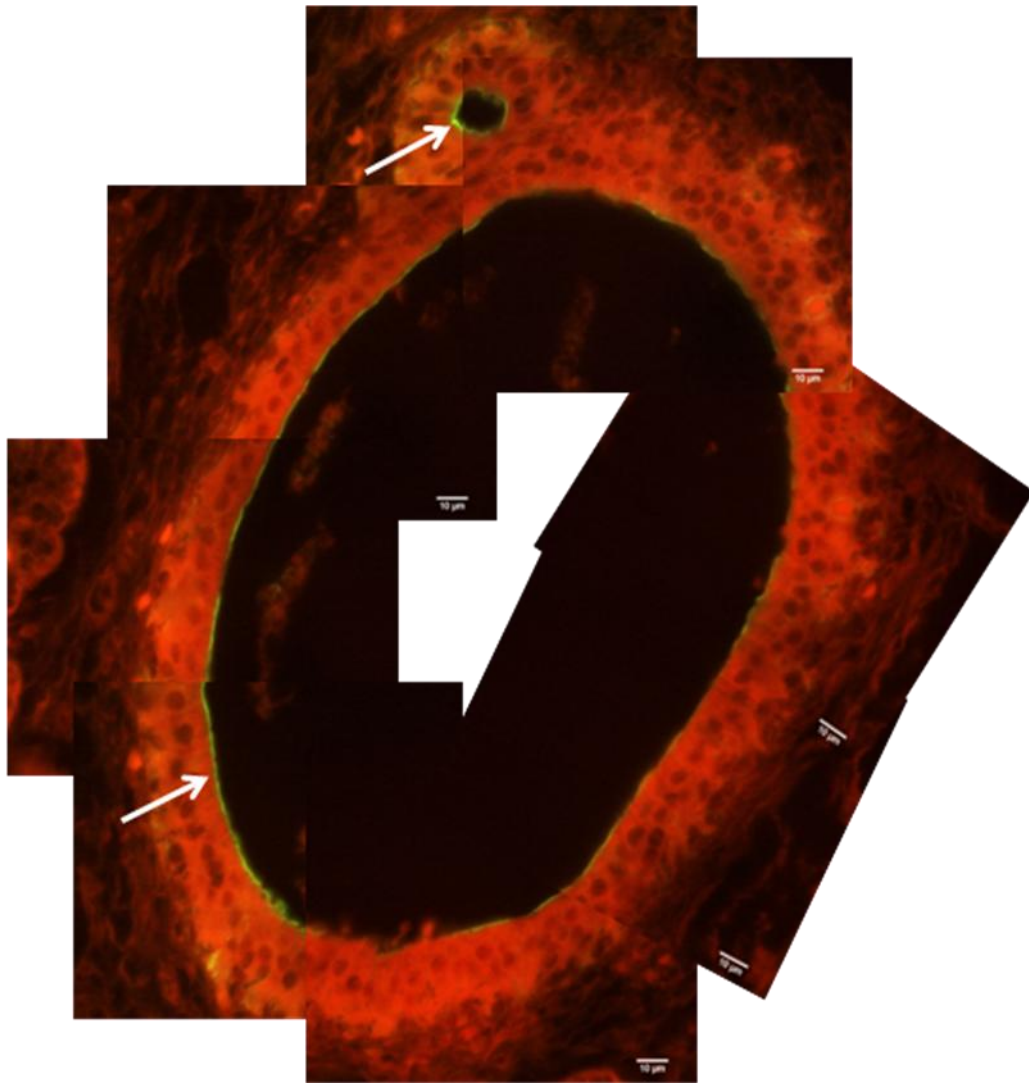
La histoquímica con SNA en cerdos de 15 días de edad no demostró la presencia de sitios de unión a esta lectina en ninguno de los segmentos analizados. Los sitios que habían sido MAA positivos no mostraron reactividad a SNA (Fig. 34). Con la cinética de pretratamiento de los cortes de la mucosa nasal con sialidasa tampoco se observó algún tipo de reactivación o aumento de la positividad a SNA (Fig. 35) como lo descrito para MAA.



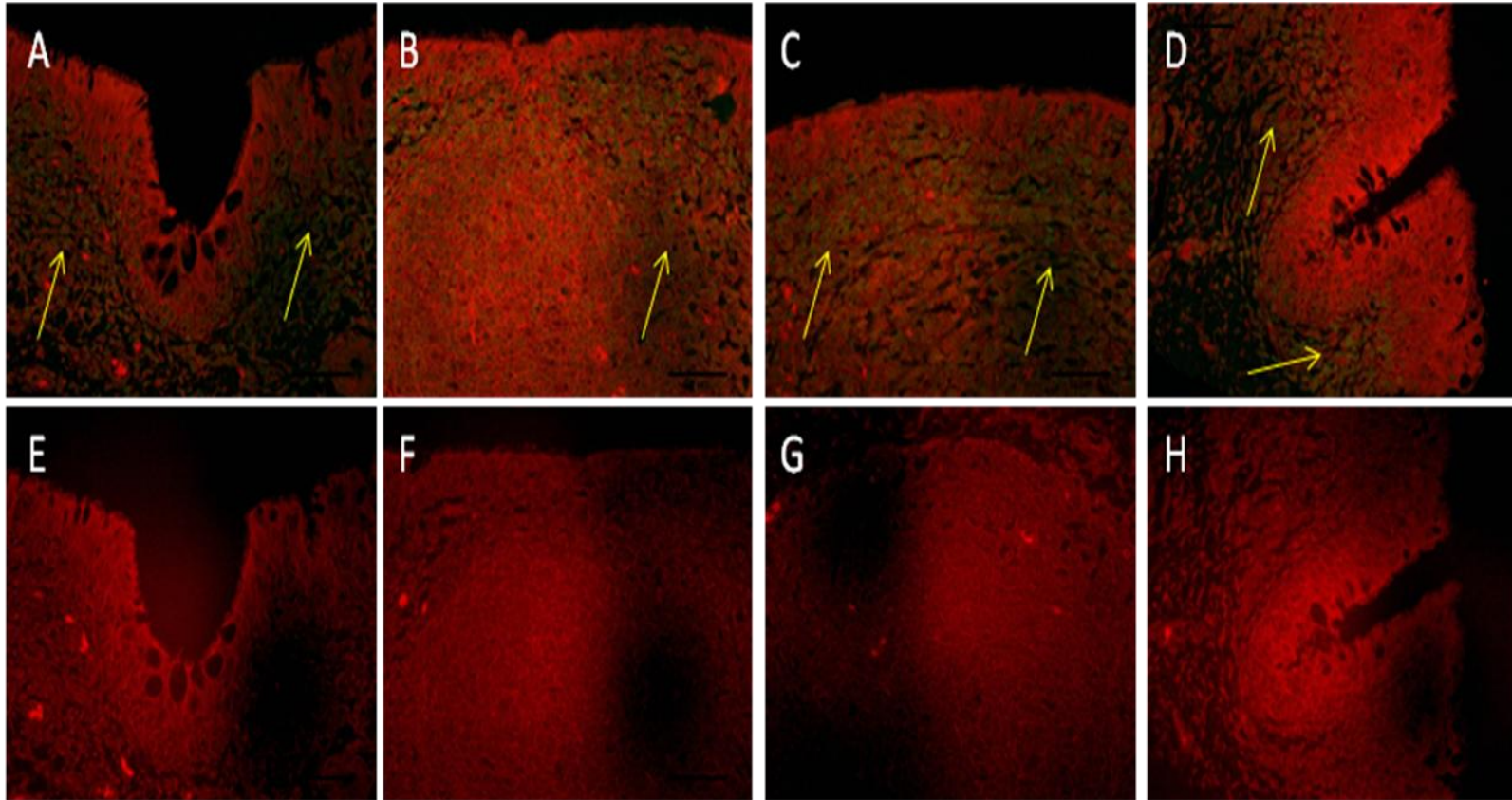
**Figura 18.** Histoquímica con MAA en el tercio medio de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad. Obsérvese la fluorescencia en el borde apical (flechas blancas) de las células epiteliales de los conductos interlobulillares (A-E) y de los conducto excretores de las glándulas seromucosas (F) de la mucosa del tabique nasal (partes superior y media), de la curvatura convexa del toro glandular y de la curvatura convexa del cornete superior. Los adenómeros (estrellas blancas) y el epitelio cilíndrico pseudoestratificado con cilios y células caliciformes (parte inferior de F) fueron negativos.



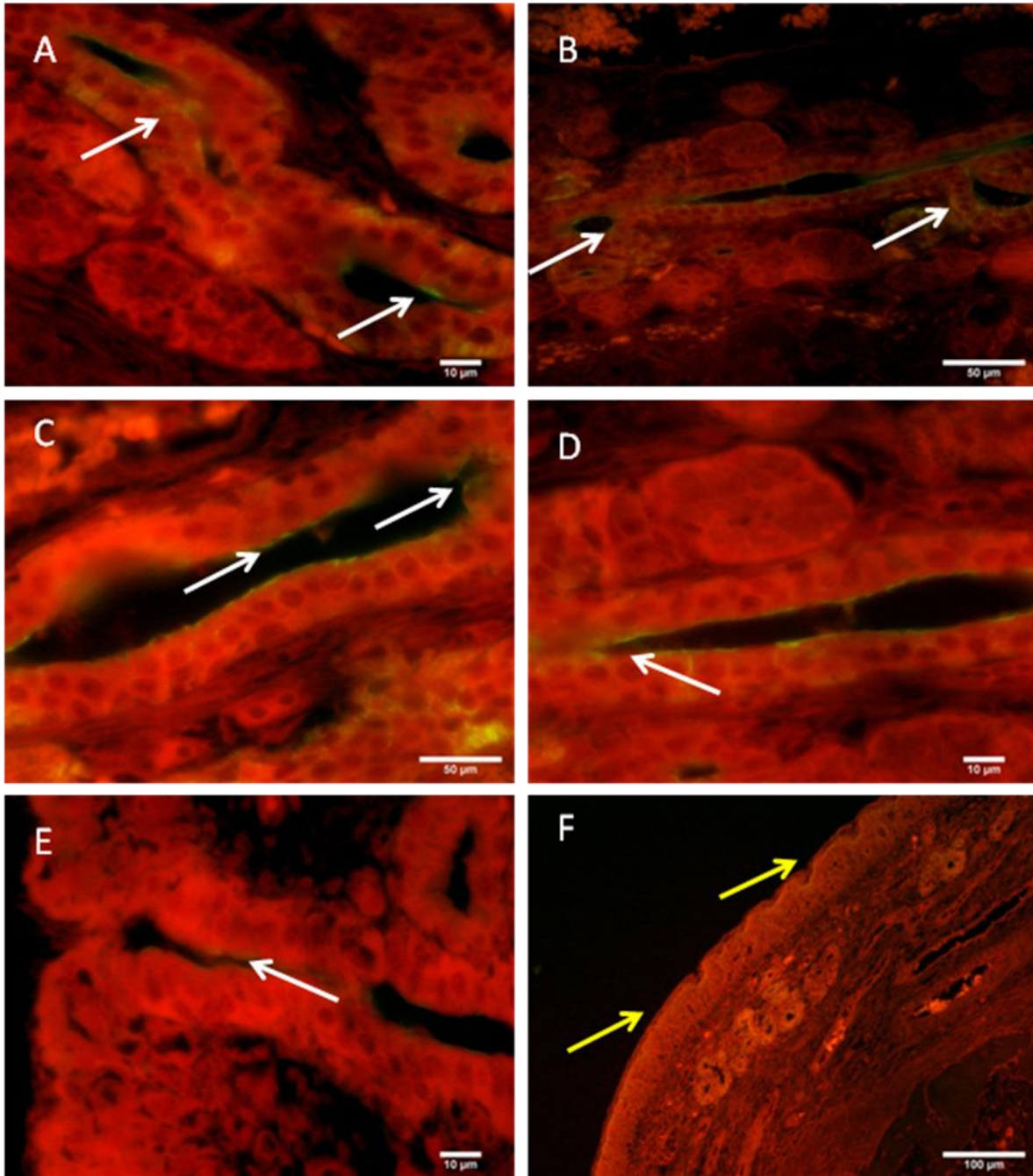
**Figura 19.** Histoquímica con MAA en el tercio medio de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad. Obsérvese la fluorescencia en el borde apical (flechas blancas) de las células epiteliales de los conductos interlobulillares (A-E) y de los conducto excretores de las glándulas seromucosas (E). El borde luminal del epitelio del conducto nasolagrimal también fue positivo (F flecha blanca).



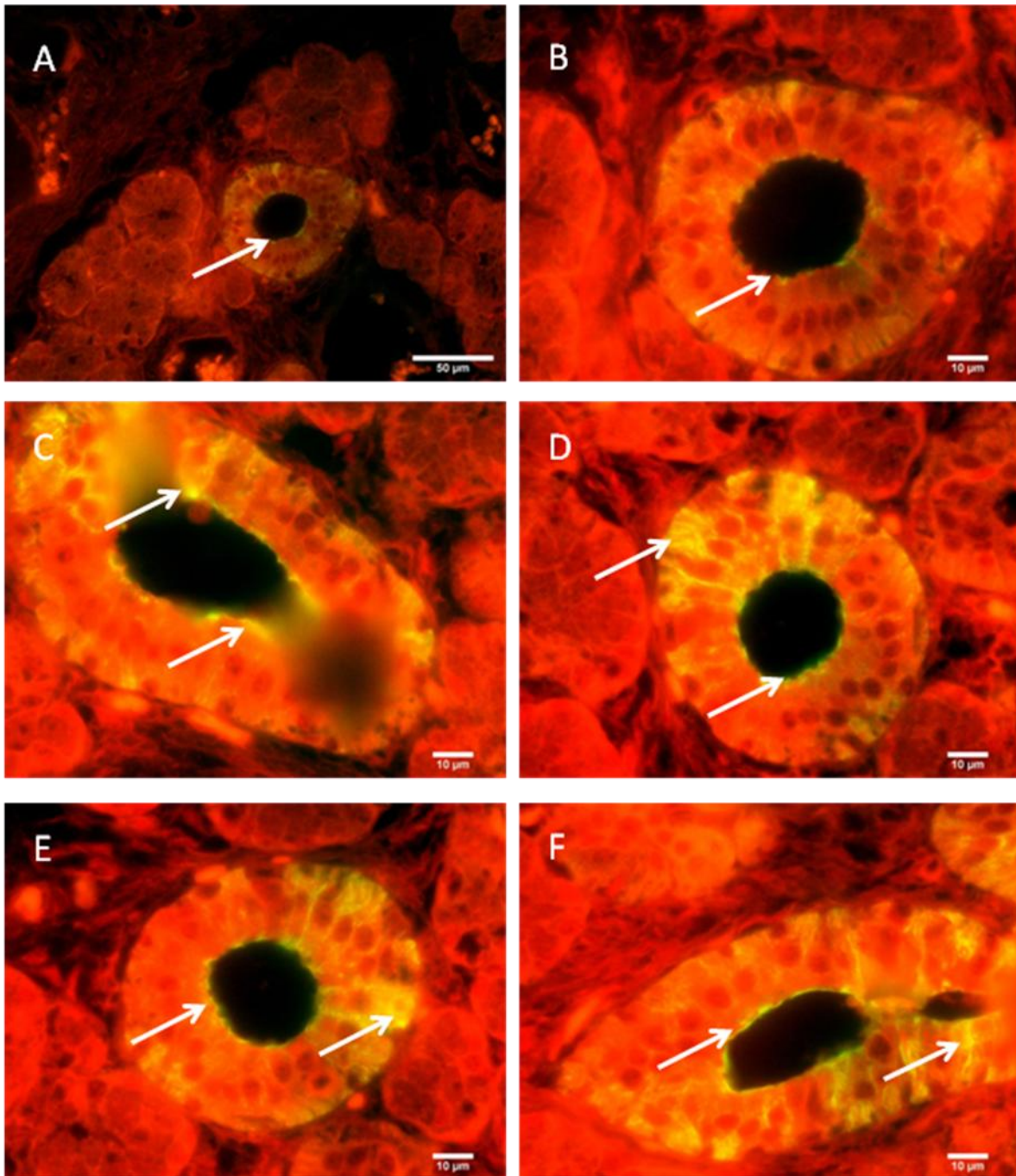
**Figura 20.** Reconstrucción del conducto nasolagrimal de la Fig. 18F. El borde luminal del epitelio de revestimiento expresa sitios de unión a MAA. Barras = 50 µm.



**Figura 21A-H.** Histoquímica con MAA en el tercio posterior de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad, a la altura del tejido linfoide asociado al conducto nasofaríngeo (A-D) y sus controles correspondientes en cortes seriados (E-H). Los sitios con especificidad para MAA fueron el tejido linfoide internodular del NALT, a células situadas en la periferia de los nódulos y a células linfoides que infiltran el epitelio respiratorio asociado a los nódulos linfoides (flechas amarillas). Se observa claramente que los cortes seriados no incubados con MAA biotinilada pero si con el complejo estreptavidina-FITC son negativos (E-H). Una vez más, ninguna células del epitelio “respiratorio” tiene sitios de unión a MAA.

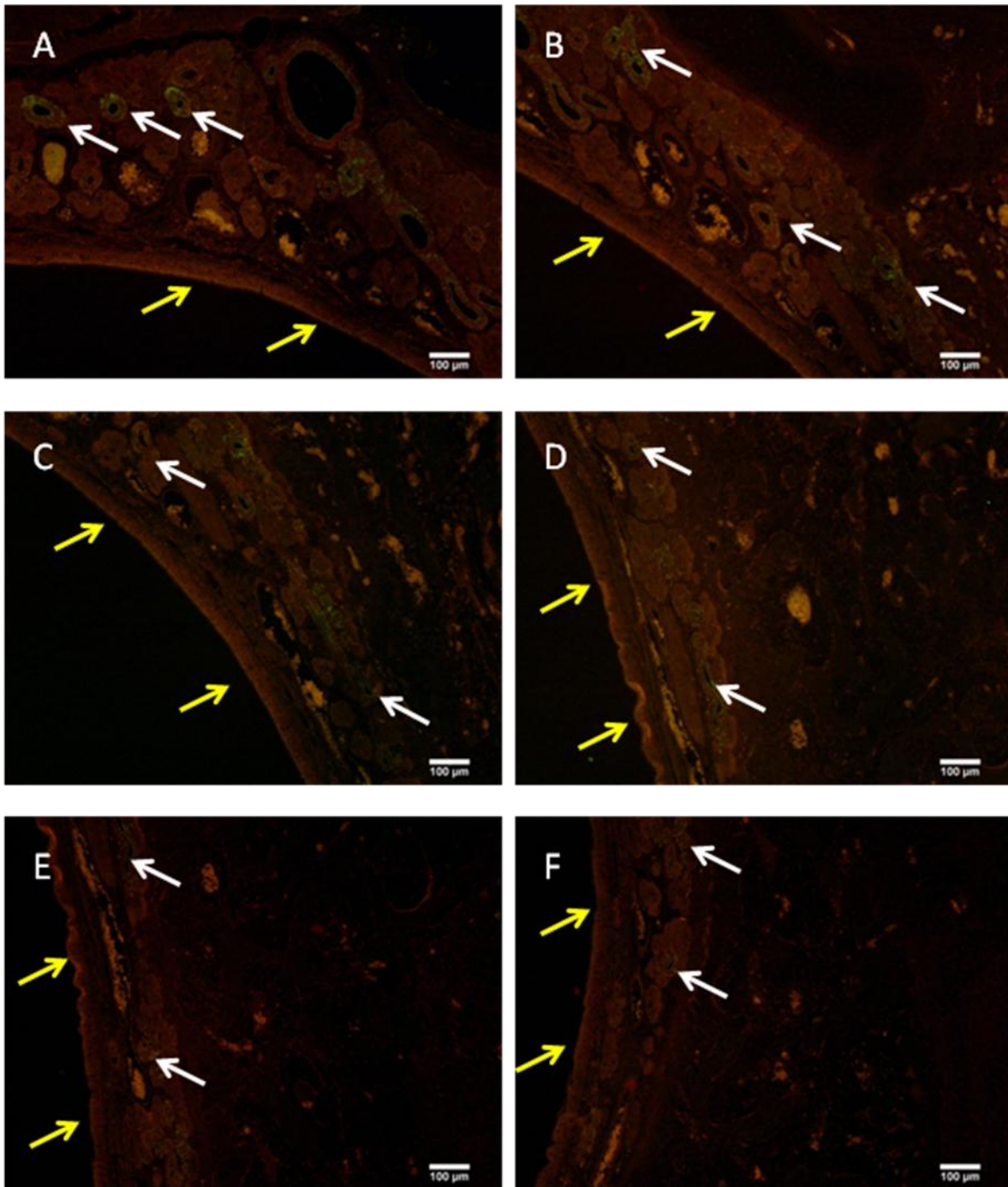


**Figura 21A-H.** Histoquímica con MAA en el tercio posterior de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad, a la altura del tejido linfoide asociado al conducto nasofaríngeo (A-D) y sus controles correspondientes en cortes seriados (E-H). Los sitios con especificidad para MAA fueron el tejido linfoide internodular del NALT, a células situadas en la periferia de los nódulos y a células linfoides que infiltran el epitelio respiratorio asociado a los nódulos linfoides (flechas amarillas). Se observa claramente que los cortes seriados no incubados con MAA biotinilada pero si con el complejo estreptavidina-FITC son negativos (E-H). Una vez más, ninguna células del epitelio “respiratorio” tiene sitios de unión a MAA



**Figura 23.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 6 h de tratamiento con sialidasa.** Obsérvese la positividad del borde apical de las células epiteliales de los conductos interlobulillares (A-F, flechas blancas) y en el borde basolateral de algunas células.

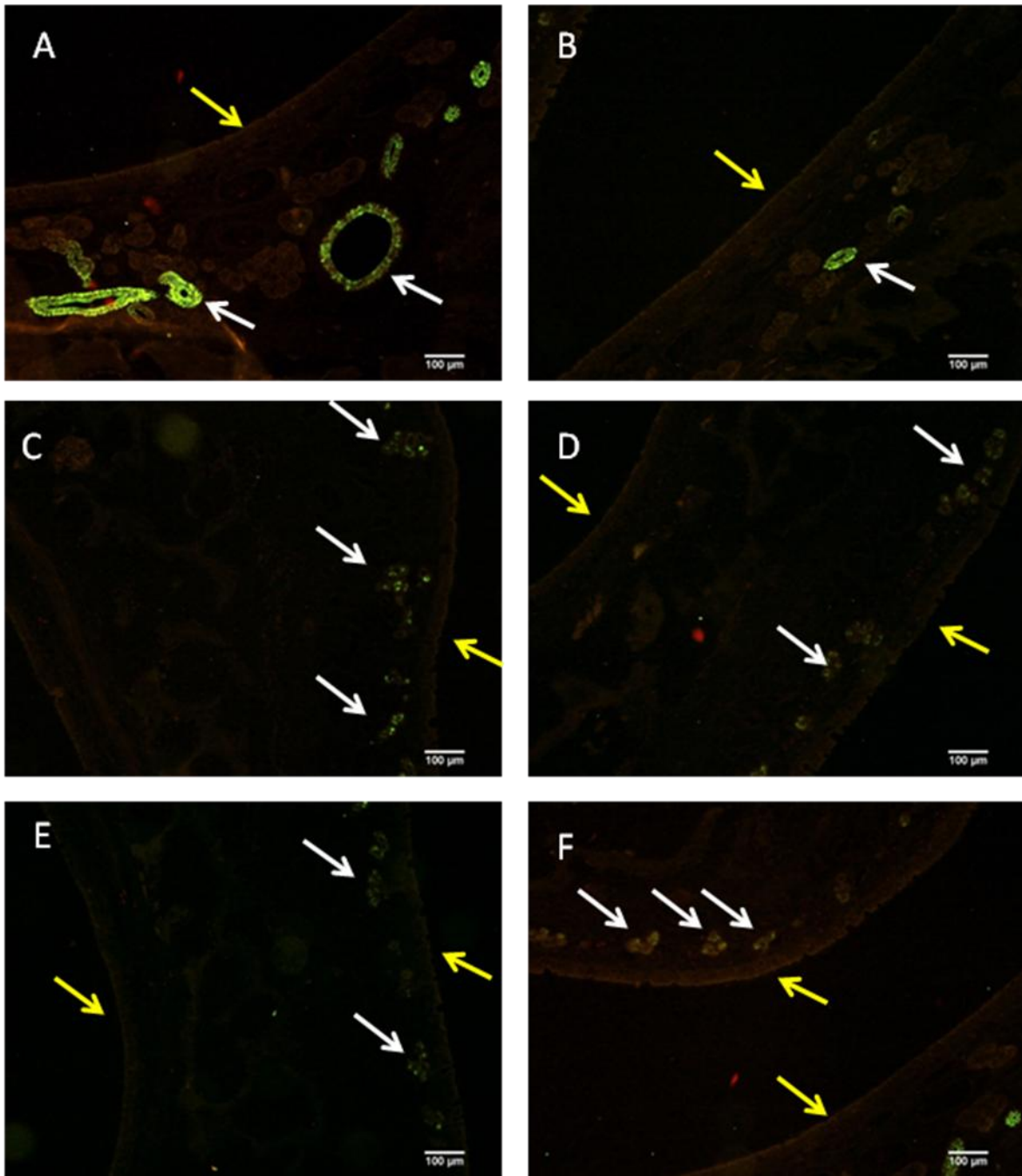




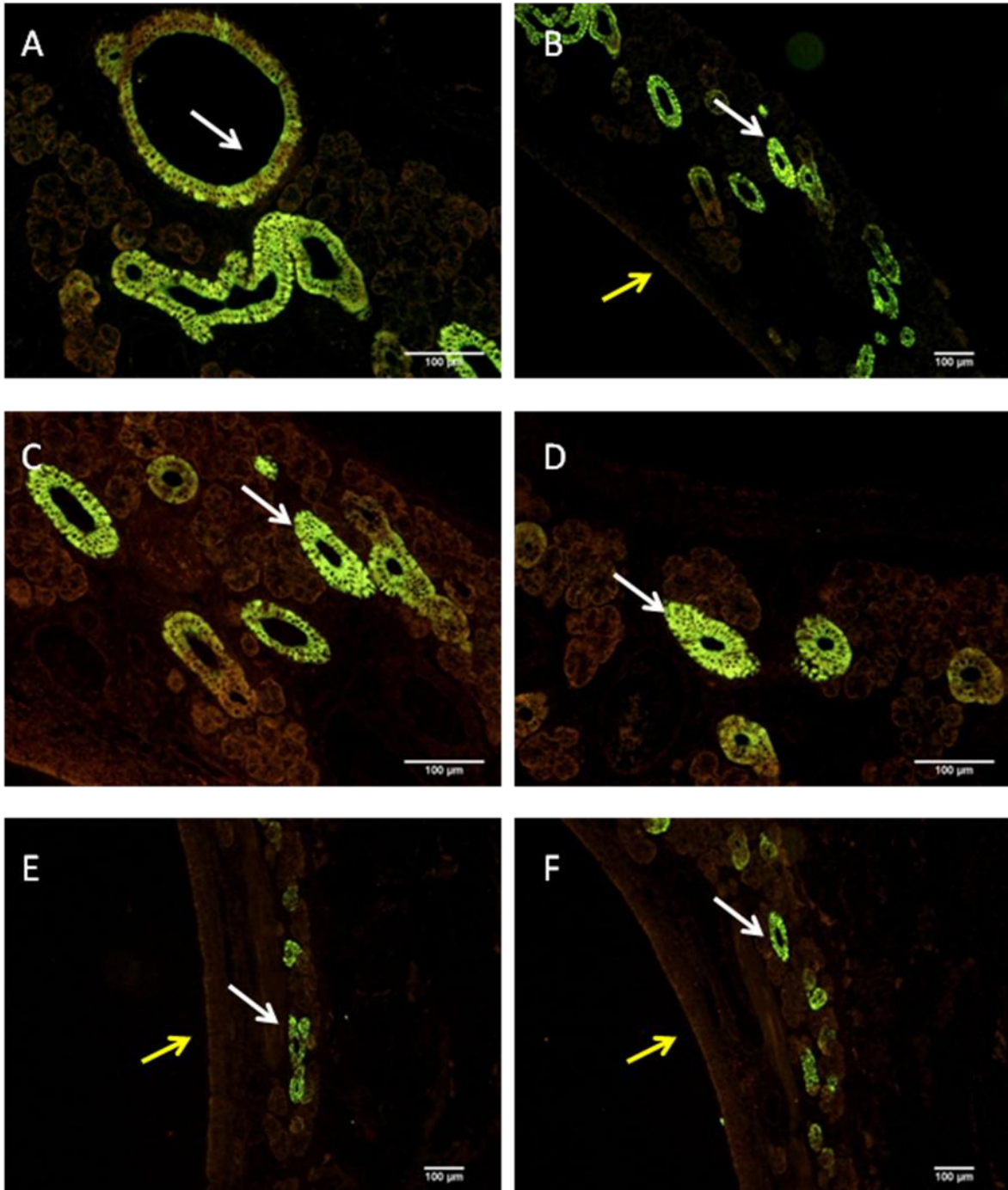
**Figura 24.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 6 h de tratamiento con sialidasa.** Obsérvese la positividad (verde) positiva en el borde apical de las células epiteliales de los conductos interlobulillares (A-D) (flechas blancas) y de los conducto excretores de las glándulas seromucosas (E, F) (flechas blancas). No se detecto tinción en cilios (flechas amarillas)



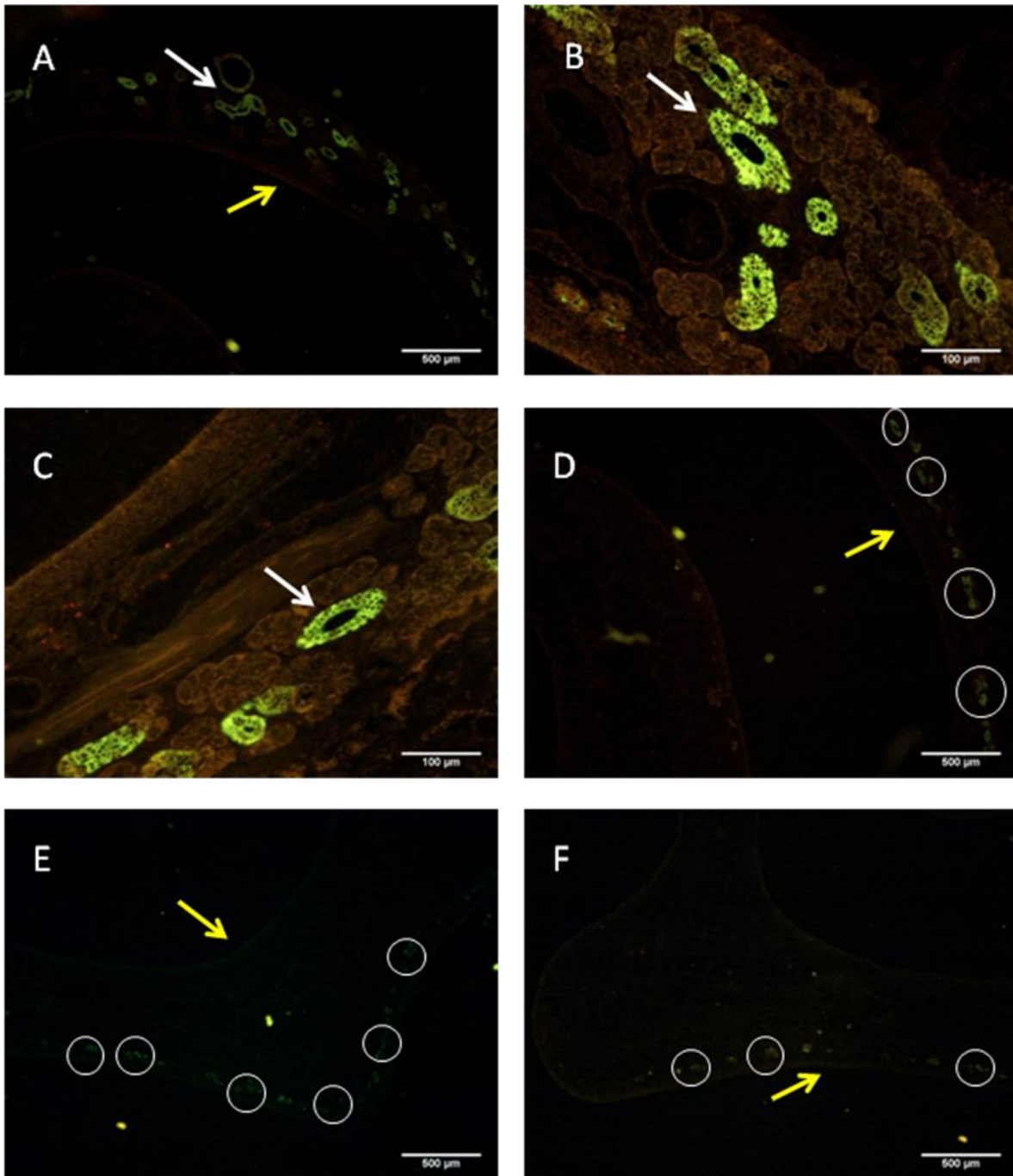
**Figura 25.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 6 h de tratamiento con sialidasa.** Reconstrucción de la transición entre el tercio superior del tabique nasal y parte del techo de la cavidad nasal. Obsérvese la positividad en el borde apical de las células epiteliales de los conductos interlobulillares (en recuadro y flecha blanca) y de los conductos excretores de las glándulas seromucosas (en recuadro y flecha amarilla).



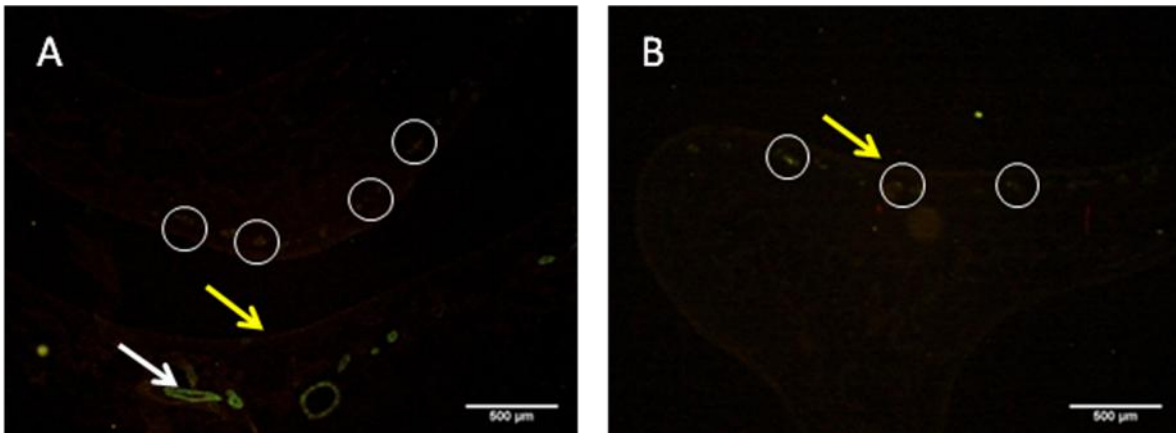
**Figura 26.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 48 h de tratamiento con sialidasa.** Obsérvese los sitios de unión de MAA (flechas blancas) en el borde apical de las células epiteliales de conductos interlobulillares y conductos excretores de las glándulas seromucosas y conducto lagrimal a nivel del techo (A), de la pared superior del tabique (B) y de la superficie convexa del cornete superior (C-F). Nótese que no hay lectinofluorescencia de cilios (Flechas amarillas).



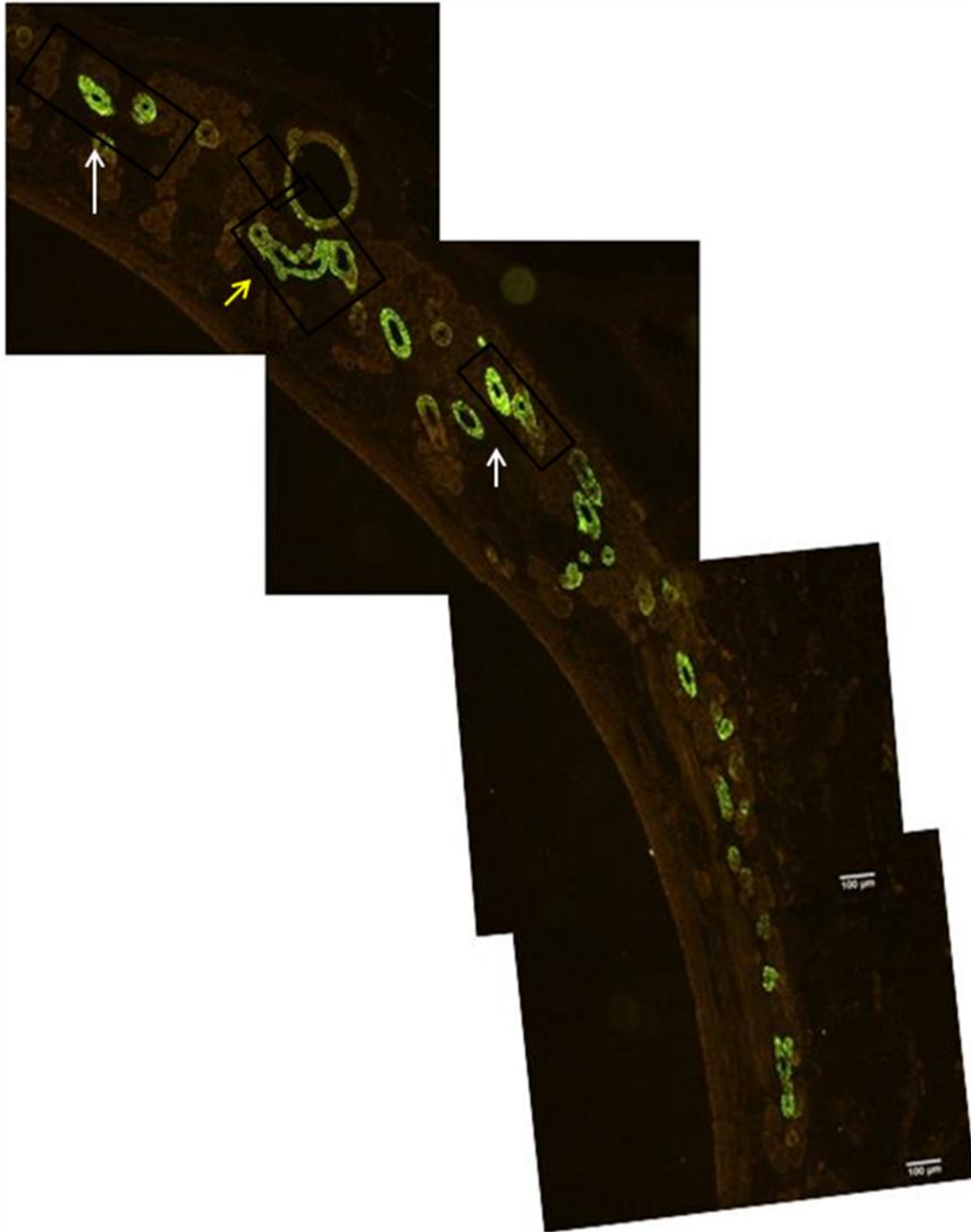
**Figura 27.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 48 h de tratamiento con sialidasa.** Obsérvese el incremento en la intensidad de la lectinofluorescencia en toda las células y no sólo en el borde apical o la región basolateral del epitelio de los conductos interlobulillares y excretoras de las glándulas seromucosas del techo (A, conducto nasolagrimal incluido, flecha blanca) y de la pared superior del tabique nasal (B-F, flechas blancas). No hubo lectinofluorescencia en los cilios (Flechas amarillas).



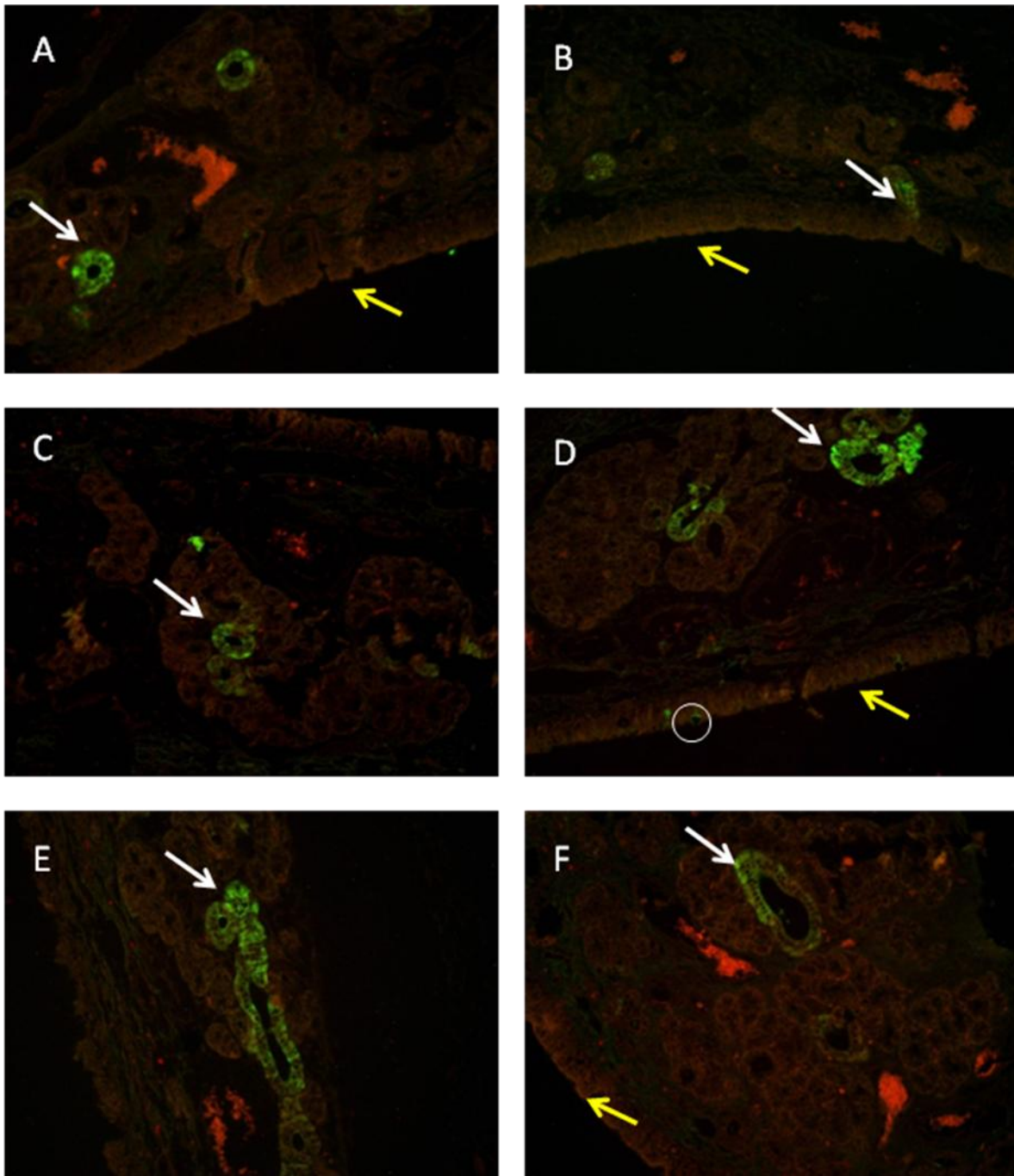
**Figura 28.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 48 h de tratamiento con sialidasa.** Campos microscópicos del techo-parte superior del tabique nasal (A-C) similares a los de la figura 26. En D se observa la luz de la cavidad nasal que separa la superficie convexa del cornete superior y parte superior y media del tabique nasal; la lámina propia de ambas estructuras presenta reactividad a MAA en los conductos glandulares, sobre todo en el tabique. En E y F se observa que los conductos glandulares presentes en la lámina propia de la mucosa que cubre la superficie convexa del cornete superior, pero no los de la superficie cóncava, presentaron sitios de unión a MAA aún después de 48 h de tratamiento con sialidasa. No hubo lectinofluorescencia en los cilios (Flechas amarillas).



**Figura 29.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 48 h detratamiento con sialidasa**. Obsérvese la positividad a la lectina (flecha y círculo blanco) en los conductos glandulares de lámina propia de la superficie convexa del cornete superior y pared superior del tabique (A), y borde superior del cornete (B). No hubo lectinofluorescencia en los cilios (Flechas amarillas).

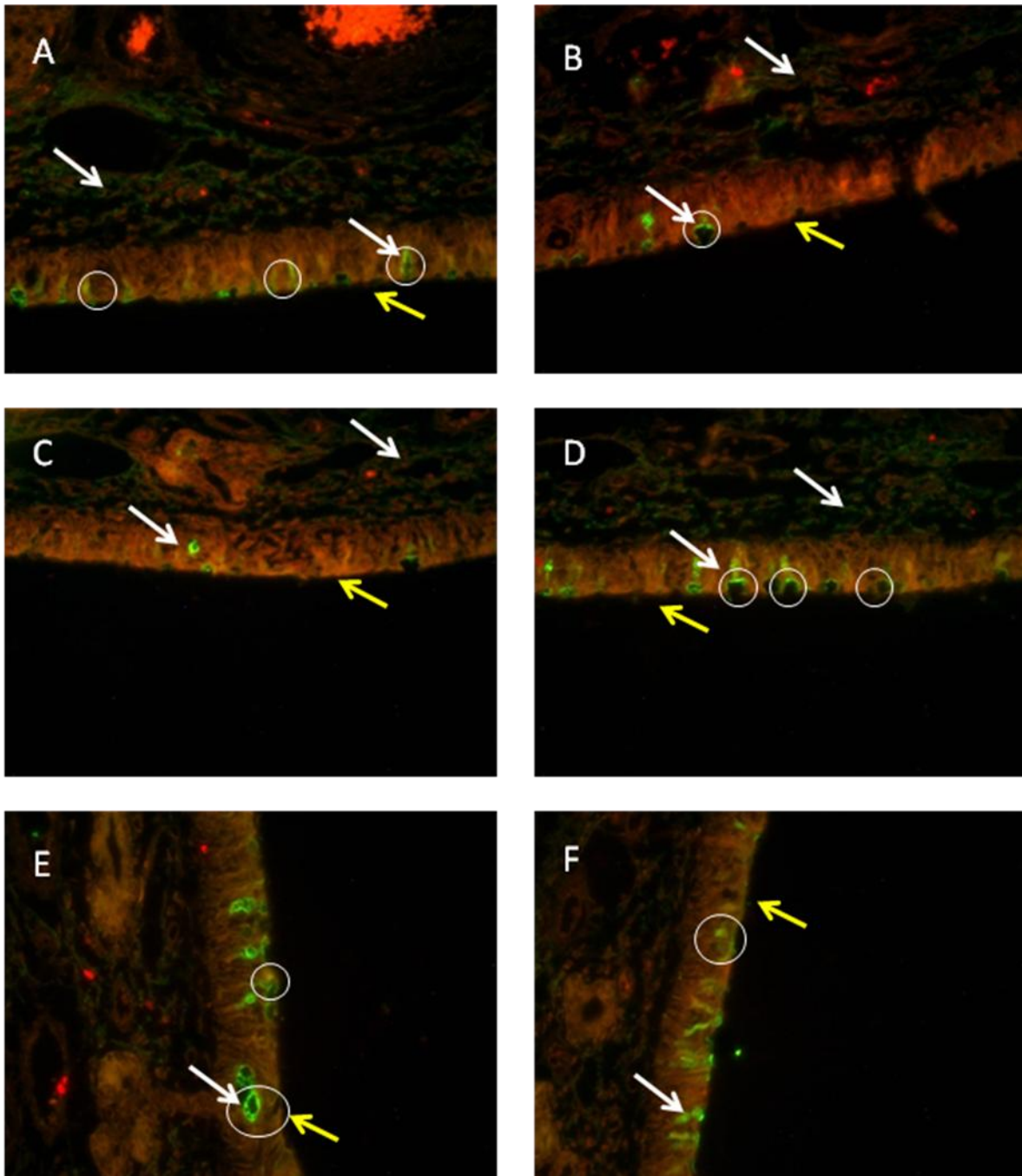


**Figura 30.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 48 h de tratamiento con sialidasa.** Reconstrucción de la transición entre el tercio superior del tabique nasal y parte del techo de la cavidad nasal. Obsérvese la positividad a MAA en las células epiteliales de los conductos interlobulillares (en recuadro y flecha blanca) y de los conductos excretorios de las glándulas seromucosas (en recuadro y flecha amarilla). Nótese la ausencia de lectinofluorescencia en la superficie luminal del epitelio.



**Figura 31.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 50 h de tratamiento con sialidasa.** Aun se observa el incremento en la lectinofluorescencia (flechas blancas) en la mayoría de las células de los conductos interlobulillares (A,C-F) y en conductos excretores (B, E) de las glándulas seromucosas del techo de la cavidad nasal y del cornete superior (F) en el segmento 6. En este tiempo de tratamiento con sialidasa algunas células caliciformes mostraron positividad a MAA en el contorno de la teca y hacia la parte basal de la célula (D, círculo blanco). No hubo lectinofluorescencia en los cilios (Flechas amarillas). Barras = 100µm

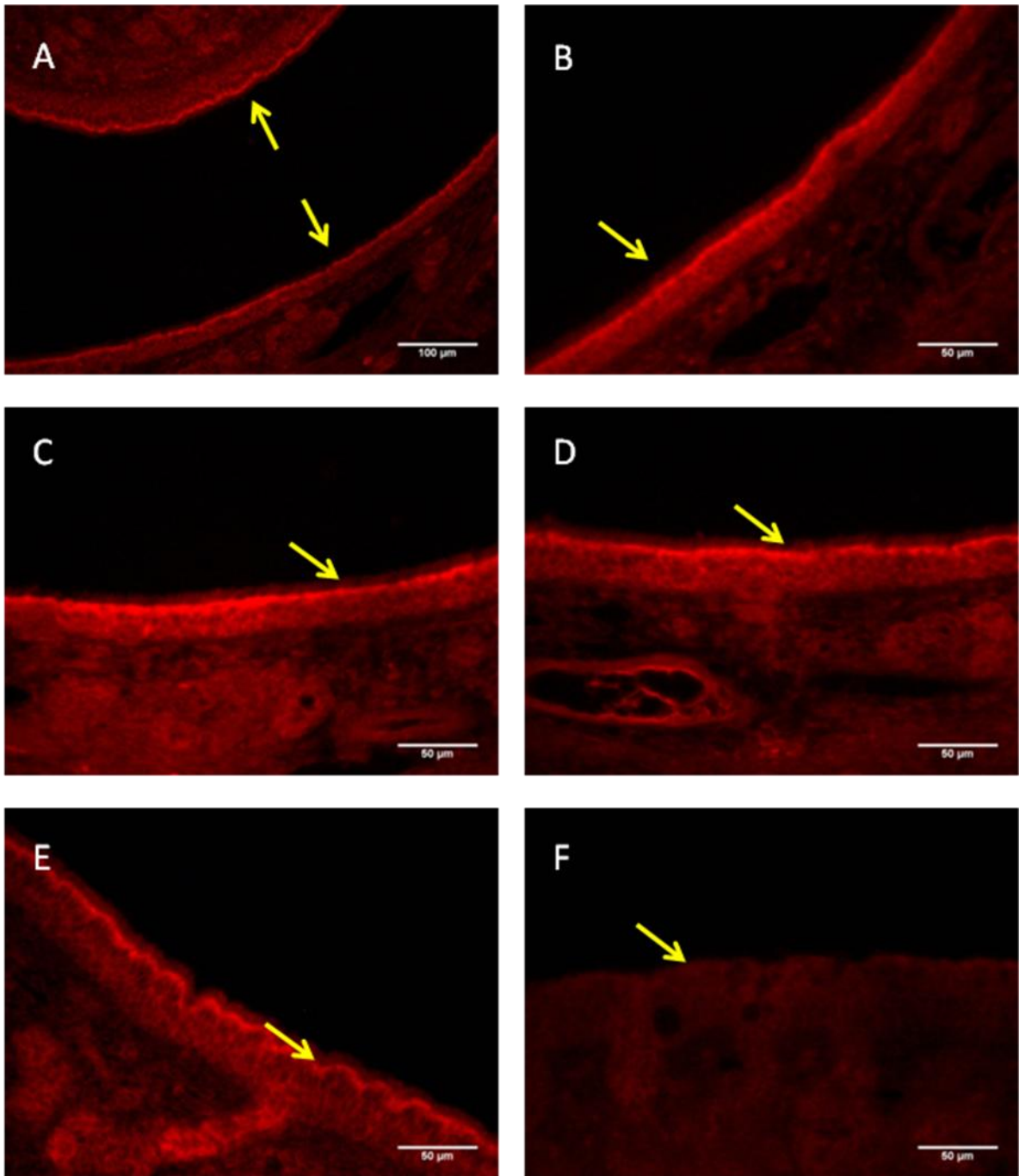




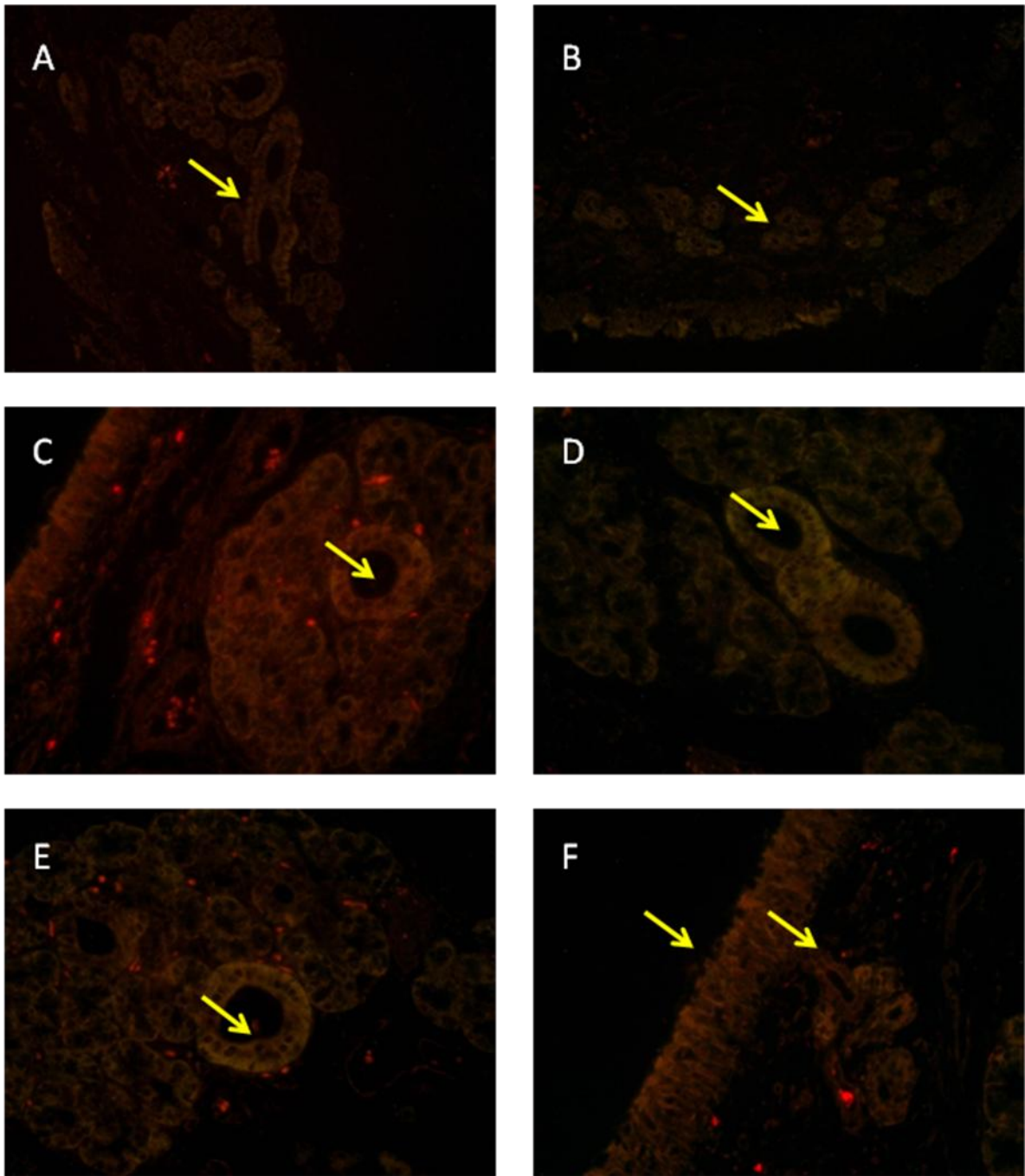
**Figura 32.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 50 h de tratamiento con sialidasa.** Únicamente en el epitelio respiratorio techo y en la pared lateral correspondiente al toro glandular de los segmentos 5 y 6 las células caliciforme mostraron lectinofluorescencia con el tratamiento de 50h con sialidasa (Círculos y flechas blancas). En A y B, las flechas blancas superiores señalan cierta positividad a MAA en el tejido conjuntivo de la lámina propia. No hubo lectinofluorescencia en los cilios (Flechas amarillas). Barras = 100 $\mu$ m



**Figura 33.** Reconstrucción de la transición entre tabique nasal y parte del techo de la cavidad nasal a nivel del tercio medio, S5-S6, de la cavidad nasal de cerdos de 15 días. Cortes histológicos tratados durante 6 h (izquierda) y 48h (derecha) con sialidasa. Nótese que la seriación de cortes es prácticamente en el mismo nivel anatómico de la cavidad nasal. Esto facilita y hace más confiable la comparación del efecto de la cinética de tratamiento con la enzima sialidasa y la reactividad de los componentes histológicos y celulares a la histoquímica con MAA. Es evidente el incremento de la lectinofluorescencia a mayor tiempo de tratamiento con sialidasa. Barras = 100  $\mu$ m.



**Figura 34.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, histoquímica con SNA. Curvatura del cornete superior (A), Pared lateral (B-F). No se observaron sitios de lectinofluorescencia (Flechas amarilla) en cilios, células caliciformes, conductos excretores ni interlobulillares como lo descrito con MAA.



**Figura 35.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con SNA después de 50 h de tratamiento con sialidasa.** Obsérvese la ausencia lectinofluorescencia en las estructuras epiteliales de la mucosa nasal como en la histoquímica sin tratamiento con sialidasa.

### **Inmunohistoquímica enzimática en cerdos de 15 y 30 días inoculados intranasalmente con Rubulavirus Porcino.**

Una hora después de la instilación intranasal unilateral de RVP en cerdos de 15 días de edad se observó inmunorreactividad al virus en una de las fosas nasales del segmento 6. La coloración café oscuro del producto de la reacción peroxidasa-peróxido-diaminobencidina se observó en el borde apical del epitelio respiratorio del cornete superior y del tabique nasal, así como en el endotelio de los vasos sanguíneos de la lámina propia (Fig. 35 A, B). En la misma región nasal contralateral no hubo inmunorreactividad (Fig. 37 C, D) ni en los cortes controles en los que se omitió la incubación con el antisuero hiperinmune (Fig. 36 E, F).

A las 3 h de la instilación intranasal unilateral de RVP, la mucosa nasal del segmento 6 de los cerdos de 15 días de edad, mostró inmunorreactividad difusa, localizada en cilios, borde apical de células caliciformes, lámina propia y eritrocitos. Pudo observarse bilateralmente, a veces con mayor intensidad en un lado pero frecuentemente bilateral (Fig. 37 A-E). El cortes controles fueron negativos aunque a veces se observó un poco de fondo en el tejido conjuntivo de la lámina propia (Fig. 36 F).

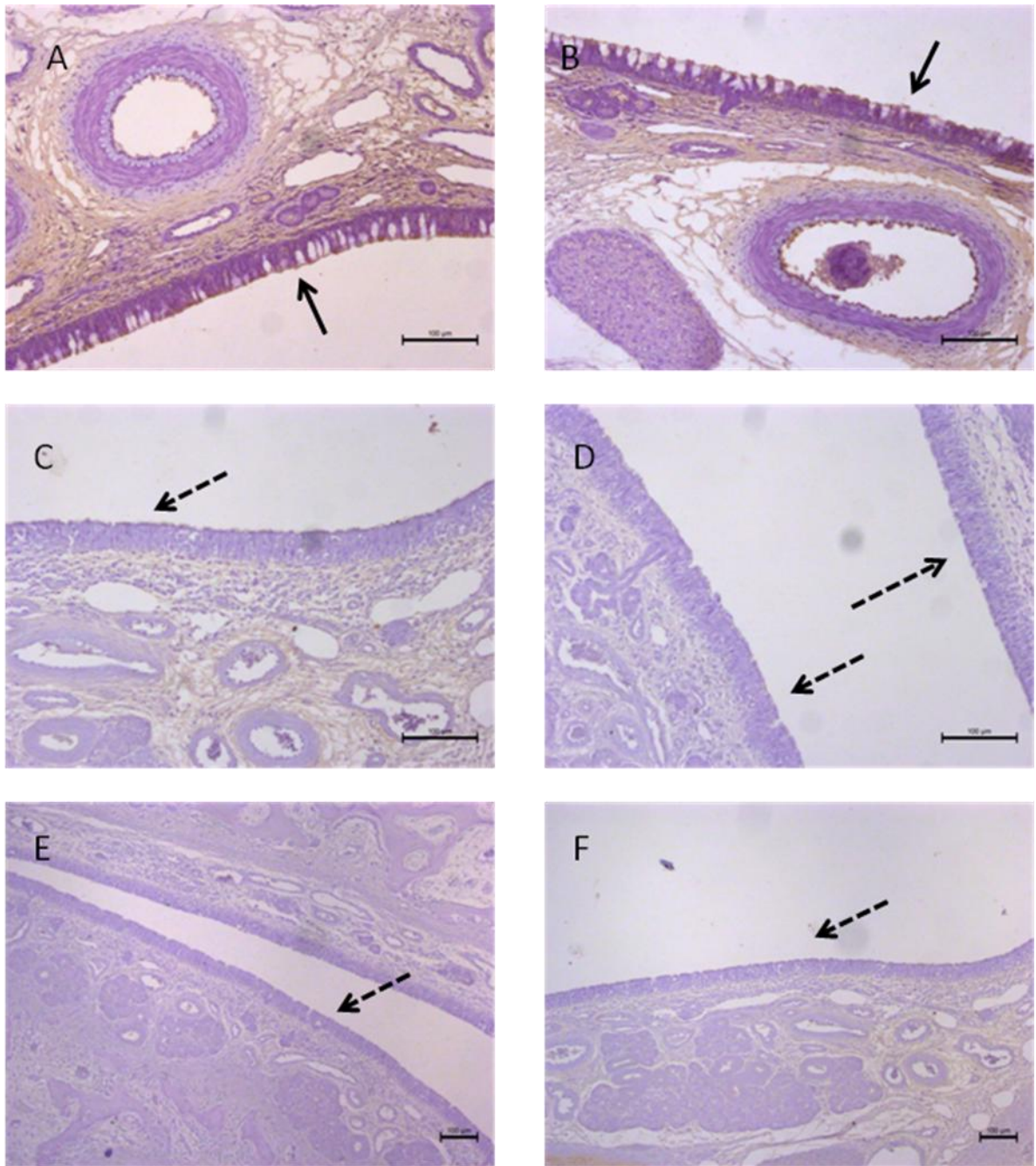
En cerdos de 30 días de edad y después de 1 y 3 h de instilación intranasal de RVP (Fig. 38) la inmunorreactividad de la mucosa fue similar a la descrita en los animales de 15 días con 3 h de instilación intranasal con RVP.

Una observación que debemos señalar es que algunos cerdos (controles) no instilados intranasalmente con RVP mostraron inmunorreactividad débil en la mucosa en sitios histológicamente equivalentes a los mostrados en las Figuras 36-38. Tabla 3.

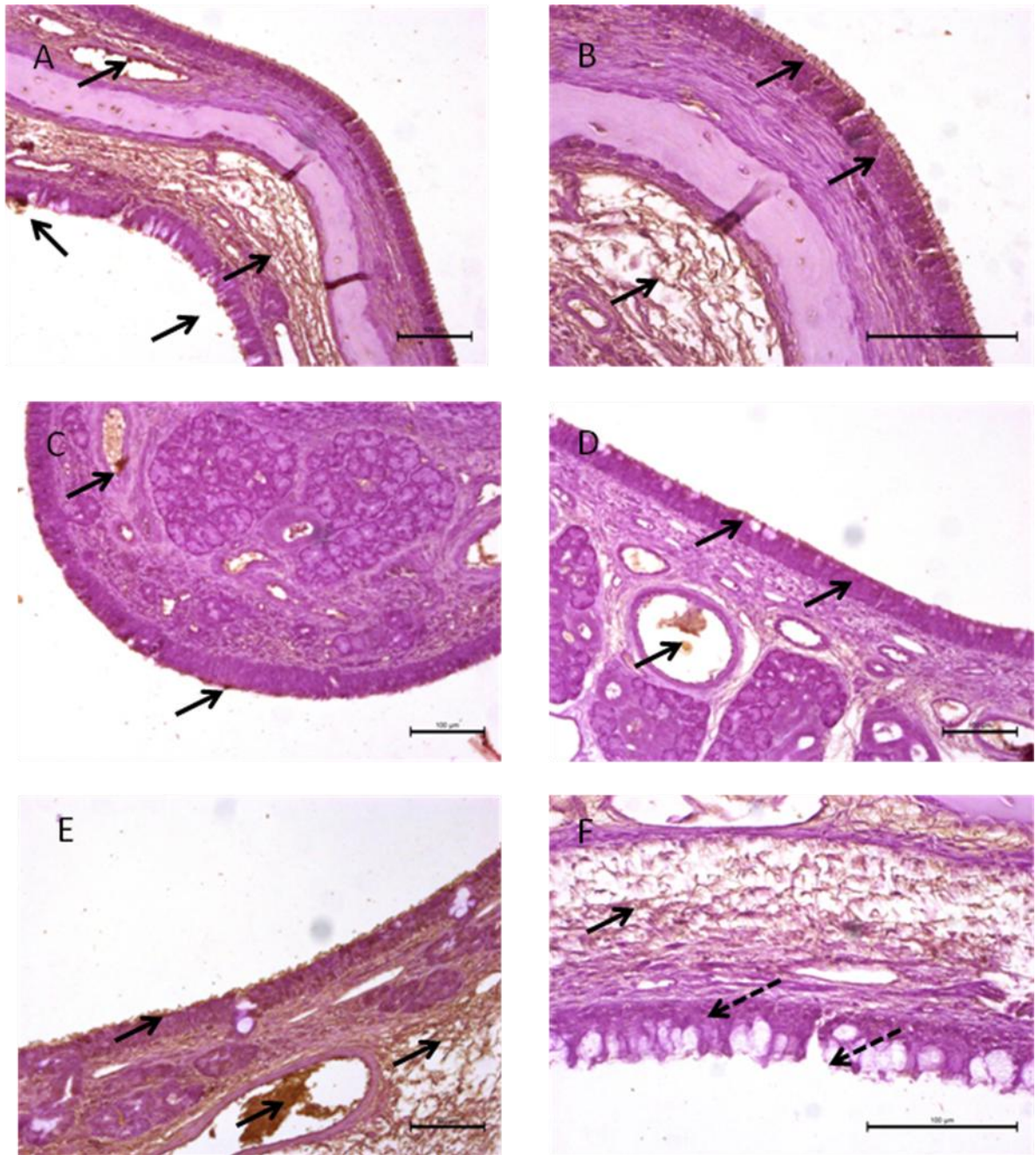
En la figura 41 se sintetiza y se compara esquemáticamente los sitios de la mucosa nasal del tercio medio y segmento 6 de cerdos de 15 días de edad en los que se expresan glicoconjugados con ácido siálico  $\alpha 2,3Gal$  identificados con la lectina MAA antes (A) y después (B) de la cinética de tratamiento con sialidasa (48h), con la inmunorreactividad al RVP en cerdos de 15 y 30 días, 1 y 3 h después de la inoculación intranasal del RVP (C).

	Inmunoreactividad a RVP			
	15y 30 días			
	1 h		3h	
	Control	RVP	Control	RVP
Borde apical	-	+++	-	+
Cornete superior	-	+++	-	+
Tabique nasal	-	+++	-	
Lamina propia	-	+++	-	+/-

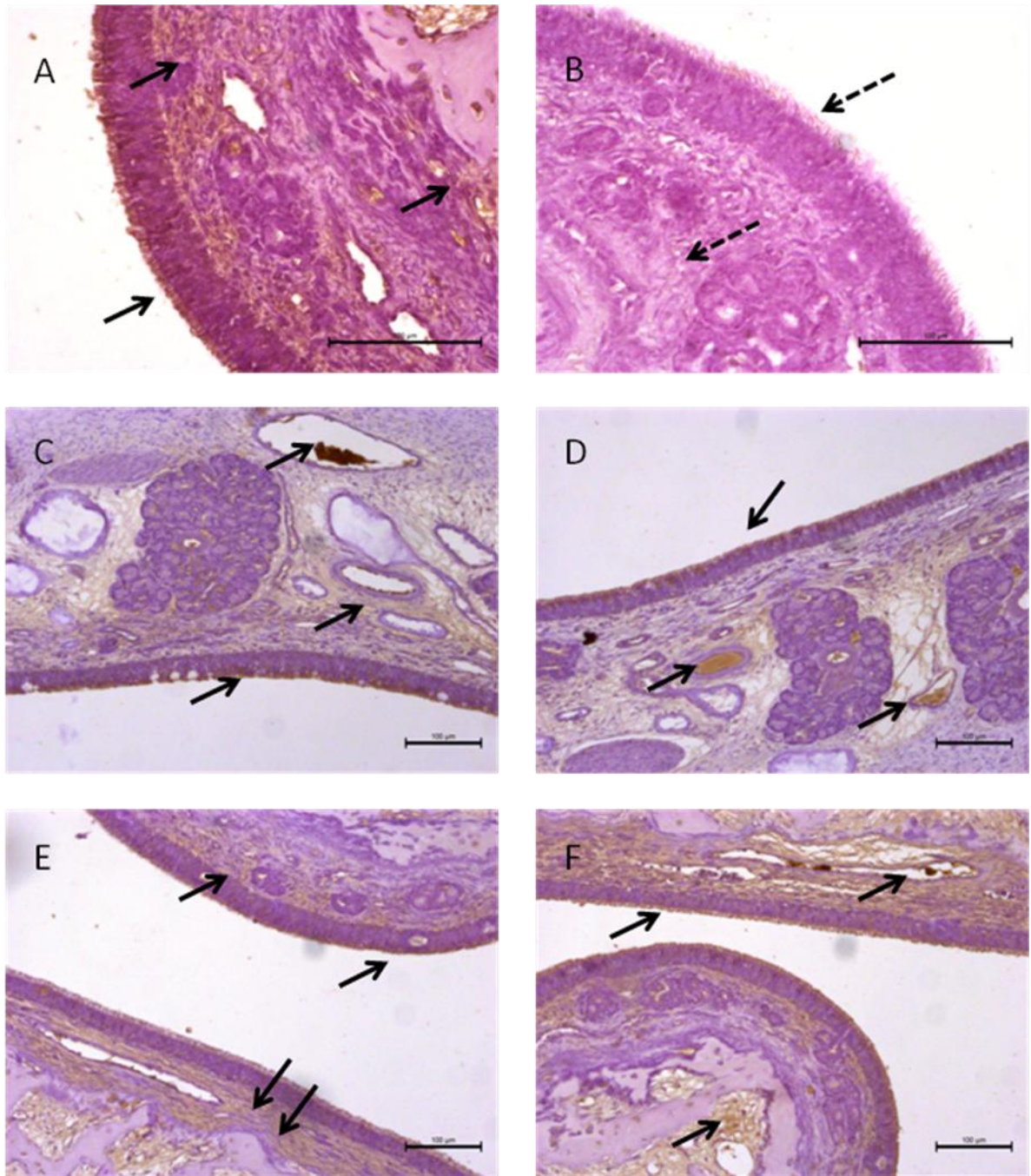
Tabla 3. Intensidad de inmunoreactividad +, indica raramente encontrado; ++, regularmente encontrado; +++, encontrado frecuentemente y en abundancia.



**Figura 36.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de **cerdo de 15 días, 1h después de la inoculación intranasal de RVP.** Inmunohistoquímica con suero hiperinmune de conejo para RVP. En una de las fosas nasales se observó inmunorreactividad al virus en el borde apical o luminal del epitelio respiratorio y en el endotelio de vasos sanguíneos (arterias y venas) de la lámina propia (A, B, flechas). En la fosa contralateral (C, D) y en los cortes controles (E, F) no hubo detección inmunohistoquímica de RVP. Barras = 100 µm.

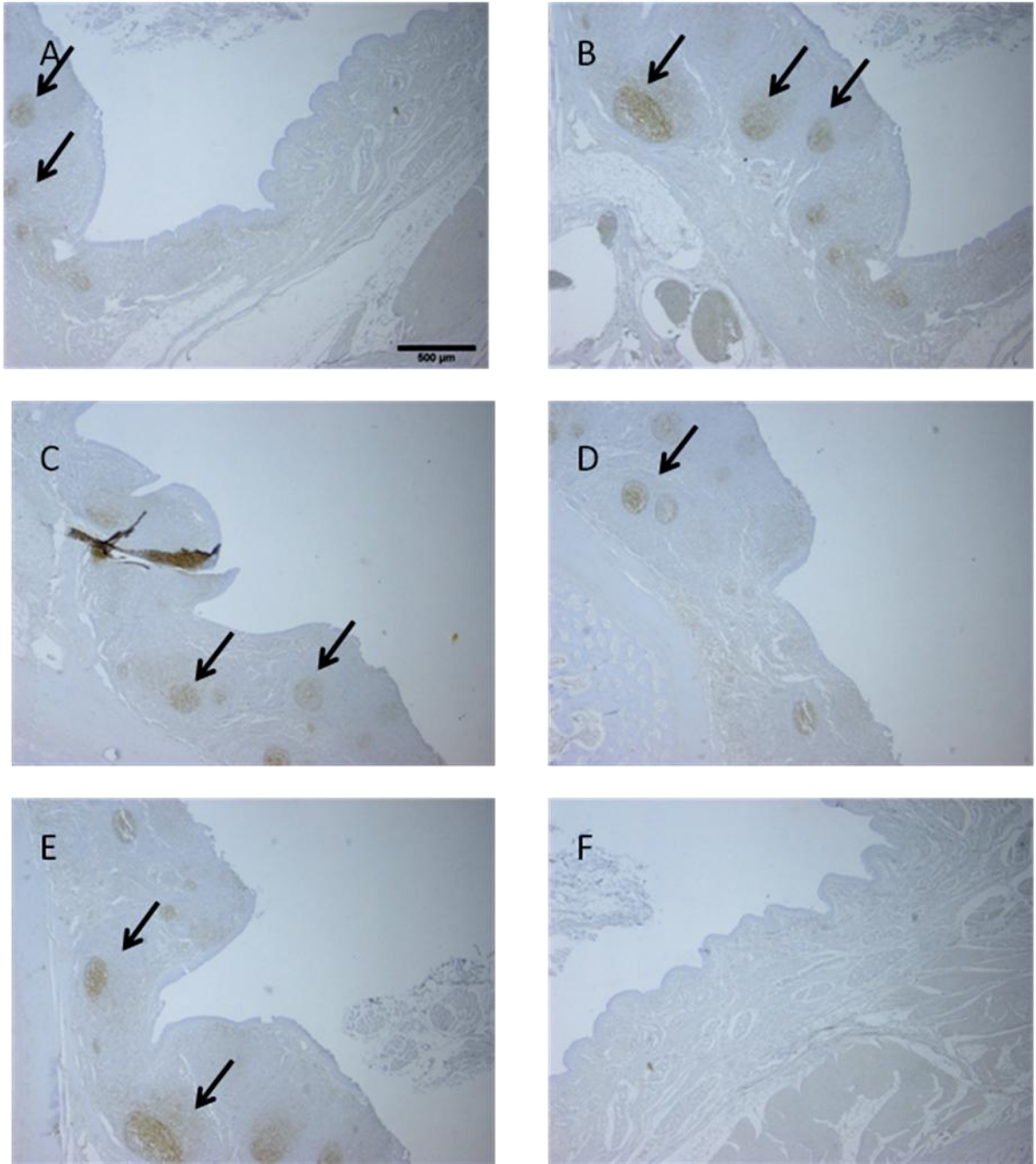


**Figura 37.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, 3h después de la inoculación intranasal de RVP. Inmunohistoquímica con suero hiperinmune de conejo para RVP. En la base o pilar del cornete superior, revestido por dos tipos de epitelio (A) se observó positividad homogénea en los cilios (arriba a la derecha) y en forma de agregado en donde había células caliciformes (abajo a la izquierda). Obsérvese mayor aumento del pilar (B). En el epitelio de la convexidad del cornete superior (C) y en la porciones media y superior del tabique nasal (D, E) fue observada una inmunorreactividad similar a la descrita, además de positividad en eritrocitos y en el endotelio vascular. Nótese algo de fondo en la lámina propia pero ausencia de inmunorreactividad en el epitelio respiratorio del pilar del cornete superior en el corte control (F). Barras = 100  $\mu$ m.

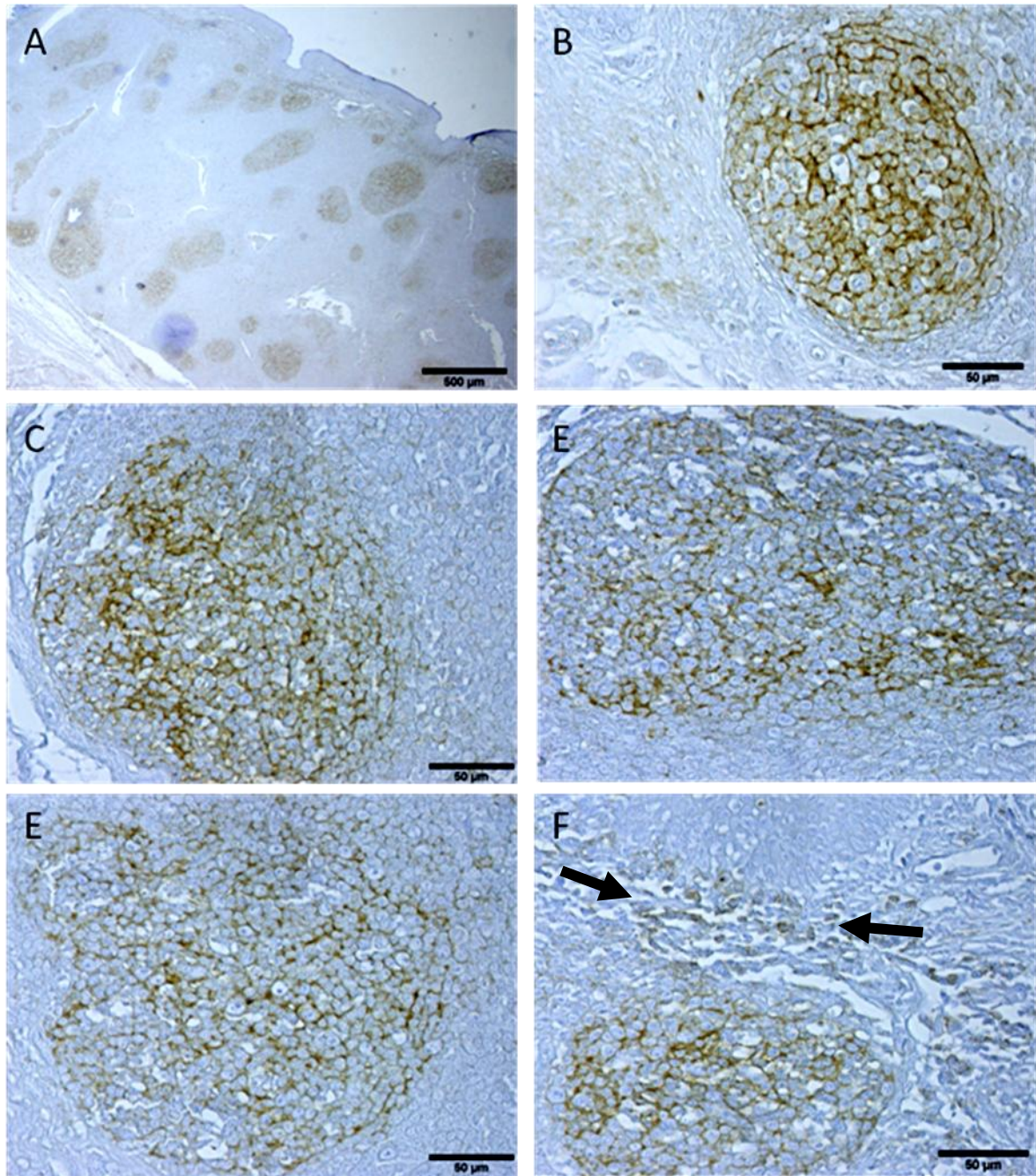


**Figura 38.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 30 días, 3h después de la inoculación intranasal de RVP. Inmunohistoquímica con suero hiperinmune de conejo para RVP. La inmunorreactividad a RVP fue observada consistentemente en los cilios del epitelio respiratorio, eritrocitos y endotelio vascular, así como en forma tenue en la lámina propia de cornete superior (A,E,F) y en la parte media y superior de la mucosa del tabique nasal (C,D, E parte inferior y F parte superior). En estos animales la tinción bilateral también fue frecuente. Obsérvese la ausencia de inmunorreactividad en la mucosa del cornete superior en los cortes control (B). Barras = 100  $\mu$ m.

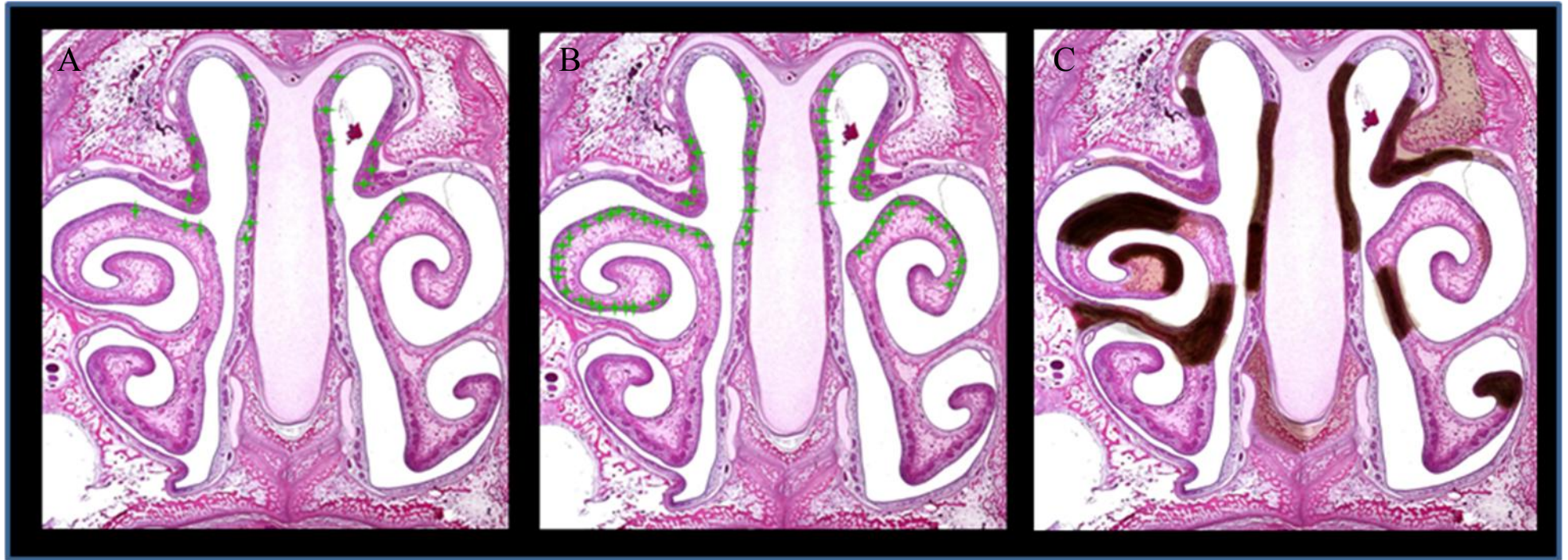




**Figura 39.** Inmunohistoquímica enzimática del tejido linfoide asociado al conducto nasofaríngeo (NALT) de cerdos de 15 días edad con el anticuerpo policlonal antiCD21. Obsérvese la positividad de los nódulos linfoides del NALT, localizado en el techo y pared lateral del conducto nasofaríngeo (A-E). El piso del conducto no posee nódulos linfoides (F) y no fue observada ninguna reactividad a CD21. En la parte izquierda de A está la pared lateral y hacia la izquierda la transición hacia el piso del conducto nasofaríngeo, carente de nódulos linfoides. Barra= 500 µm para todas las fotomicrografías.



**Figura 40.** Inmunohistoquímica enzimática de tonsila palatina de cerdo de 15 días edad con el anticuerpo policlonal antiCD21. Nótese la positividad de todos los nódulos linfoides (A) La células CD21 positivas presentaron una morfología dendríticas, formando una red de prolongaciones citoplásmicas entre los linfocitos B (B-F). Algunas células redondas subepiteliales (F, flechas) también fueron marcadas.



**Figura 41.** Síntesis esquemática de los sitios de la mucosa nasal del tercio medio y segmento 6 de cerdos de 15 días de edad en los que se expresan glucoconjugados con ácido siálico  $\alpha 2,3\text{Gal}$  identificados con la lectina MAA antes (A) y después (B) de la cinética de tratamiento con sialidasa (48h), con la inmunorreactividad al RVP en cerdos de 15 y 30 días, 1 y 3 h después de la inoculación intranasal del virus (C).

## DISCUSION

En el presente trabajo se realizó un análisis anatómico e histológico de la cavidad nasal de cerdos de 15 y 30 días de edad, a través de un abordaje novedoso que dividió a la cavidad nasal en tres tercios (anterior, medio y posterior, de tamaños similares), subdivididos en 15 segmentos, cada uno de 1 cm de grosor, aproximadamente.

El estudio histológico incluyó histoquímica de lectinas para glicoconjugados con ácido siálico utilizando las lectinas MAA y SNA. En ningún caso fue observada la unión de SNA pero si para MAA, particularmente en los conductos interlobulillares y excretores de las glándulas seromucosas del tercio medio en la superficie convexa de los cornetes, de la mitad superior del cartílago septal y del techo de la pared lateral. En el tercio posterior, en el tejido linfoide del conducto nasofaríngeo, la unión de MAA fue en células linfoides internodulares e intraepiteliales y, en menor grado, en células localizadas en la periferia de los nódulos linfoides secundarios.

Adicionalmente, se ensayó la inoculación intranasal de RVP, cuya HN reconoce glicoconjugados con ácido siálico  $\alpha 2,3\text{Gal}$ , expresados las células epiteliales de la mucosa nasal del hospedero. La inmunorreactividad regional al virus 1 y 3 horas después de la inoculación fue comparada con la distribución de la unión de MAA.

Los nódulos linfoides agregados del techo y paredes laterales del conducto nasofaríngeo presentaron CDF CD21 positivas. Estas células son un componente funcional y un requisito histogénico para la conformación de nódulos de células B en órgano linfoide secundario. <sup>(55-57, 118)</sup> La tonsila palatina, que aparece en los cortes de los segmentos más posteriores, también presentó CDF CD21 positivas.

Es la primera vez que se identifica en cerdos comerciales un órgano linfoide secundario similar al NALT, lo que concuerda con lo reportado en minicerdos, el NALT es un órgano simple, localizado en el techo del conducto nasofaríngeo, comparable al adenoide o tonsila nasofaríngea en humanos y perros (Kuper *et al* 2012) <sup>(46)</sup> y que difiere en su localización con respecto a los animales de laboratorio y otros mamíferos, <sup>(15-29)</sup> ya que el NALT de los cerdos estudiados muestra un desplazamiento posterior o caudal, es único y se localiza en el techo del conducto nasofaríngeo, mientras que en otros mamíferos se ubica en el piso del tercio posterior de la cavidad nasal, cercano a la pared lateral, y es par.

Existe muy poca información sobre las características histológicas de la cavidad nasal de cerdos durante las primeras 4 semanas de vida que permitan hacer una comparación con los resultados obtenidos por nosotros. La situación se hace más compleja si consideramos que existen claras diferencias en el crecimiento y desarrollo de la cabeza entre razas de cerdos y aún entre individuos

de la misma camada.<sup>(119)</sup> Nuestros cerdos de 15 días de edad presentan variaciones regionales muy evidentes con respecto a cerdos de la misma raza<sup>(47)</sup> a minicerdos<sup>(46)</sup> y a otros mamíferos en los que se describen típicamente tres tipos de epitelio: simple estratificado, respiratorio y olfatorio. Nuestros cerdos de 15 días presentan 8 tipos diferentes de epitelio y sus transiciones correspondientes así como el nulo o insipiente desarrollo de células ciliadas, de células caliciformes y de glándulas seromucosas, situación similar observada durante la gestación.<sup>(120)</sup> Estas características histológicas pueden interpretarse como una histodiferenciación no completa de la mucosa nasal de los cerdos de 15 días. Es probable que esto propicie lo que se menciona como desbalance homeostático del epitelio<sup>(121-126)</sup> que es más susceptible a infecciones, como la de *Bordetella bronchiseptica*<sup>(127-130)</sup> que en los primeros días causa cambios epiteliales que incluye la disminución de los cilios aunado a zonas que carecen de ellos, hiperplasia y metaplasia del epitelio plano estratificado<sup>(127)</sup> provocando una rinitis atrófica de los cornetes además de provocar bronconeumonías por diferentes organismos<sup>(126,130)</sup>.

En cerdos de la raza Landrace de 1, 14 y 28 días de edad han sido descritos 4 tipos de epitelio:<sup>(47)</sup> plano estratificado en el vestíbulo de la cavidad nasal, desde la parte rostral de la cavidad nasal hasta el nivel del primer incisivo; epitelio pseudoestratificado con distribución heterogénea de células caliciformes en la región respiratoria, la más grande de la cavidad nasal, y el epitelio olfatorio que reviste la cavidad nasal a la altura de los huesos etmoidales. El cuarto epitelio ha sido llamando erróneamente transicional, ubicado a la altura del primer incisivo en el límite del vestíbulo con la región respiratoria de la cavidad nasal. La descripción de este epitelio con características intermedias entre epitelio cilíndrico simple y epitelio cilíndrico estratificado sin cilios y distribución heterogénea de células caliciformes está lejos de ser similar a las características del epitelio transicional o urotelio. Lo que el autor describe es una transición de epitelios y no una forma especial de epitelio que sólo se encuentra en uréteres, vejiga y la porción proximal de la uretra. Nuestro estudio no evidenció la presencia de un epitelio transicional, pero si varias transiciones de epitelios en la mucosa nasal del cerdos machos híbridos York-Landrace, sobre todo en la porción respiratoria lo que podría ser indicativo de los cambios bioquímicos y morfológicos asociados a completar la diferenciación a un tipo de epitelio respiratorio.

En los minicerdos Göttingen de 1 día hasta los 6 meses de edad, se describe un patrón epitelial nasal similar al descrito en los cerdos Landrace de 30 días, formado por epitelios plano estratificado, respiratorio y olfatorio. Adicionalmente, estos minicerdos también presentan un órgano impar linfoide similar al NALT, cubierto por un linfoepitelio y rodeado por un epitelio respiratorio, situado en el techo del conducto nasofaríngeo,<sup>(46)</sup> anatómica e histológicamente similar al descrito en el presente trabajo. El NALT de minicerdos está presente desde el 1 día de edad, y aparece como

acumulaciones escasas de celulares linfoides, que aumentan rápidamente en tamaño hasta los 6 meses de vida. Tomados en conjunto, nuestros hallazgos en los cerdos machos híbridos York-Landrace coinciden en parte con los estudios referidos. Sin embargo, observamos que en cada uno de los 15 segmentos analizados existe una mayor variabilidad epitelial en los cerdos de 15 días de edad, pudiéndose observar dos tipos de epitelio como mínimo y de cinco como máximo en un segmento (S5), con diferencias en altura del epitelio, de la presencia o no de cilios, o donde existe diferencia de la densidad y longitud de los mismos y en la presencia o no de células caliciformes. Como se mencionó en resultados, la cavidad nasal de los cerdos York-Landrace de 15 días de edad presenta ocho tipos de epitelios que se distribuyen en las tres regiones de la cavidad, lo cual aporta nueva información en esta raza de cerdos.

Con base en la heterogeneidad epitelial y a que la formación adecuada de glándulas serosas, mucosas y seromucosas depende de la diferenciación de un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con células caliciformes, los cerdos de 15 días de edad no han completado la histodiferenciación de las tres regiones típicas de la mucosa nasal, mientras que los cerdos de 30 días si presentan una mucosa nasal más parecida a la observada en la mayoría de los mamíferos adultos. Esta característica de los cerdos de 15 días de edad, y seguramente de edades menores, establece la posibilidad de que la ausencia de la barrera fisicoquímica de moco, junto con la escases de células ciliadas que muevan esa capa seromucosa, represente una desventaja para el animal con respecto a la eliminación de inóculos naturales o experimentales que entran por la vía aérea. En ese sentido, la histodiferenciación incompleta de la mucosa nasal de estos cerdos durante las primeras dos semanas de vida podría ser un factor de susceptibilidad a infecciones y enfermedades frecuentes en estos animales. <sup>(120-130)</sup>

En los cerdos de 30 días ya están diferenciados los 3 tipos de epitelio: plano estratificado sin estrato córneo, cilíndrico pseudoestratificado ciliados con células caliciformes y en el epitelio olfatorio, que caracterizan a las tres regiones de la cavidad nasal del adulto. Las glándulas seromucosas, cuyos conductos drenan a la superficie mucosa revestida con epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado con células caliciformes, son más numerosas en el tercio medio o región respiratoria. Estas características permiten que la cavidad nasal presente una barrera mecánica o física de moco que atrapa partículas de diferente tamaño, presentes en el aire inspirado, incluidos patógenos, y la movilización de dicha barrera por acción ciliar, depurando y preparando no sólo al aire que llegará a las vías respiratorias inferiores, sino también limpiando la superficie mucosa. De igual relevancia es la composición principal del moco a base de mucinas, glucoproteínas con ácido siálico, <sup>(123)</sup> conformaciones del gliconjugado que son sitios de unión de patógenos, como los virus de influenza y RVP, cuyas hemaglutininas presentan un dominio de unión a esos carbohidratos. La combinación

de la acción del sistema mucociliar con la unión de patógenos a ácidos siálicos de mucinas, dificultaría la interacción o adhesión de estos virus a las células epiteliales, lo que podría conferir a los cerdos de 30 días, y mayores, mayor resistencia a estas infecciones virales. <sup>(122-126)</sup>

El órgano linfoide del techo del conducto nasofaríngeo de los cerdos de 15 y 30 días estudiados es morfológicamente equivalente a los órganos linfoides secundarios del anillo de Waldeyer. La formación o histodiferenciación del NALT está precedida por la migración masiva de células linfoides a través de vasos venosos localizados en la lámina propia de la mucosa nasal en los tercios medio y posterior de la cavidad nasal observada en algunos cerdos durante la primera semana de edad, en minicerdos se observa el mismo fenómeno donde el NALT está presente en el 1 día de edad, en pocas acumulaciones celulares linfoide dispersas (Kuper *et al* 2012) <sup>(46)</sup>

Un hallazgo original y relevante en relación con la presencia del NALT es la identificación Inmunohistoquímica de CDF CD21 positivas, que no habían sido identificadas en el MALT de las vías respiratorias superiores y digestivas del cerdo. Antes de ejercer su capacidad de presentar complejos inmunes, las CDF establecen una estrecha aposición morfogénica o histogénica con los linfocitos B para formar los nódulos primarios, y luego los secundarios, constitutivos de todos MALT y otros órganos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos. Esta relación morfofuncional bidireccional o bicelular mantiene al órgano linfoide secundario. <sup>(50-54)</sup>

Historicamente consideradas como células retenedoras de antígenos, las CDF han adquirido mayor relevancia ya que parecen ser esenciales en la producción de anticuerpos de alta afinidad y para el desarrollo de células B de memoria (Heesters, Myers y Carroll. 2014) <sup>(131)</sup>. Sin embargo, otra faceta de las CDF es que pueden ser infectadas por el VIH, aunque no expresan CD4 como receptor del virus, funcionar como reservorio y al ser productivas del virus contribuir en su diseminación. En los cerdos es ampliamente conocido el fenómeno de la persistencia viral y de otros patógenos que ingresan a estos animales por las vías respiratoria y digestiva. Es probable que el estudio de las CDF en órganos linfoides como el NALT y las tonsilas palatinas ayuden a entender dicho fenómeno y, eventualmente, a diseñar estrategias de prevención, tratamiento o disminución de dicha persistencia. El aspecto histológico del NALT de los cerdos estudiados sugiere que es un órgano linfoide secundario inmunocompetente. Sin embargo, habría que estudiar cuáles son los efectos inmunológicos y patogénicos de las infecciones naturales y experimentales en cerdos antes y después de completada la histodiferenciación concomitante de la mucosa nasal y del NALT. Los resultados de estos estudios podrían definir de manera más razonada y selectiva la forma de inducir inmunizaciones por vía intranasal <sup>(132)</sup>.

Se requiere un estudio más detallado durante los primeros días posnatales para identificar algunas de las señales moleculares necesarias para la formación del NALT en cerdos y de la presencia de antígenos o de patógenos completos asociados a las CDF identificadas en la tonsila palatina y en el NALT. Adicionalmente, estudiar ontogénicamente el tamaño y la presencia del NALT y conocer si permanece o involuciona como en el humano después de los primeros años de vida. <sup>(44)</sup> Por los estudios en roedores, el NALT es considerado un componente constitutivo del sistema inmune nasal y un sitio de inducción para la vacunación. <sup>(133-134)</sup> Por lo anterior, nuestros hallazgos podrían alentar el diseño de estudios futuros en los que se caracterice sistemáticamente la respuesta inmune inducida en el NALT, particularmente por las implicaciones preventivas y de producción animal, en la ventana crítica de desarrollo inmunológico, que se comprende entre finales de la gestación y el destete. <sup>(135,136)</sup>

Los histoquímica con MAA indica que la expresión de está en el borde apical o luminal de las células de los conductos interlobulillares y excretores de las glándulas seromucosas del cornete superior, del tabique nasal y del techo, a nivel del tercio medio de la mucosa nasal del S6. Esta expresión tan restringida de glicoconjugados de SA en posición  $\alpha$ 2,3Gal es coincidente, en cierto sentido, a los obtenidos por Trebbien (2011) <sup>(137)</sup> en la mucosa nasal de cerdos de la misma especie que la empleada por nosotros pero de dos meses de edad, en los que no encuentra expresión de receptores SA  $\alpha$ 2,3Gal utilizando MAA-I, <sup>(138,139)</sup> lo que contrasta con la alta positividad a SNA en células epiteliales de la mucosa nasal, y que nosotros no observamos. Otros estudios, en los que no se da evidencia fotomicrográfica habiendo empleado histoquímica con lectinas, mencionan que hay una distribución ubicua de SA  $\alpha$ 2,3Gal y  $\alpha$ 2,6Gal en la mucosa nasal de cerdos neonatos y adultos. <sup>(79-81)</sup> Nelly et al 2010 <sup>(141)</sup> demuestra en cerdos comerciales de 4-8 semanas, un patrón de distribución en la expresión en tráquea fue dominante para el receptor SA  $\alpha$  2,6-Gal <sup>(139)</sup> en el epitelio pseudoestratificado con cilios se continua hasta el epitelio cúbico de los bronquiolos, en la lámina propia (mucosa) de las vías respiratorias, SA a2,3-Gal (MAA II) <sup>(138,139)</sup> era dominante sobre SA a2,6-Gal <sup>(141)</sup>.

Aunque la citoarquitectura de la mucosa nasal es similar a la de las vías respiratorias inferiores <sup>(142)</sup>, nuestros resultados sobre la expresión de gliconjugados con SA sugieren que no es aceptable la extrapolación de resultados obtenidos en estudios similares realizados en tráquea o en vías aéreas intrapulmonares. Es recomendable considerar que existen variaciones regionales, interespecies, de edad, metodológicas, etc, al momento de hacer generalizaciones sobre el asunto. <sup>(72-75,77,78)</sup> Al respecto, las células de los conductos interlobulillares de las glándulas seromucosas de la tráquea de cerdos, pero no el epitelio respiratorio superficial, expresen sitios de unión a MAA <sup>(142,143)</sup> tisularmente pero no regionalmente similar a lo encontrado por nosotros en la mucosa nasal.



En el tercio posterior, en el tejido linfoide del conducto nasofaríngeo, la unión de MAA fue en células linfoides internodulares e intraepiteliales y, en menor grado, en células intranodulares de la periferia de los nódulos linfoides secundarios.

La inoculación intranasal de RVP, cuya HN se une a gliconjugados con SA  $\alpha$ 2,3Gal, esencial para la infección por RVP, demostrado *in vitro* por Leyva y cols <sup>(80,81)</sup>. La inmunorreactividad al virus 1 y 3 horas después de la inoculación fue comparada con el resultado de la histoquímica con MAA. La inmunorreactividad tuvo una distribución ubicua en la mucosa nasal del tercio medio, incluido el endotelio vascular arterial, con positividad notable en los cilios pero no se observó que coincidiera con la positividad a MAA. En este sentido, la expresión intranasal de ácidos siálicos como sitios de unión de la hemaglutinina viral parece ser muy restringida como para explicar la susceptibilidad al RVP o la infección a las células epiteliales nasales del hospedero. <sup>(80,81)</sup> De manera especulativa podría pensarse que existen otras vías para la infección por RVP u otros miembros de las familias de paramixovirus y ortomixovirus para los que sólo se ha insistido en la relevancia de la interacción HN y ácido siálico para la infección <sup>(82)</sup>. Podrían ser mecanismos más generales como la pinocitosis y el muestreo de moco por las células dendríticas, entre otros. Consideramos que es una propuesta atractiva estudiar otras vías de infección diferentes a la vía de HN-ácido siálico.

Una explicación a la inmunorreactividad bilateral ante la inoculación unilateral de RVP es que con las inspiraciones y espiraciones ocurra una redistribución del inóculo a la fosa nasal no instilada con el virus. Por otro lado, la ligera positividad al VRP en cerdos controles es aún más difícil de explicar, aunque pensar en una infección natural no está alejado de la realidad epidemiológica. Podría ser una circunstancia técnica en la que ocurra un pegado inespecífico del antisuero hiperinmune pero lo descartamos porque los cortes controles siempre fueron negativos. El empleo de anticuerpos monoclonales específicos para RVP podría ayudar a reinterpretar estos resultados.

El pretratamiento con sialidasa en ninguno de los tiempos explorados abolió la reactividad a MAA. El efecto que observamos parece paradójico ya que lo esperado es que la enzima elimine los sitios de unión epitelial a MAA, sin embargo, lo que ocurrió fue un aumento en la intensidad de la fluorescencia en los sitios mencionados, en una relación directa al tiempo de incubación en la enzima, aunque parece haber una ligera disminución hasta después de 50 h de tratamiento con sialidasa.

No tenemos una explicación satisfactoria para los resultados obtenidos en la cinética de sialidasa, los cuales no parecen estar relacionados con la calidad de los reactivos ya que los ensayos de hemaglutinación con eritrocitos de cerdo indican que la actividad de MAA y la de sialidasa están

presentes, corroboradas adicionalmente por la disminución de la unión de MAA en cortes pretratados con fetuína y con el incremento de la hemaglutinación con PNA, respectivamente. Podría pensarse que el procesamiento de las muestras para hacer inclusión y corte en parafina “enmascararon” la expresión de glicoconjugados y que sialidasa, que también tiene actividad de proteasa como lo indica la hoja técnica, actuó como reactivador de esos sitios antigénicos con ácido siálico. Leyva *et al* 1997,<sup>(80)</sup> utilizó el tratamiento de tripsina en células *in vitro* y observó aumento en la infectividad de RVP, lo que indica que la modificación topográfica en la superficie de las células inducida por la proteasa facilita o aumenta la interacción de HN viral con los ácidos siálicos expuestos por la acción enzimática, unidos con receptores que contienen NeuAca2,3Gal respectivamente. La disminución de la intensidad de la histofluorescencia observada por nosotros a las 50 h de incubación de los cortes con sialidasa sugiere que en ese tiempo podría estarse dando la escisión de ácido siálico y propiamente la actividad de sialidasa, precedida de la actividad de proteasa. Aunque no existen reportes que sustenten esta especulación, un primer abordaje para saber si hay actividad de proteasa preparatoria a la actividad de sialidasa podrían probarse otras proteasas empleadas en protocolos de reactivación antigénica en especímenes fijados en formol e incluidos en parafina y realizar la histoquímica de lectinas con MAA con y sin tratamiento con sialidasa.

Hasta ahora no existen informes sobre la probable relevancia de la expresión de glicoconjugados con ácido siálico reconocidos con MAA en las áreas T dependientes de órganos linfoides secundarios en cerdos. Una observación personal (Dr. Armando Pérez-Torres) señala que en cerdos infectados experimentalmente con Virus de Influenza Aviar e infección persistente con RVP hay numerosas células apoptóticas que pudieran corresponder a linfocitos T en dichas zonas de la tonsila palatina. Actualmente se están realizando inmunohistoquímicas para investigar si estas células expresan o coexpresan antígenos de ambos virus (Rivera-Benitez *et al* 2015)<sup>(144)</sup>

La unión de SNA no fue observada en ningún segmento de la cavidad nasal lo cual difiere con estudios previos en los que también se utilizaron cortes histológicos e histoquímica con SNA<sup>(79-81, 110,140)</sup>. Nuestros controles en los ensayos de hemaglutinación con eritrocitos de cerdo indican que la actividad de SNA y la de sialidasa están presentes, la última corroborada con el incremento de la hemaglutinación con PNA. Por ello, sugerimos que en los cerdos estudiados aun no se expresa el receptor en la mucosa nasal para la unión de SNA.

## Conclusiones

La cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad posee 8 tipos de epitelio, así como poco desarrollo de glándulas, células ciliadas y células caliciformes, lo cual indica que la histodiferenciación de la mucosa nasal continúa posnatalmente.

La cavidad nasal de cerdos de 30 días de edad tiene las características histológicas de la mucosa nasal que predominarán en la vida adulta, lo que indicaría que el grado de histodiferenciación a esa edad es alto.

En el techo y pared lateral del conducto nasofaríngeo fue identificado un órgano linfoide secundario que designamos como NALT (Tejido Linfoide Asociado al conducto Nasofaríngeo). En éste y en la tonsila palatina adyacente demostramos por primera vez la presencia de células dendríticas foliculares CD21 positivas.

El tercio medio de la cavidad nasal presenta histoquímicamente sitios de unión a MAA en los conductos interlobulillares y excretorios de las glándulas seromucosas localizadas en la mucosa de la porción media y superior septo, del toro glandular y de la convexidad del cornete superior, lo que sugiere la presencia de glicoconjugados con ácido siálico alfa 2-3.

Sialidasa funcionó como reactivadora a los sitios de unión a MAA, aumentando la intensidad de la histofluorescencia en relación directa al tiempo de tratamiento con la enzima en los mismos sitios descritos y desenmascarando otros, como las células caliciformes y en menos grado el tejido conjuntivo de la lámina propia

En el tercio posterior la positividad a MAA se observó en células linfoides que pueden corresponder a células T por su ubicación internodular, nodular periférica e infiltrando el epitelio respiratorio que cubre al NALT.

La ausencia de histofluorescencia con SNA en la mucosa nasal de cerdos de 15 días sugiere la no expresión de glicoconjugados con ácido siálico alfa 2-6.

La inmunoreactividad al RVP en cerdos de 15 y 30 días, 1h y 3h posteriores a la instilación intranasal del virus, fue observada en los cilios y en el endotelio vascular. La presencia bilateral de la inmunotinción en algunos cerdos inoculados unilateralmente sugiere una redistribución del inóculo por la inspiración y espiración.

La comparación de la histofluorescencia con MAA y la inmunoreactividad al RVP señala que la expresión de receptores es insuficiente para explicar y establecer una correlación con la inmunotinción en su localización histológica.

Un desafío importante es aumentar nuestra comprensión de los perfiles de expresión de glicanos en vivo. Esta brecha de conocimiento presenta actualmente el mayor obstáculo para lograr una comprensión de las interacciones virus-glicanos y sus funciones en la enfermedad.

## Referencias bibliograficas

1. Liang B, Hyland L, Hou S. Nasal-associated lymphoid tissue is a site of long-term virus-specific antibody production following respiratory virus infection of mice. *J Virol* 2001;75:11:5416-5420.
2. Trautman A.-Fiebiger J. *Histología y Anatomía Microscópica Comparada de los Animales Domésticos*. Ed. Labor, S.A. 1950.
3. Sisson S, Grossman JD. *Anatomía de los animales domésticos*. 5ª edición Salvat 1982.
4. Hiroi T, Iwatani K, Iijima H, Kodama S, Yanagita M, Kiyono H. Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. *Eur J Immunol* 1998;28:3346–3353.
5. Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol.* 2004;25:570–577.
6. Sosa GA, Roux ME. Development of T lymphocytes in the nasal-associated lymphoid tissue (NALT) from growing Wistar rats. *Clin Dev Immunol* 2004; 11:1:29-34.
7. Liebler-Tenorio EM, PABST R. MALT structure and function in farm animals. *Vet. Res* 2006;37:257–280.
8. Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 2002; 16:1–4.
9. Carlsen HS et al. Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood.* 2005;15(2):106
10. Brandtzaeg P. Potential of Nasopharynx-associated Lymphoid Tissue for Vaccine Responses in the Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(12):1595-604.
11. Bienenstock J, McDermott MR. Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues. *Immunol Rev.*2005;206:22-31.
12. Jurcisek JA, Durbin JE, Kusewitt DF, Bakaletz LO. Anatomy of the nasal cavity in the chinchilla. *Cells Tissues Organs* 2003;174:136–152.
13. Kraal G, Samsom JN, Mebius RE. The importance of regional lymph nodes for mucosal tolerance. *Immunol Rev* 2006; 213:119-130.
14. Sosa GA, Roux ME. Development of T lymphocytes in the nasal-associated lymphoid tissue (NALT) from growing Wistar rats. *Clin Dev Immunol* 2004;11(1):29-34.
15. Giannasca PJ, Boden JA, Monath TP. Targeted delivery of antigen to hamster nasal lymphoid tissue with M-cell-directed lectins. *Infect Immun* 1997;65(10):4288-4298.
16. Casteleyn C, Broos AM, Simoens P, Van den Broeck W. NALT (nasal cavity-associated lymphoid tissue) in the rabbit. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;15;133(2-4):212-218.
17. Zhang Z, Bashiruddin JB, Doel C, Horsington J, Durand S, Alexandersen S. Cytokine and Toll-like receptor mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissues of cattle during foot-and-mouth disease virus infection. *J Comp Pathol* 2006;134(1):56-62.
18. Loo SK. and Chin KN. Lymphoid tissue in the nasal mucosa of primates, with particular reference to intraepithelial lymphocyte. *J Anat* 1974;117:249–259.

19. Mair TS, Batten EH, Stokes CR, Bourne FJ. The histological features of the immune system of the equine respiratory tract. *J Comp Pathol* 1987; 97:575–586.
20. Mair TS, Batten EH, Stokes CR, Bourne FJ. The distribution of mucosal lymphoid nodules in the equine respiratory tract. *J Comp Pathol* 1988;99:159–168.
21. Ohshima K, Hiramatsu K. Distribution of T-cell subsets and immunoglobulin-containing cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) of chickens. *Histol Histopathol* 2000;15(3):713-720.
22. Billen F, Peeters D, Dehard S, Day MJ, Clercx C. Distribution of Leucocyte Subsets in the Canine Pharyngeal Tonsil. *J Comp Pathol*.2006;135:63-73.
23. Roberto Suárez, María Lucia Taylor, Armando Pérez Torres. Identificación histológica del tejido linfoide asociado a la nariz (NALT) en el murciélago migratorio (*Tadarida Brasiliensis*). *Lab-acta* 2009: 5-8.
24. Debertin AS, Tschernig T, Tönjes H, Kleemann WJ, Tröger HD, Pabst R. Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children. *Clin Exp Immunol* 2003;134(3):503-507.
25. Hameleers DM, van der Ende M, Biewenga J, Sminia T. An immunohistochemical study on the postnatal development of rat nasal-associated lymphoid tissue (NALT). *Cell Tissue Res* 1989;256(2):431-438.
26. Spit BJ, Hendriksen EG, Bruijntjes JP, Kuper CF. Nasal lymphoid tissue in the rat. *Cell Tissue Res* 1989;255(1):193-198.
27. Koornstra PJ, de Jong FI, Vlek LF, Marres EH, van Breda Vriesman PJ. The Waldeyer ring equivalent in the rat. A model for analysis of oronasopharyngeal immune responses. *Acta Otolaryngol* 1991;111(3):591-599.
28. Okada S, Ohtsuka A, Akagi H, Nishizaki K, Masuda Y. Blood microvascular organization of the nasal-associated lymphoid tissue of the guinea pig: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Acta Med Okayama* 1995; 49(4):213-219.
29. Koornstra PJ, Duijvestijn AM, Vlek LFM, Marres EHM and van Breda Vriesman, PJC. Immunohistology of nasopharyngeal (Waldeyer's ring equivalent) lymphoid tissue in the rat". *Acta Otolaryngol* 1993;113:660–667.
30. Spit BJ, Hendriksen EGJ, Bruijntjes JP and Kuper CF. Nasal lymphoid tissue in the rat. *Cell Tissue Res* 1989; 255: 193–198.
31. Belai AA, El-Gohery Y, Talaat M. Nasal and paranasal pathology in experimental bilharziasis. *J Laryngol Otol* 1977; 91: 391–400.
32. Ichimiya I, Kawauchi H, Fujiyoshi H, Tanak, T, Mogi G. Distribution of immunocompetent cells in normal nasal mucosa: comparisons among germ-free, specific pathogen free, and conventional mice. *Ann Otol. Rhinol Laryngol* 1991;100:638–642.
33. Kuper CF, Hameleers DMH, Bruijntjes JP, van der Ven I, Biewenga J and Sminia T. "Lymphoid and non-lymphoid cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) in the rat". *Cell Tissue Res* 1990;259:371–377.
34. Heritage PL, Underdown BJ, Arsenault AL, Snider,DP, McDermott MR. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156: 1256–1262.
35. Wu HY, Russell MW. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res*1997;16:187–201.

36. Asakura K, Saito H, Hata M, Kataura A. Antigen-specific IgA response of NALT and cervical lymph node cells in antigen-primed rats. *Acta Otolaryngol* 1998;118:859–863.
37. Liang B, Hyland L, Hou S. Nasal-associated tissue is a site of long term virus-specific antibody production following respiratory virus infection of mice. *J Virol* 2001; 75:5416–5420.
38. Brandtzaeg P. Immune functions of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Adv Otorhinolaryngol* 2011;72: 20-24.
39. Yan Z, Wang JB, Gong SS, Huang X. Cell proliferation in the endolymphatic sac in situ after the rat Waldeyer ring equivalent immunostimulation. *Laryngoscope* 2003;113(9):1609-1614.
40. Brandtzaeg P. Potential of nasopharynx-associated lymphoid tissue for vaccine responses in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(12):1595-1604.
41. Kuper CF, PJ Koornstrat, DMH Hameleers, J Biewenga, BJ Spit, AM Dujvestjin, PJC. van Breda Vriesman, T Sminia. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 1992;13:219.
42. Karchev T, Kabakchiev P. M-cells in the epithelium of the nasopharyngeal tonsil. *Rhinology* 1984;22(3):201-210.
43. Sahaza JH, Pérez-Torres A, Zenteno E, Taylor ML. Usefulness of the murine model to study the immune response against *Histoplasma capsulatum* infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2014;37(3):143-152.
44. Casteleyn C, Broos AM, Simoens P, Van den Broeck W. NALT (nasal cavity-associated lymphoid tissue) in the rabbit. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;15:133(2-4):212-218.
45. Debertin AS, Tschernig T, Tönjes H, Kleemann WJ, Tröger HD, Pabst R. Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children. *Clin Exp Immunol* 2003;134(3):503-7.
46. Kuper CF, Ernst H, van Oostrum LC, Rittinghausen S, Penninks AH, Ganderup NC, Wolterbeek AP. Nasal passages of Göttingen minipigs from the neonatal period to young adult. *Toxicol Pathol* 2012;40(4):656-666.
47. Larochelle R, Martineau-Doizé B. Distribution of epithelia in the nasal cavity of piglets. *Acta Anat* 1990;139(3):214-219.
48. Larochelle R, Martineau-Doizé B. Distribution and histochemical characterization of goblet cells in the nasal cavity of piglets. *Am J Anat* 1991;191(1):103-111.
49. Kairouz S, Hashash J, Kabbara W, McHayleh W, Tabbara IA. Dendritic cell neoplasms: an overview. *Am J Hematol* 2007;82: 924-928.
50. Rezk SA, Agrawal R, Weiss LM. Do indeterminate cells follow the footsteps of Langerhans cells and migrate from the skin to the lymphnode? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;5:463-467.
51. Grouard G, Durand I, Filgueira L, Banchereau J, Liu YJ. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* 1996;384:364-367.
52. Park CS, Choi YS. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* 2005;114:2-10.
53. Liu YJ, Grouard G, de Bouteiller O, Banchereau J. Follicular dendritic cells and germinal centers. *Int Rev Cytol* 1996;166:139-179.

54. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, Tang HL, Luther SA, Ngo VN. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Rev* 2000;176:181–193.
55. Aguzzi A and Krautler NJ. Characterizing follicular dendritic cells: a progress report. *Eur J Immunol* 2010;40: 2134–2138.
56. Green JA and Cyster JG. S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation. *Immunol Rev* 2012;247:36–51.
57. Gatto D and Brink R. B cell localization: regulation by EBI2 and its oxysterol ligand. *Trends Immunol* 2013;34:336–341.
58. Bianchi AT, Scholten JW, Moonen Leusen BH, Boersma WJ. Development of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pig as a function of organ, age and housing. *Dev Comp Immunol* 1999;23:511–520.
59. Kim YB. Developmental immunity in the piglet. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1975;11:549–557.
60. Hammerberg C, Schurig GG, Ochs DL. Immunodeficiency in young pigs. *Am J Vet Res* 1989;50:868–874.
61. Haelterman EO. Immunity of the transmissible gastroenteritis. *Vet Med Small Anim Clin* 1975;70:715–717.
62. Bohl EH, Gupta RK, Olquin MV, Saif LJ. Antibody responses in serum, colostrum, and milk of swine after infection or vaccination with transmissible gastroenteritis virus. *Infect Immun* 1972;6:289–301.
63. Bohl EH, Saif LJ. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infect Immun* 1975;11:23–32.
64. Saif LJ, van Cott JL, Brim TA. Immunity to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus infections in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;43:89–97.
65. Leece JG. Effect of dietary regimen on cessation of uptake of macromolecules by piglet intestinal epithelium (closure) and transport to the blood. *J Nutr* 1973;103:751–756.
66. Xu R, Doan QC, Register GO. Detection and characterisation of transforming Nguyen TV, Yuan L, Azevedo MS, Jeong KI, Gonzalez AM, Saif LJ. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: in vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;117:236–248.
67. Donovan SM, McNeil LK, Jimenez-Flores R, Odle J. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in porcine serum and milk throughout lactation. *Pediatr Res* 1994;36:159–168.
68. Odle J, Zijlstra RT, Donovan SM. Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. *J Anim Sci* 1996;74:2509–2522.
69. Sinkora M, Butler JE. The ontogeny of the porcine immune system. *Dev Comp Immunol.* 2009;33(3):273-283.
70. Rima B, Alexander DJ, Billeter MA, Collins PL, Kingsbury DJ, Lipkind MA, Nagai Y, Orvell C, Pringle CR, ter Meulen V. Family Paramyxoviridae. In: Murphy, FA, Fauquet CM. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*, 1995: 268-274.

71. Santos-López G, J Hernandez, MT Borraz-Argüello, H Ramirez-Mendoza, V Vallejo, J Reyes-Leyva. Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. *Arch Med Vet* 2004;35(2).
72. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Chambers TM, Kiso M. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol* 2000;74:11825-11831.
73. Klenk E and H Lempfrid.. Über die Natur der Zellreceptoren fir das Influenzavirus. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem*1957;307:278–283.
74. Klenk E, and G Uhlenbruck. Über ein neuraminsaurehaltiges Mucoproteid aus Rindererythrocytenstroma. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 1958;311:227–233.
75. Martensson E, A Raal and L Svennerholm. Sialic acid in blood serum. *Biochim Biophys Acta* 1958;301:124–129.
76. Murphy BR, VS Hinshaw, D L Sly, W T London, N T Hosier, FT Wood, RG Webster, and RM Chanock. Virulence of avian influenza A viruses for squirrel monkeys. *Infect Immun* 1982;37:1119–1126.
77. Schauer R. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1982;40:131–234.
78. Schauer R. Sialic acids: chemistry, metabolism, and function. Springer (NY) 1982.
79. Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez H, Delannoy P, Zenteno E. Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2000;126(3):415-24.
80. Reyes Leyva J Espinosa B, Hernandez J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jáuregui P, Zenteno E. NeuAc  $\alpha$  2,3gal glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1997;118(2):327-332.
81. Reyes Leyva J, Santos Gerardo, Hernández Jesús, Espinosa Blanca, Borraz María del Tránsito, Ramírez Humberto, Vallejo Verónica, Zenteno Edgar. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: Estudio con el Ruvulavirus porcino. En: Mensaje Bioquímico Vol XXVI pp99-127, 2002. Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E, (eds). Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México DF, MÉXICO. (2002). (<http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>).
82. Villar E, Barroso IM. Role of sialic acid containing molecules in paramyxovirus entry into the host cell: a minireview. *Glycoconj J* 2006;23(1-2):5-17.
83. Drickamer K. Making a fitting choice: common aspects of sugar-binding sites in plant and animal lectins. *Structure* 1997;15:5(4):465-468.
84. Kilpatrick DC. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim Biophys Acta* 2002;19:1572(2-3):187-197.
85. Hakomori S. Carbohydrate-carbohydrate interactions as an initial step in cell recognition. *Pure & Appl Chem* 1991; 63(4):473-482.
86. Varki A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* 1997;11(4):248-255.
87. Sharon N. Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am*1993;268(1):82-89.
88. Sabesan S, Jens O Duss, Susana Neira, Peter Domaille, Serrge Kelm, James C. Paulson and Klaus Bock. Cluster Sialoside Inhibitors for Influenza Virus: Synthesis, NMR, *J Am Chem SOC* 1992;114: 8337-8363.
89. Hernández Cruz P, Pérez Campos E, Martínez Martínez L, Ortiz B, Martínez G. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB* 2005;24(1):21-27.
90. Brooks SA, Hall DM. Lectin histochemistry to detect altered glycosylation in cells and tissues. *Methods Mol Biol* 2012;878:31-50.
91. Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem* 2007;2:282(5):2753-2764.



92. Sharon N. Lectins: past, present and future. *Biochem Soc Trans* 2008;36(6):1457-1460.
93. Naeem A, Saleemuddin M, Khan RH. Glycoprotein targeting and other applications of lectins in biotechnology. *Curr Protein Pept Sci* 2007;8(3):261-271.
94. Akimoto Y, Kawakami H. Histochemical staining using lectin probes. *Methods Mol Biol* 2014;1200:153-163.
95. Sharon y Lis. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004;14(11):53-62.
96. Stephano-Hornedo A, Gay M. El síndrome de ojo azul. Estudio experimental. In: *Proceedings of the Livestock Research in México* 1982:57.
97. Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Vet.Rec* 1988;122: 6-10.
98. Stephano, HA. Blue Eye diseases, In AD Leman, BF Straw, WL Mengeling, AD Allaire & DJ Taylor (eds). *Swine Diseases*. Iowa. State University, Ames, E.U.A. 1993; 237-241.
99. Stephano A. La enfermedad del ojo azul. Signos clínicos y lesiones. En: *Memorias del Simposium Internacional sobre Enfermedades Emergentes del Cerdo*. Irapuato, Gto. México. 2000.
100. Moreno-López J, Correa-Girón P, Martínez A, Ericsson A. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in México. *Archives of Virology* 1986;91: 221–231.
101. Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jauregui P, Linné T, Moreno- Lopez J. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *Journal General of Virology* 1990;71: 609–613.
102. Sundqvist A, Berg M, Moreno-Lopez J, Linné, J. The haemagglutinin–neuraminidase gene of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxovirus revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Archives of Virology* 1992; 122:331–340.
103. Berg M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other paramyxovirus. *Journal of General Virology* 1991;72: 1045–1050.
104. Berg M, Hjertner B, Moreno-López J, Linné T. The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the proteins mRNA is edited. *Journal of General Virology* 1992;73:1195–1200.
105. Lamb RA. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* 1993;197:1-11.
106. Lamb RA & D Kolakofsky. Paramyxoviridae: the viruses and their replication,. In DM Knipe & PM. Howley (eds). *Lippincott Williams & Wilkins*. Filadelfia, Pensilvania, EUA. *Fields Virology*. 2001:1177-1204
107. <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
108. Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jauregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-López J, Kennedy S .Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *J Comp Path* 1997;117:237-252.
109. Yamamoto K, Konami Y, Irimura T. Sialic acid-binding motif of Maackia amurensis lectins. *J Biochem* 1997;121(4):756-761.
110. Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac( $\alpha$ 2–6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* 1987;262:1596–1601.
111. J A Kiernan. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*, 4th edition. **Scion Publishing Ltd**, 2008.
112. Gridley Mary Francis, *Manual of Histologic and Special Staining Technics*, Mc Graw-Hill, New York, 1960.

113. De la Lande IS, Waterson JG Modification of autofluorescence in the formaldehyde-treated rabbit ear artery by Evans blue. *J Histochem Cytochem* 1968;16(4):281-2.
114. Baschong W , Suetterlin R, Laeng RH. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanningmicroscopy (CLSM). *J Histochem Cytochem* 2001;9(12):1565-72.
115. Kardasewitsch B. Eine Methode zur Beseitigung der Formalin sedimente (Paraform) aus mikroskopischen Präparaten. *Zeitsch Wissensch Mikrosk Techn* 1925;42:322–324.
116. Craig AS. Sodium borohydride as an aldehyde blocking reagent for electron microscope histochemistry. *Histochemistry* 1974;42(2):141-144.
117. J Wordinger R, W Miller G, S Nicodemus D. *Manual of Immunoperoxidase Techniques*. Amer Society of Clinical; 2nd edition 1987.
118. Liu YJ, Grouard G, de Bouteiller O, Banchereau J. Follicular dendritic cells and germinal centers. (*Int Rev Cytol*. 1996;166:139-79.
119. Tucker A L and Widowski TM. Normal profiles for deciduous dental eruption in domestic pigs: effect of sow, litter, and piglet characteristics. *J Anim Sci* 2009;87:2274–81.
120. Finn Bojsen-Moller. Topography and development of anterior nasal glands in pigs. *J. Anat.* 1967; 101:2: 321-331.
121. Rubin BK. Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care*.2002;47(7):761-8.
122. Michael R. Knowles, Richard C. Boucher Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 2002;109(5):571-577
123. Duncan F Rogers. Physiology of Airway Mucus Secretion and Pathophysiology of Hypersecretion. *Respiratory Care* 2007; 52: 9:1134-1149
124. A Wanner, M Salathé, and T G O'Riordan. Mucociliary clearance in the airways *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996;154: 6: 1868-902.
125. Fahy JV, Dickey BF: Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med* 2010; 363:2233-2247.
126. Hatstrup CL1, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol* 2008;70:431-57.
127. Brockmeier SL, Register KB, Magyar T, Lax AJ, Pullinger GD, Kunkle RA. Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine. *Infect Immun* 2002;70(2):481-90.
128. Eliás B, Albert M, Tuboly S, Rafai P. Interaction between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* on the nasal mucosa of SPF piglets. *J Vet Med Sci* 1992;54(6):1105-1110.
129. M R Ackermann, R B Rimler, and J R Thurston Experimental model of atrophic rhinitis in gnotobiotic pigs. *Infect Immun* 1991; 59(10): 3626–3629.
130. O. P. Miniats, J. A. Johnson. Experimental Atrophic Rhinitis in Gnotobiotic Pigs. *Can J Comp Med*1980;44(4): 358–365.
131. Heesters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* 2014 Jul;14(7):495-504.
132. Lamichhane A1, Azegamia T, Kiyonoa H. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine*. 2014 Nov 20;32(49):6711-23.
133. Hiller AS, Tschernig T, Kleemann WJ et al. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and larynx-associated lymphoid tissue (LALT) are found at different frequencies in children, adolescents and adults. *Scand J Immunol* 1998;47:159–62.
134. Fukuyama S, Takachika H, Yokota Y et al. Initiation of NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT bR, and NIK Signaling Pathways but requires the Id2 gene and CD3-CD4+ CD45 + Cells. *Immunity* 2002;17 :31–40.

135. Butler JE, Weber P, Wertz N. Antibody repertoire development in fetal and neonatal pigs. XIII “Hybrid VH genes” and the pre-immune repertoire revisited. *J Immunol* 2006;177:5459–5470.
136. Butler JE, Sinkora M. The isolater piglet: A model for studying the development of adaptive immunity. *Immunol Res* 2007;39:33–51.
137. Trebbien R, Larsen LE, Viuff BM. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virology Journal* 2011;8:434.
138. Geisler C, Jarvis DL. Effective glycoanalysis with *Maackia amurensis* lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology* 2011:988-993.
139. Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JS. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: Evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir Res* 2007;8:73.
140. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y: Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 1998;72(9):7367-7373.
141. Nelli RK, Kuchipudi SV, White GA, Perez BB, Dunham SP, Chang KC. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *Veterinary Research* 2010;27:6:4.
142. Van Poucke et al. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. *Virology Journal* 2010;7-38
143. Imberty A1, Gautier C, Lescar J, Pérez S, Wyns L, Loris R. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. *J Biol Chem* 2000;9;275(23):17541-8.
144. En revisión *Veterinary Microbiology* Rivera-Benitez JF et al., 2015

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Diseño experimental para la identificación e interacción del RVP con la mucosa nasal común y el NALT de cerdos, 1 y 3 horas post-inoculación por instilación intranasal	<b>23</b>
<b>Tabla 2.</b> Lectinas utilizadas para identificar receptores en la mucosa nasal común y NALT	<b>24</b>
<b>Tabla 3.</b> Inmunoreactividad de RVP	<b>63</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Tejido linfoide asociado a las mucosas de vías respiratorias como interacción con patógenos y antígenos. (Modificada de Sahaza et al., 2014). <sup>(43)</sup>	<b>9</b>
<b>Figura 2.</b> Tejido Linfoide Asociado a la Nariz en diferentes especies. Ratón (a-d), rata (e) conejo (f,g), humano (h) , murciélago (i,j) y minicerdo (k,l). NC: cavidad nasal. NS: septo nasal. TN: Tabique nasal. PB: Paladar blando. P: paladar duro. FAE: epitelio asociado a folículos. ND: ducto nasofaríngeo. ET: turbina etmoidal. IIFol: Folículos secundarios., ILF: folículo linfoide aislados	<b>11</b>
<b>Figura 3.</b> a) Esquema del RVP y sus proteínas constituyentes. En la superficie de la membrana viral se encuentran las glicoproteínas transmembranales HN y F, en la parte interna de la misma se localiza la proteína de matriz M. Íntimamente ligada a la cadena de ARN se encuentran las nucleoproteínas (NP) que conforman la nucleocápside helicoidal y las proteínas P y L que forman el complejo con actividad polimerasa del virus Tomada y modificada de G. SANTOS-LOPEZ y cols., 2004	<b>16</b>
<b>Figura 4.</b> Ciclo biológico o replicativo de Rubulavirus. Tomado de Leyva et al, 2002, con base a 1. Lamb RA, Kolakofsky D (1996). Paramyxoviridae: The viruses and their replication, En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. (Eds). Fields Virology. Tercera Ed. Lippincott-Raven Publishers. Filadelfia-Nueva York, pp. 1177-1204	<b>17</b>
<b>Figura 5.</b> Estructura del disacárido sialil $\alpha$ 2,3-galactosa. Esta molécula está formada por un residuo de ácido N-acetil-neuramínico unido en enlace glicosídico alfa al carbono 3 de la galactosa. Se muestra el sitio de corte de la enzima neuraminidasa. Los estudios indican que esta molécula es componente del receptor celular del rubulavirus porcino. Tomado de Leyva et al, 2002	<b>18</b>
<b>Figura 6.</b> Cerdos machos híbridos York-Landrace de 15 y 30 días de edad.	<b>22</b>
<b>Figura 7.</b> Corte seriados del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días. Se observa autofluorescencia en nervios excitados con longitudes de onda azul (a) y verde (b). La mucosa nasal tratada con azul de Evans y excitada con luz azul emite en rojo (d). La fotomicrografía de este corte fue editada con Photoshop, usando niveles en negro sólo para el fondo para eliminar el fondo y resaltar el virado de la autofluorescencia con azul de Evans (c). Nótese que la autofluorescencia en verde ha sido abatida.	<b>27</b>
<b>Figura 8.</b> Resultados de hemoaglutinación con lectinas PNA, MAA y SNA. Obsérvese que en la fila 1, se encuentra el control de la prueba, no hay hemoaglutinación al igual que en la fila 2 para PNA, en la fila 3 y 4 se observó hemoaglutinación de 3 pozos para MAA y 7 pozos para SNA	<b>28</b>
<b>Figura 9.</b> Ensayo de hemaglutinación con sialidasa con las lectinas PNA (Peanut agglutinin), MAA y SNA. En el pozo: (1) control (PBS) no hubo hemaglutinación. (2) con PNA el título es 256. (3) con MAA es 64 y (4) con SNA es 64	<b>28</b>
<b>Figura 10.</b> Corte medial de las fosas nasales de un cerdo de 30 días. Septo nasal removido parcialmente (a), septo nasofaríngeo (b), cornete inferior (c), cornete superior (d), huesos etmoidales (e), nasofaringe (f), seno frontal (g), bulbo olfatorio (h), paladar duro (i), zona de NALT (j)	<b>31</b>
<b>Figura 11.</b> Corte sagital de las fosas nasales de un cerdo de 30 días después de eliminar el tabique nasal y el tabique nasofaríngeo. Se observa el cornete inferior (c), cornete superior (d), huesos etmoidales (e), nasofaringe (f), seno frontal (g), bulbo olfatorio (h), paladar duro (i) tonsila palatina (i*), zona de NALT (j)	<b>32</b>
<b>Figura 12.</b> Disección del macizo óseo nasal para someterlo al procedimiento de descalcificación con ácido fórmico al 5% durante 2 semanas.	<b>33</b>

- Figura 13.** Descalcificación y corte sagital de la cabeza de un cerdo de 30 días. Todos los macizos nasales se dividieron en 15 segmentos **34**
- Figura 14.** Cortes transversales de los segmentos anteriores de las cavidades nasales de cerdos de 15 días de edad. Identificación y distribución de los diferentes tipos de epitelios: Rojo: plano estratificado sin estrato córneo; verde: plano estratificado con estrato córneo; azul: cilíndrico estratificado; amarillo: cilíndrico estratificado sin cilios; púrpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios. TN: tabique nasal, H & E **36**
- Figura 15.** Cortes transversales de los segmentos 5 al 8 del tercio medio de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad. Identificación y distribución de los diferentes tipos de epitelios: Rojo: plano estratificado sin estrato córneo; amarillo: cilíndrico estratificado sin cilios; púrpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios; negro: cilíndrico estratificado con cilios; anaranjado: cilíndrico pseudoestratificado sin cilios; verde azulado: epitelio olfatorio. TN: tabique nasal. H & E **38**
- Figura 16,** Segmentos 11 al 13. Estos segmentos corresponden al inicio del tercio posterior o caudal de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad. Identificación y distribución de los diferentes tipos de epitelios: Púrpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios; verde azulado: olfatorio. BO: ubicación del bulbo olfatorio. TN: tabique nasal, CNF: conductos nasofaríngeos, separados por el tabique nasofaríngeo. TP: tonsila palatina. H & E **40**
- Figura 17.** Segmentos nasales 14 y 15. Son los más caudales del tercio posterior de cerdos de 15 días de edad. Se distinguen por el NALT más desarrollado, la desembocadura de las tubas auditivas y la transición del conducto nasofaríngeo a la faringe propiamente dicha. Por esta razón existen dos transiciones epiteliales (ver texto). Color púrpura: cilíndrico pseudoestratificado con cilios, NALT: tejido linfoide asociado a la nasofaringe. TP: tonsila palatina, H & E **41**
- Figura 18.** Histoquímica con MAA en el tercio medio de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad. Oobscrévese la fluorescencia en el borde apical (flechas blancas) de las células epiteliales de los conductos interlobulillares (A-E) y de los conducto excretores de las glándulas seromucosas (F) de la mucosa del tabique nasal (partes superior y media), de la curvatura convexa del toro glandular y de la curvatura convexa del cornete superior. Los adenómeros (estrellas blancas) y el epitelio cilíndrico pseudoestratificado con cilios y células caliciformes (parte inferior de F) fueron negativos **45**
- Figura 19.** Histoquímica con MAA en el tercio medio de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad. Obsérvese la fluorescencia en el borde apical (flechas blancas) de las células epiteliales de los conductos interlobulillares (A-E) y de los conducto excretores de las glándulas seromucosas (E). El borde luminal del epitelio del conducto nasolagrimal también fue positivo (F flecha blanca) **46**
- Figura 20.** Reconstrucción del conducto nasolagrimal de la Fig. 18F. El borde luminal del epitelio de revestimiento expresa sitios de unión a MAA. Barras = 50 µm. **47**
- Figura 21. A-H.** Histoquímica con MAA en el tercio posterior de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad, a la altura del tejido linfoide asociado al conducto nasofaríngeo (A-D) y sus controles correspondientes en cortes seriados (E-H). Los sitios con especificidad para MAA fueron el tejido linfoide internodular del NALT, a células situadas en la periferia de los nódulos y a células linfoides que infiltran el epitelio respiratorio asociado a los nódulos linfoides (flechas amarillas). Se observa claramente que los cortes seriados no incubados con MAA biotinilada pero si con el complejo estreptavidina-FITC son negativos (E-H). Una vez más, ninguna células del epitelio “respiratorio” tiene sitios de unión a MAA **48**
- Figura 21A-H.** Histoquímica con MAA en el tercio posterior de la cavidad nasal de cerdos de 15 días de edad, a la altura del tejido linfoide asociado al conducto nasofaríngeo (A-D) y sus controles correspondientes en cortes seriados (E-H). Los sitios con especificidad para MAA fueron el tejido linfoide internodular del NALT, a células situadas en la periferia de los nódulos y a células linfoides que infiltran el epitelio respiratorio asociado a los nódulos linfoides (flechas amarillas). Se observa claramente que los cortes seriados no incubados con MAA biotinilada pero si con el complejo estreptavidina-FITC son negativos (E-H). Una vez más, ninguna células del epitelio “respiratorio” tiene sitios de unión a MAA **49**

**Figura 23.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 6 h de tratamiento con sialidasa.** Obsérvese la positividad del borde apical de las células epiteliales de los conductos interlobulillares (A-F, flechas blancas) y en el borde basolateral de algunas células **50**

**Figura 24.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 6 h de tratamiento con sialidasa.** Obsérvese la positividad (verde) positiva en el borde apical de las células epiteliales de los conductos interlobulillares (A-D) (flechas blancas) y de los conductos excretorios de las glándulas seromucosas (E, F) (flechas blancas). No se detecto tinción en cilios (flechas amarillas) **51**

**Figura 25.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 6 h de tratamiento con sialidasa.** Reconstrucción de la transición entre el tercio superior del tabique nasal y parte del techo de la cavidad nasal. Obsérvese la positividad en el borde apical de las células epiteliales de los conductos interlobulillares (en recuadro y flecha blanca) y de los conductos excretorios de las glándulas seromucosas (en recuadro y flecha amarilla). **52**

**Figura 26.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 48 h de tratamiento con sialidasa.** Obsérvese los sitios de unión de MAA (flechas blancas) en el borde apical de las células epiteliales de conductos interlobulillares y conductos excretorios de las glándulas seromucosas y conducto lagrimal a nivel del techo (A), de la pared superior del tabique (B) y de la superficie convexa del cornete superior (C-F). Nótese que no hay lectinofluorescencia de cilios (Flechas amarillas). **53**

**Figura 27.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 48 h de tratamiento con sialidasa.** Obsérvese el incremento en la intensidad de la lectinofluorescencia en toda las células y no sólo en el borde apical o la región basolateral del epitelio de los conductos interlobulillares y excretorios de las glándulas seromucosas del techo (A, conducto nasolagrimal incluido, flecha blanca) y de la pared superior del tabique nasal (B-F, flechas blancas). No hubo lectinofluorescencia en los cilios (Flechas amarillas) **54**

**Figura 28.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 48 h de tratamiento con sialidasa.** Campos microscópicos del techo-parte superior del tabique nasal (A-C) similares a los de la figura 26. En D se observa la luz de la cavidad nasal que separa la superficie convexa del cornete superior y parte superior y media del tabique nasal; la lámina propia de ambas estructuras presenta reactividad a MAA en los conductos glandulares, sobre todo en el tabique. En E y F se observa que los conductos glandulares presentes en la lámina propia de la mucosa que cubre la superficie convexa del cornete superior, pero no los de la superficie cóncava, presentaron sitios de unión a MAA aún después de 48 h de tratamiento con sialidasa. No hubo lectinofluorescencia en los cilios (Flechas amarillas) **55**

**Figura 29.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 48 h de tratamiento con sialidasa.** Obsérvese la positividad a la lectina (flecha y círculo blanco) en los conductos glandulares de lámina propia de la superficie convexa del cornete superior y pared superior del tabique (A), y borde superior del cornete (B). No hubo lectinofluorescencia en los cilios (Flechas amarillas) **56**

**Figura 30.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 48 h de tratamiento con sialidasa.** Reconstrucción de la transición entre el tercio superior del tabique nasal y parte del techo de la cavidad nasal. Obsérvese la positividad a MAA en las células epiteliales de los conductos interlobulillares (en recuadro y flecha blanca) y de los conductos excretorios de las glándulas seromucosas (en recuadro y flecha amarilla). Nótese la ausencia de lectinofluorescencia en la superficie luminal del epitelio **57**

**Figura 31.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 50 h de tratamiento con sialidasa.** Aun se observa el incremento en la lectinofluorescencia (flechas blancas) en la mayoría de las células de los conductos interlobulillares (A,C-F) y en conductos excretorios (B, E) de las glándulas seromucosas del techo de

la cavidad nasal y del cornete superior (F) en el segmento 6. En este tiempo de tratamiento con sialidasa algunas células caliciformes mostraron positividad a MAA en el contorno de la teca y hacia la parte basal de la célula (D, círculo blanco). No hubo lectinofluorescencia en los cilios (Flechas amarillas). Barras = 100µm **58**

**Figura 32.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con MAA después de 50 h de tratamiento con sialidasa.** Únicamente en el epitelio respiratorio techo y en la pared lateral correspondiente al toro glandular de los segmentos 5 y 6 las células caliciforme mostraron lectinofluorescencia con el tratamiento de 50h con sialidasa (Círculos y flechas blancas). En A y B, las flechas blancas superiores señalan cierta positividad a MAA en el tejido conjuntivo de la lámina propia. No hubo lectinofluorescencia en los cilios (Flechas amarillas). Barras = 100µm **59**

**Figura 33.** Reconstrucción de la transición entre tabique nasal y parte del techo de la cavidad nasal a nivel del tercio medio, S5-S6, de la cavidad nasal de cerdos de 15 días. Cortes histológicos tratados durante 6 h (izquierda) y 48h (derecha) con sialidasa. Nótese que la seriación de cortes es prácticamente en el mismo nivel anatómico de la cavidad nasal. Esto facilita y hace más confiable la comparación del efecto de la cinética de tratamiento con la enzima sialidasa y la reactividad de los componentes histológicos y celulares a la histoquímica con MAA. Es evidente el incremento de la lectinofluorescencia a mayor tiempo de tratamiento con sialidasa. Barras = 100 µm **60**

**Figura 34.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, histoquímica con SNA. Curvatura del cornete superior (A), Pared lateral (B-F). No se observaron sitios de lectinofluorescencia (Flechas amarilla) en cilios, células caliciformes, conductos excretores ni interlobulillares como lo descrito con MAA **61**

**Figura 35.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de cerdo de 15 días, **histoquímica con SNA después de 50 h de tratamiento con sialidasa.** Obsérvese la ausencia lectinofluorescencia en las estructuras epiteliales de la mucosa nasal como en la histoquímica sin tratamiento con sialidasa **62**

**Figura 36.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de **cerdo de 15 días, 1h después de la inoculación intranasal de RVP.** Inmunohistoquímica con suero hiperinmune de conejo para RVP. En una de las fosas nasales se observó inmunorreactividad al virus en el borde apical o luminal del epitelio respiratorio y en el endotelio de vasos sanguíneos (arterias y venas) de la lámina propia (A, B, flechas). En la fosa contralateral (C, D) y en los cortes controles (E, F) no hubo detección inmunohistoquímica de RVP. Barras = 100 µm **64**

**Figura 37.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de **cerdo de 15 días, 3h después de la inoculación intranasal de RVP.** Inmunohistoquímica con suero hiperinmune de conejo para RVP. En la base o pilar del cornete superior, revestido por dos tipos de epitelio (A) se observó positividad homogénea en los cilios (arriba a la derecha) y en forma de agregado en donde había células caliciformes (abajo a la izquierda). Obsérvese mayor aumento del pilar (B). En el epitelio de la convexidad del cornete superior (C) y en la porciones media y superior del tabique nasal (D, E) fue observada una inmunorreactividad similar a la descrita, además de positividad en eritrocitos y en el endotelio vascular. Nótese algo de fondo en la lámina propia pero ausencia de inmunorreactividad en el epitelio respiratorio del pilar del cornete superior en el corte control (F). Barras = 100 µm **65**

**Figura 38.** Corte transversal del segundo tercio de la cavidad nasal de **cerdo de 30 días, 3h después de la inoculación intranasal de RVP.** Inmunohistoquímica con suero hiperinmune de conejo para RVP. La inmunorreactividad a RPV fue observada consistentemente en los cilios del epitelio respiratorio, eritrocitos y endotelio vascular, así como en forma tenue en la lámina propia de cornete superior (A,E,F) y en la parte media y superior de la mucosa del tabique nasal (C,D, E parte inferior y F parte superior). En estos animales la tinción bilateral también fue frecuente. Obsérvese la ausencia de inmunorreactividad en la mucosa del cornete superior en los cortes control (B). Barras = 100 µm **66**

**Figura 39.** Inmunohistoquímica enzimática del tejido linfoide asociado al conducto nasofaríngeo (NALT) de cerdos de 15 días edad con el anticuerpo policlonal antiCD21. Obsérvese la positividad

de los nódulos linfoides del NALT, localizado en el techo y pared lateral del conducto nasofaríngeo (A-E). El piso del conducto no posee nódulos linfoides (F) y no fue observada ninguna reactividad a CD21. En la parte izquierda de A está la pared lateral y hacia la izquierda la transición hacia el piso del conducto nasofaríngeo, carente de nódulos linfoides. Barra= 500  $\mu\text{m}$  para todas las fotomicrografías **67**

**Figura 40.** Inmunohistoquímica enzimática de tonsila palatina de cerdo de 15 días edad con el anticuerpo policlonal antiCD21. Nótese la positividad de todos los nódulos linfoides (A) La células CD21 positivas presentaron una morfología dendríticas, formando una red de prolongaciones citoplásmicas entre los linfocitos B (B-F). Algunas células redondas subepiteliales (F, flechas) también fueron marcadas **68**

**Figura 41.** Síntesis esquemática de los sitios de la mucosa nasal del tercio medio y segmento 6 de cerdos de 15 días de edad en los que se expresan glucoconjugados con ácido siálico  $\alpha 2,3\text{Gal}$  identificados con la lectina MAA antes (A) y después (B) de la cinética de tratamiento con sialidasa (48h), con la inmunorreactividad al RVP en cerdos de 15 y 30 días, 1 y 3 h después de la inoculación intranasal del virus (C) **69**