



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

FAGOCITOSIS EN CERDOS ALIMENTADOS CON
DIFERENTES NIVELES DE AFLATOXINA B₁ EN
LA DIETA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A ;

LADISLAO PALOMAR MORALES

DIRECTOR DE TESIS:

MVZ. MSc. PhD. ANTONIO MORILLA GONZALEZ



CUAUTITLAN IZCALLI, MEX.

1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

	RESUMEN	2
	ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO	3
I.	INTRODUCCION	4
II.	VISION GENERAL DE LA RESPUESTA INMUNE	5
	1. Las células fagocíticas y la respuesta inmune	7
	a. Fase inicial	8
	b. Fase central	10
	c. Fase efectora	11
	d. Regulación	13
	e. Acción en órganos linfoides	14
	2. La fagocitosis y su importancia en la respuesta inmune	15
	3. Pruebas para evaluar la fagocitosis	17
III.	OTRAS ACTIVIDADES DE LAS CELULAS FAGOCITICAS	20
IV.	AFLATOXINAS	22
	1. Que son y como se clasifican	22
	2. Efecto de las aflatoxinas sobre el organismo en general y sobre el sistema inmune	25
	a. Daño hepático agudo y crónico	26
	b. Baja ganancia de peso	26
	c. Efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos	27
	d. Efectos sobre los mecanismos inespecíficos de defensa y sobre el sistema inmune	27
V.	JUSTIFICACION	30
VI.	HIPOTESIS DE TRABAJO	31
VII.	OBJETIVO	32
VIII.	MATERIAL Y METODOS	33
IX.	RESULTADOS	37
X.	DISCUSION	43
XI.	CONCLUSIONES	46
XII.	REFERENCIAS	47

R E S U M E N

Con el objeto de estudiar el efecto, en cerdos, de la aflatoxina B₁ sobre el sistema fagocítico se tomaron muestras de sangre periférica de nueve cerdos y se realizó una técnica semicuantitativa para evaluar: a) Porcentaje de células aptas para fagocitar, b) Índice fagocítico y c) Metabolismo oxidativo. Los animales fueron separados en tres grupos de tres cerdos cada uno, a los que se les administró en la dieta aflatoxina B₁ en las siguientes concentraciones: 0.0, 0.6 y 1.0 ppm. La técnica se realizó utilizando fagocitos adheridos a cubreobjetos a partir de una pequeña cantidad de sangre total y como microorganismo de prueba se utilizaron levaduras. Los valores basales de los parámetros evaluados fueron muy semejantes en todos los grupos estudiados y el comportamiento a lo largo del experimento fue muy similar, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas. - Estos tres grupos se pesaron al inicio y al final de 35 días de la alimentación con la aflatoxina B₁ incluida en la dieta para determinar la ganancia de peso, que al final del experimento fue de 100% para el grupo control, 75.76% para el grupo que recibió 0.6 ppm y 28.0% para el grupo que recibió 1.0 ppm (P < 0.05 y P < 0.005 respectivamente). se concluyó que la aflatoxina B₁ a la dosis de 1.0 ppm por 35 días provoca pérdida de peso en cerdos, pero no altera el sistema fagocítico.

ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO

Ac	Anticuerpo
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AF	Aflatoxina
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
Ag	Antígeno
ATP	Trifosfato de adenosina
C'4	Cuarto factor del complemento
CP	Célula plasmática
CPA	Célula presentadora del antígeno
DL ₅₀	Dosis letal media
ECPF	Factor potenciador de colonias eritroides
FIM	Factor inductor de la monocitopoyesis
G-CSF	Factor estimulador para colonias de granulocitos
G/M-CSF	Factor estimulador para colonias de granulocitos y monocitos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Ia ⁺	Molécula asociada a la inmunidad
IF	Índice fagocítico
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
K	Célula asesina
L-B	Linfocito B
L-T	Linfocito T
L-T _a	Linfocito T cooperador
L-T _c	Linfocito T citotóxico
L-T _{hr}	Linfocito T de hipersensibilidad retardada
L-T _m	Linfocito T de memoria
L-T _s	Linfocito T supresor
M	Monocito
MØ	Macrófago
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NK	Célula asesina natural
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH ⁻	Radical hidróxilo
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PMN	Polimorfonuclear
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
SSF	Solución salina al 0.85%
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

I. INTRODUCCION

La porcicultura nacional es una de las industrias más importantes del país; esto es debido a que la carne de cerdo es una fuente de proteínas para los mexicanos. La porcicultura comercial está muy tecnificada, sin embargo, la alimentación que reciben los animales no siempre cumple con los requisitos sanitarios indispensables, o las condiciones sanitarias de las granjas no son las óptimas, y prueba de ello es la serie de enfermedades que están diezmando el inventario nacional hasta en un 30% de su población.

En éste contexto, la detección de agentes contaminantes en el alimento es de gran importancia, ya que muchos de ellos ejercen efectos nocivos en la salud de los animales. La proliferación de hongos, o la presencia de sus toxinas en alimentos en mal estado de conservación, es frecuente. Muchas de estas sustancias afectan al sistema inmune disminuyendo la resistencia del animal hacia los microorganismos patógenos, haciéndolos más susceptibles a contraer enfermedades. Es por este motivo que en esta tesis se determinará el efecto en cerdos de la aflatoxina B₁ sobre la fagocitosis.

II. VISION GENERAL DE LA RESPUESTA INMUNE

Todos los seres vivos, incluyendo al hombre, sobreviven gracias a funciones vitales como la respiración, la alimentación, la excreción, etc. Otra función indispensable para la supervivencia es el mecanismo de defensa llamado sistema inmune. El sistema inmune es, en el fondo, un complejo mecanismo natural de lucha contra las enfermedades, y si se le considera como un órgano, es tan indispensable para la vida como el pulmón o el riñón. Pero su complejidad y la sutileza de su funcionamiento están aún lejos de ser totalmente explicadas (14).

Día con día los seres vivos se enfrentan a miles de agentes que provocan enfermedades y sin embargo salen triunfantes de estos encuentros y solamente en casos muy excepcionales ocurre la enfermedad.

Los organismos superiores evitan que los agentes infecciosos (extraños al organismo) entren en contacto con ellos por medio de una serie de barreras físicas (mecánicas) y químicas y por la presencia de ciertas cepas bacterianas, de hongos y parásitos (barrera microbiológica o flora normal) que han logrado una relación de equilibrio con el organismo, proporcionándole algunos nutrientes y evitando la colonización por otras cepas patógenas (tabla 1) (1, 32).

TABLA 1 Barreras del organismo humano

FISICAS	QUIMICAS	MICROBIOLOGICAS
-Impermeabilidad bacteriana de la piel	-pH estomacal	<u>Candida albicans</u>
-Movimiento ciliar de las células epiteliales de la faringe	-Presencia de ácidos grasos insaturados en la piel	<u>Escherichia coli</u>
-Tos, Estornudo	-Espermina	<u>Entamoeba coli</u>
-Presencia de moco	-Lisozima	<u>Lactobacillus spp</u>
-Movimientos peristálticos del intestino	-Otras enzimas	Otros
-Parpadeo, Lagrimeo		
-Descamación de la piel		

Cuando el microorganismo agresor logra entrar en contacto con el organismo, el sistema inmune se pone en guardia, lo ataca y finalmente lo destruye. Esta defensa del organismo es llevada a cabo por dos mecanismos generales: uno inespecífico constituido por la fagocitosis de sustancias y materiales extraños al organismo y la inflamación, y otro específico en el que hay una reacción inmunitaria celular y humoral. En los vertebrados la fagocitosis es realizada por los monocitos, macrófagos (M ϕ 's) y polimorfonucleares (PMN); la inmunidad celular por los linfocitos T (L-T) y M ϕ 's activados; y la inmunidad humoral por los anticuerpos (Ac) producidos y secretados por los linfocitos B (L-B) (14, 64).

Aunque estos mecanismos se estudian por separado, para una mejor comprensión, estrictamente no podemos hablar de fagocitosis, inmunidad celular o inmunidad humoral, sino que se debe hablar de sistema inmune: esto es debido a la gran cantidad de interacciones que existen entre todas y cada una de las partes que conforman el sistema inmune (14, 18, 65, 67, 69, 70).

Una vez que se pone en marcha el sistema inmune (figura 1), todo un complejo de señales entra en función, dirigiendo y regulando la respuesta del organismo hacia el agente extraño o antígeno (Ag). ¿Cuál es la célula más importante en la respuesta inmune? ¿Cuál es la actividad más importante de todo el proceso? Muchos investigadores se lo han preguntado y algunos opinan que son los L-T y la secreción de linfocinas, otros afirman que son los L-B y la producción de Ac's y algunos más responden que los fagocitos y la fagocitosis, sin embargo el total de la respuesta, en conjunto, es mayor que la suma de las partes (1, 38, 40, 70).

En este contexto esta parte de la tesis comprende la revisión de la importancia del sistema fagocítico dentro del sistema inmune, por lo que enfatizará la

actividad de las células fagocíticas en todas y en cada una de las etapas de la --
respuesta inmune.

1. LAS CELULAS FAGOCITICAS Y LA RESPUESTA INMUNE

Para estudiar la respuesta inmune se le ha dividido artificialmente en tres fases (figura 1); la primera o inicial, que va desde la entrada del Ag hasta su contacto con los receptores específicos de membrana del linfocito; la segunda o central, que se caracteriza por la cooperación celular, la proliferación celular y la generación de linfocitos T y B de memoria y efectores; y la tercera o efectora, que conlleva a la destrucción del Ag. Simultáneamente el sistema inmune aumenta o disminuye su respuesta por el proceso denominado regulación, y envía señales a la médula ósea para iniciar o favorecer el proceso hematopoyético (27, 38, 64).

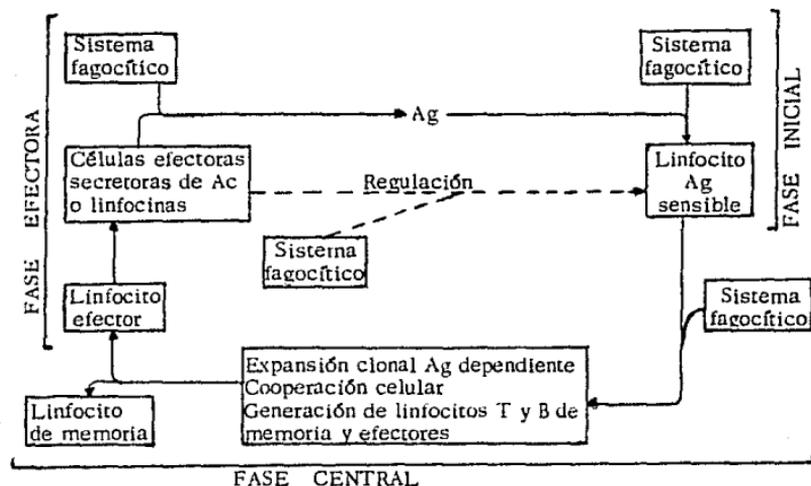


Figura 1. El sistema inmune y las tres fases de la respuesta inmune

a. Fase inicial

En esta fase de la respuesta inmune se realizan tres procesos, todos ellos efectuados por las células fagocíticas (figura 2):

--Fagocitosis

Este proceso elemental de la respuesta inmune, es la primera línea de defensa del organismo, es en realidad una serie de eventos, que da inicio cuando -- las células fagocíticas son atraídas hacia el sitio por el que entro el Ag (quimiotaxis), una vez que las células fagocíticas han llegado, reconocen al Ag y se adhieren a él para dar inicio a la pinocitosis (si el Ag en cuestión es soluble) o fagocitosis (si es particulado); en general este evento se denomina endocitosis, y continúa con la muerte y/o digestión del Ag, por acción del contenido enzimático y otros componentes altamente tóxicos, en la vacuola fagocítica. Cuando ha terminado la digestión del Ag, éste puede ser exocitado o unido a la membrana - de los MØ's para dar lugar al segundo proceso (14, 51, 59, 60, 66, 73).

Si el Ag que va a ser endocitado es muy grande para ser interiorizado por la célula fagocítica, ésta vaciará su contenido enzimático para destruirla, a este evento se le conoce como desgranulación (12).

La vida media de las células fagocíticas es muy variada; los PMN tienen una vida media en circulación de 6 a 7 horas y mueren después de haber fagocitado, ya que no poseen la capacidad para regenerar su dotación enzimática y no realizan la exocitosis; por su lado los monocitos permanecen uno o dos días en circulación y posteriormente pasan a los tejidos y a la circulación linfática, ya como MØ's fijos o circulantes; los MØ's como tales poseen una vida media de varios - meses (59, 72).

--Presentación del antígeno a linfocitos B y T

Algunos MØs sólo digieren parcialmente al Ag y posteriormente lo exteriorizan en su membrana para presentárselo a los linfocitos B y T, los cuales inician en este momento su proliferación hacia células efectoras y de memoria; esta proliferación es parte de la fase central de la respuesta inmune (2, 22, 66, 68-70).

En condiciones normales, el MØ funge como célula presentadora del antígeno (CPA) aunque virtualmente todas las células que tengan la molécula Ia⁺ en su membrana pueden ser capaces de procesar y presentar el Ag a los linfocitos T y B (20).

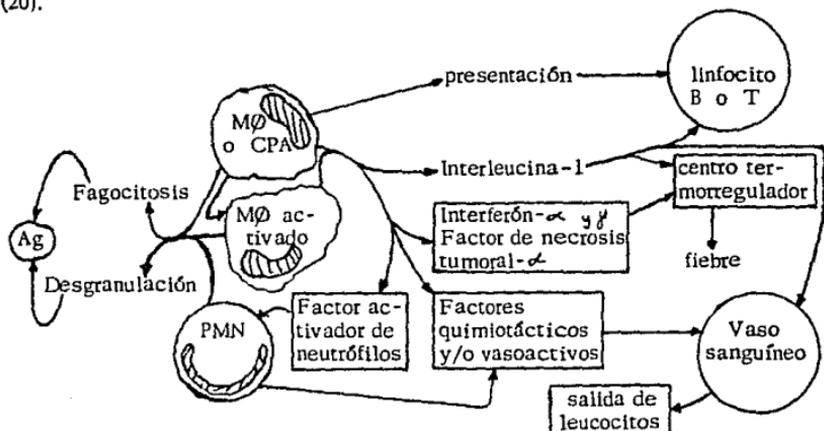


Figura 2. Fase inicial de la respuesta inmune

--Liberación de factores solubles

Tanto los monocitos-MØs como los PMN liberan factores solubles que difunden para poder atraer a más células a la zona dañada (factores quimiotácticos) o que permiten su salida de los vasos sanguíneos (factores vasoactivos). Los MØs van a liberar además un factor activador de neutrófilos que intensificará las

actividades de éstos, una serie de sustancias que irán al centro termorregulador para provocar la fiebre (que es una señal de alarma, de que algo anda mal en el organismo), y la Interleucina-1 (IL-1), la cual además de ser una sustancia quimiotáctica y promover la fiebre, activará la proliferación de los linfocitos. Los PMN liberan unas sustancias que se han denominado defensinas que impiden la proliferación bacteriana y que pueden ser consideradas como antibióticos (2, 19, 38, 71).

b. Fase central

La fase central de la respuesta inmune es la más grande en lo que concierne a la cooperación celular y es la más compleja. Involucra interacciones entre el Ag, los linfocitos B y T, los MØ's, las IL's y probablemente otros componentes (27, 65).

Como ya se mencionó anteriormente, la señal para la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y T es la presentación del Ag por el MØ o la CPA y la liberación de IL-1. El L-T al activarse y proliferar dará lugar a las subpoblaciones cooperador/hipersensibilidad retardada (a/hr), citotóxico/supresor (c/s) y de memoria. El L-T_a libera IL-2, IL-4 y IL-5 que activan respectivamente a los L-B de memoria, vírgenes y activados, y que sólo actúan en presencia del Ag. La proliferación de los L-B dará como resultado células plasmáticas (CP), productoras de Ac, y L-B de memoria (figura 3) (16, 69).

La distinción entre los dos estados de madurez de los linfocitos refleja probablemente el grado de proliferación inducido por el Ag. Los linfocitos efectivos son células terminales, es decir células activas que producen y secretan linfocinas o Ac y de corta vida media, en tanto que los linfocitos de memoria se vol

verán activos sólo cuando haya un nuevo contacto con el Ag específico, dando lugar a nuevos linfocitos efectores y de memoria (27).

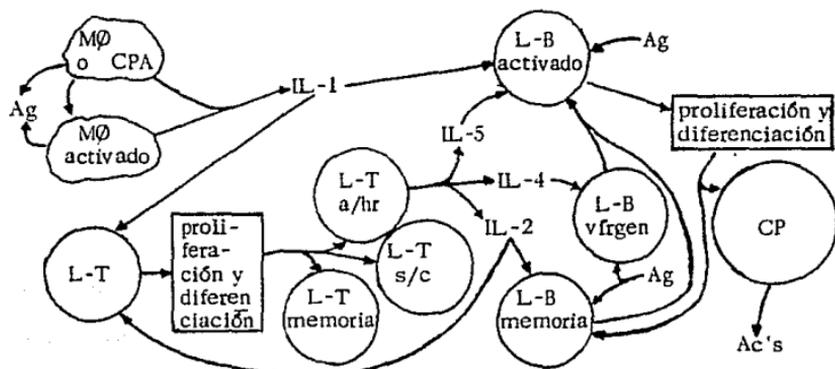


Figura 3. Fase central de la respuesta inmune

Es importante recalcar que en esta fase el papel de los MΦ's es proporcionar la señal para la proliferación y diferenciación, además de continuar efectuando el proceso fagocítico.

c. Fase efectora

El Ag no tiene un papel en esta fase de la respuesta inmune, excepto como "blanco" para su destrucción (figura 4). Los Ac's producidos y secretados por la CP van a recubrir al Ag y es entonces cuando las células fagocíticas van a actuar sobre él en varias formas:

--Fagocitosis

En esta fase se le llama también fagocitosis inmune, por ser dependiente de Ac's, al mismo tiempo que es más específica y más efectiva, este proceso puede ser efectuado por MΦ's y PMN (7).

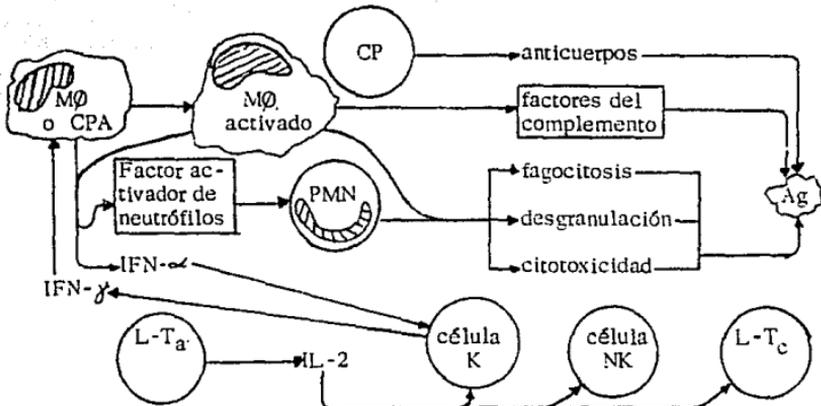


Figura 4. Fase efectora de la respuesta inmune

--Citotoxicidad

Es el equivalente a la desgranulación de la fase inicial; entre los compuestos que van a liberar los MΦ's podemos contar un gran número de enzimas, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y reactivos intermediarios de oxígeno (H_2O_2 , OH^- , O_2^- y otros); este fenómeno puede ser efectuado no sólo por las células fagocíticas (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, ADCC), sino también por la subpoblación citotóxica de los L-T y por las células asesinas, K (killers) o NK (natural killers), que son estimuladas por la IL-2. Las células K reconocen al Ag sólo cuando está cubierto por el Ac específico (36, 38).

--Liberación de factores solubles

El MΦ no sólo fagocita o mata por el fenómeno de citotoxicidad, también coopera en la destrucción del Ag, con la liberación de algunos factores del complemento (factores 1, 2, 3, 4, y 5 de la vía clásica y factores B, D y properdina de la vía alterna) que al unirse al complejo Ag-Ac van a provocar el estallamiento o la destrucción del Ag, además de liberar interferón- γ (IFN- γ) que activa a -

las células K (2, 38).

d. Regulación

Similarmente al funcionamiento ideal de la economía capitalista, la respuesta inmune esta bajo un estricto control de vigilancia (figura 5); esto da como resulta una adecuada respuesta al Ag y por consiguiente la eliminación del Ag (27, 32). Este control de la respuesta inmune no esta del todo comprendido, aunque se sabe que esta influenciado por varios factores:

--La presencia del antígeno

En condiciones normales el Ag es degradado por las células fagocíticas o por otros medios; esto disminuye o elimina al Ag y el organismo sólo desarrolla la respuesta inmune en presencia del Ag (41, 67).

--Vida media de las células efectoras

Las células efectoras tienen una vida media de entre tres y cinco días, por lo que al cabo de este tiempo si no existe el Ag que estimule la proliferación de otras células para convertirlas en efectoras el proceso se vé detenido (32).

--Retroalimentación por anticuerpos

Cuando el Ag ha sido eliminado, los Ac (específicos contra el Ag) producidos por la CP no van a unirse al Ag, por lo que existirá un exceso en circulación; este exceso se sabe que activa a los L-T_S, además de que el organismo los reconocerá como extraños y dará origen a una respuesta contra ellos, que dará lugar a la producción de anti-Ac (67).

--Factores producidos por los macrófagos

Los MØ's producen y secretan algunos factores que tienen como función regular o inhibir la respuesta inmune: la prostaglandina E₂ (PGE₂) activa a los L-T_S,

el IFN (además de promover la respuesta inmune) y los leucotrienos regulan la respuesta, aunque su mecanismo de acción y sobre que células actúan no se conocen por el momento (38, 41).

--El linfocito T supresor

Una vez activado el L-T_s por un exceso de Ac en circulación, por la PGE₂ o por otros mecanismos, se inhibirá la respuesta inmune por un mecanismo no conocido del todo. Se manejan como hipótesis: bloquear la proliferación y diferenciación de los linfocitos a células efectoras y de memoria, bloquear la presentación del Ag por la CPA a los linfocitos e incluso inhibir procesos como la fagocitosis, la secreción de Ac's y linfoquinas (32).

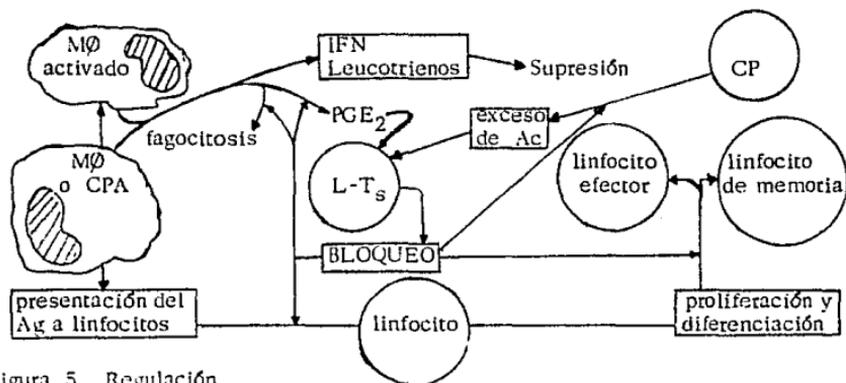


Figura 5. Regulación

e. Acción en órganos linfoides

Los MØs no sólo actúan sobre las células del sistema inmune favoreciendo la producción de una respuesta inmune hacia un Ag determinado, sino que además secretan algunos factores que van a actuar sobre la médula ósea promoviendo la proliferación de las células sanguíneas (figura 6); los factores que van a liberar -

son: factor estimulador para colonias de granulocitos o monocitos (G/M-CSF), - factor estimulador para colonias de granulocitos (G-CSF), factor inductor de la monocitopoyesis (FIM), factor potenciador de colonias eritroides (ECPF) y eritropoyetina (38).

Otro factor que van a sintetizar los M ϕ 's es la timosina B₄ que actúa en el timo favoreciendo la maduración de los L-T (38).

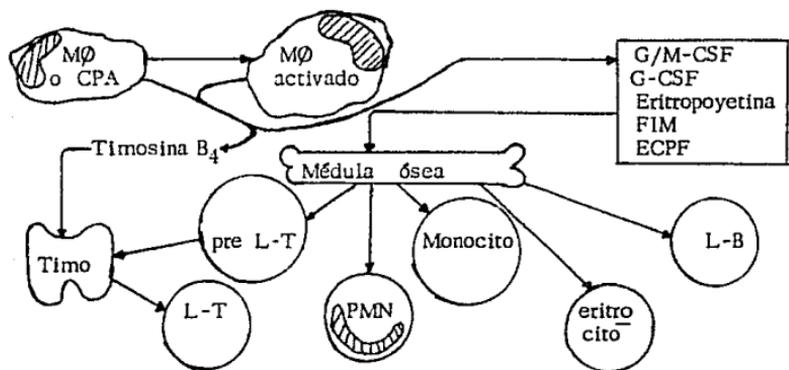


Figura 6. Acción en órganos linfoides

2. LA FAGOCITOSIS Y SU IMPORTANCIA EN LA RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune evolucionó en tres etapas: la primera de ellas el reconocimiento y la fagocitosis, son la esencia misma del sistema inmune, la aparición de este mecanismo sirvió a los primeros organismos para realizar dos actividades al mismo tiempo (alimentarse y defenderse de otros organismos), es decir, obtuvo la capacidad de reconocer lo propio de lo ajeno; en la segunda etapa evolutiva apareció la inmunidad celular, en la cual algunas células fueron capaces de matar a otras células o a otros organismos sin interiorizarlos (citotoxicidad); en esta etapa aparecieron también las características de la respuesta inmune, que es induci

ble, específica y que además posee memoria. En la tercera etapa aparece la inmunidad humoral, en la que hay producción y secreción de Ac, que confiere al organismo la capacidad de defenderse a distancia, no sólo cuando hay un contacto íntimo entre el agente agresor y las células encargadas de la defensa, como en el caso de la fagocitosis o en la inmunidad celular (14, 65).

La fagocitosis es el mecanismo de defensa más antiguo que posee el organismo, además de que como ya se hizo notar anteriormente las células encargadas de la fagocitosis son fundamentales para el desarrollo de una buena respuesta inmune del organismo hacia lo que es dañino para él (14, 22, 24, 38, 41).

En condiciones normales el sistema fagocítico va a limitar la zona en que está el Ag, impidiéndole avanzar y proliferar, además de que va a poner en función todo el sistema de defensa que ya se ha mencionado (14, 67).

La importancia de este sistema se ha puesto de manifiesto al estudiar a las células fagocíticas en infecciones crónicas (24) o en una desnutrición crónica como el kwashiorkor (55), en las que se ha determinado una disminución del índice fagocítico, de la quimiotaxis, de la capacidad fagocítica y microbicida, aunque el número de fagocitos sea muy alto en comparación con los de individuos normales. En infecciones agudas o en el embarazo el organismo pone en marcha un estado de alerta, que puede desencadenar la respuesta inmune, en el cual el sistema fagocítico tiene una actividad por encima de la normal sin llegar a romper el equilibrio, con el fin de preservar la integridad propia y en el caso del embarazo además al feto (29). Todo esto indica un equilibrio que permite al organismo defenderse de lo ajeno sin dañarse a sí mismo: A menor cantidad de células fagocíticas hay una mayor actividad de estas células y a mayor cantidad de células fago

cíticas hay una menor actividad (31).

3. PRUEBAS PARA EVALUAR LA FAGOCITOSIS

Bordet y otros investigadores han sostenido que la resistencia del organismo a una infección guarda estrecho paralelismo con el poder fagocítico de las células del primero. Las bacterias inyectadas en la sangre suelen desaparecer en pocos minutos. El poder bactericida de los líquidos corporales es limitado; por lo tanto, parece intervenir también un mecanismo celular. Esto lo confirman los exámenes microscópicos de los tejidos de animales recién inyectados; los gérmenes suelen encontrarse en hígado, bazo, pulmón y otros órganos. Además de que las bacterias patógenas tienen menor tendencia a producir enfermedades mortales -- cuando se introducen en una zona rica en células fagocíticas, y un cambio favorable en el curso de la infección suele acompañarse de aumento en el número de fagocitos circulantes (7, 16, 31).

Si es importante tener un número adecuado de fagocitos circulantes, es de mayor, o similar importancia que estos sean funcionalmente aptos para poder fagocitar y eliminar al agente causal de la enfermedad. En algunos casos, como las infecciones crónicas o después de la administración de corticosteroides adrenales, el número de fagocitos aumenta en circulación, pero no son lo suficientemente maduros para realizar sus funciones; y al estar en circulación pueden poner en peligro la integridad del organismo, pues se sugiere que pueden adherirse a -- zonas no dañadas y provocar los daños, al vertir en estas zonas el contenido enzimático de sus gránulos, y de esta manera poner a funcionar todo el sistema inmune (31).

Para evaluar la actividad de las células fagocíticas existe una gran varie--

dad de métodos; cada uno evalúa una o más etapas del proceso fagocítico, por lo que la prueba o método de elección va a depender del paso que se quiera evaluar y en algunos casos será posible elegir si la determinación debe ser cualitativa o cuantitativa, de resultados rápidos o no, barata o costosa, si se requiere una sola de ellas o si se requieren combinaciones, etc. En la tabla 2 se muestran los principales métodos empleados para evaluar la fagocitosis tanto in vivo como in vitro.

TABLA 2 Métodos para evaluar las etapas de la fagocitosis

ETAPA	METODO	MODO DE EVALUACION	REFERENCIAS
Número de fagocitos en circulación	Cuenta de leucocitos totales y conteo diferencial	Microscopía	31, 49, 55
Quimiotaxis	Cámara de Boyden Migración en agarosa Ventana de Rebut* ^o	Microscopía	25, 55, 61
Adherencia	Rosetas con eritrocitos, bacterias, Zimozán Adherencia al nylon	Microscopía	9, 22
Endocitosis	Ingestión de eritrocitos, levaduras, bacterias, látex, zimozán, naranja de acridina	Microscopía	9, 23, 28 49, 51, 55
	Ingestión de eritrocitos, aceite rojo O	Espectrofotometría	28, 61
	Ingestión de componentes radiactivos: ³ H, ³⁵ Cr, ¹⁴ C, ¹³¹ I	Radiométrico	51, 55
	Depuración de carbón*	Microscopía	25

* pruebas in vivo

continua ...

TABLA 2 (continuación)

ETAPA	METODO	MODO DE EVALUACION	REFERENCIAS
Endocitosis	Depuración de bacterias*	Cuenta de colonias	25
	Depuración de polivinilpirrolidona*	Espectrofotometría	25
Metabolismo oxidativo	Reducción del NBT	Microscopía	44
	Quimioluminiscencia del pirogalol, luciferina Reducción del NBT	Espectrofotometría	37, 75, 76
	Oxidación de glucosa	Radiométrico	49
	Consumo de O_2 Producción de H_2O_2 Reducción del citocromo C Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa, mieloperoxidasa, piruvato cinasa, glucosa-6-fosfodiesterasa	Electroquímica	25, 75, 76
Muerte intracelular	cultivo de bacterias	Cuenta de colonias	37, 49 55, 75

* pruebas in vivo

III. OTRAS ACTIVIDADES DE LAS CELULAS FAGOCITICAS

Debido al papel tan importante de la fagocitosis en la defensa del organismo, otras actividades que poseen los MØ's no se han estudiado con la misma intensidad ni con la misma profundidad que se ha hecho con la fagocitosis, de la cual ya se ha hablado (41, 45, 67),

Una de las actividades que realizan los MØ's, y que está muy relacionada con la fagocitosis, es la remoción de desechos celulares, que no son inmunogénicos. Esta actividad se pone en marcha una vez que la respuesta inmune ha terminado o esta a punto de terminar, o cuando es necesario transportar en forma íntegra (sin degradar) protefñas, lipidos u otros componentes a cualquier otra zona del organismo (38, 45).

La producción y secreción de componentes es quizá la función más importante, después de la fagocitosis, que realizan los MØ's, ya que los productos que liberan suman más de cien, con pesos moleculares desde 32 Daltones hasta 40,000 Daltones, y que poseen actividades biológicas diversas, desde la inducción del crecimiento celular hasta la muerte celular; algunos de ellos ya se mencionaron en el capítulo anterior, y en la tabla 3 se muestran algunos componentes que no poseen actividad sobre el sistema inmune (38), entre ellos:

Un compuesto surfactante es liberado por los MØ's alveolares, el cual tiene la capacidad de lubricar y evitar que las paredes pulmonares se adhieran entre sí (45).

Los MØ's captan hierro en la mucosa intestinal, hígado o bazo y lo unen a moléculas de ferritina, la cual puede ser almacenada como tal en hígado, o bien puede ser transportada por los MØ's para depositar el hierro en la médula ósea o

en zonas en las que existan células que lo requieran para su metabolismo (45)

Se ha reportado que los MØ's son células "nodrizas" que aportan energía y otros nutrientes a melanocitos, linfocitos y espermatozoides (45).

TABLA 3 Compuestos liberados por los macrófagos

<p>Hormonas polipeptídicas :</p> <p>Factor de crecimiento derivado de plaquetas Factor de activación de fibroblastos Factor con actividad similar a la insulina Eritropoyetina Factor activador de colonias eritroides</p>
<p>Factores de la coagulación :</p> <p>Vía intrínseca: V, IX, X y protrombina Vía extrínseca: VII Activadores de superficie: Factor tisular, protrombinasa Actividad protrombolítica: Activador del plasminógeno Actividad antitrombolítica: Inhibidores de la plasmína Inhibidores del activador del plasminógeno</p>
<p>Proteínas de unión :</p> <p>Para metales: Transferrina, isoferritinas ácidas, Transcobalamina II Para lípidos: Apolipoproteína E, proteína transferidora de lípidos</p>
<p>Productos de Purinas y Pirimidinas :</p> <p>Timídina, uracilo, ácido úrico Deoxicitidina Neopterinina</p>

IV. AFLATOXINAS

1. QUE SON Y COMO SE CLASIFICAN

Las aflatoxinas (AF) son un grupo de metabolitos tóxicos de tipo secundario producidas principalmente por Aspergillus flavus (de donde toman su nombre A. flavus toxinas para dar lugar a aflatoxinas) y A. parasiticus de los cuales fueron aisladas en 1962 por Zijden y cols (78) y Nesbit y cols (39). En la actualidad se sabe que también son producidas por especies como A. oryzae, A. rubrum, -- A. ochraceus, A. wentii y A. ostianus, algunos otros hongos como Penicillium indicum, P. flavum, P. puberulum, P. variable, P. frequentans, P. citricum y Rhizopus spp (48), bacterias del género Pseudomona se han mencionado como posibles productoras de estas micotoxinas (56).

A partir de la fecha de su descubrimiento todo un aparato de investigación se ha desarrollado en torno a las AF's, y en 1963 Asao (3) propone su estructura química. Las AF's se consideran derivadas de la cumarina, a la que se ha fusionado un sistema difurano (figura 7) (3).

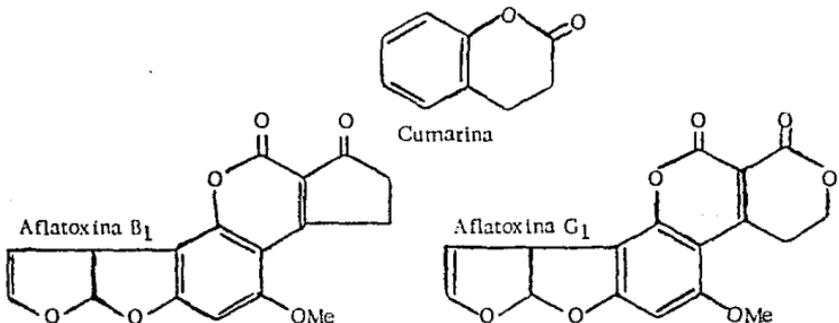


Figura 7. Estructura química de la cumarina y de las principales aflatoxinas

Un total de 17 compuestos denominados genéricamente como aflatoxinas se han aislado hasta 1983, pero el término se usa habitualmente para mencionar a los cuatro principales metabolitos (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂); las letras B y G corresponden a la coloración presentada en fluorescencia de luz ultravioleta: B corresponde a azul (blue) y G a verde (green) (42).

Las AFB₂ y AFG₂ son dihidroderivados de las AFB₁ y AFG₁ respectivamente (figura 7), y en general se puede decir que los demás compuestos aislados son derivados de la AFB₁ y de la AFG₁. Algunas propiedades de las cuatro principales AF's se muestran en la tabla 4 (6, 74).

TABLA 4 Propiedades de las aflatoxinas

Aflatoxina	fórmula molecular	peso molecular	punto de fusión °C	$[\alpha]_D^{25}$	toxicidad*
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269**	-559	1.0
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289**	-492	0.5
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246**	-553	0.25
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240**	-473	0.125

*tomando como unidad a la aflatoxina B₁

**descompuesto

La AFB₁ es la más importante desde el punto de vista toxicológico, se encuentra y se produce en mayores cantidades en los cultivos de hongos (10, 42, -- 47); es la que más se ha estudiado, y debido a que las AF's tienen un núcleo muy similar en sus estructuras, los hallazgos se pueden generalizar. Las AF's son libremente solubles en disolventes moderadamente polares como el cloroformo y el metanol, y especialmente en dimetilsulfoxido (usado como vehículo en la ad

ministración experimental de las AF's a animales), su solubilidad en agua oscila entre 10 y 20 mg/litro (42).

La AFB₁ al ser fragmentada por ozonólisis da como productos los ácidos - glutárico, malónico, succínico y levulínico (74). La presencia del anillo lactona la hace sensible a la hidrólisis alcalina, aunque si ésta se produce en condiciones débiles un tratamiento ácido puede regenerar la AF (74).

En estado puro las AF's son sumamente estables a las temperaturas elevadas, cuando se calientan al aire libre. Sin embargo, son relativamente inestables cuando se les expone a la luz, particularmente a la luz ultravioleta y al aire, especialmente cuando se les disuelve en solventes altamente polares. Las soluciones en cloroformo y benceno son estables por muchos años si se mantienen en lugares oscuros y fríos (42).

En condiciones ordinarias de cocción y en el calentamiento en el proceso de pasteurización hay poca o ninguna pérdida por destrucción de AF's. Sin embargo, el tostado del cacahuate reduce las concentraciones hasta un 50% (42); el proceso de nixtamalización lo reduce hasta un 25% (54); la eliminación de ciertas nueces (pequeñas, que resisten a partirse o blanquearse, decoloradas) de las normales es un remedio eficaz para reducir la contaminación por las AF's (42); el de secamiento de granos y polvos a la luz y al aire en capas delgadas lo reduce hasta en un 50 y 93% (57).

En nuestro país se han encontrado AF's en diversas concentraciones: en maíz ensilado se han reportado hasta 5 ppm, y con el tratamiento y mezclado para convertirlo en alimento para animales se observa una reducción hasta 1.0 ppm (17, 53); en tortillas se han encontrado concentraciones similares a las del alimento para animales (53, 54). Esto es alarmante ya que en algunos países como

E. U. A. los niveles máximos permitidos en alimento para consumo animal y humano, o en granos destinados a exportación o traslado a otros estados es de ---- 0.02 ppm (20 ppb) (47, 54).

Aunque los hongos del género Aspergillus pueden provocar algunas infecciones en animales y en el hombre, tienen mayor impacto a nivel salud y económico la producción de AF's (17), para lo cual el hongo requiere (17, 47):

- adecuada concentración de carbohidratos en forma disponible (17)
- humedad en los granos de entre 10 y 18% y una humedad relativa del 85% (17)
- temperatura óptima de 27°C, mínima de 12°C y máxima de 42°C (42)
- pH relativamente elevado (17)
- disponibilidad de oxígeno en el medio ambiente, bajo condiciones normales - el oxígeno no es un factor limitante (17)
- la ruptura o fraccionamiento del grano lo hace más fácilmente atacable por el hongo (42)
- especie y cepa del hongo invasor, ya que no todas las cepas producen la misma AF, ni la misma cantidad (4, 47),

2. EFECTO DE LAS AFLATOXINAS SOBRE EL ORGANISMO EN GENERAL Y SOBRE EL SISTEMA INMUNE

En Inglaterra, en el año de 1960, se observó una gran mortandad de pavos, como resultado del consumo de harina de cacahuete importada de Brasil; la pérdida se estimó en más de 100,000 aves (6, 42, 48). La concentración de AFB₁ en la harina de cacahuete fue calculada posteriormente en 10 mg/Kg (10 ppm). Las aves mostraron progresivamente un deterioro en su estado, hemorragias subcutáneas y muerte; a la necropsia, el hígado mostró una coloración pálida y apariencia

grasa con zonas de necrosis y proliferación biliar extensiva (42).

En estudios posteriores se ha determinado el efecto tóxico de las AF's sobre diferentes especies animales y en general los efectos se pueden agrupar en cuatro categorías (47).

a. Daño hepático agudo y crónico

Siendo las AF's hepatotóxicas (5) sus efectos en este órgano se notan inmediatamente después de una dosis elevada o intoxicación aguda, o después de una serie de dosis mínimas o intoxicación crónica. Muchos de los efectos de las AF's están relacionados con su reacción con las nucleoproteínas celulares interfiriendo la síntesis proteica y el mantenimiento de la integridad celular. Así podemos encontrar entre los daños una actividad elevada de las siguientes enzimas: Transaminasa Glutámica Pirúvica, Transaminasa Glutámica Oxalacética, Transaminasa Ornitín Carbamilo, Aminotransferasa Aspártica, Fosfatasa Alcalina, Deshidrogenasa Isocítrica y deshidrogenasa del Sorbitol; otras alteraciones son el tiempo elevado de coagulación de la sangre completa y de la protrombina. Hay sangre en heces y aumento de la fragilidad capilar: la concentración de la bilirrubina está aumentada, la eliminación de la bromosulfaleína está aumentada, la albúmina plasmática está disminuida, y hay fibrosis, ictericia, carcinoma hepático, necrosis centrolobulillar y cariomegalia (11, 15, 33, 42, 43, 47, 58).

b. Baja ganancia de peso

La baja ganancia de peso se observa paralelamente al daño hepático crónico y es provocada por consumir AF's en bajas dosis durante periodos prolongados. La dosis mínima para observar los efectos de la AFB₁ es de 0.03 mg/Kg de peso corporal (5, 26, 33, 47, 58).

c. Efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos

Estos efectos se atribuyen a metabolitos de las AF's, principalmente al aflatoxicol. En animales a los que se ha administrado AF's se ha observado carcinoma hepático, de colon, de riñón, en glándulas lacrimales, en lengua y en traquea; efectos teratogénicos como anencefalia, microencefalia, ectopia córdia y otros efectos. Los efectos mutagénicos se han observado en plantas (Vicia fabia) • o bacterias (Salmonella tiphymurium) donde se han presentado algunas aberraciones cromosómicas cuando se tratan con AF's o con algunos de sus metabolitos. - Las AF's actúan de manera semejante a los agentes alquilantes (30, 42, 47, 74).

d. Efecto sobre los mecanismos inespecíficos de defensa y sobre el sistema inmune

La actividad de las AF's sobre los mecanismos inespecíficos de defensa y sobre el sistema inmune es de particular importancia en algunos grupos de animales donde la inmunización es parte importante del programa de salud, por ejemplo en aves y cerdos (5, 46, 47, 50, 64).

Se ha demostrado que las AF's poseen un efecto supresor en el desarrollo de la inmunidad adquirida, principalmente en la mediada por células. El timo y los L-T parecen ser excepcionalmente sensibles a los efectos de las AFB₁ y AFM₁. Parece ser que dosis tan bajas como las requeridas para disminuir la ganancia de peso son suficientes para disminuir la respuesta de hipersensibilidad retardada. El modo de acción de los efectos Inmunosupresores todavía es incierto, pero parece que involucra a los L-T, la interacción Ag-célula, la fagocitosis y posiblemente la producción de linfocinas. La AFB₁ actúa sobre los mecanismos inespecíficos de defensa: reduce la fagocitosis de MØ's, disminuye la concentración de

algunos factores del complemento, por ejemplo C'4, y retarda la producción del IFN. Generalmente la producción de Ac's no se afecta, sin embargo a dosis elevadas la IgG y la IgA disminuyen en circulación, pero no la IgM (46, 74).

Pier (46) y Thaxton (63) han reportado que aves alimentadas con AFB₁ en la dieta eran más susceptibles a infecciones provocadas por Pasteurella multocida, Salmonella spp, Candida albicans, Eimeria tenella y el virus de la enfermedad de Marek, pero no a las causadas por Aspergillus fumigatus y el virus del Newcastle.

Con respecto a la fagocitosis los resultados son contradictorios; Mohiuddin (35) reporta un descenso del 10% en el porcentaje de fagocitosis después de administrar 20 ppm de AFB₁ a aves; Campbell (5) administra 2.5 ppm de AFB₁ y Chang (10) administra 10 ppm a pollos y no encuentran diferencias significativas. Richard (50) en un experimento interesante realizó lo siguiente:

grupo A	esporas* + suero de conejo	+ fagocitos de conejo
grupo B	esporas* + suero de conejo	+ fagocitos de conejo**
grupo C	esporas* + suero de conejo**	+ fagocitos de conejo**

* de Aspergillus fumigatus

** conejos a los que se les administro AFB₁

y no encontró diferencias significativas entre los grupos A y B, pero si las encontró entre los grupos A y C.

Todos los efectos de las aflatoxinas van a depender de algunos factores propios de los animales como son la especie, raza, cepa, sexo, edad y condición nutricional (4, 74) y de otros factores como el tipo de aflatoxina, la dosis, tiempo de consumo y del manejo que se les da a los animales (42, 46, 74).

En el hombre los efectos de las AF's se han demostrado de manera casual,

señalándose efectos muy semejantes a los reportados en animales (42).

En la tabla 5 se muestran las dosis letales medias (DL₅₀), por vía oral, de la AFB₁ en algunas especies animales (42, 46, 74).

TABLA 5 Dosis letal media de la aflatoxina B₁ en algunas especies

ESPECIE	DL ₅₀ (mg/Kg de peso corporal)
Embrión de pollo	0.025*
Conejo	0.3
Pavipollo	0.335
Gato	0.55
Perró	0.5 - 1.0
Cerdo	0.62
Oveja	1.0
Trucha arcoiris	1.36
Cobayo	1.4
Paloma	2.0
Pavo	6.5
Rata (macho)	7.2
Macaco	7.8
Ratón	9.0
Hamster	10.2
Rata (hembra)	17.9

* μ g/embrión.

V. JUSTIFICACION

Las granjas porcícolas de nuestro país presentan una alta morbi-mortalidad de origen diverso, lo cual es preocupante; esta situación puede estar influenciada por un gran número de causas como son la elevada contaminación ambiental, el deficiente manejo y alimentación de los animales, malos programas de inmunización, así como la presencia de compuestos inmunosupresores en el medio ambiente o en el alimento (20).

Pier (46) y Thaxton (63) han reportado la inmunosupresión de animales por el consumo de alimento contaminado con aflatoxinas; en estudios realizados en nuestro país se ha encontrado esta micotoxina en concentraciones de hasta 1.0 ppm (17). En algunos países la concentración máxima permitida es de 0.02 ppm (47, 54) razón por la que en nuestro país se está estudiando la relación que existe entre la dosis de aflatoxinas y algunos parámetros que permitan evaluar el sistema inmune de los cerdos. Parte de este trabajo es medir la fagocitosis en cerdos -- alimentados con diferentes niveles de aflatoxina B₁ en la dieta, ya que la fagocitosis es un paso importante para desarrollar una buena respuesta inmune (67).

VI. HIPOTESIS DE TRABAJO

Determinar si los cerdos presentan alteraciones en su mecanismo inespecífico de defensa, como es la fagocitosis, en el transcurso de una intoxicación por aflatoxina B₁ incluida en el alimento.

VII. OBJETIVO

Determinar si las concentraciones de 0.6 ppm y 1.0 ppm de aflatoxina B₁, que se encuentran frecuentemente en el alimento para animales, influyen en el mecanismo inespecífico de la fagocitosis de fagocitos circulantes en cerdos, que consumen alimento contaminado, y en la ganancia de peso.

VIII. MATERIAL Y METODOS

Material biológico. Se utilizaron nueve cerdos de ocho semanas de edad, los cuales se dividieron en tres grupos de tres animales, cada uno. Fueron alimentados ad libitum durante 35 días con alimento conteniendo las siguientes concentraciones de AFB₁: 0.0 ppm (grupo control); 0.6 ppm (grupo A) y 1.0 ppm (grupo B). Todos los animales se pesaron los días cero, 20 y 33 del experimento. Se tomaron muestras de sangre periférica, de todos los cerdos, dos veces por semana durante siete semanas.

Un cerdo adicional alimentado ad libitum con alimento libre de aflatoxinas se utilizó para la obtención de suero fresco de cerdo.

Aflatoxinas. Las aflatoxinas necesarias para este experimento fueron obsequiadas por el Dr. René Rosiles Martínez del departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U. N. A. M., y se mezclaron con alimento libre de aflatoxinas en las cantidades suficientes para obtener las concentraciones antes mencionadas.

Técnica de la fagocitosis

a. Lavado de cubreobjetos

Cada cubreobjetos se lavó con una solución detergente (Inalimpia) frotándolo con los dedos y enjuagando con agua corriente. Se introdujeron en ácido sulfúrico y se calentaron ligeramente durante una hora. Los cubreobjetos se tomaron con pinzas de extremos planos y se enjuagaron en una serie de vasos que contenían agua corriente, agua destilada y agua bidestilada sucesivamente. Se colocaron en posición vertical y se dejaron secar, se guardaron en cajas de Petri

para su esterilización por calor seco.

b. Preparación de levaduras

Se pesaron cinco gramos de levadura de pan (Saccharomyces cerevisiae) - disgregandolas en 125 ml de solución salina al 0.85% (SSF). Se hicieron tres lavados con SSF centrifugando a 2500 rpm durante 10 min. Se resuspendieron en 50 ml de SSF y se contaron las levaduras en cámara de Neubauer tiñendo con azul tripan (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. U.S.A.) al 0.1% en SSF. Se ajustaron las levaduras a una concentración final de 5×10^6 lev/ml mediante las diluciones necesarias. La suspensión se envasó en frascos ampula de 50 ml, se sellaron y se esterilizaron a 15 lb de presión durante 15 min quedando listas para su uso o conservación a 4°C.

c. Opsonización de levaduras

Al momento de usarse las levaduras, se les adicionó suero fresco de cerdo a razón de 1 ml de suero por cada 5 ml de la suspensión de lavaduras, se mezcló y se incubo a 37°C durante 30 min, posteriormente se hicieron tres lavados con SSF y finalmente se resuspendieron al volumen original con SSF.

d. Ensayo de fagocitosis

Se obtuvo sangre venosa sin anticoagulante y directamente de la jeringa se depositaron tres gotas de sangre en cada uno de los cubreobjetos (tres por cada muestra) contenidos en una cámara húmeda; se incubó a 37°C durante una hora para permitir la sedimentación y la adherencia de los PMN y monocitos al vidrio, luego se desprendió el coágulo lavando el cubreobjetos con SSF a 37°C a fin de retirar las células no adheridas al vidrio. Inmediatamente y sin dejar secar las pre

paraciones se colocaron en cajas de Petri de 30 X 15 mm y se cubrieron las células con 1.5 ml de solución salina amortiguada y se les adicionó 0.5 ml de la suspensión de levaduras (S. cerevisiae) ajustadas a una concentración de 5×10^6 lev/ml, y 0.6 ml del colorante Nitroazul de tetrazolio (NBT) (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. U. S. A.) al 0.1% en SSF, se homogeneizó con agitación moderada y se incubó a 37°C durante 75 min. Las preparaciones se tiñeron con safranina -- (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. U. S. A.) al 0.5% cubriendo las células durante 15 min y lavandolas con agua destilada. Los cubreobjetos se dejaron escurrir en papel absorbente y una vez secos se fijaron con bálsamo del Canadá (E. Merck Darmstad, Germany). Se permitió que la resina seicara durante 24 horas y las preparaciones quedaron listas para la observación y cuantificación de los fagocitos con objetivo de inmersión (100 X) por microscopía de luz.

e. Conteo celular

En cada preparación se contaron 500 células potencialmente fagocitarias (PMN y monocitos), obteniéndose de este modo el porcentaje de fagocitosis. Se contó el número promedio de levaduras que ingirió cada fagocito, determinado en 500 células, y el valor obtenido se expreso como índice fagocítico (IF). Además se cuantifico la proporción de fagocitos que reducen el colorante NBT precipitandolo como formazán: observandose las levaduras endocitadas de color azul, en comparación a los fagocitos que no lo reducen (levaduras endocitadas de color naranja, teñidas por la safranina), como un método directo para medir el metabolismo oxidativo ("explosión respiratoria") de las células fagocíticas.

La técnica de fagocitosis que se utilizó es una variante de la técnica empleada en el laboratorio de Inmunología Molecular de la Escuela Nacional de Cien

cias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y en el Laboratorio de Investigación de Infectología del Instituto Nacional de Pediatría (8) y de la descrita por Rivero (51).

f. Estudio estadístico

Se aplicó una prueba de significancia entre medias, mediante el análisis estadístico "t" de Student (62).

Determinación de aflatoxinas. Las aflatoxinas se extrajeron, de una muestra de 50 g del alimento, con acetonitrilo, se desengrasaron con éter de petróleo y se decoloraron con gel de hierro y finalmente se efectuó una separación líquida en cloroformo. El extracto final se resuspendió en 0.5 ml de una mezcla benceno:acetonitrilo [98:2] para su lectura en cromatografía de capa fina. El cromatograma utilizó como fase estacionaria sílica gel (Merck, Sharp and Dome de México) y como fase móvil una mezcla de acetona, etil acetato y tolueno.

Se utilizó como muestra de referencia la fluorescencia azulada emitida por un extracto purificado de aflatoxina B₁ y adicionalmente cambiando la longitud de onda de la lámpara de luz ultravioleta, considerando que las aflatoxinas no fluorescen con luz ultravioleta de onda corta, así como el cambio de color amarillento que sufren después de la atomización con ácido sulfúrico al 25% (17).

IX. RESULTADOS

Se obtuvieron cinco valores basales antes del experimento, siendo muy similares entre sí, por lo que sólo se muestra uno de ellos.

Porcentaje de fagocitosis: Los valores basales del experimento fueron --- 80.1%, 83.1% y 82.1% para los grupos control, A y B respectivamente (tabla 6 y figura 8 A). A lo largo del experimento no mostraron diferencias estadísticamente significativas, salvo en el día 31 de la alimentación con la AFB₁ en el cual el -- grupo B muestra una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo control, 91.5% y 91.5% respectivamente.

TABLA 6 Porcentaje de células fagocíticas en cerdos alimentados con aflatoxina B₁ incluida en la dieta

Día	Grupo control (n=3)	Grupo A (n=3)	Grupo B (n=3)
0	80.1 ± 0.6	83.1 ± 1.0	82.1 ± 2.5
1	81.8 ± 2.6	79.3 ± 1.3	80.3 ± 1.4
7	83.0 ± 1.0	87.2 ± 1.9	88.0 ± 3.2
11	87.8 ± 0.1	98.3 ± 1.3	88.1 ± 1.6
14	86.2 ± 1.6	89.2 ± 1.7	86.5 ± 0.9
18	89.0 ± 1.0	87.5 ± 1.0	90.7 ± 1.6
22	88.0 ± 2.0	86.7 ± 0.7	88.3 ± 1.8
28	91.2 ± 0.7	88.0 ± 2.0	89.5 ± 1.3
31	91.5 ± 1.0	88.3 ± 2.5	88.2 ± 0.9*
35	91.5 ± 1.0	87.8 ± 1.7	89.8 ± 0.4

El número de unidades experimentales en cada grupo aparece como (n) en cada columna. Cada ensayo se realizó por triplicado, empleándose como medida de dispersión el error estándar.

* Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con el grupo control.

Indice fagocítico: El número de levaduras endocitadas por fagocito, expresado como índice fagocítico, fue muy similar para todos los grupos, durante todo el periodo experimental. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 7 y en la figura 8B.

TABLA 7 Índice fagocítico en cerdos alimentados con aflatoxina B₁ incluida en la dieta*

Día	Grupo control (n=3)	Grupo A (n=3)	Grupo B (n=3)
0	2.1 ± 0.25	2.1 ± 0.17	2.1 ± 0.15
4	2.3 ± 0.13	2.0 ± 0.06	2.0 ± 0.09
7	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.06	2.1 ± 0.05
11	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.07	2.6 ± 0.07
14	2.4 ± 0.03	2.4 ± 0.05	2.6 ± 0.06
18	2.3 ± 0.05	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.1
21	2.3 ± 0.05	2.4 ± 0.05	2.5 ± 0.06
28	2.4 ± 0.03	2.3 ± 0.11	2.4 ± 0.07
31	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.03	2.4 ± 0.07
35	2.3 ± 0.1	2.4 ± 0.06	2.3 ± 0.03

El número de unidades experimentales en cada grupo aparece como (n) en cada columna. Cada ensayo se realizó por triplicado, empleándose como medida de dispersión el error estándar.

* No hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos.

Porcentaje de reducción del Nitroazul de tetrazolio: El porcentaje de células capaces de producir sustancias microbicidas, evaluadas por la reducción del colorante Nitroazul de tetrazolio fue muy similar al inicio del experimento, 87.5%, 85.3% y 86.5% respectivamente para los grupos control, A y B. A lo largo del experimento sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el día 18 de la alimentación con la AFB₁, 95.5% para el grupo control, 87.5% (P<0.025) para el grupo A y 90.6% (P<0.05) para el grupo B. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 8 y en la figura 8C.

TABLA 8 Porcentaje de células que reducen el Nitroazul de tetrazolio en cerdos alimentados con aflatoxina B₁ incluida en la dieta

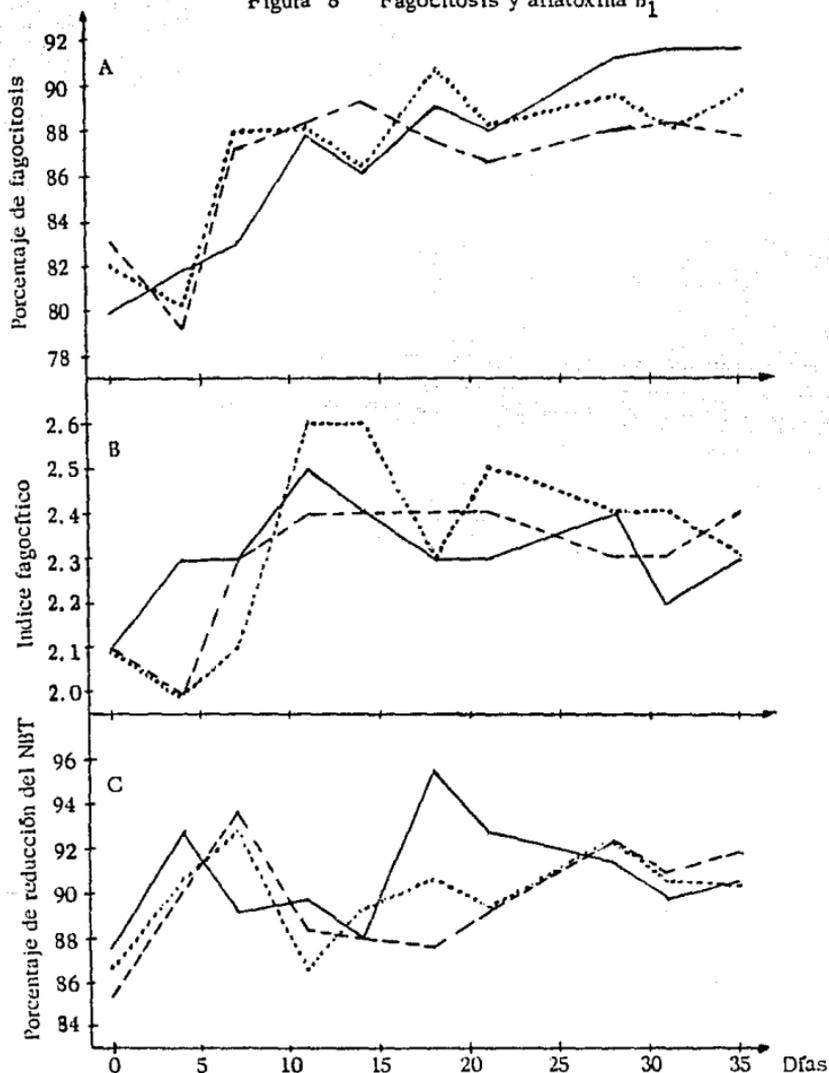
Día	Grupo control (n=3)	Grupo A (n=3)	Grupo B (n=3)
0	87.5 ± 0.5	85.3 ± 2.9	86.5 ± 1.7
4	92.9 ± 1.9	90.1 ± 1.3	90.5 ± 2.5
7	89.2 ± 1.8	93.6 ± 0.7	92.7 ± 2.0
11	89.7 ± 0.7	88.3 ± 2.5	86.5 ± 1.7
14	88.0 ± 1.8	88.0 ± 2.0	89.2 ± 2.2
18	95.5 ± 1.0	87.5 ± 1.0**	90.6 ± 1.6*
21	92.7 ± 2.8	89.2 ± 1.8	89.3 ± 0.7
28	91.3 ± 3.0	92.3 ± 2.3	92.3 ± 2.4
31	89.7 ± 1.3	90.8 ± 2.7	90.5 ± 0.7
35	90.5 ± 2.5	91.8 ± 1.8	90.3 ± 1.9

El número de unidades experimentales aparece en cada columna como (n). Cada ensayo se realizó por triplicado, empleándose como medida de dispersión el error estándar.

* Diferencia significativa (P<0.05) con el grupo control.

** Diferencia significativa P<0.025) con el grupo control.

Figura 8 Fagocitosis y aflatoxina β_1



Cada punto representa el valor promedio de tres cerdos, en cada animal se realizó el ensayo por triplicado. — Grupo control (0.0 ppm); - - - Grupo A (0.6 ppm) y Grupo B (1.0 ppm).

Incremento porcentual del peso corporal: En este estudio se determinó la ganancia de peso corporal de los cerdos al día 20 y 33 de su alimentación con la AFB₁ en relación al peso al inicio del experimento. Al día 20 los incrementos porcentuales fueron 37.66%, 40.8% y 32.0% para los grupos control, A y B respectivamente, no mostrando diferencias estadísticamente significativas, sin embargo a los 33 días el grupo A (75.76%) y el grupo B (28.0%) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) y ($P < 0.005$) respectivamente con el grupo control (100%). Los datos se muestran en las tablas 9 y 10 y en la figura 9.

TABLA 9 Peso corporal de cerdos alimentados con aflatoxina B₁ incluida en la dieta

Grupo	Dosis de aflatoxina B ₁	(n)	Día de consumo de la aflatoxina B ₁		
			cero	20	33
Control	0.0 ppm	3	8.13 ± 1.85	10.93 ± 2.47	15.60 ± 3.34
A	0.6 ppm	3	11.26 ± 2.02	15.53 ± 2.00	19.46 ± 2.85
B	1.0 ppm	3	9.40 ± 1.10	12.33 ± 1.07	12.46 ± 2.25

El número de unidades experimentales en cada grupo aparece como (n), la medida de dispersión empleada es el error estándar.

TABLA 10 Incremento porcentual del peso corporal de cerdos alimentados con aflatoxina B₁ incluida en la dieta

Grupo	Dosis de aflatoxina B ₁	(n)	Día de consumo de la aflatoxina B ₁		
			cero	20	33
Control	0.0 ppm	3	0.0 ± 0.0	37.66 ± 7.21	100.00 ± 12.58
A	0.6 ppm	3	0.0 ± 0.0	40.80 ± 8.33	75.76 ± 6.88*
B	1.0 ppm	3	0.0 ± 0.0	32.00 ± 4.71	28.00 ± 7.91***

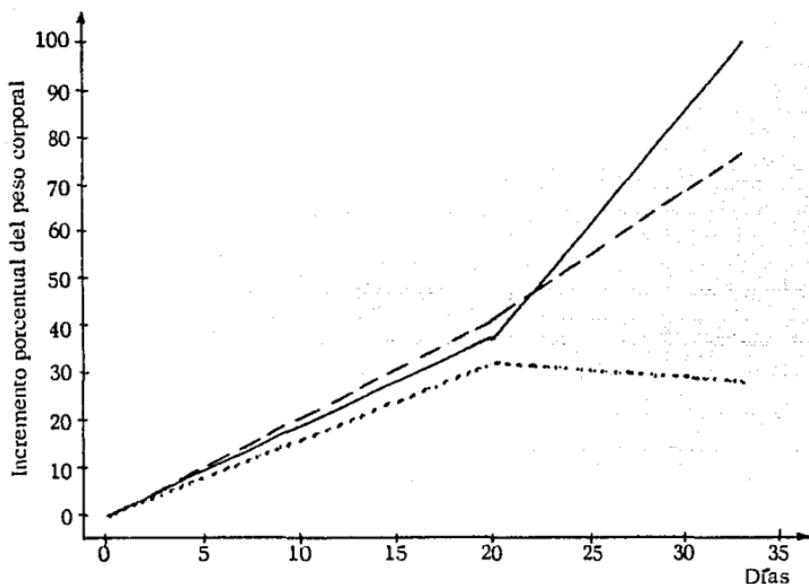
El número de unidades experimentales en cada grupo aparece como (n), la medida de dispersión empleada es el error estándar.

* Diferencia significativa ($P < 0.05$) con el grupo control.

*** Diferencia altamente significativa ($P < 0.005$) con los grupos control y A.

Figura 9

Incremento porcentual del peso corporal de cerdos alimentados con aflatoxina B₁ incluida en la dieta



Cada punto representa el valor promedio de tres cerdos.

— Grupo control (0.0 ppm); - - - Grupo A (0.6 ppm) y
..... Grupo B (1.0 ppm).

X. DISCUSION

Este trabajo se realizó alimentando a los animales con las concentraciones de AFB₁ encontradas en alimento para animales, con condiciones semejantes a las del campo y no con las condiciones que se montan en un laboratorio de investigación. En este contexto hay que tener en cuenta que la AFB₁ puede inactivarse por influjo de los rayos solares, por la aereación de los corrales y otros factores más (57) y que los animales dejan de consumir el alimento contaminado, quizá por percibir un olor o sabor desagradable, o por pérdida de apetito, y como consecuencia la dosis real de AFB₁ consumida por cada animal es muy variable.

Los resultados descritos en este estudio indican que, a las dosis y condiciones en que se trabajó, la AFB₁ a una concentración de 1.0 ppm provocó una marcada baja de peso, sin embargo tuvo una actividad mínima o nula en el sistema fagocítico de los cerdos. Esto se manifestó en que los animales no tuvieron manifestaciones de mayor susceptibilidad a las enfermedades.

En este trabajo se encontró un comportamiento muy similar en todos los -- grupos estudiados, a lo largo del periodo experimental, lo que sugiere que en las condiciones del experimento la AFB₁ no afectó el sistema inmune de los cerdos. El descenso del 10% en el porcentaje de fagocitosis reportado por Mohiuddin (35) indica que la AFB₁ tiene una actividad inmunodepresora, pero a una concentración de 20 ppm, que fue muy elevada en comparación con las concentraciones empleadas en este experimento. Por otro lado los datos reportados por Chang (10) a concentraciones de AFB₁ de 10 ppm y los de Campbell (5) que administró 2.5 ppm - no mostraron inmunodepresión.

En otros trabajos se ha reportado la influencia de las aflatoxinas en la die

ta sobre la actividad del complemento (64), la pérdida de peso (58), la actividad enzimática, la coagulación sanguínea y las concentraciones de las proteínas séricas (15, 34, 43, 58). En cultivos celulares se ha reportado la disminución de la multiplicación celular y la formación de células gigantes (30, 74).

Las diferencias en el porcentaje de fagocitosis y en el porcentaje de reducción del NBT encontradas en este experimento en un solo día pueden ser atribuidas a otros factores y no debidas al consumo de AFB₁, ya que como se describió anteriormente, la fagocitosis se incrementa fácilmente, para defender al organismo de infecciones microbianas. Este fue el caso de los animales del grupo control que tuvieron una infección gastrointestinal causada por Treponema disenteriae, - esta infección fue manifiesta el día 13, empezando su tratamiento de inmediato y previniendo el contagio a los animales de los demás grupos. Como resultado de esta infección los animales del grupo control presentaron inmediatamente fagocitos "activados" en los que la "explosión respiratoria" estuvo incrementada (13, 37) y esto se reflejó en el porcentaje de reducción del NBT y en un ligero aumento en el porcentaje de células aptas para fagocitar.

La opsonización de las levaduras se realizó con suero de un animal que consumía alimento libre de AF's; esto fue porque se quería determinar la influencia de la AFB₁ en las células fagocíticas (influencia primaria) y no sobre otros factores que ayudan a incrementar la fagocitosis (influencia secundaria), por lo que los datos obtenidos concuerdan con los reportados por Richard (50).

Además hay que tener en cuenta que la función de las células fagocíticas no es dependiente del estado inmune o restringida por él (52).

El efecto de la AFB₁ que sí se pudo observar y comprobar fue el de la baja ganancia de peso de los animales que consumieron 1.0 ppm. A una concentra-

ción menor los animales tuvieron una ganancia de peso un poco más baja que la normal, lo que concuerda con lo reportado por Sisk (58) y por Pier (47).

XI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que, con concentraciones de 1.0 ppm y 0.6 ppm de aflaroxina B₁ administradas en la dieta, el sistema fagocítico de los cerdos no sufrió alteraciones, sin embargo hubo una pérdida notable en la conversión alimenticia, lo que provocó una baja en el peso de los animales. Esto explica la pérdida económica de los poricultores, ya que un cerdo sano y con buena conversión alimenticia sale más rápidamente al mercado que un cerdo sano con baja o nula conversión alimenticia.

Los métodos aquí empleados para determinar el porcentaje de células aptas para fagocitar y el porcentaje de células capaces de producir sustancias microbidas (reducción del NBT) fueron buenos ya que se pudieron determinar cambios pequeños en estos parámetros que indican la "activación" de las células fagocíticas en el curso de una infección.

XII. REFERENCIAS

1. Abernathy, E. 1987. How the immune system works. *Am. J. Nursing*, 87: 456-459.
2. Adams, D.O. and T.A. Hamilton. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.*, 2: 283-318.
3. Asao, T., G. Büchi, M.M. Abdel-Kader, S.B. Chang, E.L. Wick and G.N. Wogan. 1963. Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 1706-1707.
4. Bennett, J.W. and S.B. Christensen. 1983. New perspectives on aflatoxin biosynthesis. *Adv. Appl. Microbiol.*, 29: 53-92.
5. Campbell Jr., M.L., J.D. May, W.E. Huff and J.A. Doerr. 1983. Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poultry Sci.*, 62: 2138-2144.
6. Carnaghan, R.B.A., R.D. Hartley and J. O'Kelly. 1963. Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, 200: 1101.
7. Carpenter, P.L. Fagocitosis. En, *Inmunología y Serología*. Editado por La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. 1ª reimpresión. pp: 226-239. 1972.
8. Celaya, B.G., Santos, A.L., Sánchez, T.M. y Arredondo, L.J. Estandarización de una técnica para evaluar la función fagocítica en infantes. Resúmenes del XVI Congreso Nacional de Microbiología, Durango, Dgo., -- PP:27. 1985.
9. Chakravarti, B., R.D. Schreiber and H.J. Müller-Eberhard. 1986. Phagocytosis by human monocytes of unopsonized particulate activators of the human alternative complement pathway: Induction by citokine. *J. Immunol.*, 137: 880-886.
10. Chang, Chao-Fu and P.B. Hamilton. 1979. Refractory phagocytosis by chickens thrombocytes during aflatoxicosis. *Poultry Sci.*, 58: 559-561.
11. Clark, J.D., R.C. Hatch, D.M. Miller and A.V. Jain. 1984. Caprine aflatoxicosis: Experimental disease and clinical pathologic changes. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 1132-1135.
12. Clark, R.A. 1986. Oxidative inactivation of pneumolysin by the myeloperoxidase system and stimulated human neutrophils. *J. Immunol.*, 136: 4617-4622.

13. Cohn, Z.A. 1978. The activation of mononuclear phagocytes: Fact, fancy, and future. *J. Immunol.*, 121: 813-816.
14. Cooper, E.L. 1979. L'évolution de l'immunité. *La Recherche*, 10: 824-833.
15. Cysewski, S.J., A.C. Pier, G.W. Engstrom, J.L. Richard, R.W. Dougherty and J.R. Thurston. 1968. Clinical pathologic features of acute aflatoxicosis of young swine. *Am. J. Vet. Res.* 29: 1577-1590.
16. David, J.R. 1975. Macrophage activation by lymphocyte mediators. *Fed. Proc.*, 34: 1730-1738.
17. Figueroa C., A. 1980. Evaluación de tres métodos para la determinación de aflatoxinas en alimento para animales. Tesis de licenciatura de MVZ, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México, D.F. -- pp: 16-20.
18. Fradelizi, D. 1986. Les messagers de l'immunité. *La Recherche*. 17: 668-678.
19. Ganz, T. 1987. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Inf. Immun.*, 55: 568-571.
20. García, F., H. La porcicultura mexicana en la década de los ochentas. En, *Avances en enfermedades del cerdo*. Editores A. Morilla G., P. Correa y C. Stephano. Ediciones de la AMVEC. México, D.F. pp:13-15. 1985.
21. Germain, R.N. 1987. Antigen processing is not restricted to specialized haematopoietic accessory cells. *Ann. Immunol. Inst. Pasteur*, 137 D: -- 334-338.
22. Good, R. 1986. Introduction, Proceedings of the clinical symposium of the recognition and management of immunodeficient disorders. *Vox Sangs.*, 51 suppl 2: 1-13.
23. Guidry, A. J., M.J. Peape and R.H. Miller. 1974. *In vitro* procedure for measuring phagocytosis of blood neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, 35: 705-709.
24. Ha, D.K.K., J.W.M. Lawton and I.D. Gardner. 1986. Evaluation of phagocytic function in *Mycobacterium lepraemurium* infection. *J. Comp. Path.* 96: 415-423.
25. Hayward, A.R. Deficiencia inmunitaria. Editado por El Manual Moderno, S.A. México, D.F., pp: 64-116. 1973.

26. Hintz, H. F., A. N. Booth, A. F. Cucullu, H. K. Gardner and H. Heitman Jr. 1967. Aflatoxin toxicity in swine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124: 266--268.
27. Hobart, M. J. and I. McConnell. Preamble to section II: Immunobiology. -- En, *The Immune System*. Blakwell Scientific Publications, Oxford, Great Britain. pp: 91-97. 1975.
28. Klebanoff, S. J., P.G. Beatty, R.D. Schreiber, H.D. Ochs and A. M. Waltersdorff. 1985. Effect of antibodies directed against complement receptors on phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes: Use of iodination as a convenient measure of the phagocytosis. *J. Immunol.*, 134: 1153-1159.
29. Koumandakis, E., I. Koumandaki, E. Kaklamani, L. Sparos, D. Aravantinos and D. Trichopoulos. 1986. Enhanced phagocytosis of mononuclear phagocytes in pregnancy. *British J. Obst. Gyn.*, 93: 1150-1159.
30. Legator, M. 1966. Biological effects of aflatoxin in cell culture. *Bact. Rev.* 30: 471-477.
31. Martin, R.R. 1987. In host defense, leucocytes that are counted may not count. *J. Lab. Clin. Med.*, 109: 378-379.
32. McCarty, M. Relaciones entre huésped y parásito en las enfermedades bacterianas. En, *Tratado de Microbiología*. Editores B.D. Davis, R.D. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood Jr. y M. McCarty. Salvat Editores S.A. Barcelona, España. pp: 365-674. 1983.
33. Miller, D.M., B.P. Stuart and W.A. Crowell. 1981. Experimental aflatoxicosis in swine: Morphological and clinical pathological results. *Can. J. Comp. Med.*, 45: 343-351.
34. Miller, D.M., W.A. Crowell and B.P. Stuart. 1982. Acute aflatoxicosis in swine: Clinical pathology, histopathology and electron microscopy. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 273-277.
35. Mohiuddin, S.M., M.V. Reddy, M.M. Reddy and K. Ramakrishna. 1986. Studies on phagocytic activity and haematological changes in aflatoxicosis in poultry. *Indian Vet. J.*, 63: 442-445.
36. Moreno R., J. 1987. Papel de los factores solubles en la comunicación celular en el sistema inmune: Interferón y otras citocinas. *Rev. Mex. Reumatol.*, 2: 72-83.
37. Nagahata, H., A. Yatsu and H. Noda. 1986. The evaluation of a quantitative assay for estimating the bactericidal activity of bovine neutrophils by nitroblue tetrazolium reduction. *Br. Vet. J.*, 142: 578-584.

38. Nathan, C. F. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, 79: 319-326.
39. Nesbitt, B. F., J. O'Kelly, K. Sargent and A. Sheridan. 1962. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 195: 1062-1063.
40. North, R. J. 1978. The concept of the activated macrophage. *J. Immunol.*, 121: 806-807.
41. Oehler, J. R., R. B. Herberman and H. T. Holden. 1978. Modulation of --- immunity by macrophages. *Pharm Ther. A*, 2: 551-593.
42. Organización Panamericana de la Salud. 1983. Criterios de salud ambiental: 11 Micotoxinas. Editado por Organización Panamericana de la Salud. Mé--- xico, D. F. pp: 11-84.
43. Osuna, O. and G. T. Edds. 1982. Toxicology of aflatoxin B₁, warfarin and cadmium in young pigs: Clinical chemistry and blood coagulation. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 1387-1394.
44. Park, B. H., S. M. Fikrig, and E. M. Smithwick. 1968. Infection and nitro-blue-tetrazolium reduction by neutrophils. *Lancet*, 2: 532-534.
45. Pearsall, N. N. and R. S. Weiser. Function of macrophages. En: *The Macrophage*. Editado por Lea & Febiger. Philadelphia, U. S. A. pp: 71-82. -- 1970.
46. Pier, A. C. 1973. Effects of aflatoxins on immunity. *J. A. V. M. A.*, 163: -- 1268-1269.
47. Pier, A. C. 1981. Mycotoxins and animal health. *Adv. Vet. Sci. Comp. -- Med.*, 25: 185-243.
48. Pippi S., C. T., A. Antillón R. y R. Rosiles M. 1980. Aflatoxicosis en --- aves domésticas. *Veterinaria México*, 11: 13-22.
49. Rhodes, J. M., J. Bennedsen, S. O. Larsen, S. Riisgaard and J. V. Spärck, 1979. Correlation between *in vivo* and *in vitro* functional tests for activated macrophages. *Inf. Immun.* 23: 34-40.
50. Richard, J. L. and J. R. Thurston. 1975. Effect of aflatoxin on phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* spores by rabbit alveolar macrophages. *Appl. microbiol.*, 30: 44-47.
51. Rivero, I., M. S. Diumenjo y J. Nasiff. 1978. Fagocitosis de *Saccharomyces cerevisiae* en el hombre: Técnicas y características. *Rev. Clín. Esp.*, 143: 267-271.

52. Rosenthal, A. S. 1980. Regulation of the immune response. Role of the -- macrophage. N. Eng. J. Med., 303: 1153-1156.
53. Rosiles M., R. 1978. Estudio de las aflatoxinas en ensilado de maíz. Veterinaria México, 9: 163-167.
54. Rosiles M., R. 1979. Las aflatoxinas en las tortillas. Veterinaria México, 10: 37-44.
55. Schopfer, K. and S. D. Douglas. 1976. Neutrophil function in children --- with Kwashiorkor. J. Lab. Clin. Med., 88: 450-461.
56. Servicio Informativo Merck. # 14. Aflatoxinas. Editado por Merck México. México, D.F. paginas centrales. Sin fecha.
57. Shantha, T. and V. S. Murthy. 1981. Use of sunlight to partially detoxify - groundnut (peanut) cake flour and casein contaminated with aflatoxin B₁. -- J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64: 291-293.
58. Sisk, D. B., W. W. Carlton and T. M. Curtin. 1968. Experimental aflatoxi- cosis in young swine. Am. J. Vet. Res., 29: 1591-1602.
59. Stossel, P. T. 1974. Phagocytosis (first of three parts). N. Eng. J. Med., 290: 717-722.
60. Stossel, P. T. 1974. Phagocytosis (second of three parts). N. Eng. J. Med., 290: 774-780.
61. Stossel, P. T. 1974. Phagocytosis (third of three parts). N. Eng. J. Med., 290: 833-839.
62. Swinscow, T. D. V. 1978. Statistics at square one. 4th ed. Editado por The British Medical Association. Tavistock Square, London, Great Britain.
63. Thaxton, J. P., H. T. Tung and P. B. Hamilton. 1974. Immunosupresion in chickens by aflatoxin. Poultry Sci., 53: 721-725.
64. Thurston, J. R., J. L. Richard, S. J. Cysewski, A. C. Pier and C. K. Graham. 1972. Effect of aflatoxin on complement activity in guinea pigs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 139: 300-302
65. Truffa-Bachi, P. et C. Leclerc. 1986. Comment les cellules coopèrent -- pour défendre l'organisme. La Recherche, 17: 702-717.
66. Unanue, E. R. and J. Calderon. 1975. Evaluation of the role of macropha- ges in immune induction. Fed. Proc., 34: 1737-1742.
67. Unanue, E. R. 1980. Cooperation between mononuclear phagocytes and lym- phocytes in immunity. N. Eng. J. Med., 303: 977-985.

68. Unanue, E.R., D.I. Beller, C.Y. Lu and P.M. Allen. 1984. Antigen presentation: Comments on its regulation and mechanism. *J. Immunol.*, 132: 1-5.
69. Unanue, E.R. and P.M. Allen. 1987. The immunoregulatory role of the macrophage. *Hosp. Pract.*, 22: 87-104.
70. Unanue, E.R. and P.M. Allen. 1987. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*, 236: 551-557.
71. Usui, M., I. Aoki, G.H. Sunshine and M.E. Dorf. 1984. A role for macrophages in supresor cell induction. *J. Immunol.*, 132: 1728-1734.
72. Valdimarsson, H. Effector mechanisms in cellular immunity. En, *The Immune System*. Editado por M. J. Hobart and I. McConnell. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Great Britain. pp: 180-187. 1975.
73. Valdimarsson, H. Immunity and immunity deficiency. En, *The Immune System*. Editado por M. J. Hobart and I. McConnell. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Great Britain. pp: 320-332. 1975.
74. Wogan, G. N. 1966. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bact. Rev.*, 30: 460-470.
75. Yazdanbakhsh, M., C.M. Eckmann, A.A. Bot and D. Roos. 1986. Bactericidal action of eosinophils from normal human blood. *Inf. Immun.*, 53: 192-198.
76. Young, S. and P. Beswick. 1986. A comparison of the oxidative reactions of neutrophils from a variety of species when stimulated by opzonized zymosan and f-met-leu-phe. *J. Comp. Path.* 96: 189-196.
77. Zendejas B., V.M. 1987. Efecto de la edad en los niveles de fagocitosis en cerdos. Tesis de licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo. FES-Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. pp: 5-49.
78. Zijden, A.S.M. Van der; W.A.A.B. Koelensmid, J. Boldingh, C.B. Barrett, W.O. Ord and J. Philp. 1962. *Aspergillus flavus* and turkey X disease. *Nature*, 195: 1060-1062.