



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS CEBADAS DEL TRACTO
RESPIRATORIO EN CERDOS CLÍNICAMENTE SANOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
M A E S T R A E N C I E N C I A S
P R E S E N T A :
GUADALUPE AZUCENA CASTILLO PEÑA

TUTOR:
TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ

COMITÉ TUTORAL:
CARLOS IGNACIO SOTO ZARATE
HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue apoyado por el Proyecto PAPIIT IN209701 y la Cátedra IN2-34 “Análisis de poblaciones del sistema Inmune del Tracto Respiratorio del Cerdo ante la Infección de Mycoplasmas”

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el proyecto PAPIIT IN203106-3 “Estudio comparativo de los rearrreglos del citoesqueleto en células RK-13 y enterocitos de conejos durante la infección de *Escherichia coli* enteropatógena para conejo (REPEC)”

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Apoyo técnico de Histología L-711 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, bajo la asesoría del Dr. Germán Garrido Fariña de la Sección de Ciencias Morfológicas, y en el Laboratorio No.6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

DEDICATORIAS

A mi hija, Sara Fernanda, por los momentos en que te deje sola y no pude cuidarte de tiempo completo, por tu paciencia y por ser el regalo más grande que dios me ha dado. Te amo.

A Gustavo, mi compañero de vida. Gracias por todo el amor, la comprensión y el apoyo que me has brindado. Espero que este logro sea un aliciente para continuar superándonos día con día.

A mis padres por brindarme todo su apoyo, por sus consejos y deseos de superación, especialmente a ti mamá por ser mi fortaleza y estar en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis hermanas Lauris y Say, por estar siempre a mi lado, por su ayuda y apoyo moral en los momentos de austeridad, sin ustedes no hubiera podido culminar esta etapa de mi vida. Las quiero mucho y deseo que cumplan sus metas, no es fácil pero sé que tienen la capacidad para lograrlo.

A mi hermana Bere, por ser la segunda madre de mi hija, por darle el cariño y la atención que ella necesitaba en mis momentos de ausencia. Te lo agradeceré toda la vida y de verdad muchísimas gracias sin ti no lo hubiera logrado.

A mi abuelita, por ser una parte fundamental en mi familia, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la oportunidad de dar un paso más en la vida, por estar en cada momento y hacer más ligero el camino.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán –UNAM, que a través del Programa de Ciencias de la Producción y Salud Animal me dio la oportunidad de superarme profesionalmente.

Al Dr. Tonatiuh Cruz, con gratitud por el gran apoyo y confianza que siempre me brindó para la realización de mis estudios y sobre todo por su valiosa amistad. Muchas gracias.

Al Dr. Germán Garrido, por compartir sus conocimientos y enseñanzas, por su colaboración y disponibilidad para realizar este trabajo.

Al Dr. Carlos Soto por las sugerencias emitidas para el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Humberto Ramírez por su asesoría y contribución para realizar la investigación.

A la Dra. Gabriela Barcenás por todo su apoyo y por brindarme su valiosa amistad.

A los miembros del jurado, Dr. Jorge Tórtora, Dra. Beatriz Banda, Dra. Rosa Elena Miranda y al Dr. Abel Ciprián por dedicar parte de su valioso tiempo en realizar la revisión y corrección del trabajo escrito de esta investigación.

A mis compañeros y amigos, quienes compartieron conmigo momentos difíciles y gratos durante el desempeño de los estudios y de quienes recibí su apoyo incondicional, a Mónica, Mariano y Evelyne.

A Marco, Chelo y Lili, pero especialmente a Ariadna y a Paty porque siempre me han dado palabras de aliento para seguir adelante, por su apoyo, pero principalmente por su amistad.

A todas aquellas personas que no mencioné que colaboraron en la realización de este trabajo y me permitieron culminar otra etapa de mi vida.

ÍNDICE

| | |
|------------------------|------|
| ÍNDICE DE CUADROS..... | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | v |
| RESUMEN..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| ABREVIATURAS..... | ix |

1. INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| 1.1 Impacto de las enfermedades del cerdo..... | 1 |
| 1.2 Respuesta inmune..... | 2 |
| 1.2.1 Barreras Físicas..... | 3 |
| 1.2.2 Inmunidad innata..... | 3 |
| 1.2.2.1 Mecanismos internos del sistema inmune innato..... | 6 |
| 1.2.3 Inmunidad adaptativa..... | 9 |
| 1.2.4 Inmunidad de las mucosas..... | 12 |
| 1.3 Células cebadas (mastocitos)..... | 14 |
| 1.3.1 Mecanismos de activación de las células cebadas..... | 16 |
| A) TLR..... | 16 |
| B) Los patógenos asociados a amonosa..... | 17 |
| C) Complemento..... | 17 |
| 1.3.2 Activación mediada por receptores Fc..... | 18 |
| 1.3.2.1 Receptores de inhibición..... | 20 |
| 1.3.2.2 Inmunoglobulina IgE..... | 20 |
| 1.3.2.3 Interacción IgE/ FcεRI..... | 21 |
| 1.3.2.4 Regulación negativa de la señalización del receptor FcεRI por la fosforilación del ITIM..... | 23 |
| 1.3.2.5 Mecanismos de estimulación independiente del FcεRI..... | 24 |
| 1.3.3. Medidores liberados por las células cebadas..... | 24 |
| 1) Medidores preformados..... | 24 |
| 2) Medidores de nueva síntesis..... | 26 |
| 1.3.4 Actividad de la célula cebada en presencia de bacterias..... | 29 |
| 1.3.4.1 Fagocitosis y eliminación de la bacteria por la célula cebada..... | 29 |
| 1.3.5 Muerte celular..... | 31 |

| | |
|--|----|
| 2. JUSTIFICACIÓN | 32 |
| 3. HIPÓTESIS | 33 |
| 4. OBJETIVOS | |
| 4.1 Objetivo general..... | 34 |
| 4.2 Objetivos particular..... | 34 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 5.1 Animales de estudio..... | 36 |
| 5.2 Muerte de los animales | 36 |
| 5.3 Toma de muestras | 37 |
| 5.4 Procesamiento de las muestras | 38 |
| 5.4.1 Tinción de Hematoxilina y Eosina..... | 39 |
| 5.4.2 Prueba piloto | 39 |
| 5.4.2.1 Tinción de azul de toluidina..... | 39 |
| 5.5 Captura de imágenes | 39 |
| 5.6 Cuantificación celular | 40 |
| 5.7 Análisis estadístico | 40 |
| 6. RESULTADOS | |
| 6.1 Revisión macroscópica del tracto respiratorio..... | 42 |
| 6.2 Revisión microscópica del tracto respiratorio | 42 |
| 6.3 Resultados de la prueba piloto | 42 |
| 6.4 Resultados de la distribución de las células cebadas en los sitios anatómicos estudiados..... | 46 |
| 6.5 Resultados de la cuenta celular | 52 |
| 7. DISCUSIÓN | 65 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 69 |

9. ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Método de electrocución | 70 |
| Anexo 2. Obtención del tracto respiratorio..... | 70 |
| Anexo 3. Preparación del fijador | 71 |
| Anexo 4. Técnica de inclusión en parafina..... | 71 |
| Anexo 4.1. Pegameto para los cortes..... | 72 |
| Anexo 5 Tinción de azul de toluidina..... | 72 |
| Anexo 6. Aceptación de la publicación del proyecto de tesis en el Journal Animal Veterinary Since | 72 |
| 10. REFERENCIAS..... | 73 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| 1. Características del fenotipo de las células cebadas | 15 |
| 2. Lote de los animales..... | 36 |
| 3. Sitios anatómicos muestreados | 37 |
| 4. Número de células cebadas en la prueba piloto | 43 |
| 5. Número de células cebadas en diferentes etapas de desarrollo..... | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| 1. Activación celular vía TLR..... | 5 |
| 2. Inmunidad celular..... | 10 |
| 3. Inmunidad humoral | 12 |
| 4. Receptores de la IgE..... | 18 |
| 5. Fagocitosis y eliminación de la bacteria por la célula cebada | 30 |
| 6. Diseño experimental..... | 35 |
| 7. Plantigrafía de los sitios muestreados | 38 |
| 8. Número de células cebadas en la prueba piloto | 44 |
| 9. Cortes histológicos de sitios anatómicos. Tinción H-E | 45 |
| 10. Corte histológico de tonsila de un cerdo recién nacido . Tinción de azul de toluidina..... | 48 |
| 11. Corte histológico de linfonodo traqueobronquial de un cerdo recién nacido. Tinción azul de toluidina | 48 |
| 12. Corte histológico de pulmón izquierdo lóbulo craneal de un cerdo recién nacido. | |

| | |
|---|----|
| Tinción azul de toluidina | 48 |
| 13. Corte histológico de tonsila de un cerdo de destete.Tinción azul de toluidina | 49 |
| 14. Corte histológico de pulmón izquierdo lóbulo craneal de un cerdo destetado. Tinción de azul de toluidina..... | 49 |
| 15. Corte histológico de linfonodo traqueobronquial de un cerdo destetado. Tinción de azul de toluidina..... | 49 |
| 16. Corte histológico de linfonodo traqueobronquial de un cerdo destetado. Tinción azul de toluidina... .. | 50 |
| 17. Corte histológico de tonsila de un cerdo adulto.Tinción de azul de toluidina | 50 |
| 18. Corte histológico de tonsila de un cerdo adulto.Tinción de azul de Toluidina... .. | 50 |
| 19. Corte histológico de pulmón derecho lóbulo craneal de un cerdo adulto. Tinción de azul de toluidina..... | 51 |
| 20. Corte histológico de pulmón izquierdo lóbulo caudal de un cerdo adulto. Tinción de azul de toluidina..... | 51 |
| 21. Número de células cebadas en los sitios anatómicos respiratorios de cerdos recién nacidos | 55 |
| 22. Número de células cebadas en los sitios anatómicos respiratorios de cerdos de destete | 56 |
| 23. Número de células cebadas en los sitios anatómicos respiratorios de cerdos adultos..... | 57 |
| 24. Número de células cebadas en tonsila de cerdos recién nacidos, de destete y adultos..... | 58 |
| 25. Número de células cebadas en pulmón derecho lóbulo craneal de cerdos recién nacidos, de destete y adultos..... | 59 |
| 26. Número de células cebadas en pulmón derecho lóbulo caudal de cerdos recién nacidos, de destete y adultos | 60 |
| 27. Número de células cebadas en pulmón izquierdo lóbulo craneal de cerdos recién nacidos, de destete y adultos..... | 61 |
| 28. Número de células cebadas en pulmón izquierdo lóbulo caudal de cerdos recién nacidos, de destete y adultos..... | 62 |
| 29. Número de células cebadas en linfonodos traqueobronquiales de cerdos recién nacidos, de destete y adultos..... | 63 |
| 30. Comparación de los datos obtenidos en las tres etapas de crecimiento | 64 |

RESUMEN

El presente estudio proporciona información cuantitativa sobre las células cebadas en el tracto respiratorio de cerdos clínicamente sanos en tres etapas de crecimiento. Se cuantificó la presencia de células cebadas en tonsila, pulmón derecho lóbulo craneal, pulmón derecho lóbulo caudal, pulmón izquierdo lóbulo craneal, pulmón izquierdo lóbulo caudal y linfonodos traqueobronquiales en cerdos recién nacidos, destetados y adultos. Se emplearon 5 animales clínicamente sanos por etapa, los cuales fueron serológicamente negativos a *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRS, Aujeszky y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Las muestras obtenidas fueron procesadas por inclusión en parafina y teñidas con azul de toluidina al 1%. En cerdos recién nacidos la mayor cantidad de células cebadas se observó en linfonodos traqueobronquiales (1.44 ± 1.84) y la menor cantidad en pulmón derecho lóbulo craneal (0.16 ± 0.04), sin embargo al realizar la prueba no paramétrica de Tukey no se observó diferencia estadística entre los sitios anatómicos muestreados. En cerdos de destete se obtuvo diferencia estadística significativa entre la tonsila y el pulmón derecho lóbulo craneal ($p < 0.01$) y entre el pulmón derecho lóbulo craneal y el pulmón derecho lóbulo caudal ($p < 0.01$). En tonsila de los cerdos adultos se obtuvo diferencia de ($p < 0.05$) comparado con las regiones pulmonares y los linfonodos traqueobronquiales. El número de células cebadas en las diferentes etapas de crecimiento fue mayor en cerdos adultos con respecto a los cerdos recién nacidos y de destete, a excepción de los linfonodos traqueobronquiales en los que se obtuvo una mayor cantidad en esta etapa. Se considera que el sistema inmune de los cerdos adultos ya ha sido estimulado por diferentes antígenos y por lo tanto ha madurado.

Las células cebadas se encuentran distribuidas en tonsila en el espacio interfolicular, a nivel respiratorio en la mucosa y submucosa de bronquios y bronquiolos, en la pleura visceral, en el septo interlobular e interalveolar. En linfonodos traqueobronquiales, están distribuidas en las trabéculas y en la paracorteza. La distribución de las células cebadas en las tres etapas de crecimiento fue homogénea.

ABSTRACT

This study provides quantitative information on mast cells in the respiratory tract clinically healthy pigs at three growth stages.

The presence of mast cells was quantified in the tonsils, the right cranial lung lobe, the right caudal lung lobe, the left cranial lung lobe and the left caudal lung lobe, as well as in the tracheobronchial lymph nodes, in newborn, weaned and adult pigs. 5 clinically healthy animals were employed for each stage, all serologically negative to *Mycoplasma hyopneumoniae*, *PRRS*, *Aujeszky* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

The extracted samples were processed by inclusion in paraffin and dyed with toluidine blue 1%. Among recently newborn, the greatest quantity of mast was observed in the tracheobronchial lymph nodes (1.44 ± 1.84) and the least quantity in the right cranial lung lobe (0.16 ± 0.04), however, to perform the nonparametric Tukey test was not observed statistical difference between the anatomical sites sampled. At weaned pigs were obtained statistically significant difference between the right lung cranial lobe ($p < 0.01$) and between the right lung cranial lobe right lung caudal lobe ($p < 0.01$). In tonsils of adult pigs were obtained difference ($p < 0.05$) compared with lung regions and the tracheobronchial lymph nodes. The number of mast cells in different stages of growth was greater in adult pigs in relation to newborn pigs and weaned, with the exception of the tracheobronchial lymph nodes was obtained in greater quantity at this stage. It is believed that the immune system in adult pigs has already been stimulated by different antigens and therefore has matured.

Mast cells are distributed in space interfollicular tonsil, at the respiratory mucosa and submucosa of bronchi and bronchioles, in the visceral pleura, the interlobular and interalveolar septum.

In tracheobronchial lymph nodes are distributed in the trabeculae and in the paracortex. The distribution of mast cells in the three stages of growth was homogeneous.

Keywords: Pig, respiratory tract, mastocytes, mast cells, distribution.

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| BALT | Tejido linfoide asociado a bronquios |
| BCR | Receptor para antígenos de las células B |
| CAM | Complejo perforante |
| CAM | Complejo de ataque a la membrana |
| CD40L | Ligando CD40 |
| COX-2 | Enzima ciclooxigenasa-2 |
| CPA | Célula presentadora de antígenos |
| CRP | Proteína C reactiva |
| CTMC | Células cebadas de tejido conectivo |
| DAG | Diamil glicerol |
| FcεRI | Receptor de superficie de alta afinidad para la ige |
| FcγRI | Receptores de alta afinidad para la igg |
| HPET | Ácido hidroperoxieicosatetraenoicos |
| HTES | Ácido hidroxieicosatetraenoicos |
| Ig | Inmunoglobulina |
| I-KB | Inhibidor del factor nuclear kappa B |
| IL | Interleucina |
| IRAK | Cinasa asociada al receptor de IL-1 |
| ITAM | Inmunorreceptores basados en tirosina |
| ITIM | Motivo Inhibitorio de inmunorreceptores basado en Tirosina |
| LTC ₄ | Leucotrienos |
| MBL | Proteína fijadora de manosa |
| MBL | Lectina fijadora de manosa |
| MCH | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| MM | Células cebadas de la mucosa |
| NFκB | Factor nuclear kappa-B |
| NK | Naturales, células asesinas |
| NOS2 | Oxido nítrico sintasa-2 |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PGD ₂ | Prostaglandina |
| PGN | Peptidoglicano |
| PIP ₂ | Fosfatidil inositol bifosfato |
| PKC | Proteína cinasa C |
| PLA ₂ | Fosfolipasa A ₂ |
| PLC-γ | Fosfolipasa C |
| PRRS | Síndrome respiratorio y reproductivo porcino |
| RIG-1 | Ácido retinoico-1 |
| SCF | Factor de células primitivas |
| SLA | Antígeno leucocitario del cerdo |
| TAB1-2 | Proteínas de unión TAK-1 |
| TAK-1 | Cinasa asociada al factor de crecimiento B |
| Tc | Linfocito citotóxico |
| TCR | Receptor para antígenos de las células T |
| Th | Linfocito cooperador |
| TLR | Receptores Toll |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TRAF-6 | Factor 6 activado por el factor de necrosis tumoral |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Impacto de las enfermedades respiratorias en el cerdo

Las infecciones respiratorias son causa de importantes pérdidas económicas en la producción porcina, aparecen en función de la cantidad de microorganismos presentes, la virulencia de éstos y la capacidad del cerdo para controlar o eliminar las infecciones. La intensificación de los sistemas de producción ha coincidido con un aumento dramático de las patologías respiratorias con pérdidas reflejadas en elevada mortalidad, deficiente ganancia de peso, mala conversión alimenticia, excesivos gastos en medicamentos, aumento en el número de días en que los cerdos llegan al rastro, y altos decomisos en el mismo. Por cada 10% de lesión pulmonar existe una disminución del 5% en la ganancia diaria de peso (Morilla, 2005). Por esta razón en la actualidad los mayores esfuerzos van encaminados a controlar el efecto de las enfermedades, por lo que existen sistemas de manejo y producción que se han desarrollado y puesto en práctica con el objetivo principal de evitar el efecto negativo de cualquier infección en una población porcina.

El fenómeno de asociación de patógenos ha sido determinado en forma reiterada tanto a partir de casos de campo como en base a trabajos realizados en condiciones experimentales controlados (Iglesias y Trujano, 2000). El síndrome respiratorio de los cerdos conocido como complejo respiratorio porcino, ha emergido como un problema severo de salud en la mayoría de las granjas porcinas del mundo, el cual ha sido llamado así debido a que se trata de un complejo de factores negativos del ambiente y manejo de los sistemas de producción, de agentes patógenos y la alteración de la capacidad inmune de los cerdos para responder de forma adecuada frente a estas agresiones (Ciprián, 1999; Tracker, *et al.*, 2001).

Algunos de los patógenos más reportados son el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV), *Mycoplasma hyopneumoniae* (agente causal de neumonía enzootica), virus de la influenza porcina, virus de la enfermedad de Aujeszky, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa porcina), *Haemophilus parasuis* y *Pasteurella multocida* (Cruz, 2000). En términos

generales se cree que las infecciones de estos patógenos son producto de la combinación de habilidades del patógeno, para favorecer su permanencia y proliferación en el tracto respiratorio porcino. El mejor ejemplo de colaboración es el que ocurre con *Pasteurella multocida*, un habitante normal de las vías respiratorias, pero en cuanto existen condiciones propicias es capaz de causarle daño severo al tejido pulmonar. Estas condiciones ocurren a menudo como resultado de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*. En repetidas ocasiones se ha demostrado que la asociación de estos dos agentes tiene un efecto negativo notable en la función respiratoria, mientras que cualquiera de estos dos agentes solos producen una infección de poco impacto en el pulmón (Iglesias y Trujano, 2000).

Las superficies epiteliales del tracto respiratorio representan un componente importante del sistema inmune de las mucosas ya que están expuestas continuamente a antígenos inhalados (Peeters *et al.*, 2005; Pier *et al.*, 2004; Bytautiene *et al.*, 2004), contaminantes ambientales, alérgenos y microorganismos, que inducen la activación de células inflamatorias y de respuesta inmune, células cebadas, macrófagos, eosinófilos, linfocitos, células dendríticas, basófilos, neutrófilos y plaquetas (Levine, 1995; Moran *et al.*, 2006), y por ende a la liberación de mediadores químicos que son responsables de los cambios fisiopatológicos de éstas (Barnes, 1998; Villaseñor *et al.*, 1999); ya que se incrementa el flujo sanguíneo local, se produce broncoconstricción, exudación plasmática, secreción de moco, efecto neural, contracción del músculo liso, atracción y activación de otras células inflamatorias (Barnes, 1998).

1.2 Respuesta Inmune

El sistema inmune está constituido por órganos linfoides, células y moléculas que en caso de infección elaboran una respuesta coordinada para lograr la recuperación, la protección contra una nueva infección y la vigilancia inmune contra las neoplasias malignas y enfermedades auto-inmunes (Collado *et al.*, 2008; Chaplin, 2003).

Para que ocurra la respuesta inmune en el cerdo se deben suceder una serie de eventos tales como el reconocimiento del antígeno, activación de la célula inmunocompetente y la

fase efectora para la eliminación del antígeno, lo cual se da por una combinación de la respuesta inmune innata y adaptativa. La inmunidad innata sirve como una señal de alarma para que el sistema adaptativo desencadene una respuesta en defensa del huésped (Janeway 2003; Abbas y Lichtman, 2006).

1.2.1 Barreras Físicas

Están constituidas por la piel, secreciones de las mucosas, enzimas proteolíticas (lisozima, lactoperoxidasa, etc), pH del estómago (Sánchez Vizcaíno, 2004), entre otras, que aunados a los procesos de auto limpieza como la tos, el estornudo, el movimiento ciliar y el flujo de moco en las vías respiratorias, el vómito y la diarrea en el tubo digestivo, y el flujo de orina en las vías urinarias impiden la entrada de los microorganismos hacia el interior del organismo y su proliferación (Tizard, 2009; O'Hara and Shanahan, 2006; Halliwell, 1989).

1.2.2 Inmunidad Innata

La inmunidad innata incluye proteínas solubles y pequeñas moléculas bioactivas que están presentes en fluidos biológicos (proteínas del complemento y defensinas) o son liberadas de células activadas, tanto polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), como mononucleares (macrófagos y células dendríticas) y células asesinas: K (killer), NK (natural killer) y LAK (lymphokine activated killer) (Whiteside, 2001 a y 2001 b), citocinas que regulan la función de otras células, las quimiocinas que atraen los leucocitos inflamatorios, mediadores lipídicos de la inflamación, aminos bioactivas y enzimas que también contribuyen a la inflamación del tejido (Barnes, 1998).

El sistema inmune innato representa una de las primeras líneas de defensa en contra de estructuras moleculares conservadas que se expresan en un gran número de microorganismos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), por ejemplo los lipopolisacáridos, el peptidoglicano, la flagelina y ácidos nucleicos microbianos, que son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que están presentes en las células del sistema inmune innato (macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células cebadas), que conduce a la activación de vías de

señalización inflamatoria tales como el factor nuclear kappa B (NFκB) y la vía protein cinasa activada por mitógenos (MAPK) (Chen *et al.*, 2009) que incluye la liberación de citocinas y quimocinas, fiebre, y en casos sistémicos extremos shock, coagulación intravascular diseminada y muerte.

Se han identificado tres tipos de PRRs: Los receptores Toll-like (TLR) que son proteínas transmembrana, con un dominio extracelular involucrado en la unión y el reconocimiento del antígeno en la superficie extracelular o dentro de endosomas, y un dominio intracelular involucrado en la traducción de señales. Los receptores NOD-like (NLR) son intracelulares, se expresan en células fagocíticas (macrófagos y células presentadoras de antígenos) y reconocen péptidos derivados de la degradación del peptidoglicano (PGN) constituyente de las paredes bacterianas. El receptor, gen inducible por ácido retinoico-1 (RIG-1) posee dominio ARN-helicasa que detecta ARN extraño en el citosol principalmente viral (Kawai and Akira, 2006; Laing *et al.*, 2008).

Los PRR más estudiados son los receptores Toll-like. Se llaman así por su homología con los receptores Toll (nombre que se le dio a los receptores descubiertos por primera vez en *Drosófila*) (Cristofaro and Opal, 2006). Los TLR se encuentran en macrófagos células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, células epiteliales, queratinocitos y células cebadas. La familia de los TLR en mamíferos esta constituida por al menos 11 miembros. En el cerdo se ha informado una expresión elevada de TLR2 en células mononucleares sometidos a choque letal endotóxico por la infusión de una dosis alta de LPS. En este estudio se utilizó una sonda de hTLR2 porque TLR2 es altamente homólogo entre especies, al contrario de TLR4, para el cual la homología entre especies es relativamente baja (Liu *et al.*, 2001). Por su parte, TLR9 se identificó en placas de Peyer y en ganglios linfáticos mesentéricos de cerdo y la expresión en estos tejidos es tres veces más alta que en el bazo (Shimosato *et al.*, 2003). Al compararlo con otras especies, este receptor mostró una identidad de aminoácidos más alta con humanos (81.8%) y gatos (86.7%) que con ratones (74.9%); de manera notable, el sTLR9 reconoce motivos CpG, por lo que se supone que tiene un papel similar al del hTLR (Shimosato *et al.*, 2003).

Estructuralmente son proteínas transmembrana con un dominio extracelular rico en leucina y un dominio intracelular homólogo al receptor de interleucina 1 de los mamíferos (TIR).

Los receptores TLR comparten los mismos mecanismos para la señalización corriente abajo. La interacción del receptor Toll con el receptor CD14 y sus PAMPs respectivas activa su dominio intracelular TIR, el cual forma un complejo con la proteína adaptadora MyD88 (Factor de diferenciación mieloide) (Kawai and Akira, 2006), el cual activa a Tollip (proteína de interacción Toll) y fosforila a IRAK (cinasa asociada al receptor de IL-1). La fosforilación de IRAK recluta a TRAF-6 (factor 6 activado por el factor de necrosis tumoral) y a TAK-1 (cinasa asociada al factor de crecimiento B) y a dos proteínas que la unen que son: TAB1-2 (proteínas de unión TAK-1).

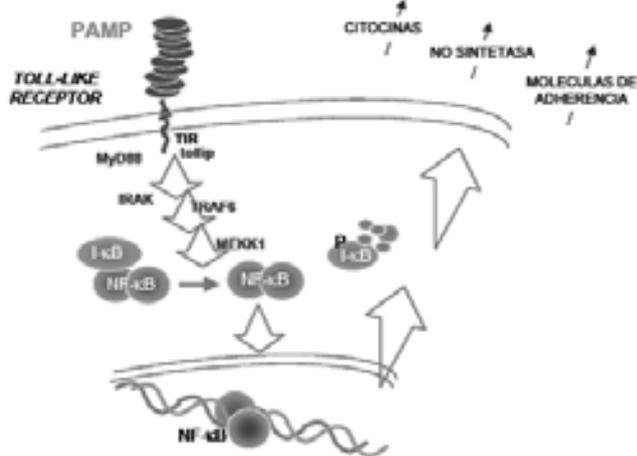


Figura 1. Activación celular vía TLR que induce la producción de diversas moléculas. 1) Reconocimiento de PAMP en la membrana, 2) Activación de la cascada de señalización intracelular, 3) Transcripción de genes para la producción de IL- 1, 6, 8, 12, CD40, CD80, CD86, INOS. (Escobar, 2009)

El complejo activado TRAF-6/TAK-1/ TAB1-2 fosforila al inhibidor del factor nuclear kappa B (I-KB) como se muestra en la figura 1, el cual libera al FNKB de su inhibidor para que éste transloque al núcleo, se una a la región promotora de los genes de respuesta inflamatoria preferentemente c-Fos y c-Jun, lo cual inicia la síntesis de citoquinas y otros mediadores proinflamatorios como la sintetasa inducible de óxido nítrico y las moléculas de adhesión endotelial, IRAK fosforilado además de integrar el sistema de inmunidad innata, activa la apoptosis a través de FADD (Fas-Associated Death Domain Protein) y caspasa 8, lo cual explica la estrecha relación que existe entre respuesta inflamatoria

sistémica, control de la infección y muerte celular programada (O'Neill, 2003; Takeda and Akira, 2005).

La activación de la vía del NF- κ B conduce a la iniciación de la respuesta inmune adaptativa por la producción de citocinas inflamatorias tales como la IL-1, IL-8, TNF-alfa, IL-12, y la inducción de moléculas de coestimulación, tales como la CD80, CD86 y CD40 (Takeda and Akira, 2005).

1.2.2.1 Mecanismos internos del sistema inmune innato

Los mecanismos internos consisten en la activación del complemento, el proceso de fagocitosis y la respuesta inflamatoria.

El complemento es un sistema funcional presente en el suero, integrado por unas 30 proteínas que interactúan entre sí de modo regulado dando lugar a una cascada enzimática que promueve la inflamación y la muerte microbiana.

El papel de la activación del complemento en la defensa en contra de las infecciones también está relacionado con la eliminación de los desechos necróticos o apoptóticos, así como el procesamiento de los complejos inmunes (Chaplin, 2003; Rus *et al.*, 2005, Parslow, 2002).

Para que se produzca la cascada enzimática se requiere de su activación, que se puede realizar por tres vías o rutas diferentes:

- La vía alternativa: corresponde a la inmunidad innata y se inicia interactuando directamente con la superficie del microorganismo. Normalmente, una cierta cantidad de C3 es hidrolizada espontáneamente liberando 3a y 3b. En condiciones normales, 3b es inactivada, pero en presencia de partículas o moléculas invasoras (virus, hongos, bacterias, parásitos, veneno de serpiente o Ig A) 3b puede unirse a la membrana bacteriana e interactuar entonces con otra proteína del plasma llamada Factor B, formando un complejo C3bB, el cual al ser hidrolizado por otra proteína (Factor D) libera Ba y se convierte en un complejo C3bBb, que tiene actividad de C3 convertasa y desencadena ulteriores cambios que desembocan en la formación del Complejo de Ataque a Membrana y la lisis de la célula invasora. (las proteínas Factor H y factor I tienen efecto inhibitorio sobre la C3 convertasa,

mientras la properdina estabiliza su conformación activa) (Chaplin, 2003; Rus *et al.*, 2005).

- La vía de las lectinas: también de la inmunidad innata, es una variante de la ruta clásica, pero su inicio no requiere la presencia de anticuerpos. Se activa por la unión de la proteína lectina fijadora de manosa (MBL) a moléculas de manosa en la superficie de los microorganismos (Janeway, 2003; Parslow *et al.*, 2002).
- La vía clásica: se inicia fundamentalmente por la interacción con inmunocomplejos y, por lo tanto, corresponde a la inmunidad adaptativa. También se puede activar por la proteína C reactiva (CRP), a través de su unión con monoésteres fosfato (Mortensen, 2001) en presencia de calcio a la membrana de microorganismos, esta unión incrementa la eficiencia con la que los patógenos son capturados y destruidos por células del huésped, a través de la opsonización (Parslow *et al.*, 2002).

La activación en cascada de los componentes del complemento puede desencadenar las siguientes consecuencias finales:

La formación de un complejo perforante (C5b-9, CAM o MAC) que producirá un notable desequilibrio osmótico en el microorganismo que conduce a su lisis, el inicio de un proceso inflamatorio agudo, pues sus componentes C3a y C5a (anafilotoxinas), provocan vasodilatación al activar a las células cebadas y basófilos que liberan mediadores que aumentan la permeabilidad vascular y la contracción de las células del músculo liso. La opsonización de los patógenos por el factor C3b a través de los macrófagos que poseen este receptor, y la función de quimiotaxis por el fragmento C5a que atrae a los neutrófilos y macrófagos hacia el foco infeccioso (Parslow *et al.*, 2002; Janeway, 2003).

La fagocitosis es un proceso por el que células especializadas (neutrófilos y macrófagos) eliminan microorganismos y grandes partículas insolubles. Estas células engloban microorganismos patógenos y utilizan vacuolas intracelulares que contienen moléculas con efecto tóxico tales como óxido nítrico, superóxido, y enzimas (Chaplin, 2003).

En este proceso se pueden diferenciar cinco fases:

1.- La célula fagocítica reconoce un patrón molecular de la partícula extraña y se adhiere a él (Blander and Medzhitov, 2004; Sanjuan *et al.*, 2007).

2- La adherencia activa a la membrana, la cual emite pseudópodos que engloban a la partícula extraña formando la vesícula fagocítica o fagosoma.

3- Una vez que el fagosoma se encuentra en el citoplasma celular, se fusiona con vesículas que contienen enzimas (lisosomas) formando el llamado fagolisosoma.

4- Dentro del fagolisosoma se producen los mecanismos necesarios para la destrucción del material ingerido a través de reacciones dependientes de oxígeno, independientes de oxígeno o por reacciones dependientes de óxido nítrico, así como en la acción de enzimas lisosomales (hidrolasas, proteasas, etc).

5- Una vez que han actuado los sistemas de digestión, la vesícula se fusiona de nuevo con la membrana celular y elimina al exterior el material digerido, o, dependiendo del tipo de célula, lo presenta a células especializadas como los linfocitos T (Collado *et al.*, 2008; Tizard, 2009).

La inflamación es una serie de cambios tisulares, celulares y moleculares por el que los elementos del sistema inmunitario se dirigen al sitio del organismo en donde ha ocurrido un daño traumático o una infección (Roitt, 2007).

La presencia de agentes patógenos es detectada a través de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por los macrófagos, células dendríticas y células cebadas mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), se produce una señal en la que se activa el factor nuclear NF κ B (factor nuclear kappa-B) que activa los genes que codifican la producción de las citocinas, IL-1 y TNF α , así como IL-6, IL-12 y IL-18 que sintetizan óxido nítrico sintasa-2 (NOS2) y sustancias oxidantes como el óxido nítrico. También sintetizan la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), que genera lípidos inflamatorios, prostaglandinas y leucotrienos.

En su forma clásica la inflamación se clasifica en aguda y crónica. La inflamación aguda tiene cinco signos cardinales: calor, rubor, edema, dolor y pérdida de la función, estos signos son el resultado de los cambios que se dan en los vasos sanguíneos pequeños. Después de la lesión, el flujo sanguíneo de los capilares pequeños aumenta, permitiendo a los linfocitos que se adhieran a las paredes de los mismos. Poco después los vasos sanguíneos de la zona se dilatan y aumenta el flujo sanguíneo, se produce la filtración de fluido desde la sangre a los tejidos, edema y tumefacción.

Los cambios celulares de las paredes de los vasos permiten que neutrófilos y monocitos se adhieran a las células endoteliales. Si los vasos sanguíneos están lesionados, las plaquetas se fijan en los lugares dañados liberando moléculas vasoactivas y de coagulación (Parslow *et al.*, 2002; Tizard, 2009).

1.2.3. Inmunidad Adaptativa

Ésta se desarrolla a lo largo del tiempo y mantiene la especificidad inmunológica del patógeno (Day, 1999), es decir, depende de la exposición previa del organismo a un agente extraño y del subsiguiente reconocimiento y respuesta hacia éste (Ramírez, 1982). Sus características principales son especificidad, diversidad, memoria, especialización, auto limitación y ausencia de auto reactividad (Abbas, 2006).

La respuesta adaptativa se induce mediante la activación de los linfocitos la cual involucra tres señales:

- a) Reconocimiento del antígeno
- b) Activación de linfocitos (linfocitos T y B)
- c) Etapa efectora

- a) Reconocimiento antigénico

En la inmunidad adaptativa el reconocimiento del antígeno es específico y se realiza entre el receptor de linfocitos T (TCR) o el receptor de los linfocitos B (BCR) y el epítipo del antígeno que le es complementario.

En la respuesta inmune celular, el TCR sólo reconoce epítopos presentados por moléculas especializadas de la superficie de células presentadoras de antígeno (CPA), células dendríticas, macrófagos y linfocitos B que presentan péptidos o moléculas CD1 que presentan glicolípidos (Gascoigne *et al.*, 2001; Tupin *et al.*, 2007).

La célula dendrítica como CPA, expone en su membrana el epítipo para que sea reconocido por los linfocitos T (Chaplin, 2003). Estos epítopos son expuestos en la membrana plasmática de la célula dendrítica alojados en una hendidura dentro de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad o CMH (Aparicio, 2007), en cerdos se conoce como SLA (Swine Leucocyte Antigens) (Tizard, 2009, Amaya, 2006),

quienes son las responsables de presentarlos a los linfocitos T y desencadenar la respuesta inmune, este proceso ocurre en el nódulo linfático más próximo a la infección. El CMH I, presenta péptidos antigénicos a los receptores TCR de los linfocitos T citotóxicos (Tc), mientras que el CMH II presenta péptidos a los receptores TCR de los linfocitos T helper (Th) (Sánchez Vizcaíno, 2004).

Si el antígeno es reconocido por los linfocitos, esta presentación induce su activación. En este proceso participan las moléculas coestimuladoras CD 80 y CD 86 las que son necesarias para una eficiente activación (Gascoigne *et al.*, 2003; Robinson and Delvig, 2002).

b y c) Activación y Etapa Efectora

En la figura 2 se muestra que la activación de linfocitos Tc induce la proliferación y diferenciación a clones de linfocitos Tc efectores y de memoria. Los linfocitos Tc efectores destruyen células infectadas por virus que expresan antígenos extraños.

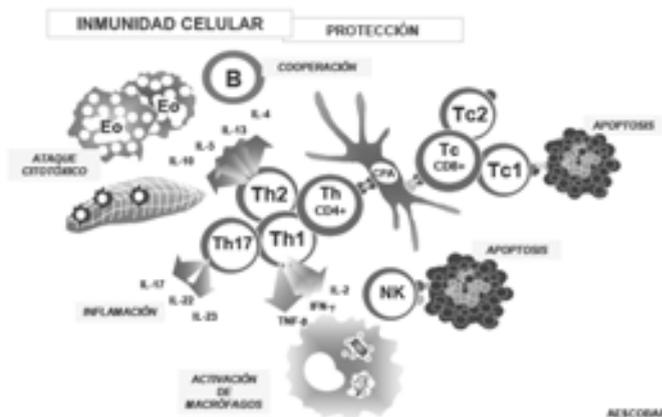


Figura 2. La CPA procesa el antígeno y lo presenta en su superficie por medio de las moléculas CMH de clase I y II, a los receptores TCR de los linfocitos Tc y Th inactivos desencadenando su activación. (Escobar, 2009)

Además las células Tc activadas secretan citocinas que atraen a los macrófagos y otros glóbulos blancos fagocíticos a la zona de infección para ingerir los restos de las células

lisadas, incluso los virus que contenían. Las células de memoria actúan en una segunda exposición a la infección viral (Belkaid and Rouse, 2005).

La interacción del antígeno con el linfocito Th induce su activación y adquiere la capacidad para secretar citocinas. Estas actúan de forma local participando en la proliferación, diferenciación y expansión clonal de los linfocitos. A partir de esta activación se generan dos subtipos de linfocitos Th: linfocitos Th1 y Th2, que se diferencian entre sí por el tipo o patrón de citocinas que producen y por la acción efectora final. Los linfocitos Th1, utilizan células de la inmunidad innata para su acción efectora, liberan citocinas que potencian la actividad fagocítica de los macrófagos y la actividad citotóxica de los linfocitos NK. Las células NK del cerdo, difieren de las de otras especies, debido a que su actividad es mediada por pequeños linfocitos granulares que tienen el marcador CD2. Las células NK porcinas son CD2⁺, CD8⁺, MHC-II⁺ y LFA-1⁺ (Roth, 1999; Tizard, 2009). Los linfocitos NK poseen receptores innatos que son capaces de detectar la ausencia de moléculas CMH clase I en la superficie celular, hecho muy común en células infectadas por virus (Caligiuri, 2004; Hewitt, 2003).

Los linfocitos Th 2 favorecen la diferenciación y la expansión clonal de los linfocitos B. ya que las citocinas que liberan al ser activados determinan el isotipo de la Ig producida por el linfocito B y la mutación somática. El linfocito B como CPA capta el antígeno a través de su Ig de membrana, lo internaliza y lo procesa para su posterior presentación a través de la MCH II. La captación del antígeno incrementa la expresión del MCH II y la expresión de CD80 y CD86. En la activación de la células T por la interacción de las moléculas coestimuladoras y el complejo MCH II-TCR sobre la superficie de las células B se da una señal recíproca para la interacción del ligando celular T CD40 (CD40L) con el receptor CD40 localizado en la superficie de las células B (Ver figura 3). El linfocito B activado crece y se divide repetidas veces, una parte de su progenie se diferencia a células plasmáticas que secretan anticuerpos circulantes, de los que en cerdos se han identificado cuatro tipos IgG, IgA, IgE e IgM, y otra a linfocitos B de memoria (Parslow *et al.*, 2002; Chaplin, 2003).

Los linfocitos Th 2 favorecen la inmunidad de tipo humoral. Los anticuerpos actúan sobre los patógenos extracelulares desactivándolos o marcándolos para favorecer su destrucción

por acción de los macrófagos, neutrófilos, las células NK y complemento. Los anticuerpos circulantes, los linfocitos Tc y Th activos, abandonan el ganglio linfático por vía eferente hacia el foco de infección. Los linfocitos T y B de memoria entran a la circulación y residen en tejidos normales, en preparación para próximas infecciones con el mismo antígeno (Gascoigne *et al.*, 2001; Liew, 2002).

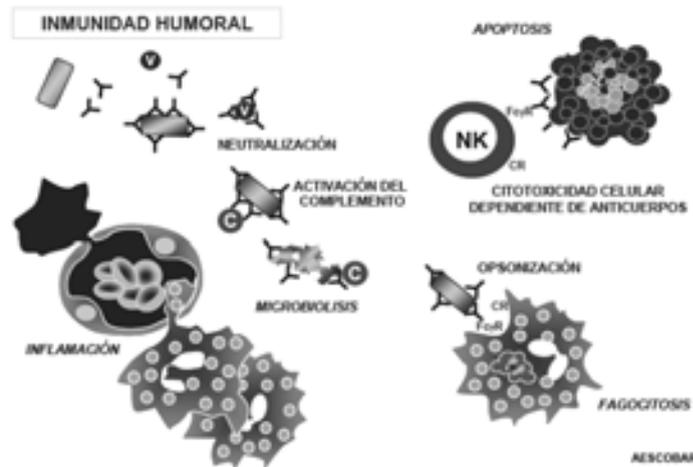


Figura 3. Los anticuerpos actúan sobre los patógenos extracelulares desactivándolos o marcándolos para favorecer su posterior destrucción a través de la fagocitosis, inflamación o apoptosis. (Escobar, 2009.)

1.2.4 Inmunidad de las mucosas

Las superficies epiteliales del tracto respiratorio representan un componente importante del sistema inmune de las mucosas ya que están expuestas continuamente a la inhalación de antígenos (Rodríguez *et al.*, 2006).

La función primaria del sistema inmunitario de las mucosas es proporcionar defensa al individuo en las superficies mucosas, ésta función la realiza en conjunto con diversos factores protectores no inmunitarios, como la flora bacteriana normal, actividad motriz del órgano, secreciones mucosas, movimiento ciliar y factores humorales innatos. Una segunda función del sistema inmunitario de las mucosas es evitar la entrada de antígenos por la mucosa a la circulación y proteger así al sistema inmunitario sistémico de exposiciones antigénicas inadecuadas (Parslow, 2002; Kunisawa and Kiyono, 2005).

El sistema inmune de las mucosas debe inducir: a) una respuesta especializada que genere tolerancia o no reacción contra las moléculas propias; b) una respuesta inmune no

esterilizante para la flora normal, y c) una inmunidad esterilizante contra los patógenos. Esta triple función determina las diferencias principales entre el sistema inmune interno y el de las mucosas (Vega, 2007).

Igual que la piel, las superficies mucosas son barreras entre el medio interno y externo y, por tanto son un lugar importante de entrada de microorganismos (Abbas, 2006). El tejido linfoide se localiza a lo largo de las mucosas, presenta una relativa independencia del sistema inmune sistémico (Sánchez Vizcaíno, 2004) ya que a diferencia de los linfonodos, estos tejidos linfoides organizados no reciben antígenos extraños de la linfa aferente, sino que los contactan directamente desde la luz del órgano (Tizard, 2009). Las estructuras organizadas están constituidas por el tejido linfoide asociado al aparato digestivo (Gut Associated Lymphoid Tissues, GALT por sus siglas en inglés), el tejido linfoide asociado a bronquios (Bronchus Associated Lymphoid Tissues, BALT por sus siglas en inglés) y tonsilas (Cordero, 2004). En todas las mucosas existe adicionalmente una gran cantidad de células de respuesta infiltradas y dispersas en el tejido conectivo.

El GALT está formado por el tejido linfoide que se encuentra en las paredes intestinales (linfonodos, linfonódulos agregados, linfonódulos solitarios).

El BALT está localizado en el pulmón principalmente a lo largo del bronquio principal y cerca de las bifurcaciones, es decir, en los sitios donde se favorece el impacto entre el antígeno y el epitelio. Consiste en folículos linfáticos con centros germinales desarrollados en la lámina propia de la mucosa por debajo de un epitelio especializado (Acosta, 1992). También hay linfocitos que se distribuyen de manera difusa en el pulmón y las paredes de las vías respiratorias (Tizard, 2009). El BALT puede ser dividido en tres regiones anatómicas que son: a) la región central o centronodular constituido principalmente de linfocitos B así como células dendríticas o macrófagos, b) la región periférica que rodea a la región central y que contiene linfocitos T cooperadores (CD4+), supresores/citotóxicos (CD8+) y posiblemente células NK, c) la región subepitelial asociada con la presencia de macrófagos y/o células dendríticas (Acosta, 1992). La inmunoglobulina que se sintetiza en estos apartados linfoides es principalmente IgA secretora, en especial en las vías superiores; sin embargo, las secreciones de bronquiolos y alvéolos contienen una gran

proporción de IgG, cuya concentración se encuentra entre los valores de la tráquea y el suero (Tizard, 2009).

Los antígenos que ingresan en el organismo a través de una mucosa, tienden a inducir una respuesta de anticuerpos clase IgA, en la superficie de las estructuras organizadas se encuentran células epiteliales especializadas llamadas células en cúpula o M, superpuestas al BALT; estas células pinocitan antígenos y los transportan a través del epitelio. El antígeno puede ser procesado entonces por las APCs y puede presentarse a los linfocitos T y B desencadenando la respuesta inmune (Roth, 1999).

1.3 Células cebadas (mastocitos)

Las células cebadas o mastocitos fueron inicialmente descritos por Ehrlich en 1877, los nombro como "Zellen mástil" (células cebadas) al observar la gran cantidad de gránulos que contiene el citoplasma (Erlich, 1979). Más del 40% del volumen total de la célula cebada esta ocupada por las membranas de los gránulos de secreción, los cuales se originan en el aparato de Golgi, que es el responsable de la síntesis y organización de los mediadores preformados (Caulfield *et al.*, 1980; Saavedra, 2005). Estas células hacen evidentes sus gránulos con la tinción metacromática con colorantes como el azul de toluidina. La metacromasia se da por el cambio de color de un colorante catiónico (azul de toluidina), consecutivo a su fijación y polimerización sobre sustancias de peso molecular elevado que contienen una cantidad pequeña de cargas de superficie aniónica. Las sustancias que sufren metacromasia son los mucopolisacáridos de las células cebadas adquiriendo un color rojo mientras que los demás tejidos permanecen azules (Carleton, 1957).

Las células cebadas provienen de células madres hematopoyéticas pluripotenciales presentes en la medula ósea y en el hígado fetal donde adquieren las características de su linaje, bajo la influencia del factor de células primitivas (SCF) y de la IL-3 (Kallesnikoff and Galli, 2008, Brown *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2008). Las células cebadas provienen de una célula progenitora que es evidenciada por los marcadores CD34⁺ (Samorapoompichit *et al.*, 2001), c-kit⁺, Ly-1, CD14⁻ y CD17⁻ (Delves, 1998). Las células cebadas se dirigen a la médula ósea y migran a una variedad de tejidos, incluyendo el timo, nodos linfoides,

bazo, piel, corazón, la mucosa del tracto genitourinario, respiratorio e intestinal donde completan su diferenciación y adquieren características específicas del tejido en el que se alojan (Brown *et al.*, 2008; Tilley *et al.*, 2000).

Actualmente se cree que las células cebadas no solo participan en el inicio sino también en la amplificación de la respuesta inflamatoria (Zweiman *et al.*, 1998). Además se ha demostrado su participación en una gran variedad de procesos que abarcan desde la defensa frente a infecciones bacterianas (Galli, 1990), infestaciones parasitarias hasta los mecanismos de reparación tisular (Metcalf *et al.*, 1997; Cruse *et al.* 2005).

En humanos y roedores, por lo menos, forman dos poblaciones diferenciadas en base a su localización, propiedades de tinción, contenido químico, respuesta a agentes quimiotácticos y drogas (Tizard, 2009, Okuda, 1999; Samorapoompichit *et al.*, 2001) como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características del fenotipo de las células cebadas

| | Células cebadas de mucosas | Células cebadas de tejido conectivo |
|--------------------------|-----------------------------------|--|
| Estructura | Pocos gránulos de tamaño variable | Múltiples gránulos uniformes |
| Tamaño | 9-10 µm de diámetro | 19-20µm diámetro |
| Vida Media | <40 días | >6 meses |
| Localización | Pared intestinal, hígado, pulmón | Cavidad peritoneal, piel, pulmón |
| Proteasas Neutras | Triptasa | Triptasa y quimasa |
| Proteoglucano | Sulfato de condroitina | Heparina |
| Histamina | 1.3pg/célula | 15 pg/célula |

Tizard, 2009.

Las células cebadas se encuentran en los tejidos conectivos, principalmente adyacentes a vasos sanguíneos y linfáticos, se encuentran en contacto con fibras nerviosas terminales, particularmente en el tubo digestivo, y tienen receptores para varios neuropéptidos como la sustancia P (SP) por debajo de las superficies epiteliales (Ansel *et al.*, 1999; Kulka *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2008).

A nivel respiratorio el fenotipo de las células cebadas depende de su localización. En el pulmón se ha descrito su distribución en el epitelio alveolar, parénquima pulmonar y en sitios anatómicos alrededor de vasos sanguíneos, alrededor y dentro de paredes bronquiales, en músculo liso y pleura visceral (Abraham, 1997). Se ha revisado la población de células cebadas a nivel pulmonar encontrando que, las relacionadas al epitelio bronquial, subepitelio bronquial y alvéolos son células cebadas de mucosa (MMC) (Irani *et al.* 1989; Okuda, 1999). Peeters *et al.*, (2005) menciona que en perros, las células cebadas se observan mediante la tinción de azul de toluidina en epitelio y en la lámina propia, ocasionalmente asociadas con glándulas, en la capa muscular del bronquio y en el intersticio alveolar. En cerdos adultos se ha descrito la distribución de las células cebadas por histoquímica y microscopia electrónica mediante la tinción de azul alciano en el septo alveolar, tejido conectivo que rodea los bronquios y bronquiolos (Xu *et al.*, 1993).

1.3.1 Mecanismos de activación de las células cebadas

A) TLR

Las células cebadas poseen receptores de reconocimiento de patrones (PRRS) tales como los receptores TLR 1, 2, 3, 4, 6, 7, y 9 que son activados por diferentes patógenos o proteínas endógenas, por ejemplo, en humanos y roedores los receptores TLR2 activados por los peptidoglicanos de bacterias Gram positivas y el zymosan componente de la pared celular de levaduras inducen la liberación de histamina, mientras que en roedores los receptores TLR4 activados por el lipopolisacárido (LPS) induce la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e IL-4 que recluta neutrófilos (Okumura *et al.*, 2003).

La expresión y función de otros receptores TLR no se han estudiado de manera extensa *in vivo*, por lo tanto, estudios *in vitro* indican que son funcionalmente importantes. Las células cebadas de roedores y humanos que expresan receptores TLR9 producen varias citocinas en respuesta a la activación mediante el motivo Cp9 localizado dentro de la pared bacteriana. La activación de las células cebadas derivadas de la piel fetal de ratón a través del TLR3 induce la producción de citocinas proinflamatorias, mientras que, de manera similar, la activación de células cebadas humanas cultivadas selectivamente induce la expresión de INF tipo 1. También se ha confirmado la expresión de TLR 1 y

TLR 6 en roedores y humanos, mientras la expresión del TLR 5 es controversial. El TLR7 y el TLR8 son cruciales para responder a una secuencia de RNA asociada a una infección viral; actualmente también se ha reportado que el TLR 7 se expresa en células cebadas de roedores y de humanos (Supajatura *et al.*, 2001 y 2002; McCurdy *et al.*, 2003).

B) Los patógenos asociados a manosa

Se ha demostrado que las proteínas fijadoras de manosa asociadas a patógenos inducen la activación de las células cebadas a través de la degranulación. Se ha estudiado la proteína FimH de las fimbrias de *E. coli* que utiliza CD48 para activar a las células cebadas aunque la habilidad de CD48 para activar a las células cebadas no es claro, ya que es una proteína que carece de capacidad de señalización. Se ha mostrado que la proteína CD48 anclada al glicosifosfatidilinositol (GPI) es esencial para la degranulación de las células cebadas, la producción de leucotrienos y la producción de TNF en respuesta a la proteína FimH. También se ha demostrado que las bacterias que expresan FimH son fagocitadas y eliminadas por las células cebadas a través de mecanismos dependientes de superóxidos aniónicos, mientras que las bacterias que carecen de FimH son menos susceptibles (Castells, 1997).

C) Complemento

Las células cebadas interactúan con el sistema de complemento a través de receptores que incluyen CD11b (CR3), CD11c (CR4) y receptores para los productos del complemento CR3 (C3aR) y CR5 (C5aR o también conocido como CD88). Los niveles de expresión de los receptores del complemento pueden variar dependiendo del estado de diferenciación y el efecto de las citocinas en el medio. Por ejemplo en humanos se ha observado que el C5aR se expresa en células cebadas de la piel y el corazón, pero no en otros sitios anatómicos, esto indica que la respuesta de las células cebadas a los componentes del complemento puede variar de acuerdo a su localización. La habilidad de las células cebadas para responder a productos del complemento proporciona un mecanismo por el cual los patógenos pueden inducir la activación local de las células cebadas. Probablemente la señalización dependiente del complemento es un componente

importante de los mecanismos por los cuales las células cebadas son activadas durante la infección. La habilidad de componentes del complemento para inducir la liberación de mediadores lipídicos o citocinas no ha sido extensamente estudiado, pero es claro que muchas poblaciones de células cebadas incluyendo las células cebadas de la piel de humanos, degranulan en respuestas a la activación de componentes el complemento. Se ha mostrado que C3 y C5a son quimiotácticos para reclutar células cebadas al sitio de infección (Castells, 1997; Marshall and Jawdat, 2004).

1.3.2 Activación mediada por receptores Fc

Las células cebadas están definidas por la expresión de un receptor de superficie de alta afinidad FcεRI para la IgE que le confiere a la célula la capacidad para responder a un antígeno específico (Cruse *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2008; MacGlashan, 2009). A pesar de que la regulación de la expresión del FcεRI no se conoce en profundidad, estudios recientes han demostrado que esta se debe a dos mecanismos 1) reacciones de catabolismo o de síntesis de nuevos receptores y 2) procesos de endocitosis y exocitosis del receptor en la membrana celular (McGlashan *et al.*, 2009).

El FcεRI está expresado sobre la célula cebada como un receptor heterotetramérico constituido por una subunidad α que presenta una porción extracelular y es la responsable de la unión de la IgE al receptor (Reischi *et al.*, 1999; Kalesnikoff and Galli, 2008), por una subunidad β y dos subunidades γ como se muestra en la figura 4.

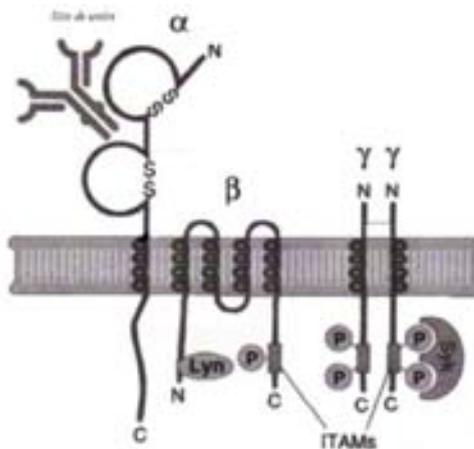


Figura 4. Diagrama del receptor de alta afinidad FcεRI, cada cadena del

receptor de alta afinidad contiene un ITAM (Abbas and Lichtman, 2006).

En humanos, las células cebadas derivadas de los precursores hematopoyéticos CD34+ también expresan receptores de alta afinidad para la IgG (Fc γ RI), su expresión es regulada por el INF- γ . La activación de las células cebadas a través del Fc γ RI conduce a la liberación de histamina, la generación de prostaglandinas D2 y leucotrienos C4 y la liberación de citocinas proinflamatorias, TNF- α e IL-1 β (Okayama *et al.*, 2000; Okayama *et al.*, 2001; Tkaczyk *et al.*, 2002). Estas observaciones proporcionan evidencias de que las células cebadas en humanos también pueden ser reclutados en la inflamación a través de mecanismos dependientes de IgG (Tkaczyk *et al.*, 2002).

Además de la activación mediada por los receptores para las IgE, las células cebadas pueden ser estimuladas mediante el entrecruzamiento de sus receptores de baja afinidad para las IgG: Fc γ RIIb1, Fc γ RIIb2 y Fc γ RIII que están expresados en la membrana celular de las células cebadas de ratón y rata y tiene especificidad para la IgG1, IgG2a y IgG2b sin reactividad cruzada con la IgE (Castells, 1997) (Fc γ RIII) (Kalesnikoff and Galli, 2008; McNeil, 1996; Okayama *et al.*, 2004). El número de Fc γ RIII expresado en la membrana de las células cebadas es menor al número de Fc ϵ RI, y la constante de afinidad para la unión de las IgG es también más baja en comparación a la correspondiente a la unión de las IgE (Reedy *et al.*, 1997). El Fc γ RIII se compone de dos cadenas y tiene una estructura similar a la del Fc ϵ RI. La cadena alfa del Fc γ RIII es similar a la del Fc ϵ RI, pues las dos pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas con dos dominios C2 en la porción extracelular.

Ambos receptores están asociados a dos cadenas homólogas gama que contienen el motivo esencial de activación de receptores inmunológicos llamado ITAM (Motivo de Activación de Receptor Inmunológico basado en Tirosina). Este motivo de 6 aminoácidos tiene dos tirosinas, que se fosforilan tras el puenteo y acercamiento de las dos cadenas alfa de dos receptores de IgE (Fc ϵ RI) o IgG (Fc γ RIII). La fosforilación de la tirosina central del ITAM se debe a la activación de las cinasas scr y una vez fosforiladas las cadenas gama propagan señales intracelulares de fosforilación de sustratos específicos destinados al

aumento del calcio intracelular y la liberación de mediadores intragranulares y de membrana (Galli *et al.*, 1994).

1.3.2.1 Receptores de inhibición

Las células cebadas presentan el receptor de inhibición Fc γ RII, estos receptores, a diferencia de los Fc γ RIII, sólo poseen una cadena y también son de baja afinidad para la IgG. Se expresan, asimismo, antes del proceso de granulocitosis (Huff *et al.*, 1995).

Estos receptores se habían considerado hasta ahora con escasa función y posiblemente fagocíticos, pero recientes avances han demostrado que tienen una función inhibitoria esencial para la homeostasis de la célula cebada. Esta inhibición es reversible al dejar libre el Fc γ RIIb1 y Fc γ RIIb2 y depende de una secuencia central de la porción citoplasmática de estos receptores llamada ITIM (Motivo Inhibitorio de Inmunoreceptores basado en Tirosina), este motivo, se compone de sólo 4 aminoácidos. En las células cebadas, la inhibición por receptores de IgG ocurre tras el puenteo de los Fc γ RIIb1 o Fc γ RIIb2 con los Fc ϵ RI y la consiguiente fosforilación de la tirosina del ITIM por la familia de las cinasas scr. Esto induce la fosforilación de otras moléculas asociadas con función inhibitoria que inducen la inhibición de la liberación de mediadores (Daeron *et al.*, 1995).

1.3.2.2 Inmunoglobulina E

La IgE es un anticuerpo que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas. Su estructura básica esta constituida por dos cadenas pesadas, constituidas a su vez por cuatro dominios constantes (C ϵ 1-C ϵ 4), un dominio variable (V ϵ 3) y dos cadenas ligeras (κ o γ), compuestas por una región variable y una región constante (Holgate and Church, 1995).

La expresión de IgE está controlada por los eventos de recombinación genética que incluyen la síntesis protéica de la cadena pesada y la diferenciación y supervivencia de las células B que la sintetizan. Tanto las células B específicas de alérgeno como las células dendríticas capturan alérgenos y presentan sus péptidos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad II (MCH II). Estos péptidos son reconocidos por el receptor de superficie de los linfocitos T alérgeno específicos induciendo su activación y liberación de citocinas (Clark *et al.*, 1994). Las dos señales esenciales para que ello se produzca son la

presencia de la citocina IL-4 o IL-13 y la interacción directa entre la molécula CD40 en los linfocitos B y el ligando de CD40 (CD40L) en los linfocitos T. El CD40L se ha descrito en los linfocitos T, así como la citocina IL-4, teniendo estas células los dos ingredientes suficientes y necesarios para la síntesis de IgE (Banchereau and Steiman, 1998; Castells, 1997) menciona que las células cebadas situadas en los lugares de inflamación alérgica como son la piel, el pulmón o el intestino, tienen potencial capacidad para proveer estimulación directa a las células B tisulares e inducir la síntesis específica local de IgE. Esto podría aumentar los niveles de IgE específica tisular sin necesariamente un aumento de la IgE plasmática o total. Cada molécula de IgE puede ser dividida por la acción de la papaína, en las fracciones Fab y Fc. La unión del antígeno a la IgE tiene lugar en las dos fracciones Fab; por tanto cada molécula de IgE es capaz de unir dos antígenos. La fracción Fc es la fracción que se unirá a la cadena α del Fc ϵ RI (Sechi *et al.*, 1996).

1.3.2.3 Interacción IgE/ Fc ϵ RI

La unión de la IgE a su receptor de alta afinidad produce un cambio en la conformación de la inmunoglobulina (Sechi *et al.*, 1996). Sin embargo este cambio conformacional no es capaz, por el mismo, de activar la desgranulación. Para que la activación de la célula cebada tenga lugar, es preciso que un antígeno multivalente interaccione con dos o más IgE unidas a la célula cebada y produzca el entrecruzamiento de dos receptores Fc ϵ RI adyacentes (Plaut *et al.*, 1989; Metcalfe *et al.*, 1997). A este fenómeno le seguirá una cascada de señales intracelulares que serán amplificadas y culminarán en la desgranulación, síntesis y liberación de los mediadores celulares (Yu *et al.*, 2006).

Las reacciones bioquímicas intracelulares que se originan después de la interacción con IgE/ Fc ϵ RI se sintetizan en cuatro fases.

1. Fosforilación del receptor: los dos residuos de tirosina del Motivo de Activación de Receptor Inmunológico basado en Tirosina (ITAM) localizado en la región citoplasmática de las cadenas β y γ del Fc ϵ RI son fosforiladas por varias proteínas (Lyn y Syk) de la familia de la tirosina cinasa (Kalesnikoff and Galli, 2008). Una vez que Syk que ha sido fosforilada por Lyn, ésta fosforila a un número de moléculas adaptadoras que son requeridas para la unión y localización de otras

moléculas de señalización pero con menor actividad enzimática intrínseca. Durante la activación de las células cebadas Syk fosforila 4 residuos de tirosina (proteínas adaptadoras localizadas en la membrana) para la activación de linfocitos T (LAT) permitiendo el acoplamiento de otras moléculas adaptadoras tales como Grb2/Sos, fosfolipasa C γ (PLC γ) y Grads. En esta fase se lleva a cabo un cambio en la conformación del receptor (Saitoh *et al.*, 2003; Ishiai *et al.*, 2000).

2. Activación de la fosfolipasa C (PLC γ 1): la enzima PLC γ 1 activada por la tirosina cinasa syk o por las proteínas G en la membrana de la célula cebada, produce la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂). Esta hidrólisis genera dos segundos mensajeros; el diacil glicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP₃). El IP₃ inicia la movilización de las reservas del calcio intracelular y la entrada del calcio extracelular, que se unirá a su receptor cadmodulina. El DAG activa la cinasa C (PKC), que promueve la polimerización de la actina y la activación de la miosina, siendo estas reacciones las responsables de la degranulación y la formación de pliegues en la membrana del mastocito (Roth *et al.*, 2008).

3. Activación de la MAP-K: La activación de la proteína G Ras y la consiguiente activación de la cinasa Raf, activan finalmente la cinasa MAP-K (proteína cinasa activadora de mitogeno) que es la responsable de la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂). La PLA₂ activa el factor de activación plaquetario y del ácido araquidónico, que al ser metabolizado por la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa dará lugar a dos mediadores celulares importantes: las prostaglandinas (PGD₂) y los leucotrienos (LTC₄) (Roth *et al.*, 2008).

4. Activación de los factores de transcripción: Algunas de las reacciones bioquímicas mencionadas como la activación de las MAP-K culminan en la activación de varios factores de transcripción (NF κ β , AP-1, NF-AT) necesarios para iniciar la transcripción del RNA en el núcleo del mastocito. En esta fase se promueve la síntesis de las citocinas por parte de las células cebadas en particular TNF y IL-6 (Roth *et al.*, 2008; Kalesnikoff and Galli, 2008). La producción de citocinas inducida por el Fc ϵ RI por la vía NF κ β es regulada por la molécula adaptadora linfoma 10 de las células B (Bcl10) y el tejido linfoide asociado a

mucosas 1 (Malt 1) el cual forma un complejo que conecta PKC β al inhibidor de cinasa κ B (IKK) que es esencial para la activación de las células cebadas (Peng *et al.*, 2005; Klemm *et al.*, 2006).

1.3.2.4 Regulación negativa de la señalización del receptor Fc ϵ RI por la fosforilación de ITIM

Las proteínas transmembrana que son entrecruzadas con el Fc ϵ RI pueden proporcionar señales inhibitorias seguida de la fosforilación citosólica de los motivos inhibitorios del inmunoreceptor de la tirosina (ITIMS) que puede inducir el reclutamiento de moléculas de señalización negativa como Ship-1, SHIP-2, SHP-1 y SHP-2 (Ishisaka, 1967). Estas proteínas transmembrana que proporcionan las señales inhibitorias incluyen Fc γ RIIB, el antígeno asociado a la función de las células cebadas (MAFA), el gp41B1 y el PECAM-1 (también conocido como CD3), que evitan la degranulación de éstas células interrumpiendo la señal IgE. Cuando el receptor Fc γ RIIB de baja afinidad para la IgG, entrecruza con el receptor Fc ϵ RI, los residuos de tirosina del ITIM citoplasmático del Fc γ RIIB se fosforilan. El Fc γ RIIB fosforilado recluta SHIP el cual interactúa con las moléculas adaptadoras Shc y Dok-1. Dok-1 recluta y fosforila RasGAP que conduce a la inhibición de Fc ϵ RI induciendo la movilización de Ca²⁺ la degranulación y la producción de citocinas (Roth *et al.*, 2008; Galli *et al.*, 2008).

La proteína transmembrana MAFA asociada directamente con el receptor Fc ϵ RI y la agregación de MAFA, conduce a la inhibición de Fc ϵ RI. Los grupos de MAFA sobre la superficie celular conducen a la fosforilación de la tirosina del ITIM por Lyn. El ITIM fosforilado recluta Dok-1 y SHP el cual inhibe la vía de señalización de Ras y la proliferación celular. De manera similar, la proteína transmembrana PECAM-1 con una secuencia ITIM es fosforilado tras la activación del Fc ϵ RI, que conduce al reclutamiento de las moléculas inhibitorias SHP-2 (Roth *et al.*, 2008).

1.3.2.5 Mecanismos de estimulación independiente del FcεRI.

La estimulación no inmunológica de la célula cebada, produce una degranulación más rápida y menos dependiente de calcio extracelular (Benyon, 1989). Entre los estímulos no inmunológicos se encuentra la sustancia P (neuropéptido) (Singh *et al.*, 1999, Ansel *et al.*, 1993), compuestos químicos como el ionóforo de calcio, el Forbol ministato acetato (PMA9), el compuesto 48/80, factores del complemento C3a y C5a (Benyon *et al.*, 1989), por ejemplo en los roedores las células cebadas expresan los receptores para la sustancia P y otros neuropéptidos tales como el factor de crecimiento de los nervios (NGF), el péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP) y el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP). Se cree que estos neuropéptidos activan a las células cebadas ya sea por la unión de la proteína G de membrana o por la unión de receptores de superficie específicos (Ferry *et al.*, 2002). Altas concentraciones de sustancia P activan la degranulación e inducen la infiltración granulocítica a través de la síntesis del factor de necrosis tumoral (TNF) o IL-8 por las células cebadas (Okayama *et al.*, 1998). El ionóforo de calcio A23187 estimula las células cebadas para liberar IL-13 en presencia de SCF (Kurosawa *et al.*, 1999). Estos estímulos actúan a través de la proteína cinasa C de membrana, movilizan el calcio intracelular y abren canales iónicos en la membrana celular (Ammon *et al.*, 1994).

1.3.3 Mediadores liberados por las células cebadas

Los mediadores liberados por las células cebadas después de ser activadas se dividen en dos grupos:

- 1) Mediadores preformados, se encuentran presentes en forma activa en el interior de los gránulos citoplasmáticos de las células cebadas
- 2) Mediadores de nueva síntesis son producidos tras la desgranulación del mastocito y se liberan a medida que son sintetizados.

1) Mediadores preformados

Estos mediadores son, por su rápida liberación, los responsables de los síntomas iniciales de las reacciones alérgicas.

a) Histamina

La histamina es una amina que se encuentra distribuida en todo el organismo es almacenada fundamentalmente por las células cebadas y los basófilos. Tras la desgranulación de las células cebadas parte de la histamina se libera en el espacio extracelular y se disocia rápidamente de la matriz granular mediante un intercambio de Na^+ extracelular (Church *et al.*, 1983; Church *et al.*, 1986). Una vez libre ejerce su función a receptores específicos (H1, H2 y H3) presentes en la superficie de las células de los diferentes tejidos. Provoca la aparición del eritema local, debido a la rápida vasodilatación producida por su acción sobre los esfínteres precapilares, incrementa en la permeabilidad vascular, la extravasación del plasma y el edema. En los procesos inflamatorios contribuye al reclutamiento de células inflamatorias (neutrófilos, eosinófilos y linfocitos) mediante la inducción de la expresión de moléculas de adhesión (P-selectinas) en las células endoteliales (Thorlacius *et al.*, 1994; Doré *et al.*, 1995; Mekori and Metcalfe, 1999). Una vez liberada, se metaboliza en pocos minutos por metilación u oxidación por lo que su efecto es local (Church *et al.*, 1989)

b) Proteoglicanos

La respuesta metacromática de las células cebadas a la tinción se debe a su contenido de los proteoglicanos (Yong, 1997), los proteoglicanos almacenados en los gránulos actúan como una matriz de soporte de los mediadores preformados y estabilizan las proteasas y la actividad de otras enzimas (Metcalf *et al.*, 1997), al ser liberados actúan como anticoagulantes potenciando la acción inhibitoria de la antitrombina III (Benyon, 1989). La heparina y el sulfato de condroitina E se han asociado a las células cebadas de humanos, mientras que el sulfato de condroitina di-B se ha asociado a ratas (Metcalf, 1997). La heparina sódica es selectivamente acumulada en células cebadas y se encuentra más en células cebadas de tejido conectivo, que en células cebadas de la mucosa (Thompson *et al.*, 1998; Craig *et al.*, 1993; Metcalf *et al.*, 1997) aunque al parecer todas las células cebadas producen sulfato de condroitina E y heparina (Metcalf *et al.*, 1997).

c) Proteasas neutras

El contenido de proteasas neutras (quimasa y triptasa) ha sido el principal criterio para establecer los subtipos de células cebadas en humanos y caninos (Irani *et al.*, 1986; Schercher *et al.*, 1988). Estas enzimas se encuentran estabilizadas por los proteoglicanos en el interior de la célula cebada, tras la desgranulación se disocian para ejercer diversas acciones proteolíticas.

La triptasa es la enzima predominante en las células cebadas de pulmón, piel y tracto gastrointestinal. Esta enzima es almacenada de manera similar a la quimasa de la rata, unida a la heparina es liberada como un complejo con este proteoglicano. El complejo proteasa-proteoglicano, el cual estabiliza la forma tetramérica activa, puede ser desestabilizado por otras proteínas tales como la antitrombina III. La triptasa es capaz de hidrolizar algunas proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina e inducir la proliferación de fibroblastos y células epiteliales (Ruoss *et al.*, 1991; Cairns and Walls, 1997). También es la responsable de la activación de la colagenasa y puede causar la secreción de moco. (Metcalf, 1997).

La quimasa es una proteasa neutra detectada en las células cebadas de la piel, músculo, parénquima pulmonar, cavidad peritoneal y pleural de la rata que son principalmente de tejido conectivo. Es la responsable de la degradación de algunos neuropéptidos y de la secreción mucosa provocada por la estimulación de células serosas pulmonares (Welle, 1997). La proteasa II de células cebadas en ratas es químicamente y antigénicamente distinta y se localiza en células cebadas de la mucosa del tracto respiratorio y gastrointestinal. Se ha observado *in vivo* que la quimasa en células cebadas de humano es un potente y selectivo quimio atrayente para macrófagos y neutrófilos. También puede inducir la producción de CXCL8 por las células endoteliales para aumentar la movilización de neutrófilos a las superficies mucosas.

2) Mediadores de nueva síntesis

De forma simultánea a la desgranulación de las células cebadas, los diversos mecanismos intracelulares activados por el estímulo, inician la síntesis de mediadores que se liberan de forma tardía y que contribuyen a la perpetuación de la respuesta inflamatoria.

a) Ecoisanoides

Tras la activación de las células cebadas los fosfolípidos de la membrana son hidrolizados a ácido araquidónico, el cual es metabolizado por ciclooxigenasas que darán origen a las prostaglandinas y tromboxanos, y a lipóoxigenasas que darán origen a leucotrienos y ácidos hidropoxieicosatetraenoicos (HPETs) y al producto reducido hidroxieicosatetraenoicos (HTESs). Las prostaglandinas liberadas son principalmente del tipo PGD₂, potentes vasodilatadores que pueden actuar de forma sinérgica con la histamina, es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria, quimiotáctico para neutrófilos en humanos y en conjunto con el LTC₄ regula la acumulación de neutrófilos en la piel de humanos.

El leucotrieno LTC₄ es un potente broncoconstrictor, incrementa la permeabilidad vascular y participa en el reclutamiento de neutrófilos (Metcalfé *et al.*, 1997; Luster and Tager, 2004). Se ha mostrado que el leucotrieno LB₄ tiene una potente actividad quimiotáctica para neutrófilos y eosinófilos, para aumentar la liberación de la enzima lisozima y la producción de superóxido aniónico.

La rápida degranulación y la respuesta a los mediadores lipídicos proporcionan señales importantes para el inicio de cambios vasculares, la movilización y el reclutamiento de células efectoras (Marshall, 2004).

b) Citocinas

Estas ejercen su función actuando de forma paracrina, sobre receptores específicos presentes en la membrana de células adyacentes, o bien autocrina, sobre la propia membrana de las células productoras (Abbas and Litchman, 2006).

Debido a que una citocina puede actuar sobre diversas poblaciones celulares de manera simultánea, se han clasificado en cuatro grupos de acuerdo a sus efectos:

- 1) Citocinas con acción proinflamatoria: TNF α , IL-1 e IL-6 constituyen algunas de las citocinas que inducen la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, por lo que participa en el reclutamiento de células inflamatorias. El TNF α estimula la secreción de citocinas quimiotácticas por parte de los macrófagos. La IL-1 induce la activación de linfocitos T cooperadores por medio

de células presentadoras de antígenos (APC) al aumentar la secreción de IL-2 y la expresión de receptores de superficie para la IL-2 e INF γ . La IL-6 participa de manera sinérgica con la IL-1 y el TNF- α para promover la activación de células T mediante APC induciendo la fase aguda de la respuesta inflamatoria, la replicación, diferenciación y producción de inmunoglobulinas en células B y la estimulación de la hematopoyesis; además es capaz de activar los hepatocitos que secretarán proteínas plasmáticas como el fibrinógeno que participa en la fase aguda de la respuesta inflamatoria.

- 2) Factores de crecimiento para leucocitos: una vez reclutado los linfocitos que constituirán el infiltrado inflamatorio la IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 y el GM-CSF liberados por las células cebadas actúan prolongando su supervivencia y estimulando su actividad.
- 3) Citocinas con acción inmunomoduladora: el IFN- γ (Interferon- γ), el TGF β (Factor β Transformador del Crecimiento), la IL-1, IL-4, IL-6, IL -10 e IL-13 regulan la interacción entre el mastocito y los linfocitos T y B. El INF γ incrementa la expresión de proteínas clase II del MHC en las APC, es un potente activador de macrófagos y estimula la producción de óxido nítrico y citocinas como la IL-1, IL-8 y TNF α . También activa neutrófilos, células NK y células endoteliales vasculares. El TGF β ejerce efectos antiproliferativos en macrófagos, célula endoteliales, y linfocitos T y B, suprime la mayor parte de linfocinas y monocinas y reduce la expresión celular de proteína clase II del MCH, bloquea los efectos proliferativos de la IL-12 en las células T y B así como de IL-2 en timocitos. También inhibe la actividad de las células NK y Lak mediada por IL-2. La IL-4 es la responsable de la maduración de los linfocitos B productores de IgE (Bischoff *et al.*, 1999). La IL-10 actúa inhibiendo la reacción inflamatoria mediada por las células T.
- 4) Citocinas con acción quimiotáctica para los leucotrienos: la MIP-1 α y la IL-8 participan en la quimiotaxis de los leucocitos a sitios de infección o lesión. La IL-8 atrae a los neutrófilos al foco inflamatorio. (Kunkel *et al.*, 1991). La quimiocina

inflamatoria MIP-1 α promueve la inflamación crónica y respuesta inmune adquirida.

1.3.4 Actividad de la célula cebada en presencia de bacterias

Las células cebadas no solo expresan receptores funcionales para la detección de bacterias (por ejemplo CD48) y productos bacterianos (receptores toll-like), sino también pueden ser activados por mediadores que son producidos durante la infección bacteriana (componentes del complemento y endotelina-1).

Recientes estudios en modelos animales (ratón) indican que las células cebadas protegen al huésped en contra de las bacterias a través de la producción del TNF- α , principalmente como un resultado de la activación de los receptores Toll-like (TLR4) o la proteína CD48 anclada al glicosifosfatidilinositol (GPI). El TLR4 ha sido estudiado intensamente por su papel en la respuesta al LPS de las bacterias Gram negativas. El LPS se une a la proteína soluble fijadora de manosa (LBP), la cual es una proteína de la fase aguda que es producida por células del hígado y por células epiteliales del pulmón; la LBP sirve para transferir LPS a CD14, una molécula que junto con la proteína molecular MD-2 es parte del complejo TLR4 (Bals and Hiemstra, 2004).

Las células cebadas tisulares contienen TNF- α en sus gránulos y son liberados por exocitosis. Este mediador tiene propiedades bactericidas y atrae neutrófilos al sitio de infección, este reclutamiento es un aspecto crítico de la segunda línea de defensa del huésped, esto representa el papel de las células cebadas como moduladora de la defensa del huésped en contra de la infección bacteriana. (Okayama *et al.*, 2004; Abraham *et al.*, 1997).

1.3.4.1 Fagocitosis y eliminación de la bacteria por la célula cebada

Adicionalmente a la liberación de los mediadores químicos, la célula cebada tiene la capacidad de englobar y digerir bacterias, esto se ha demostrado en cepas no invasivas de *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, y *Klebsiella pneumoniae*. La célula cebada ondula su membrana e introduce gradualmente a la bacteria dentro de vesículas (figura 5), este

proceso dura aproximadamente 20 min. . Una vez dentro de la célula la bacteria reduce su viabilidad hasta en un 50% en una hora.

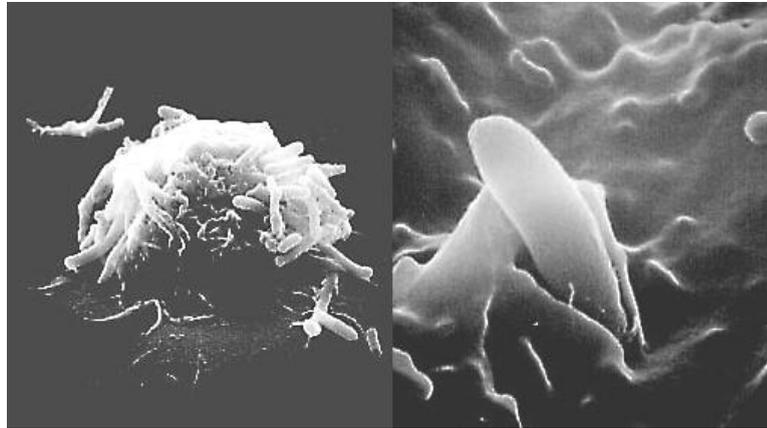


Figura 5. a) derecha: micrografía electrónica que muestra a la bacteria *E. coli* adherida a la superficie de una célula cebada mucosal de ratón. b) izquierda: Bacteria en un proceso de ingestión (Abraham et al., 1997)

El proceso de fagocitosis en los neutrófilos y macrófagos se lleva a cabo a través de la combinación de sistemas no oxidativos y oxidativos. Los sistemas no oxidativos involucran la acidificación de la vacuola fagocítica y la fusión de los gránulos lisosomales de la misma. Se ha observado que el cloruro de amonio, una base débil lisosomal que permeabiliza la célula fagocítica, equilibra el pH de las vacuolas fagocíticas y reducen significativamente la destrucción de las bacterias en las células cebadas. La actividad de muchos agentes bactericidas, tales como hidrolasas ácidas, de las cuales hay varias en las células cebadas, así como defensinas, pueden ser potenciadas por las condiciones de pH bajo en las vacuolas.

La actividad oxidativa de eliminación en células fagocíticas tales como neutrófilos y macrófagos, tradicionalmente involucra la producción de superóxidos aniónicos, oxígeno, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno; todos ellos con actividad bactericida. La evidencia de que un sistema oxidativo existe en la célula cebada viene del hecho de que se da una explosión oxidativa generada por la célula cebada en presencia de la bacteria y otros antígenos (Abraham and Malavylla, 1997).

Durante la fagocitosis hay liberación de mediadores inflamatorios. El mastocito libera, además de histamina, triptasa, quimasa y productos lipídicos, gran número de citocinas (las cuales pueden ser secretadas por medio de degranulación gradual, que provocan la activación y expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y la subsecuente migración de los linfocitos (Celada, 1994).

También se ha reportado que las células cebadas pueden procesar antígenos bacterianos a través de una ruta fagocítica para su presentación a los linfocitos T mediante el MCH clase I y que puede inducir la activación de hibridomas de linfocitos T CD4⁺ dependiente del MCH II a través de la presentación de superantígenos.

La activación efectiva de las células T requiere dos señales la primera es proporcionada por la interacción del TCR con el antígeno sobre las moléculas del MCH. La segunda señal es proporcionada a través de moléculas coestimuladoras. En ciertos casos de señalización coestimuladora las superfamilias, TNF (TNFSF) y los receptores de las superfamilias TNF (TNFRSF) regulan la inmunidad dependiente de linfocitos T. El ligando OX40 (OX40L) y el ligando 4-1BB (4-1BBL), los cuales son miembros de TNFSF, muestran una señal coestimuladora para la proliferación de células T y producción de citocinas, por lo tanto se ha reportado que OX40L tiene la capacidad para inducir la diferenciación de células TCD4⁺ en células Th2 productoras de IL-4 in vivo e in vitro (Kashiwakura *et al.* 2004).

1.3.5 Muerte celular

La muerte de la célula cebada puede ocurrir por necrosis o apoptosis, bajo condiciones fisiológicas. La apoptosis puede ser iniciada por diversos estímulos externos incluyendo la interacción del ligando fas/fas, privación de factores de crecimiento celular como SCF, IL-3, exposición a radiación e ionización, acción de inductores incluyendo el supresor tumoral p53, los proto oncogenes p53, c-myc y bax; a su vez, la apoptosis se puede suprimir por el proto oncogen bcl-2 la apoptosis es reanuda por los prooncogenes antes mencionados (Bochner, 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

Al conocer la distribución de las poblaciones celulares del sistema inmune del cerdo, se establecen las bases para poder comparar parámetros normales frente a patologías respiratorias, dada la importancia que tienen estas en la rentabilidad de las explotaciones porcinas.

En la literatura, los datos acerca de la presencia de las células cebadas en el tracto respiratorio de cerdos es escasa, existen algunos reportes de su distribución en tonsila, pulmón y linfonodos mesentéricos en cerdos adultos (Xu *et al.*, 1993), en el cuello uterino de cerdas, mucosa y submucosa del intestino, lengua, piel, uréter, nervio y ganglios autónomos, arteria y vena renal, del cerdo, (Prado *et al.*, 1999; Vonerichanov *et al.*, 2005, Vonerichanov, 2008). Martínez, 2002 cuantificó las células cebadas en pulmones de cerdos de 6 semanas de edad, normales e infectados experimentalmente con *Mycoplasma hyopneumoniae* en la que se obtuvo una mayor cantidad de células cebadas en cerdos infectados en comparación con los cerdos sanos, observando su distribución entre el tejido conectivo y la capa muscular de los bronquiolos, asociadas a las glándulas mucosas en los bronquios, en la pleura y septos interlobulares. Se ha reportado la distribución de las células cebadas en el ser humano y en otras especies (Villaseñor *et al.*, 1999; Iwamura *et al.*, 2002; Peeters *et al.*, 2005; Stefanov *et al.*, 2007; Dimitrov *et al.*, 2007; Kleinschmidt *et al.*, 2007; Sanderson *et al.*, 2008), sin embargo no se ha descrito su distribución en cerdos recién nacidos, de destete y adultos clínicamente sanos por lo tanto los datos obtenidos en este trabajo permitirán realizar estudios comparativos futuros para comprender los fenómenos inmunológicos en las enfermedades respiratorias.

3. HIPÓTESIS

La distribución de las células cebadas en tonsila, linfonodos traqueobronquiales y pulmón de cerdos clínicamente sanos es homogénea en cerdos recién nacidos, de destete y adultos, y su número aumenta con la edad.

4. OBJETIVOS

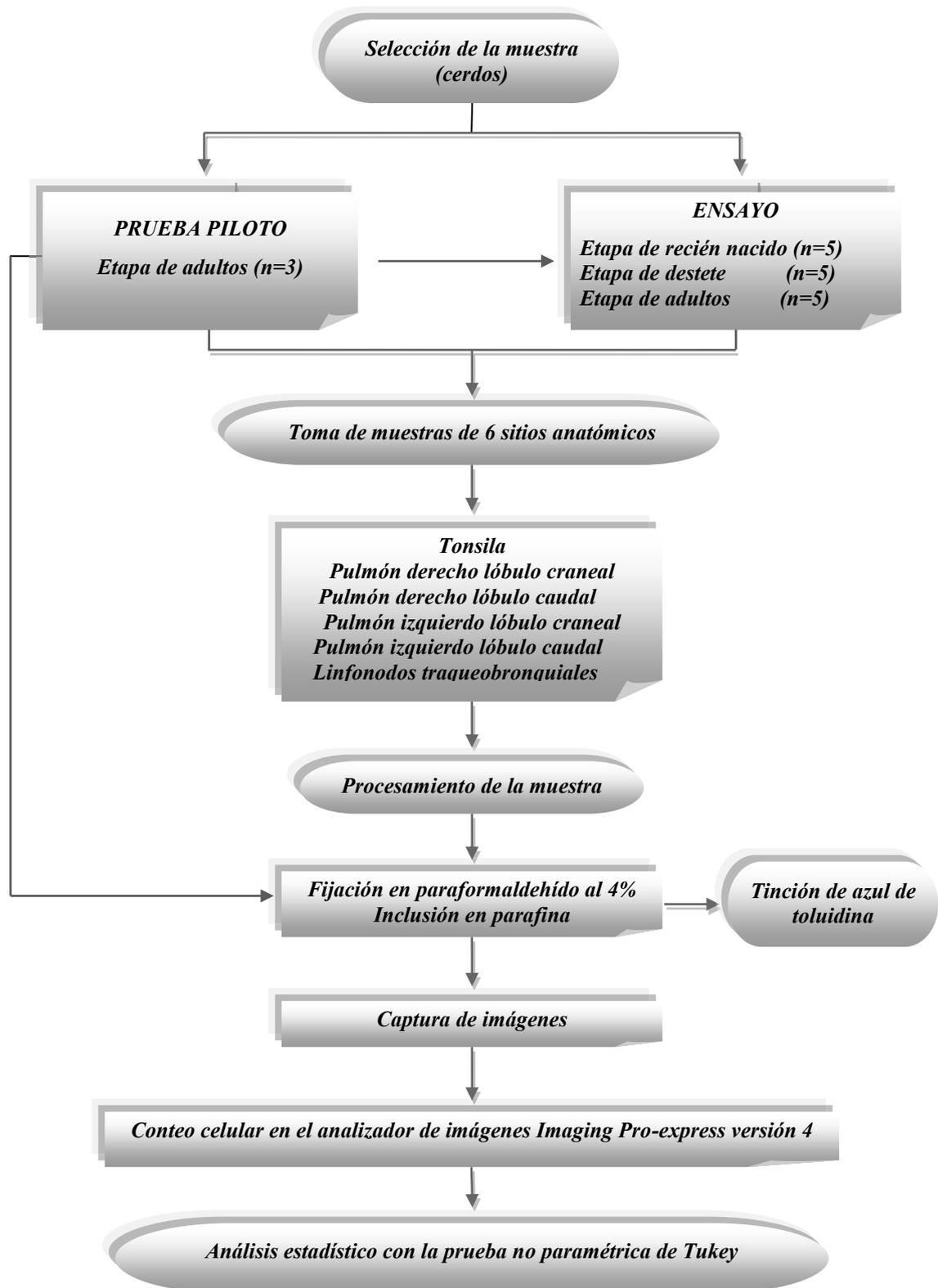
4.1 Objetivo general

Establecer la distribución y obtener las cuentas de las células cebadas en tonsila, linfonodos traqueobronquiales y pulmón de cerdos recién nacidos, de destete y adultos clínicamente sanos.

4.2 Objetivo particular

4.2.1 Contar y realizar el análisis comparativo de las células cebadas en tonsila, linfonodos traqueobronquiales y pulmón entre cerdos de tres etapas de desarrollo, para establecer en que sitio anatómico y en qué etapa de desarrollo hay mayor cantidad.

Figura 6. Diseño Experimental



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales de estudio

Se emplearon 18 cerdos Yorkshire, provenientes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM (CEEIEP Jilotepec), serológicamente negativos a *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRSV, *Aujesky* y *Actinobacillus pleuroneomoniae*. Primero se obtuvieron muestras de 3 cerdos adultos de 6 meses de edad para realizar la prueba piloto del trabajo experimental y después se obtuvieron muestras de 5 cerdos recién nacidos sin calotrar que se mantuvieron con miel de maíz y suero glucosado al 5% durante 24 hrs., 5 cerdos de destete y 5 cerdos adultos como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Lote de animales

| <i>Edad</i> | <i>n</i> |
|--------------------------------------|----------|
| <i>Recién nacido (1 día de vida)</i> | <i>5</i> |
| <i>Destete (21 días)</i> | <i>5</i> |
| <i>Adultos (6 meses)</i> | <i>5</i> |

5.2 Muerte de los animales

La muerte de los animales y la colección de muestras se realizaron en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM C-4. Los cerdos se tranquilizaron con Azaperona (Sural 2 mg/Kg., Chinoin®). El método de eutanasia empleado en los cerdos recién nacidos fue mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (Sedalphorte 0.063 g/ml., Salud y Bienestar Animal). Los cerdos de destete se sacrificaron por medio de electrocución mediante electrodos de corriente alterna de 50 hertz, con un flujo de electricidad de 1.25 amperes y a un voltaje de 127 (ver anexo 1). Los cerdos adultos se sacrificaron con el método manual utilizando una pistola de émbolo cautivo. Todo el manejo de los animales se llevo a cabo en cumplimiento de las Norma Mexicana para el cuidado y mantenimiento de animales (NOM-062-Z00-1999) (Chianini *et al.*, 2001).

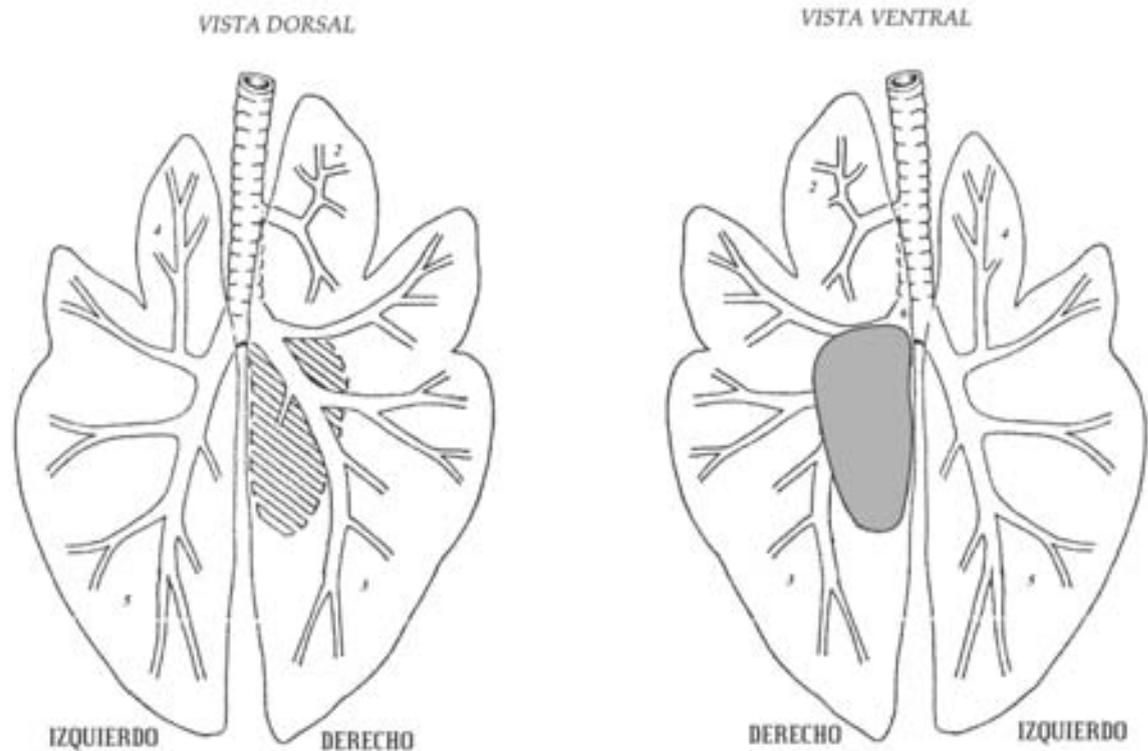
5.3 Toma de muestras

El proceso que siguió a la muerte de los animales para la obtención de las muestras, fue la exsanguinación vía vena yugular, continuando con la extracción del tracto respiratorio haciendo una incisión a lo largo de la línea media (Moreno, 1996) (anexo 2). Una vez extraído el tracto respiratorio, se realizó el lavado del mismo para quitar el exceso de sangre. Mediante un mapa plantigráfico se obtuvieron muestras de aproximadamente 1cm³ de un total de 6 sitios anatómicos (ver cuadro 3 y figura 6):

Cuadro 3. Sitios anatómicos muestreados

| |
|-------------------------------------|
| 1.- Paladar blando (Tonsila) |
| 2.- Pulmón derecho lóbulo craneal |
| 3.- Pulmón derecho lóbulo caudal |
| 4.- Pulmón izquierdo lóbulo craneal |
| 5.- Pulmón izquierdo lóbulo caudal |
| 6.- Linfonodos traqueobronquiales |

Figura 7. Plantigrafía de los sitios muestreados



**En la figura no se representa la ubicación de la tonsila*

La muestra de cada tejido se fijó inmediatamente por inmersión en Paraformaldehído al 4% (anexo 3) por 24 hrs a 4°C para la observación de las células cebadas y en formalina amortiguada al 10% para buscar posibles cambios en la estructura microscópica del tejido mediante análisis histopatológico.

5.4 Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de apoyo técnico de Histología L-711 de la FES-Cuautitlán UNAM Campo 4.

5.4.1 Tinción de Hematoxilina y Eosina

Posterior a la fijación de los tejidos en formalina amortiguada al 10%, las muestras se deshidrataron en un gradiente ascendente de alcohol etílico, se aclararon en xileno, se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 5µm de espesor en un micrótomo Leica RM820. Las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina, se deshidrataron en un gradiente descendente de alcohol etílico, se aclararon en xileno en dos cambios y se montaron con resina sintética, según Garrido y Cornejo (2000) (ver anexo 4).

5.4.2 Prueba piloto

Se realizó la prueba piloto utilizando muestras del tracto respiratorio de tres cerdos adultos de raza York. El procedimiento para la toma de muestras fue el descrito en el punto 5.3. Una vez montadas las muestras, se desparafinaron en xileno, alcohol absoluto y agua destilada, de esta manera también se rehidrataron los cortes. Las muestras se sometieron a la tinción de azul de toluidina (Sigma al 1%) durante 20 minutos (Garrido *et al.*, 2003).

Después de realizar el lavado de los cortes en agua corriente y agua destilada para eliminar el excedente del colorante, se deshidrataron en un gradiente descendente de alcohol etílico, se aclararon en xileno en dos cambios y finalmente se montaron en resina sintética de acuerdo a la técnica descrita por Garrido y Cornejo (2000).

5.4.2.1 Tinción de azul de toluidina

Las muestras que se obtuvieron de los 5 cerdos recién nacidos, 5 destetados y 5 adultos, se fijaron en paraformaldehído al 4%, se deshidrataron en un gradiente ascendente de alcohol etílico, se aclararon en xileno, se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 3 y 5µm de espesor. Las muestras se tiñeron con azul de toluidina (Sigma al 1%) durante 20min., se aclararon en xileno y se montaron con resina sintética (ver anexo 5).

5.5 Captura de imágenes

Las muestras teñidas con hematoxilina-eosina fueron examinadas en un microscopio óptico Axioskop 40 Carl ZEEIS y una cámara Evolution VF Coled Color Media Cybernetics mediante el programa QImaging a 10x y después a 40x para evaluar la calidad

de las muestras y la ausencia de anormalidades microscópicas, posteriormente se seleccionó un campo microscópico representativo de cada sitio anatómico muestreado para hacer su descripción histológica.

En las muestras teñidas con azul de toluidina se realizó una observación panorámica del corte por medio del objetivo 10x, después con el objetivo 40x se identificó la presencia de las células cebadas a través de la metacromasia de sus gránulos (coloración rosa intenso), como control positivo de la tinción se consideró la metacromasia del sulfato de condroitina, sustancia fundamental del cartílago bronquial.

5.6 Cuantificación celular

Las células cebadas se cuantificaron en el parénquima pulmonar, en los bronquios y bronquiolos.

Se determinó un campo microscópico en donde se realizó la cuantificación de las células cebadas, posteriormente se avanzó la platina y en donde quedó el nuevo campo se realizó el siguiente conteo; de esta manera se hizo el conteo en 10 campos por corte de los sitios anatómicos muestreados de cada cerdo por edad, utilizando el programa Imagen-Pro Express (versión 4.0 Media Cybernetics).

5.7 Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se obtuvo el promedio y el error estándar de la cuantificación de cada animal para crear una base de datos. Se realizó el análisis estadístico mediante el programa GraphPad Prisma (versión 4) por la prueba no paramétrica de Tukey. Se consideró como significativo el valor de $p < 0.05$.

Al realizar el análisis estadístico mediante la comparación múltiple de Tukey se consideraron los siguientes criterios:

- 1) Se hizo la comparación del promedio de células cebadas entre los sitios anatómicos muestreados de los 5 cerdos por etapa de crecimiento para poder establecer si hay diferencia estadística significativa entre ellos.

- 2) Se realizó la comparación del promedio de células cebadas de cada sitio anatómico entre las tres etapas de crecimiento para poder establecer si hay diferencia estadística significativa entre ellos.
- 3) Se realizó la comparación del promedio total de células cebadas obtenido por etapa de crecimiento para poder establecer en que etapa de crecimiento hay mayor cantidad.

6. RESULTADOS

6.1 Revisión macroscópica del tracto respiratorio

En la observación macroscópica de los tractos respiratorios empleados no se observaron cambios patológicos aparentes.

6.2 Revisión microscópica del tracto respiratorio

En la revisión microscópica de los cortes teñidos con Hematoxilia – Eosina, no se encontraron cambios patológicos aparentes en los cerdos empleados en la prueba piloto, ni en los cerdos del trabajo experimental. En la figura 8 se muestran imágenes de algunos sitios anatómicos muestreados, teñidos con H-E.

6.3 Resultados de la prueba piloto

Para la prueba piloto se realizaron cortes de 5 μm de los bloques de parafina de todos los sitios anatómicos muestreados; sin embargo se tuvieron que realizar cortes de 3 μm para identificar con mayor nitidez a las células cebadas en la tonsila y en los linfonodos traqueobronquiales ya que el mayor grosor no permitió identificar la metacromasia de las células cebadas.

Al realizar la observación en las muestras teñidas con azul de toluidina se encontró que las células cebadas en tonsila, están distribuidas en el espacio intertrabécular. A nivel pulmonar se encontraron en el tejido conectivo de la submucosa de los bronquios, algunas cerca de las glándulas mixtas, en los bronquiolos se observaron en la capa muscular y en la túnica adventicia. También se identificaron células cebadas en el tejido conectivo de la pleura y en los septos interlobulillares; así como en los septos alveolares. En los linfonodos traqueobronquiales, las células cebadas se presentaron en las trabéculas y en la paracorteza.

En la cuantificación de los sitios anatómicos muestreados de los tres cerdos adultos en tonsila se obtuvo una mayor cantidad de células cebadas (6.71 ± 2.81) ($p < 0.05$) que en el pulmón derecho lóbulo craneal (2.65 ± 0.88), pulmón derecho lóbulo caudal (2.46 ± 0.57), pulmón izquierdo lóbulo craneal (2.23 ± 0.47), pulmón izquierdo lóbulo caudal

(2.17±0.60), a diferencia de los linfonodos traqueobronquiales (1.41±1.11) en los que se observó una menor cantidad de células cebadas (cuadro 4). Al realizar la comparación del promedio de células cebadas obtenido en tonsila se observaron más células cebadas que en pulmón *(p<0.05) (figura 8).

| Cerdo | 1 | 2 | 3 | Promedio |
|------------------------------------|----------|----------|----------|-----------------|
| 1. Tonsila | 5.1 | 5.85 | 9.2 | *6.71±2.81 |
| 2. Pulmón derecho lóbulo craneal | 1.85 | 2.5 | 3.6 | 2.65±0.88 |
| 3. Pulmón derecho lóbulo caudal | 1.9 | 2.45 | 3.05 | 2.46±0.57 |
| 4. Pulmón izquierdo lóbulo craneal | 2.7 | 2.25 | 1.75 | 2.23±0.47 |
| 5. Pulmón izquierdo lóbulo caudal | 3.05 | 1.85 | 2.5 | 2.17±0.60 |
| 6. Linfonodos traqueobronquiales | 2.6 | 0.4 | 1.25 | 1.41±1.11 |

Cuadro 4. Número de células cebadas por campo microscópico en tonsila, regiones pulmonares y linfonodos traqueales de cerdos adultos (n=3). Diferencia estadística significativa *(p<0.05)

Distribución de células cebadas en cerdos adultos

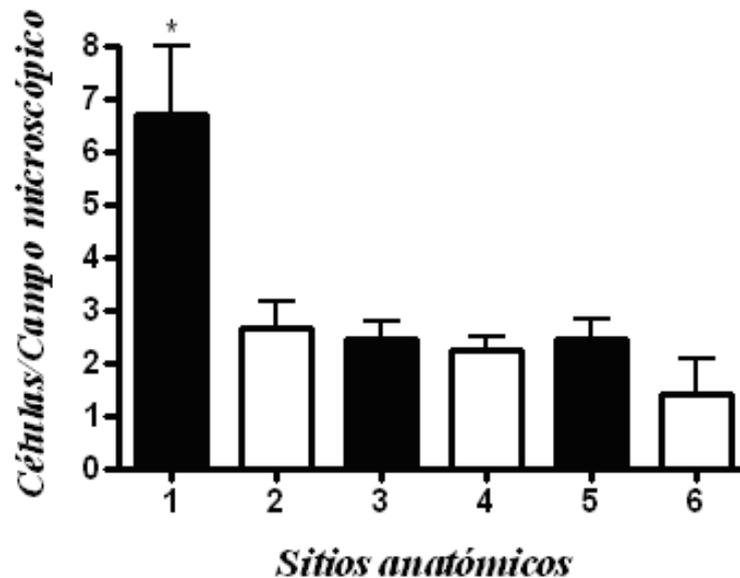


Figura 8. Número de células cebadas por campo microscópico en los sitios anatómicos respiratorios de cerdos adultos, (n=3). 1. Tonsila, 2. Pulmón derecho lóbulo craneal, 3. Pulmón derecho lóbulo caudal, 4. Pulmón izquierdo lóbulo craneal, 5. Pulmón izquierdo lóbulo caudal. 6. Linfonodos traqueobronquiales. Las barras corresponden al promedio y error estándar de las cuentas por campo en un mínimo de 10 campos por muestra/animal. Diferencia estadística significativa entre los sitios estudiados, *(p<0.05)

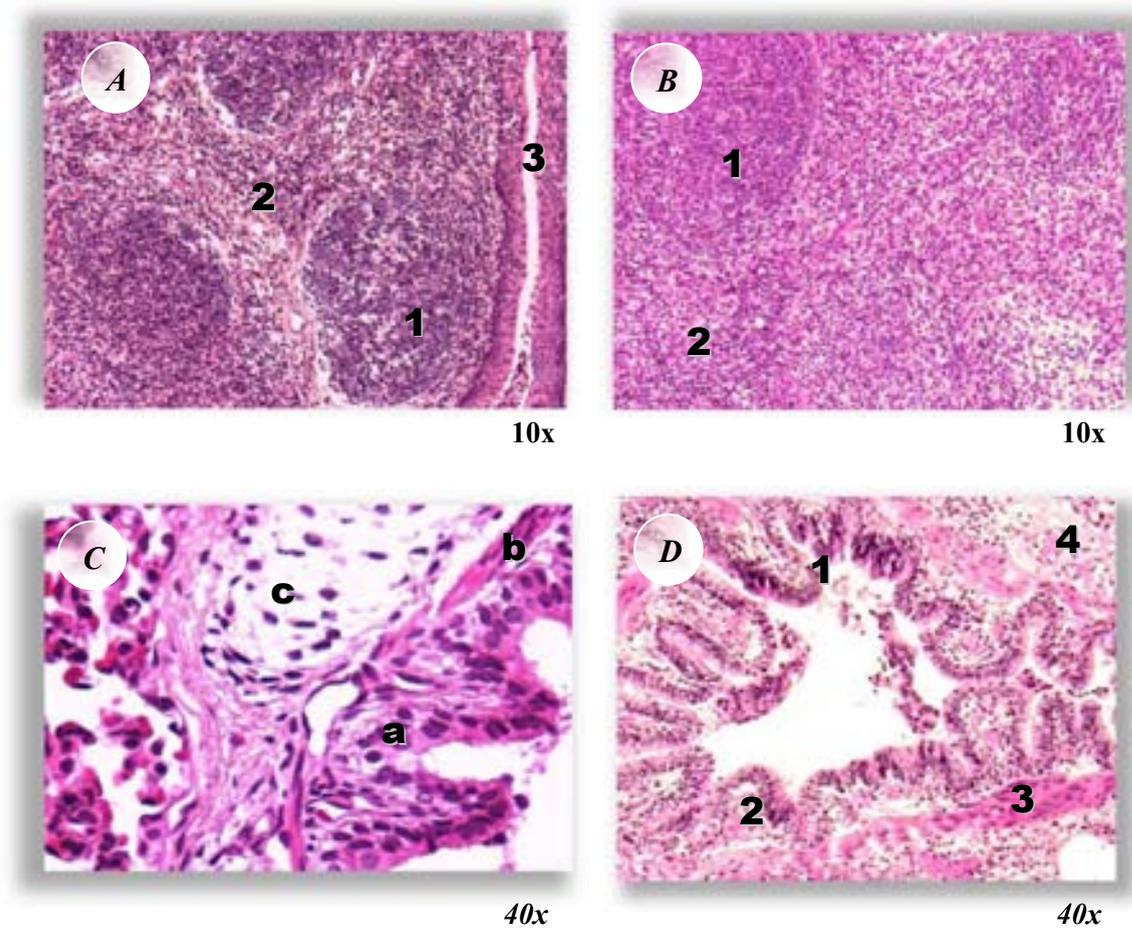


Figura 9. **A)** Corte histológico de Tonsila de cerdo adulto: 1) Foliculo linfoide, 2) trabécula, 3) cripta. **B)** Corte histológico de linfonodo traqueobronquial de cerdo adulto: 1) Foliculo linfoide, 2) tejido linfoide difuso. **C)** Corte histológico de pulmón de cerdo de destete: a) Epitelio pseudoestratificado columnar ciliado con exocriocitos caliciformes intercalados, b) capa muscular de la mucosa, c) cartilago traqueal. **D)** Corte histológico de pulmón de cerdo de destete: 1) túnica mucosa, 2) Lámina propia, 3) Túnica muscular, 4) Túnica adventicia. Tinción H-E.

6.4 Resultados de la distribución de las células cebadas en los sitios anatómicos estudiados

En tonsilas de cerdos recién nacidos se encontró a las células cebadas distribuidas en mayor cantidad en las trabéculas y en menor cantidad en tejido conectivo de la lámina propia como se observa en la figura No.10. La distribución de células cebadas en el pulmón derecho lóbulo craneal fue escasa, se observaron entre la capa muscular y la túnica adventicia del bronquiolo y en el septo interalveolar. En el pulmón derecho lóbulo caudal se observaron en la submucosa de bronquios asociadas a vénulas y a glándulas mucosas, también se observaron entre la capa muscular y la túnica adventicia de los bronquiolos y en el tejido conectivo de la pleura visceral. En el pulmón izquierdo lóbulo craneal las células cebadas se localizaron entre la capa muscular y la túnica adventicia de los bronquiolos y en el septo alveolar como se observa en la figura No.11 y en la pleura visceral. En el pulmón izquierdo lóbulo caudal la distribución de las células cebadas se observó en el septo alveolar, en el septo interlobulillar, entre la capa muscular y la túnica adventicia de los bronquiolos. En la figura No.12 se muestra que en los linfonodos traqueobronquiales de cerdos recién nacidos las células cebadas se observaron en folículos linfoides.

Las células cebadas en tonsila de los cerdos de destete se encuentran distribuidas en el tejido linfoide intertrabécular (figura No. 13). En el pulmón derecho lóbulo craneal las células cebadas se observaron entre la capa muscular y la túnica adventicia del bronquiolo, en el septo interalveolar y en el tejido conectivo de la pleura visceral. En el pulmón derecho lóbulo caudal se observaron en bronquios a nivel del tejido conectivo de la submucosa, algunos asociados a glándulas mixtas. También se encontraron distribuidas entre la capa muscular y la túnica adventicia de los bronquiolos, en los septos interlobulillares y en el tejido conectivo de la pleura visceral. En el pulmón izquierdo lóbulo craneal, las células cebadas se encontraron distribuidas en la submucosa del bronquio, en la figura No.14 se observa una célula cebada adyacente a una vénula. También se distribuyen entre la capa muscular y la túnica adventicia de los bronquiolos, asociadas a vénulas, en el septo alveolar y en la pleura visceral. En el pulmón izquierdo

lóbulo caudal la distribución de las células cebadas se observó en el tejido conectivo de la submucosa de los bronquios, en el septo alveolar, el septo interlobulillar y entre la capa muscular y la túnica adventicia de los bronquiolos. En la figura No.15 y 16 se observa que en los linfonodos traqueobronquiales las células cebadas están distribuidas en las trabéculas, el tejido linfoide difuso y en los folículos linfoides. Las células cebadas en tonsila de cerdos adultos están distribuidas en la lámina propia de manera escasa y en el tejido linfoide intertrabéculas como se muestra en la figura No.17, de igual manera que en cerdos de destete algunas asociadas a los vasos sanguíneos (figura No.18). En el pulmón derecho lóbulo craneal las células cebadas se observaron entre la capa muscular y la túnica adventicia del bronquiolo (figura No.19) o asociadas a vénulas, aunque también pudieron identificarse en el septo interalveolar. En el pulmón derecho lóbulo caudal se observaron entre la capa muscular y la túnica adventicia de los bronquiolos, en los septos interalveolares y alrededor de vénulas. En el pulmón izquierdo lóbulo craneal las células cebadas se localizaron entre la capa muscular y la túnica adventicia de los bronquiolos; asociadas a vénulas, en el septo alveolar y en la pleura visceral. En el pulmón izquierdo lóbulo caudal la distribución de las células cebadas se observó en el tejido conectivo de la submucosa de los bronquios, el septo alveolar, en el septo interlobular y entre la capa muscular y la túnica adventicia de los bronquiolos asociados a vénulas. En los linfonodos traqueobronquiales la distribución de las células cebadas pudo identificarse en el tejido linfoide de la paracorteza.

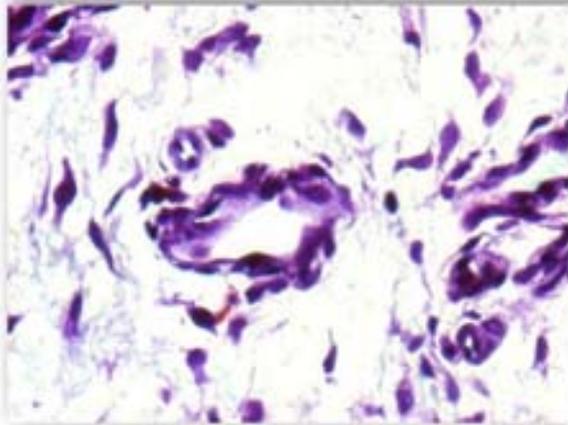


Figura 10. Corte histológico de la tonsila de un cerdo recién nacido. Se observan células cebadas (células rojas) en el tejido conectivo. Tinción de azul de toluidina. 40x

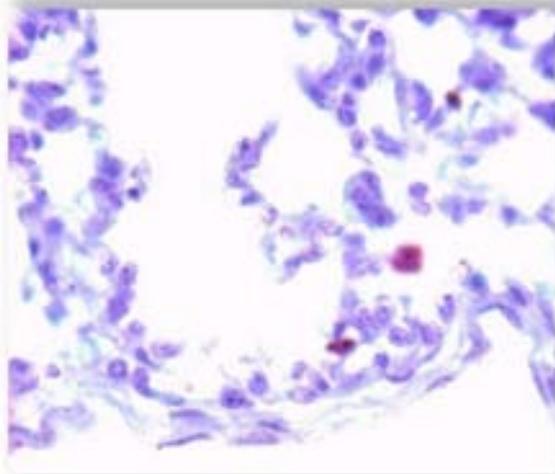


Figura 11. Corte histológico de pulmón izquierdo lóbulo craneal de un cerdo recién nacido. Se observan células cebadas (células rojas) en el septo interalveolar. Tinción de azul de toluidina. 40x

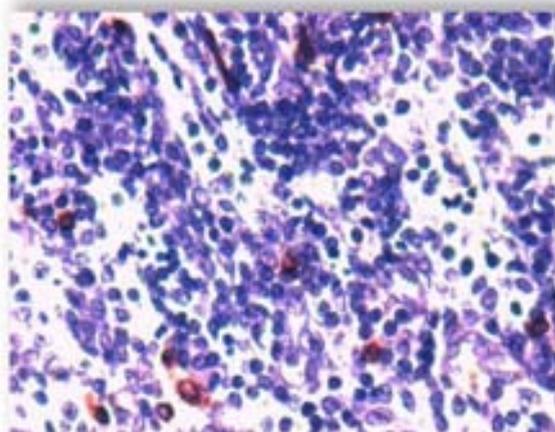


Figura 12. Corte histológico de l infonodo traqueobronquial de un cerdo recién nacido. Las células cebadas (células rojas) están distribuidas en el tejido linfoide difuso. Tinción de azul de toluidina. 40x

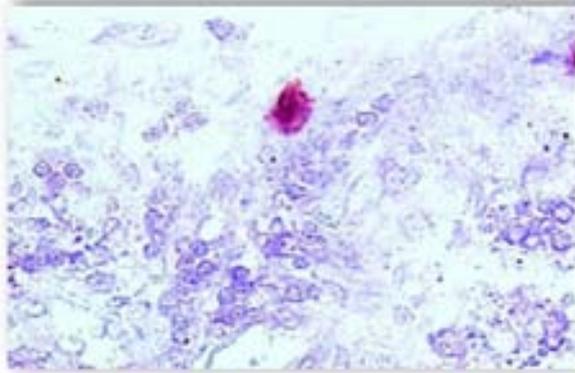


Figura 13. Corte histológico de tonsila de un cerdo destete. Se observa una célula cebada (célula roja) en el tejido conectivo interfollicular. Tinción de azul de toluidina. 40x

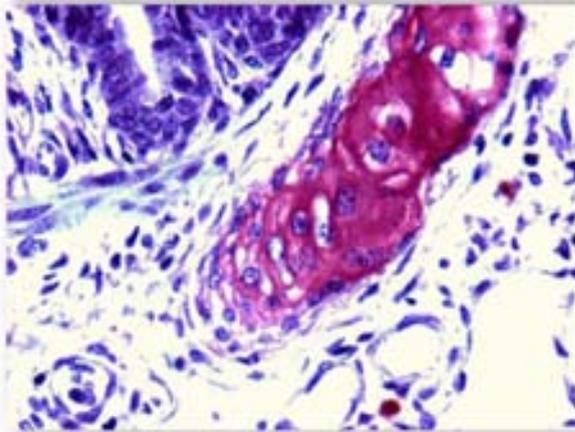


Figura 14. Corte histológico de pulmón izquierdo lóbulo craneal de un cerdo destetado. Se muestra una célula cebada adyacente a una vénula en la túnica adventicia de un bronquio. Tinción de azul de toluidina. 40x

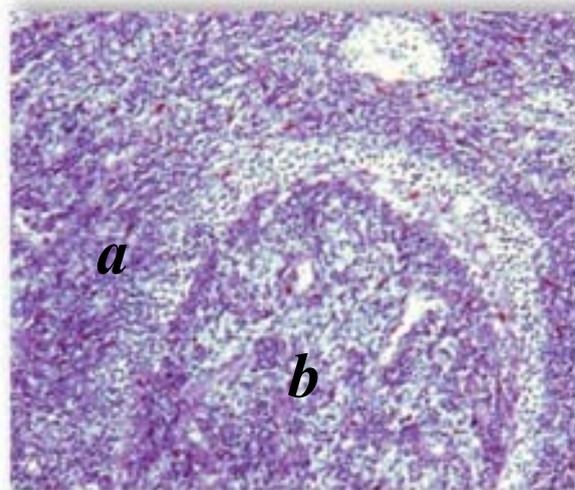


Figura 15. Corte histológico de linfonodo traqueobronquial de un cerdo destetado. Se observan células cebadas (células rojas) en folículos linfoides (a) y en el tejido linfoides difuso (b). Tinción de azul de toluidina. 10x

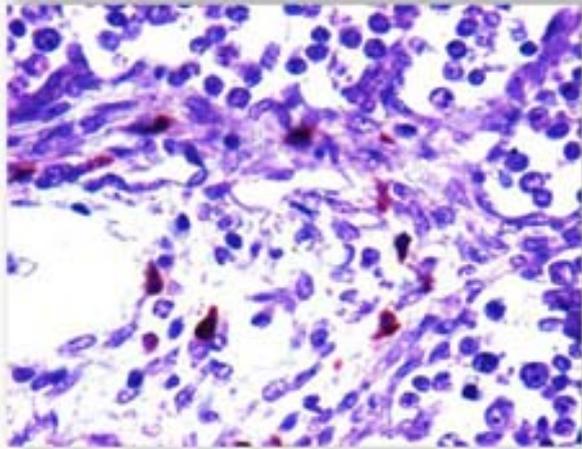


Figura 16. Corte histológico de l infonodo traqueobronquial de un cerdo destetado. Células cebadas (células ro jas) en e l tejido li nfoide difuso. Tinción de azul de toluidina. 40x

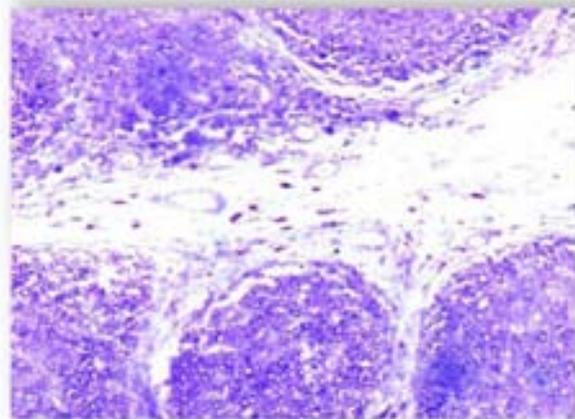


Figura 17. Corte histológico de tonsila de un cerdo ad ulto. S e observan c élulas ceb adas (rojas) en la trabécula. Tinción azul de toluidina. 10x

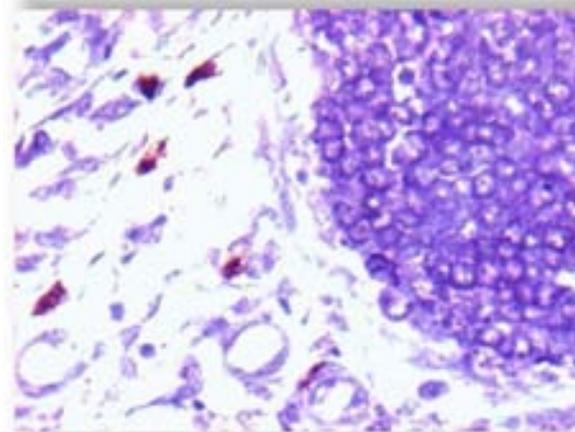


Figura 18. Corte histológico de tonsila de un cerdo adulto. Células cebadas (células rojas) en el tejido li nfoide de una trabécula, adyacente a un vaso sanguíneo. Tinción de azul de toluidina. 40x

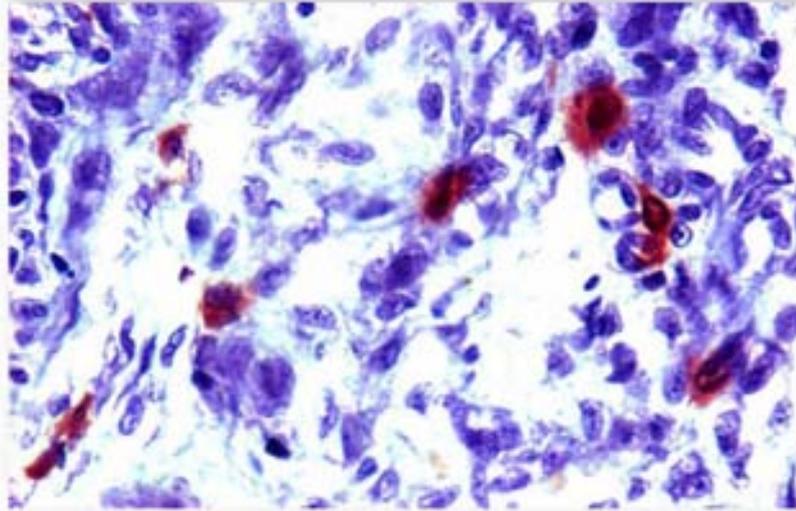


Figura 19. Corte histológico de pulmón derecho lóbulo craneal de un cerdo adulto. Se muestran las células cebadas (células rojas) en la túnica adventicia de un bronquiolo. Tinción de azul de toluidina. 40x

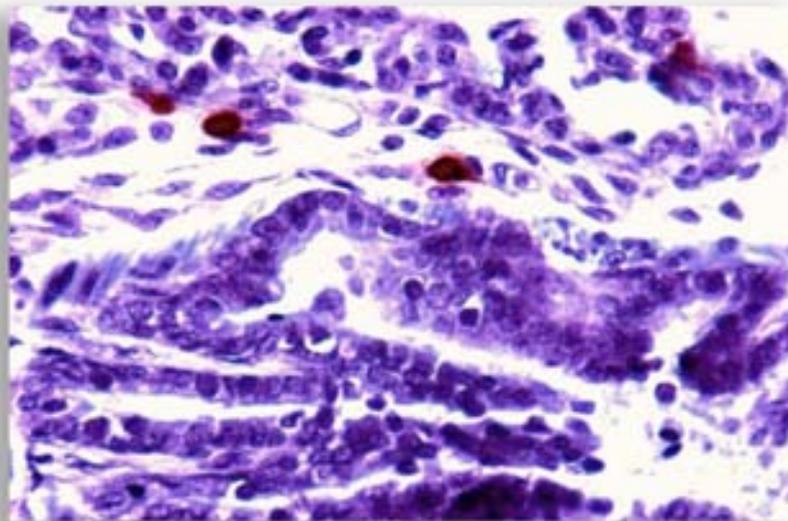


Figura 20. Corte histológico de pulmón izquierdo lóbulo caudal de un cerdo adulto. Se observan células cebadas (células rojas) entre la capa muscular y túnica adventicia de un bronquiolo. Tinción de azul de toluidina. 40x

6.5 Resultados de la cuenta celular

En el cuadro No. 5 se muestra el promedio y la desviación estándar de la cuantificación de las células cebadas en la tonsila, pulmón derecho lóbulo craneal, pulmón derecho lóbulo caudal, pulmón izquierdo lóbulo craneal, pulmón izquierdo lóbulo caudal y linfonodos traqueobronquiales en los cerdos recién nacidos, de destete y adultos.

En la comparación del promedio de células cebadas entre los sitios anatómicos muestreados en los 5 cerdos por etapa de crecimiento, el mayor número de células cebadas en cerdos recién nacidos se obtuvo en linfonodos traqueobronquiales, a pesar de que la cantidad de células cebadas fue escasa, sin embargo al comparar el promedio de las cuentas obtenidas en la tonsila, el pulmón derecho lóbulo craneal y caudal, el pulmón izquierdo lóbulo craneal y caudal no se observó diferencia estadística significativa ($p>0.05$)(figura 21).

En los cerdos de destete también la mayor cantidad de células cebadas ocurrió en linfonodos traqueobronquiales (11.76 ± 8.8) y una menor cantidad de células cebadas en pulmón izquierdo lóbulo caudal (0.53 ± 1.37). Al realizar la comparación múltiple de Tukey, (figura 22) se obtuvo diferencia estadística significativa entre la tonsila y el pulmón derecho lóbulo craneal ($p<0.01$), entre el pulmón derecho lóbulo craneal y el pulmón derecho lóbulo caudal ($p<0.01$). También se observó diferencia ($p<0.001$) al comparar los linfonodos traqueobronquiales con el pulmón izquierdo lóbulo craneal así como con el pulmón izquierdo lóbulo caudal ($p<0.001$).

En los cerdos adultos se obtuvo un mayor número de células cebadas en la tonsila (7.96 ± 3.01) y un menor número en pulmón izquierdo lóbulo craneal (3.15 ± 1.60) y al realizar el análisis comparativo del promedio de los datos obtenidos se observó que la tonsila presenta diferencia estadística significativa con respecto a los diferentes sitios anatómicos muestreados ($p<0.05$) como se muestra en la figura 23.

En la comparación del promedio de células cebadas de cada sitio anatómico entre las tres etapas de crecimiento se observó que en la tonsila de cerdos adultos se obtuvo una mayor cantidad de células cebadas y ocurrió en estas muestras de tonsila diferencia altamente significativa ($p<0.001$) con respecto a los cerdos recién nacidos y destetados (figura 24).

En la figura 25 se muestra que al realizar la comparación del promedio obtenido en el pulmón derecho lóbulo craneal en cerdos recién nacidos, de destete y adultos, los cerdos recién nacidos presentaron menor cantidad de células cebadas ($p < 0.01$) que los cerdos de destete y los cerdos adultos.

La mayor cantidad de células cebadas en el pulmón derecho lóbulo caudal, se obtuvo en cerdos adultos y la menor cantidad en cerdos de destete, al realizar la comparación entre las tres etapas de crecimiento se observó que hubo diferencia estadística significativa entre los cerdos adultos ($p < 0.01$) y los cerdos recién nacidos así como con los cerdos de destete ($p < 0.01$) (figura 26).

En la figura 27 se observa que en el pulmón izquierdo lóbulo craneal se presentó diferencias ($p < 0.01$) entre los cerdos recién nacidos y adultos y en la comparación del promedio de células cebadas entre los cerdos de destete y los cerdos adultos ($p < 0.05$).

Al realizar la comparación del promedio del número de células en el pulmón izquierdo lóbulo caudal se obtuvo diferencia entre los cerdos recién nacidos y adultos de ($p < 0.01$), también se observó diferencia entre los cerdos de destete y los cerdos adultos ($p < 0.05$) (figura 28).

En linfonodos traqueobronquiales se obtuvo diferencia entre los cerdos recién nacidos y los cerdos de destete ($p < 0.01$).

La cantidad de células cebadas en las tres etapas de crecimiento fue mayor en cerdos adultos, en la figura 30 se muestra que el número de estas células aumenta con la edad, con excepción de los linfonodos traqueobronquiales, en los que la cantidad de células cebadas aumenta en la etapa de destete pero disminuye en los adultos. La cantidad de células cebadas en las regiones pulmonares se mantuvo homogénea en las tres etapas de desarrollo sin embargo se observó un incremento en el pulmón derecho lóbulo craneal de los cerdos de destete.

Cuadro 5 Número de células cebadas por campo microscópico en tonsila, regiones pulmonares y linfonodos traqueobronquiales de los cerdos en diferentes etapas (n =5).

| <i>SITIO ANATOMICO</i> | <i>RECIEN NACIDOS</i> (n=5) | <i>DESTETE</i> (n=5) | <i>ADULTOS</i> (n=5) |
|--|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>Tonsila</i> | 0.86 ± 1.06^3 | $1,16 \pm 1,53^{b,3}$ | $7,96 \pm 3,01^{a,3}$ |
| <i>Pulmón derecho lóbulo craneal</i> | $0.16 \pm 0,04^2$ | $6,8 \pm 4,7^{b,c,2}$ | $4,26 \pm 1,92^{a,2}$ |
| <i>Pulmón derecho lóbulo caudal</i> | $0.64 \pm 0,85^2$ | $0.63 \pm 0,91^{c,2}$ | $3,54 \pm 1,41^{a,2}$ |
| <i>Pulmón izquierdo lóbulo craneal</i> | $0.64 \pm 1,00^2$ | $0.73 \pm 0,90^{c,1}$ | $3,15 \pm 1,60^{a,1,2}$ |
| <i>Pulmón izquierdo lóbulo caudal</i> | $0.55 \pm 0,42^2$ | $0.53 \pm 1,37^{c,1}$ | $3,26 \pm 1,32^{a,1,2}$ |
| <i>Linfonodos traqueobronquiales</i> | $1,44 \pm 1,84^2$ | $11.76 \pm 8,8^{c,2}$ | $4,81 \pm 3,92^a$ |

Media±Error estándar: 5 animales (3 etapas de desarrollo)=6 muestras por sitio anatómico=6 cortes por x 10 campos c/u=60 campos por sitio anatómico.

^{a,1} Diferencia estadística significativa *p<0.05

^{b,2} Diferencia estadística significativa **p<0.01

^{c,3} Diferencia estadística significativa ***p<0.001

Las letras indican la diferencia estadística entre sitio anatómico/etapa de desarrollo.

Los números indican la diferencia estadística de cada sitio anatómico entre cada etapa de desarrollo.

Comparación de los resultados obtenidos en los cerdos recién nacidos

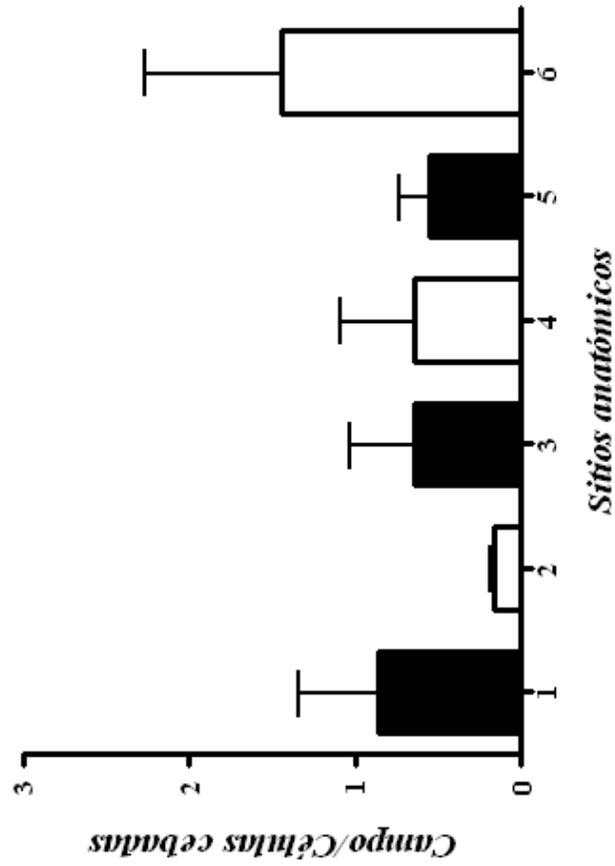


Figura 21. Número de células cebadas por campo microscópico en los sitios anatómicos respiratorios de cerdos recién nacidos, (n=5). 1. Tonsila, 2. Pulmón derecho lóbulo craneal, 3. Pulmón derecho lóbulo caudal, 4. Pulmón izquierdo lóbulo craneal, 5. Pulmón izquierdo lóbulo caudal, 6. Linfonodo traqueobronquiales. Las barras corresponden al promedio y error estándar de las cuentas por campo en un mínimo de 10 campos por muestra/animal.

Comparación de los resultados obtenidos en los cerdos de destete

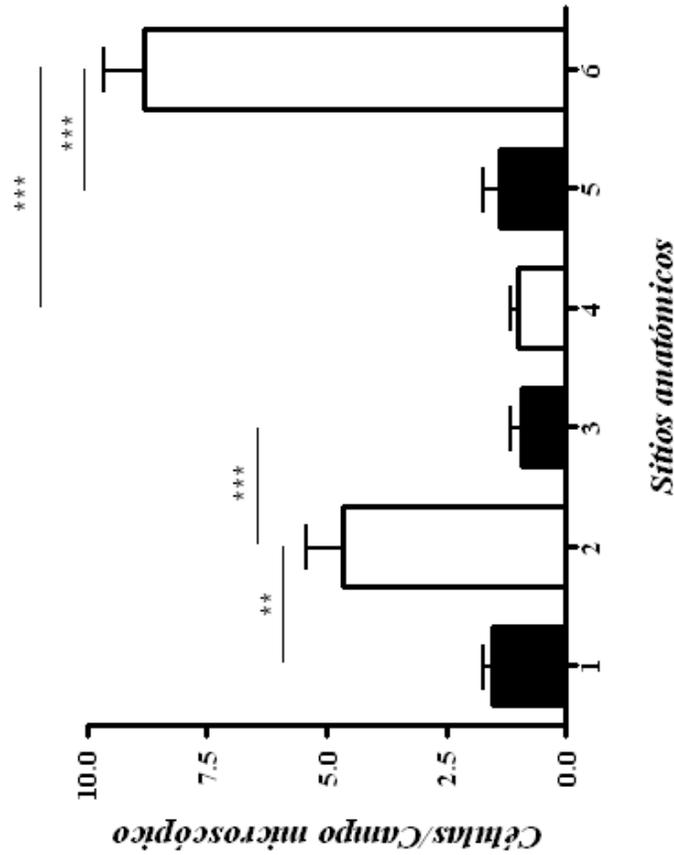


Figura 22. Número de células cebadas por campo microscópico en los sitios anatómicos respiratorios de cerdos de destete, (n=5). 1. Tonsila, 2. Pulmón derecho lóbulo craneal, 3. Pulmón derecho lóbulo caudal, 4. Pulmón izquierdo lóbulo craneal, 5. Pulmón izquierdo lóbulo caudal. 6. Linfonodo traqueobronquiales. Las barras corresponden al promedio y error estándar de las cuentas por campo en un mínimo de 10 campos por muestra/animal. Diferencia estadística significativa entre los sitios estudiados, ** (p<0.01), *** (p<0.001).

Comparación de los resultados obtenidos en los cerdos adultos

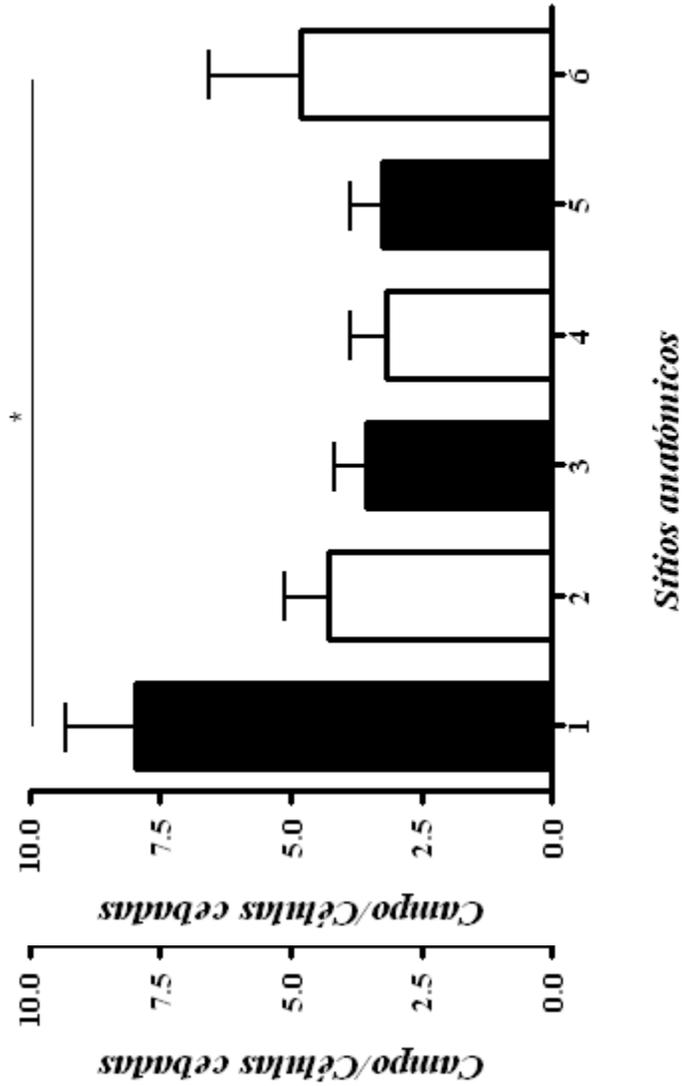


Figura 23. Número de células cebadas por campo microscópico en los sitios anatómicos respiratorios de cerdos adultos, (n=5). 1. Tonsila, 2. Pulmón derecho lóbulo craneal, 3. Pulmón derecho lóbulo caudal, 4. Pulmón izquierdo lóbulo craneal, 5. Pulmón izquierdo lóbulo caudal. 6. Tinfonodo traqueobronquiales. Las barras corresponden al promedio y error estándar de las cuentas por campo en un mínimo de 10 campos por muestra/animal. Diferencia estadística significativa entre los sitios estudiados, *(p<0.05).

Comparación de los resultados obtenidos en la tonsila de cerdos recién nacidos, adultos y destetados

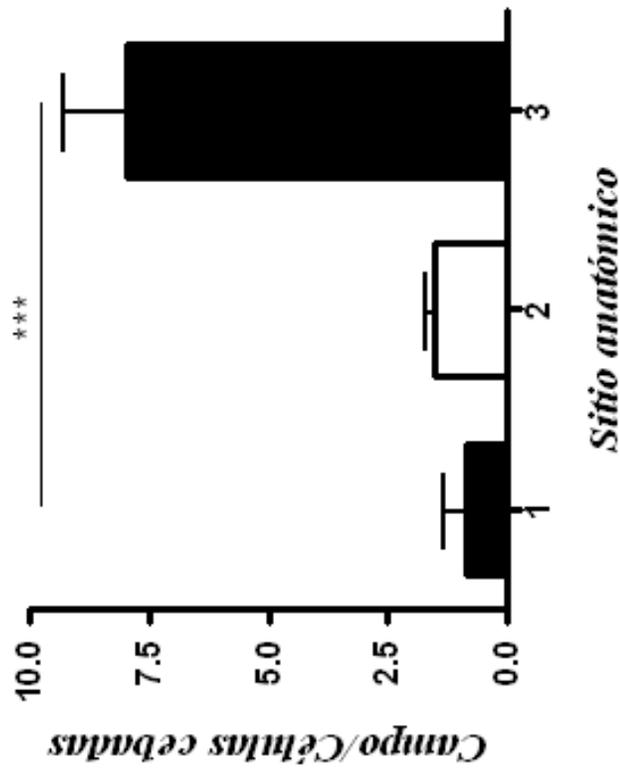


Figura 24. Número de células cebadas por campo microscópico en tonsila de cerdos recién nacidos, de destete y adultos, (n=5). Las barras corresponden al promedio y error estándar de las cuentas por campo en un mínimo de 10 campos por muestra/animal. Diferencia estadística significativa, ***($p < 0.001$).

Comparación de los resultados obtenidos en pulmón derecho lóbulo craneal de cerdos recién nacidos, adultos y destetados

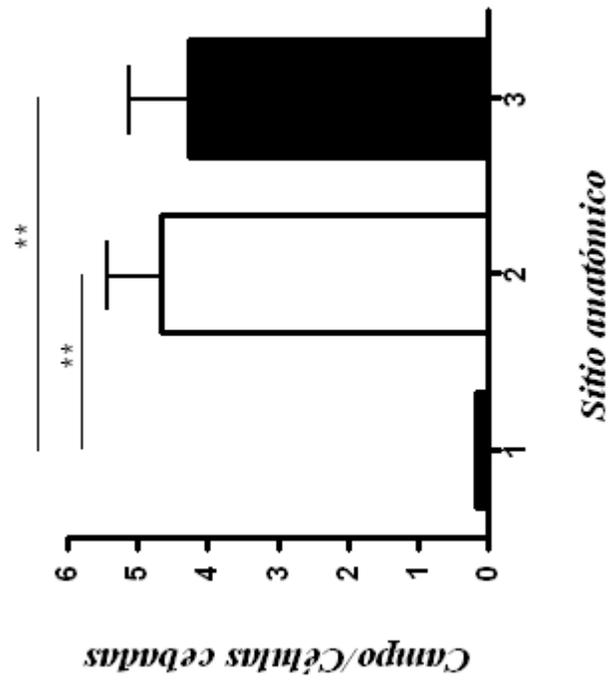


Figura 25. Número de células cebadas por campo microscópico en pulmón derecho lóbulo craneal de cerdos recién nacidos, de destete y adultos, (n=5). Las barras corresponden al promedio y error estándar de las cuentas por campo en un mínimo de 10 campos por muestra/animal. Diferencia estadística significativa, ** (p<0.01).

Comparación de los resultados obtenidos en pulmón derecho lóbulo caudal de cerdos recién nacidos, adultos y destetados

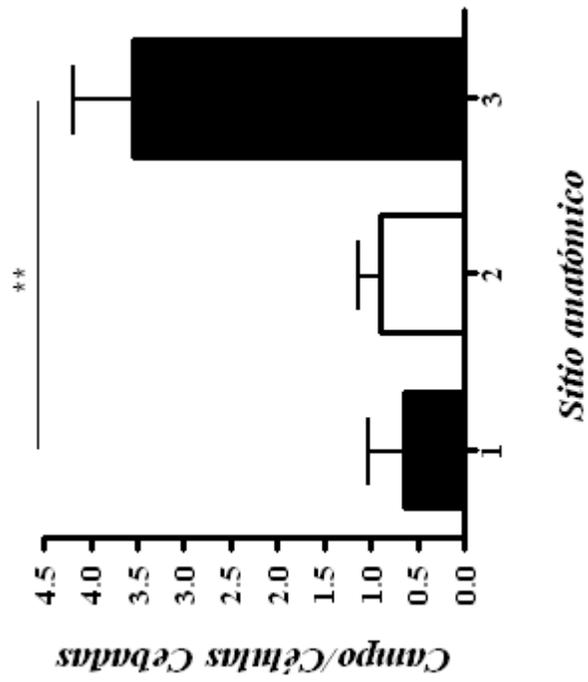


Figura 26. Número de células cebadas por campo microscópico en pulmón derecho lóbulo caudal de cerdos recién nacidos, de destete y adultos, (n=5). Las barras corresponden al promedio y error estándar de las cuentas por campo en un mínimo de 10 campos por muestra/animal. Diferencia estadística significativa, **($p < 0.01$).

Comparación de los resultados obtenidos en pulmón izquierdo lóbulo craneal de cerdos recién nacidos, adultos y destetados

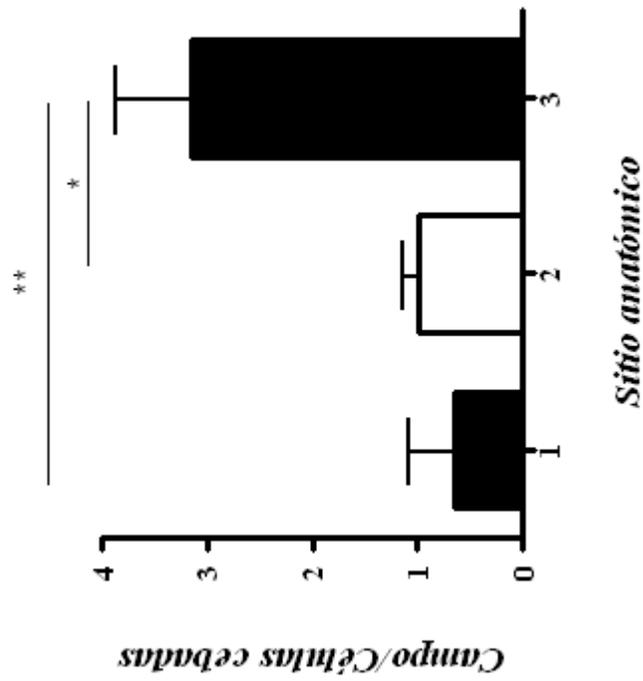


Figura 27. Número de células cebadas por campo microscópico en pulmón izquierdo lóbulo craneal de cerdos recién nacidos, de destete y adultos, (n=5). Las barras corresponden al promedio y error estándar de las cuentas por campo en un mínimo de 10 campos por muestra/animal. Diferencia estadística significativa, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

Comparación de los resultados obtenidos en pulmón izquierdo lóbulo caudal de cerdos recién nacidos, adultos y destetados

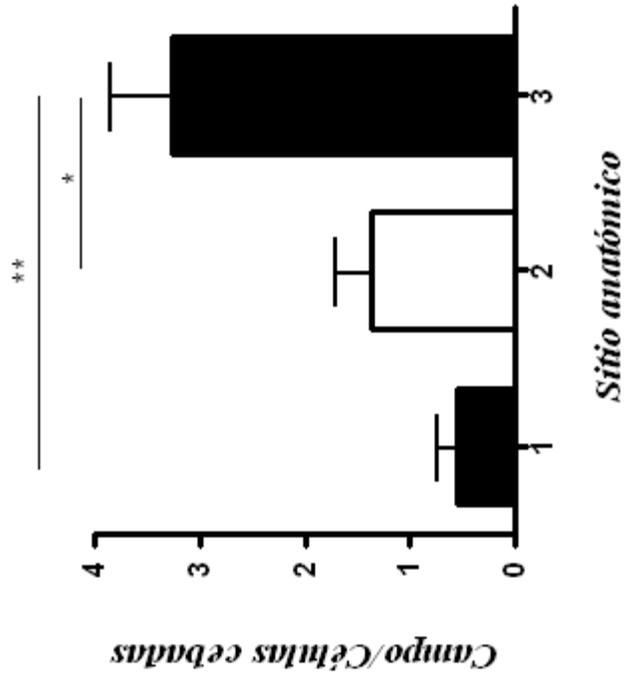


Figura 28. Número de células cebadas por campo microscópico en pulmón izquierdo lóbulo caudal de cerdos recién nacidos, de destete y adultos, (n=5). Las barras corresponden al promedio y error estándar de las cuentas por campo en un mínimo de 10 campos por muestra/animal. Diferencia estadística significativa, *(p<0.05), **(p<0.01).

Comparación de los resultados obtenidos en linfonodos traqueobronquiales de cerdos recién nacidos, adultos y destetados

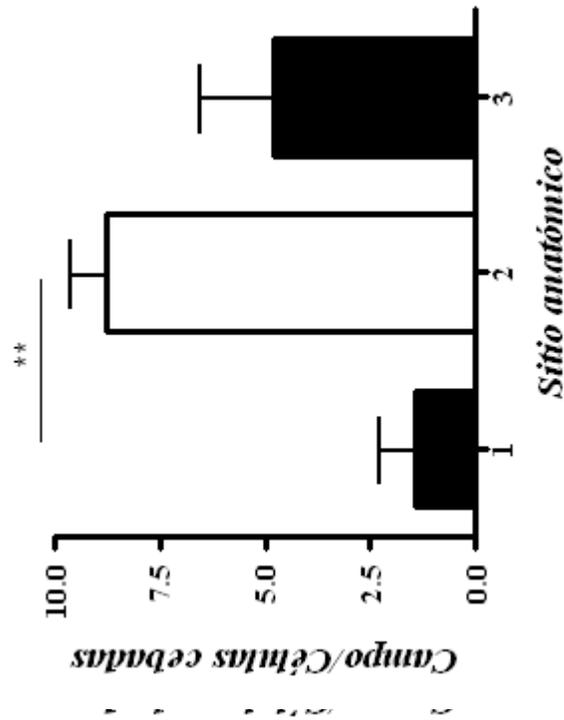


Figura 29. Número de células cebadas por campo microscópico en linfonodos traqueobronquiales de cerdos recién nacidos, de destete y adultos, (n=5). Las barras corresponden al promedio y error estándar de las cuentas por campo en un mínimo de 10 campos por muestra/animal. Diferencia estadística significativa, **($p < 0.01$).

Comparación de los datos obtenidos en las tres etapas de crecimiento

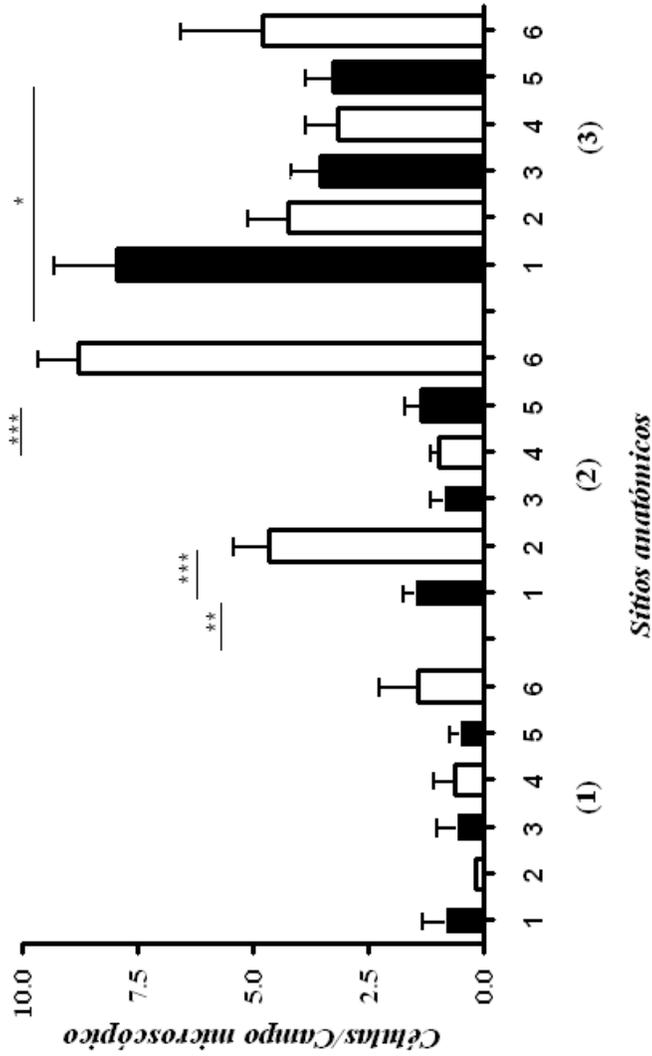


Figura 30. Número de células cebadas por campo microscópico en 1.Tonsila, 2. Pulmón derecho lóbulo craneal, 3. Pulmón derecho lóbulo caudal, 4. Pulmón izquierdo lóbulo craneal, 5. Pulmón izquierdo lóbulo caudal. 6. Linfonodo traqueobronquiales, comparando la etapa de recién nacido (1), de destete (2) y adulto. Las barras corresponden al promedio y error estándar de las cuentas por campo en un mínimo de 10 campos por muestra/animal. Diferencia estadística significativa entre los sitios estudiados, *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).

7. Discusión

La distribución de las células cebadas en las trabéculas en la tonsila de los cerdos de destete y los cerdos adultos fue similar a la descrita en humanos (Yamanaka *et al.*, 1992).

Con respecto a las regiones pulmonares se observó que las células cebadas están distribuidas en la submucosa de bronquios asociadas a vénulas y a glándulas mixtas, entre la capa muscular y la túnica adventicia de los bronquiolos, en el tejido conectivo de la pleura visceral, en el septo alveolar así como en el septo interlobulillar, esta ubicación coincide con los datos reportados por Martínez, 2002, que describió la distribución en cerdos sanos de 6 semanas de edad comparado con cerdos infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae*. Peeters *et al.*, (2005), también reportan que en el tracto respiratorio canino, las células cebadas se localizan en la lámina propia, ocasionalmente asociada a glándulas; en la capa muscular del bronquio y en el septo alveolar.

En cuanto a los linfonodos traqueobronquiales se observa que la distribución de las células cebadas en cerdos adultos coincide con lo descrito por Xu *et al.*, (1993), quien utilizó la tinción de azul de alciano para determinar la distribución de células cebadas en linfonodos mesentéricos de cerdos adultos, sin embargo en otras especies como los marsupiales se ha descrito la distribución de células cebadas en nodos linfoides maxilares y axilares en la cápsula, el septo y en los sinusoides linfáticos (Chiarini-Garcia and Pereira, 1999).

Los datos obtenidos muestran que el mayor número de células cebadas en cerdos recién nacidos se observó en linfonodos traqueobronquiales; sin embargo al comparar los datos no hubo diferencia estadística significativa entre el número de células cebadas localizadas en los sitios anatómicos muestreados. Estos resultados indican que la cantidad de células cebadas en cerdos recién nacidos es escasa, ya que las superficies epiteliales del tracto respiratorio que están expuestas continuamente a la inhalación de antígenos (Peeters *et al.*, 2005; Pier *et al.*, 2004; Bytautiene *et al.*, 2004), tales como contaminantes ambientales, alérgenos y microorganismos, que inducen la activación de células inflamatorias (mastocitos, macrófagos, eosinófilos, linfocitos, células dendríticas, basófilos, neutrófilos y plaquetas) aun no se ha estimulado (Levine, 1995; Moran *et al.*, 2006).

En los cerdos de destete se obtuvo la mayor cantidad de células cebadas en linfonodos traqueobronquiales, sin embargo se obtuvo diferencia entre la tonsila y el pulmón derecho lóbulo craneal ($p < 0.01$), entre el pulmón derecho lóbulo craneal y el pulmón derecho lóbulo caudal ($p < 0.01$). También se observó que hay diferencia estadística significativa de ($p < 0.001$) al comparar los linfonodos traqueobronquiales con el pulmón izquierdo lóbulo craneal así como con el pulmón izquierdo lóbulo caudal ($p < 0.001$). Se ha estimado la concentración de células cebadas en un rango de 500 a 4000 por mm^3 en el pulmón, de 7000 a 12000 por mm^3 en piel y 20000 por mm^3 en tracto gastrointestinal humano, esto se atribuye a que muchos de estos sitios también pueden ser una puerta de entrada de infección, en donde las células cebadas pueden ser una de las principales células inflamatorias de relación con los patógenos invasivos (Abraham *et al.*, 1997). La localización intraepitelial de las células cebadas facilitaría su relación con los microorganismos que invaden el epitelio pulmonar. Las células cebadas que se localizan alrededor de los vasos sanguíneos, entre la capa muscular y túnica submucosa, por ejemplo, es probable que tengan efecto sobre el flujo de la sangre, causando una vasoconstricción y la secreción de moco respectivamente (Abraham *et al.*, 1997).

Posiblemente la cantidad de células cebadas en linfonodos esta determinada por su función, al retener los antígenos que puedan llegar a través de los líquidos linfáticos y proceder a su presentación y procesamiento antigénico mediante la colaboración de los macrófagos y los linfocitos que los componen (Tizard, 2009).

Al realizar el análisis comparativo de los datos obtenidos en cerdos adultos se obtiene que la tonsila presenta diferencia estadística significativa con respecto a los diferentes sitios anatómicos muestreados, posiblemente por su localización estratégica en la orofaringe, (Belz y Heath, 1996) se le considera como la primera línea de defensa en la interfase entre el medio ambiente interno y externo. Las tonsilas se consideran importantes en la defensa del tracto respiratorio y digestivo alto, y es la entrada y sitio de multiplicación y persistencia de varios patógenos en cerdos (Church, 1983; Salles y Middleton, 2000).

El número de células cebadas obtenido en el presente trabajo fue similar a los presentados por Xu, *et al.* (1993) en órganos porcinos como pulmón, intestino, ganglios mesentéricos y

tonsila. Se obtuvo un mayor número en cerdos adultos que en cerdos de menor edad. Se considera que el sistema inmune de los cerdos adultos ya ha sido estimulado por diferentes antígenos y por lo tanto ha madurado. Wilkes *et al.* (1992), menciona que las células cebadas en el tracto respiratorio de ratas se incrementan con la edad. En contraste, en perros adultos se ha reportado que el número de células cebadas en el tracto respiratorio es mayor en perros jóvenes, comparado con los perros adultos. Las razones para estas discrepancias pueden estar relacionadas con la prevalencia de parásitos en perros jóvenes (Peeters *et al.*, 2005). Harris *et al.*, (1999) reporta un mayor número de células cebadas en la mucosa y musculatura de tráquea bovina. En general la cantidad de células cebadas puede ser explicada por su particular importancia en el tracto respiratorio, ya que éste, representa un componente importante del sistema inmune mucosal por estar expuesto de manera continua a antígenos inhalados (Peeters *et al.*, 2005) los cuales invaden fácilmente y en gran cantidad al animal (Hill and Martin, 1998).

En relación con los datos obtenidos se observa que en el tracto genital de cerdas el número de células cebadas es mayor (Prado *et al.*, 1999) que en el tracto respiratorio y urinario. Es posible que la distribución diferencial en el tracto genital con respecto al tracto respiratorio tenga relación con el grado de exposición a antígenos, ya que muchos de estos sitios también pueden ser una puerta de entrada de infección, en donde las células cebadas pueden ser una de las principales células inflamatorias a las que se enfrentan los patógenos invasivos. (Abraham *et al.* 1997), ya que como se sabe los productos bacterianos y parásitos inducen su activación, aunque estudios más recientes indican que también tienen respuesta antiviral (Marone *et a.*, 2001; Genovese *et al.*, 2003).

Con respecto a la participación de las célula cebadas en problemas respiratorios porcinos, se realizó un trabajo en el que se cuantificaron las células cebadas en pulmones de cerdos infectados experimentalmente con *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante la tinción de azul de toluidina, encontrando que las mayores cuentas ocurrieron los días 8 (22.5 ± 1.7), 16 (22.80 ± 1.2) y 20 (30.35 ± 1.4) (Cruz *et al.*, 2008), por lo que se observó que la cantidad de células cebadas aumentó conforme progresó la infección, ya que el patógeno (*Mycoplasma hyopneumoniae*) puede inducir la presencia de células cebadas e inducir

directamente su reclutamiento o estimular mecanismos inflamatorios. Estudios recientes han demostrado que la célula cebada tiene la capacidad de modular la respuesta inmune innata hacia las bacterias gram negativas, por medio de fagocitosis, procesando y presentando antígenos a los linfocitos T mediante el MCH I (Malaviya, 2001).

Por otro lado, no existen reportes de la cinética de las células cebadas en el tracto respiratorio porcino durante el crecimiento de los cerdos. Así se observó que, en los linfonodos desde el nacimiento, es uno de los órganos con mayor número, alcanzando su máximo en el destete; para el caso de la tonsila el mayor número se alcanza en el cerdo adulto.

En relación a los lóbulos pulmonares, el número de estas células va elevándose de forma homogénea, con excepción del pulmón derecho lóbulo craneal en el destete, es de llamar la atención que las células cebadas alcanzan su mayor número en este lóbulo y en esta etapa, donde ocurre la mayor incidencia de enfermedades respiratorias, como es la producida por *Mycoplasma hyopneumoniae* que precisamente inicia su infección en este lóbulo. No sería de extrañar que las lesiones macroscópicas observadas por esta infección, sean el resultado de la estimulación de las células cebadas que en conjunto con CD8 desencadenan procesos inmunopatológicos, como ya lo ha sugerido Cruz *et al.*, (2008).

8. Conclusiones

En cerdos recién nacidos la mayor cantidad de células cebadas se observa en linfonodos traqueobronquiales y la menor cantidad en pulmón derecho lóbulo craneal. En cerdos de destete la mayor cantidad de células cebadas se localiza en los linfonodos traqueobronquiales y la menor cantidad en el pulmón izquierdo lóbulo craneal. En los cerdos adultos la mayor cantidad de células cebadas se localiza en la tonsila, observándose una menor cantidad en pulmón izquierdo lóbulo caudal.

Las células cebadas se encuentran distribuidas en tonsila en el espacio interfolicular, a nivel respiratorio en la mucosa y submucosa de bronquios y bronquiolos, en la pleura visceral, en el septo interlobular e interalveolar. En linfonodos traqueobronquiales se observan en las trabéculas, el tejido linfoide difuso y folículos linfoides. La distribución de las células cebadas en las tres etapas de crecimiento fue homogénea.

Estos resultados permitirán realizar comparaciones posteriores en cerdos que padezcan de enfermedades respiratorias inflamatorias o infecciosas.

9. Anexos

Anexo 1. Método de electrocución

Este método también se considera una forma de sacrificio humanitario en cerdos. Provoca la muerte mediante la insensibilización del cerebro seguido de una fibrilación cardíaca, la cual causa anoxia cerebral (ausencia de oxígeno en cerebro).

El método de electrocución que se realizó fue de la cabeza a la pierna. El electrodo frontal se colocó en la base de la oreja y el electrodo posterior se colocó en la pierna del lado opuesto del corazón para que la corriente viaje diagonalmente a través del cuerpo (Veall, 1993).

Anexo 2. Obtención del tracto respiratorio

1. Una vez sacrificado el animal, se realizó la exsanguinación de éste por las venas femorales.
2. Se colocó el cuerpo del animal en decúbito dorsal.
3. Se realizaron dos cortes sobre la piel y el tejido subcutáneo en forma de triángulo siguiendo la proyección de la mandíbula.
4. Se realizó una incisión hasta la entrada del tórax.
5. Se seccionó la zona cartilaginosa de las costillas dejando al descubierto toda la caja torácica.
6. Se separó la lengua de la mandíbula y se cortó en el punto más craneal de las tonsilas palatinas.
7. Una vez cortado el hueso hioides de cada lado, se separaron de la musculatura de la base de la lengua, la laringe, la tráquea y el esófago hasta la entrada del tórax.
8. Ayudados por una ligera tracción se extrajeron los pulmones y el corazón, con la porción torácica de la arteria aorta, la cual se anudó y posteriormente se seccionó.
9. Se realizó el examen macroscópico de los órganos.
10. Se realizó la toma de las muestras de los sitios anatómicos a estudiar.
11. Se colocaron las muestras en el fijador de Paraformaldehído al 4%.
- 12 Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su uso.

Anexo 3. Preparación de Fijador

Se preparó P-Formaldehído (Paraformaldehyde, EM Grade, Purified. Electron Microscopy Sciences 19200) al 4%.

- P- Formaldehído 4 g
- Agua destilada c.b.p. 100 ml

El P- Formaldehído al 4% se calentó a 60-65° C, y se le agregaron unas gotas de NaOH hasta que clarificó.

Anexo 4. Técnica de inclusión en parafina

Se eliminó el excedente de fijador colocando cada muestra en un cassette para inclusión con su respectiva identificación.

- Deshidratación en alcohol etílico 70 % I (15 min.)
- Deshidratación en alcohol etílico 70 % II (15 min.)
- Deshidratación en alcohol etílico 82 % (15 min.)
- Deshidratación en alcohol etílico 86 % (15 min.)
- Deshidratación en alcohol etílico 92 % I (15 min.)
- Deshidratación en alcohol etílico 92 % II (15 min.)
- Deshidratación en alcohol etílico 98 % I (15 min.)
- Deshidratación en alcohol etílico 98 % II (15 min.)
- Deshidratación en alcohol etílico 100 % I (15 min.)
- Deshidratación en alcohol etílico 100 % II (15 min.)
- Aclaración en Xileno I (30 min.)
- Aclaración en Xileno II (40 min.)

En cada cambio las muestras fueron sometidas a calentamiento en horno de microondas a temperatura media alta de aproximadamente 55-60°C por 2 minutos.

- › Las muestras se infiltraron en parafina a 60°C en dos cambios de una hora cada uno.
- › Inclusión en parafina.
- › Se realizaron cortes en el microtomo (Leica RM 820) a un grosor de 3 y 5µ.
- › Se montaron los cortes en portaobjetos.

Anexo 4.1. Pegamento para los cortes

1. Clara de huevo 13 ml.
2. Glicerina 13 ml.

Se mezcló la clara de huevo con la albúmina, se colocó una gota en el portaobjetos y se extendió por completo, formando una película delgada

Anexo 5. Tinción de azul de toluidina

- Azul de toluidina 1 gr
- Ácido bórico 1 gr
- Agua destilada 100ml

Se añadió al agua destilada la tinción de azul de toluidina que estaba en presentación de polvo al 95%, posteriormente se agregó el ácido bórico. Se obtuvo una solución acuosa de azul de toluidina al 1%, quedando con un pH de 4.4 aproximadamente.

Se desparafinaron las muestras en xileno por 5 min. en 2 pasos.

Rehidratación de las muestras:

- Alcohol etílico 100% I y II 5min.
- Alcohol etílico 96 % II 5 min.
- Alcohol etílico 80% 5min.
- Alcohol etílico 70% 5 min.
- Lavado en agua destilada.
- Teñido con Azul de toluidina durante 20 min.
- Lavado con agua corriente.
- Lavado en agua destilada.
- Deshidratación en alcohol etílico al 96 % I y II.
- Deshidratación en alcohol etílico al 100 % I y II.
- Aclarado en Xileno en dos pasos.
- Montado en resina sintética.

Anexo 6. Aprobación de Publicación del artículo del proyecto de tesis en el Journal of Animal and Veterinary Advances.

10. Referencias

1. Abbas AK and H Litchman, 2006. *Inmunología Celular y molecular*, 5ª edición, Elseiver, España, pp.6, 7, 9, 19, 22, 33.
2. Abraham SN and R Malaviya, 1997. Mast cells in infection and Immunity, *Infection and immunity*, Minireview, 65(9): 3501-3508.
3. Acosta AG y M López, 1992. *Inmunología de las mucosas*, Editorial Atelier, México: 716, 79-86.
4. Amaya EF y J Navarrete, 2006. Del alotransplante al xenotransplante, la compatibilidad antigénica: por medio del complejo mayor de histocompatibilidad MCH, 4(6): 84-93.
5. Amon U, M Nitske, D Dieckman, BF Gibbs, CW Lahn, HH Wolff, 1994. Activation and inhibition of mediator release from skin mast cell: a review of invitro experiments, *Clin Ex Allergy*, 4: 1098-1104.
6. Ansel JC, JR Brown, DG Payan and MA Brown, 1993. Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells, *The Journal of Immunology*, 150(10): 4478-4485.
7. Aparicio AP, 2007. Respuesta inmune de base celular y mecanismos de activación celular. *Manual de Inmunología Veterinaria*. Pearson-Prentice Hall. Madrid. pp. 229-254.
8. Bals R and PS Hiemstra, 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens, *Eur Respir J*, 23:327-333.
9. Banchereau J and RM Steinman, 1998. Dendritics cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673): 245-252.
10. Barnes PJ, KF Chung and CP Page, 1998. Inflammatory mediators of asthma: An Update. *Pharmacological Reviews*, 50(4):515-596.
11. Belkaid Y, BT Rouse, 2005. Natural regulatory T disease cells in infectious, *Nature Immunology*, 6(4): 353-360.
12. Belz, GT and TJ Heath. 1996. Tonsils of the soft palate of young pigs: crypt structure and lymphoepithelium. *Anat. Rec.* 245 (1): 102-113.
13. Benyon RC, 1989. The human skin mast cell, *Clin. Exp. Allergy*, 19:375-387.

14. Bischoff SC, G Seege, A Lorentz, W Sebald, RR Raab, MP Manns, 1999. IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cell Proc Natl Acad Sci USA, 96: 8080-8085.
15. Blander JM and R Medzhitov, 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. Science 304:1014-1018.
16. Bochner B, R Schleeimer, 2001. Mast cells, basophils and eosinophils, Immunological Review, 179: 5-15.
17. Brown MA, BA Sayed and A Christy, 2008. Mast cells and adaptative immune response, J Clin. Immunol, 28: 671-676.
18. Bytautiene E, YP Vedernikov, GR Saade, R Romero, RE Garfield, 2004. Degranulation of uterine mast cell modifies contractility of isolated myometrium from pregnant women. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 191: 1705-10.
19. Cairns JA, AF Walls, 1997. Mast cells tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts, J Clin Invest, 99: 1313-1323.
20. Caligiuri MA, 2008. Human natural killer cells, Blood 112 (3):461-469.
21. Carleton HM, 1957. Histological technique for normal and pathological tissues and the identification of parasites. Oxford University Press, London-New York-Toronto: 106.
22. Castells MC, 1997. Mast cells: Molecular and cell biology Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín, 12(6): 327-339.
23. Caulfield DJ, RA Lewis and KF Austen, 1980. Secretion dissociated human pulmonary mast cell. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. J.Cell. Biol 85, 2999-312.
24. Celada A, C Nathan, 1994. Macrophage activation revisited, Immunol Today, 15(3): 100-2.
25. Chaplin DD, 2003. The immune system 1. Overview of the immune response, J Allergy Clin Immunol, 111(2):442-459.

26. Chen G, MH Shaw, Yun-Gi Kim and G Nuñez Annu, 2009. NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease, *Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 4:365-398.
27. Chianini FN, J Majó, Segalés, J Domínguez, J Domingo, 2001. Immunohistological study of the immune system cells in paraffin-embedded tissues of conventional pigs. *Vet Immunol Immunopathol*, 82:245-255.
28. Chiarini-Garcia, H and FM Pereira, 1999. A comparative study of lymph node mast cell populations in five marsupial species, *Tissue and Cell*, 31(3): 318-326.
29. Church MK and KD Young, 1983. The characteristics of inhibition of histamine release from human lung fragments by sodium cromoglycate, salbutamol and chlorpromazine, *Br. J. Pharmac.*, 78:671-679.
30. Church MK, MA Lowman, C Robinson, ST Holgate, C Benyon, 1989. Interaction of neuropeptides with human Mast Cells, *Int Arch Allergy Immunol* 8(1-2): 70-78.
31. Church MK, PJ Hughes and, CJ Vardey, 1986. Studies on the receptor mediating cyclic AMP-independent enhancement by adenosine of IgE dependent mediator release from rat mast cells. *Br. J. Pharmacol.* 87:233-242.
32. Ciprián CA, 1999. Impacto del diagnóstico serológico de *Actinobacillus pleuromneumoniae* en las diferentes practicas de destete. *Memorias Enfermedades infecciosas en el cerdo de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en los cerdos en los altos de Jalisco.*
33. Clark EA, JA Ledbetter, 1994. How B and T cells talk to each other, *Nature*. 367(6462): 425-428.
34. Collado VM, R Porras, M^a T Cutuli, E Gómez-Lucía, 2008. El sistema inmune innato I: sus mecanismos the innate immune system I: its mechanisms *revista complutense de ciencias veterinarias*, 2(1): 1-16.
35. Cordero HM, 2004. Determinación de los linfocitos T y B en órganos linfoides de cederos recién nacidos, Cuautitlán Izcalli, Edo. Méx, FES-Cuautitlán, p.4
36. Craig SS, AM Irani, DD Metcalfe, LB Schwartz, 1993. Ultrastructural localization of heparin to human mast cells of the MCTC and MCT types by labeling with antithrombin III-gold, *Lab Invest*, 69(5):552-61.

37. Cristofaro P and SM Opal, 2006. Role of Toll-Like Receptors in Infection and Immunity Clinical Implications, *Drugs* 66 (1): 15-29.
38. Cruse G, D Kaur, W Yang, SM Duff, CE Brightling and P Bradding, 2005. Activation of human lung mast cells by monomeric immunoglobulin E. *Eur. Respir. J.* 25: 858-863.
39. Cruz ST, 2000. Tesis doctorado en Microbiología. FES-Cuautitlán UNAM.
40. Cruz ST, RSS, Martínez, FG Garrido, P JL Tórtora, ES Mendoza, CA Ciprián, BE Hénnández, RA Romero and LMA.Vega., 2008. In situ analysis of CD4, CD8 and mast cells in lung of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimentally infected pigs. *J. Anim. Vet. Adv.*, 7(6): 752-758.
41. Daeron, M, O Malbec, S Latour, M Arock, WH Fridman, 1995. Regulation of high-affinity IgE receptormediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest*; 95: 577-85.
42. Day JM, 1999. Atlas en color de enfermedades inmunomediadas, Cuadros clínicos, Diagnóstico y Tratamiento, Grass Ediciones, España, pág.2
43. Delves, PJ, IM Roitt, 1998. Enciclopedia of Immunology, Editorial Mc Graw Hill-Interamericana, México, pp. 23,126.
44. Dimitrov R, A Vodenicharov, G Kostadinov and H Hristov, 2007. Morphological investigations on mast cells In feline pelvic urethra, *Bulgarian Journal of Veterinary*, 10(1): 59-62.
Disponible en: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/>
45. Dore M, S Simon, BJ Hughes, ML Entman, CW Smith, 1995. P-selectin and CD18-Mediated Recutment of canine neutrophils under canditions of shear stress. *Veterinary pathology*, 32:258-268.
46. Erlich, P., 1879. Contributions to theory and practice of histological staining. In *The Collectd Papers of Paul Erlich* (Himmelweit, F. ed.), 1956, Pergamon, New York, pp 65-68.
47. Escobar GA, 2009. XXV Curo Teórico-Práctico de Inmunología en Salud Pública, INDRE, México. DF.

48. Ferry X, S Brehin, R Kamel, Y Landry, 2002. G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. *Peptides*; 23:1507–15.
49. Galli SJ, KM Zsebo, EN Geissler, 1994. The kit ligand stem cell factor, *Adv Immunol*, 55: 1-96.
50. Galli SJ, 1990. Biology of disease - new insights into the riddle of the mast-cells - microenvironmental regulation of mast-cell. *Development and phenotypic heterogeneity, Laboratory investigation* 62 (1): 5-33.
51. Galli SJ, M Grimbaldston, M Tsai, 2008. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity, *Nature Reviews Immunology*, (8):478-486.
52. Garrido FGI y Cornejo CMA, 2000. Método de inclusión en parafina para diagnóstico rápido por medio de microondas, *Vet. Méx.* 31(4): 375-379.
53. Garrido FGI, Cornejo CMA y E Salinas Jiménez, 2003. Manual de Colorantes para laboratorios de Ciencias Básicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán . ISBN 970-32-0557-7.
54. Gascoigne NRJ, T Zal and SM Alam, 2001. T-cell receptor binding kinetics In T-cell development and activation, *Expert Reviews in molecular medicin*: 1-17.
55. Genovese A, G Borgia, J-P Bouvet, A Detoraki, A Paulis, M Piazza, G Marone, 2003. Protein Fv Produced during Viral Hepatitis Is an Endogenous Immunoglobulin Superantigen Activating Human Heart Mast Cells, *Int Arch Allergy Immunol*; 132:336-345.
56. Halliwell REW, NT Gorman, 1989. *Inmunología Clínica Veterinaria*, Editorial Acribia SA, España.
57. Harris WH, JS Marshall, S Yamashiro, and N Shaikh, 1999. Mast Cells of the Bovine Trachea: Staining Characteristics, Dispersion Techniques and Response to Secretagogues, *Can J Vet Res*; 63: 5-12.
58. Hellewell PG and JD Pearson, 1983. Metabolism of circulating adenosine by the porcine isolated perfused lung. *Circ. Res.* 53:1–7.
59. Hewitt EW, 2003. The MHC class I antigen presentation pathway:- strategies for viral immune evasion, *Immunology* 110: 163-169.

60. Hill P and R Martin, 1998. A review of mast cell biology. *Vet. Dermatol*, 9: 145-166.
61. Holgate ST, MK Church, 1995. Eczema and contact dermatitis. In: *Allergy*, Mosby Wolfe, Chapter 23:23.1 - 24.10.
62. Huff TF, CS Lantz, JJ Ryan, JA Leftwich, 1995. Mast cell committed progenitors. In: *Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function*. Kitamura, et al. (eds.) New York: Raven Press 1995: 105-117.
63. Iglesias SG y M Trujano, 2000. Diversos modelos de interacción que ocurren en el complejo respiratorio porcino, *Vet Mex.*, 31(1): 59-65.
64. Irani AA, NM Schechner, SS Craig, G. De Blois, LB Schwarte, 1986. Two subtypes of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:4464-4468.
65. Ishiai M, M Kurosaki, K Inabe, AC Chan, K Sugamura, and T Kurosaki, 2009. Involvement of LAT, Gads, and Grb2 in Compartmentation of SLP-76 to the Plasma Membrane, 22: 847-856.
66. Ishisaka K and Ishisaka T, 1967. Identification of gamma-E antibodies as a carrier of reaginic activity, *J immunol*, 99: 1187-1198.
67. Ito A, M Hagiwara and J Oonuma, 2008. Invited Review. Nerve-mast cell and smooth muscle-mast cell interaction mediated by cell adhesion molecule-1, CADM1, *Smooth Muscle Res.* 44 (2): 83-93.
68. Iwamura TK. Shinuzu and S Tanaka, 2002. Morphological and histochemical characteristics of mast cells and the content of in-tissue histamine in various pathological parathyroids: Do mast cells participate in hormone secretion in human Parathyroids?, *J Nippon Med Sch.*, 69(4): 347-354.
69. Janeway CA, P Travers, M Walport, MJ Shlomchik, 2003. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*, 2.^a edición. Editorial Masson, Barcelona: 213, 375, 480-489.
70. Kalesnikoff J and S Galli, 2008. New developments in mast cell biology. *Nature Immunology*, 9(11): 1215-1223.

71. Kashiwakura Y, M Watanabe, MD, N Kusumi, K Sumiyoshi, Y Nasu, H Yamada, T Sawamura, H Kumon, K Takei, H Daida, 2004. Dynamin-2 Regulates Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cell, *Circulation*, 110: 3329-3334.
72. Kawai T and S Akira, 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13: 816–25.
73. Kleinschmidt S, AF Meneses, I Nolte, M Hewicker-Trautwein, 2008. Distribution of mast cell subtypes and immune cell populations in canine intestines: Evidence for an age related decline in T cells and macrophages and increase of IgA-positive plasma cells, *Veterinary Science.*, 84: 41–48.
74. Klemm, S, J Gutermuth, L Hültner, T Sparwasser, H Behrendt, C Peschel, TW Mak, T Jakob, and J Ruland, 2006. The Bcl10–Malt1 complex segregates FcεRI-mediated nuclear factor κB activation and cytokine production from mast cell degranulation, *The Journal Experimental Medicine*: 1-11.
75. Kulka M, CH Sheen, BP Tancowny, LC Grammer and R P Schleimer, 2007. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production *Immunology*, 123: 398–410.
76. Kunisawa J and H Kiyono CMLS, 2005. A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense, *Cell. Mol. Life Sci.* 6: 1308–1321.
77. Kunkel SL, T Standiford, K Kasaka, RM Strietes, 1991. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in lung. *Exp Lung Res*, 17: 17-23.
78. Kurosawa M, A Hiroo, K Naotomo, I Yasushi, N Nagata, Y Tetsuji, K Fumihiko M Yoshiki, 1999. Response to cyclosporin and low-dose methylprednisolone in aggressive systemic mastocytosis, *J Allergy Clin Immunol*, 103: 412-420.
79. Laing KJ, MK Purcell, J R Winton, JD Hansen, 2008. A genomic view of the NOD-like receptor family in teleost fish: identification of a novel NLR subfamily in zebrafish. *BMC Evol. Biol.* 8(42): 1-15.
80. Levine S J, 1995. Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airways epithelium. *J Invest Med.*, 43(3):241-9.

81. Liew FY, 2002. TH1 and TH2 cells: a historical perspective, *Immunology*, 2: 55-60.
82. Liu Y Wang Y, Yamakuchi M, Isowaki S, Nigata E. Kanmura Y *et al.*, 2001. Upregulation of toll- like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglican and high concentration of lipopolysacarid is involved in NF-kappa b activation. *Infect immune* 69: 2988-2796.
83. Luster AD and AM Tager, 2004. T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. *Nat Rev Immunol*, 4: 711–24.
84. MacGlashan D, 2009. IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils, *Current Opinion in Immunology* 20:717-723.
85. Malaviya R and SN Abraham, 2001. Mast cell modulation of immune responses to bacteria, 179(1): 16-24.
86. Marone G, V Casolaro, V Patella, G Florio, M Triggiani, 1997. Molecular and cellular biology of mast cells and basophils, *International Archives and Allergy Immunology*, 114: 207-217.
87. Marshall JS and DM Jawdat, 2004. Current perspectives.Mast cells in innate immunity, *J Allergy Clin Immunol*, 114:21-24.
88. Martinez RSS, 2002. Detección y cuantificación de mastocitos (células cebadas) en pulmón de cerdos infectados experimentalmente con *Mycoplasma hyopneumoniae*, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx. p. 20, 27.
89. Mc Neil HP., The mast cell and inflammation, *Aust nzj Med*, 26: 216-225.
90. McCurdy J.D, TJ Olynych, LH Maher & JS Marshall, 2003. Distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J. Immunol.* 170: 1625–1629.
91. Mekori YA, DD Metcalffe, 1999. Mast cell-T cel interactions, *J. Aallergy Clin Immunol*, 104 : 517-523.
92. Metcalfe DD, D Baram and YA Mekori, 1997. Mast cells. *Physiol. Rev.* 77:1033–1079.

93. Morán G, O Araya and H Folch, 2006. Recurrent airway obstruction in horses, *Arch. Med. Vet.* 38 (3): 207-217.
94. Moreno CB, 1996. Manual de Necropsias, Patología General, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM: 27,28, 59-61.
95. Morilla GA. Manual de las enfermedades infecciosas de los cerdos, 2^a, edición, Editorial Manual Moderno, México, 2005.
96. Mortensen RF, 2001. C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. *Immunol Res.* 24:163-176.
97. O'Hara AM and F Shanahan, 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports* 7: 688-693.
98. O'Neill LAJ, 2003. The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction, *Biochemical Society Transactions* (31) part 3.
99. Okayama Y, DD Hagan, and DD Metcalfe, 2001. A Comparison of Mediators Released or Generated by IFN- γ -Treated Human Mast Cells Following Aggregation of Fc γ RI or Fc ϵ RI, *The Journal of Immunology*, 166: 4705-4712.
100. Okayama Y, S Okumura, H Tomita, H Katayama, K.Yuki, S Kagaya, J Kashiwakura and H Saito, 2004. Human mast cell activation through Fc receptors and Toll-like receptors, *Allergology International*, 53:227-233.
101. Okayama Y, Y Ono, T Nakazawa, MK Church, M Mori. 1998. Human skin mast cells produce TNF- α by substance P. *Int Arch Allergy Immunol*; 117:48-51.
102. Okayama Y, AS Kirshenbaum, and DD Metcalfe, 2000. Expression of a Functional High-Affinity IgG Receptor, Fc γ RI, on Human Mast Cells: Up-Regulation by IFN- γ , *The Journal of Immunology*, 164: 4332-4339.
103. Okuda M, 1999. Functional heterogeneity of airway mast cells, *Allergy* 54: 50-62.
104. Okumura S, J Kashiwakura, H Tomita, K Matsumoto, T Nakajima, H Saito, 2003. Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and Fc γ RI, *Blood* 102(7): 2547-2554.
105. Parslow TG, DP Stites, AI Terr y JB. Imboden, 2002. *Inmunología básica y clínica*, 10^a edición, Editorial El manual moderno, Méx., DF, pp. 29, 199-205.

106. Peeters MJ Day, F Farnir, P Moore and C Clercx, 2005. Distribution of leucocyte subsets in the canine respiratory tract. *Comp. Path.*, 132: 261–272.
107. Peng Y, MR Power, B Li, and Tong-Jun Lin, 2005. Inhibition of IKK down-regulates antigen _ IgE-induced TNF production by mast cells: a role for the IKK-I_B-NF-_B pathway in IgE-dependent mast cell activation, *Journal of Leukocyte Biology*, 77: 1-9.
108. Pier GB, JB Lyczak, LM Wetzler and MJ Ruebush, 2004. *Immunology, Infection and Immunity* Editorial ASM Press, Washington,DC.
109. Plaut M, JH Pierce, CJ Watson, J Hanley-Hyde, RP Nordan, WP Paul, 1989. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcεRI or to calcium ionophores, *Nature* 339: 64–67.
110. Prado MR, E Lavielle, SR Anzaldúa, M Pérez, 1999. Distribución diferencial de células cebadas en el cuello uterino de cerdas con desarrollo folicular y cuerpo lúteo ováricos, *Vet Méx*, 30(2): 143-147.
111. Ramírez NR, C Pijoan, 1982. *Diagnóstico de las enfermedades del cerdo*, Editorial Talleres de Litográfica Cultural SA., México.
112. Reedy LM, WH Miller, T Willemsse, 1997. *Allergy skin diseases of dog and cats*. WB Saunders Company Ltd Second Edition.
113. Reichl IG, WR Coward, MK Church ,1999. Molecular consequences of human mast cell activation following immunoglobulin E receptor (IgE-FcεRI) interaction, *Bochem Pharmacol*, 58: 1841-1850.
114. Retamal P, 2001. Epidemiología de las enfermedades respiratorias del cerdo, *TecnoVet*7 (3):6-8.
115. Robinson JH and AA Delving, 2002. Diversity i MCH classII antigen presentation. *Immunology*, 105:252-265.
116. Rodrigues CM, OA Martins-Filho, NM Vaz and CR. Carvalho, 2006. Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis, Blackwell Publishing Ltd, *Immunology*, 117: 517–525.
117. Roitt I, J Brostoff, D Male, 2007. *Inmunología*, 2ª edición, Ediciones Harcourt, S.A., España.

118. Roth JA. The immune system. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, DJ Taylor, 1999. Diseases of swine. 8th ed. Ames, Iowa USA: Iowa State University Press: 799-820.
119. Roth K, W-M Chen and T-J Lin, 2008. Positive and negative regulatory mechanisms in high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 56:385-399.
120. Rouss SJ, T Hartmann, GH Caughey, 1991. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts, *J Clin Invest*, 88: 493-450.
121. Rus H, C Cudrici, F Niculescu, 2005. The Role of the Complement System in Innate Immunity, *Immunologic Research*; 33(2):103-112.
122. Saavedra T, 2005. Actividad de los mastocitos de la mucosa intestinal en ratas con hipersensibilidad y mecanismos neuroendocrina reguladores de la función mastocitaria, *Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Veterinària, Departament de Biologia Celular, Microbiologia Immunologia, Bellaterra*: 1-139.
123. Saitoh S I, S Odom, G Gomez, C L Sommers, HA Young, J Rivera and LE Samelson, 2003. The Four Distal Tyrosines Are Required for LAT-dependent Signaling in FcεRI mediated Mast Cell Activation, *The Journal of Experimental Medicine*, 198(5): 831-843.
124. Salles MWS, D.M. Middleton, 2000. Lymphocyte subsets in porcine tonsillar crypt epithelium. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 77: 133-144.
125. Samorapoompichit P, HP Kiener, G-H Schernthaner, J -H Jordan, H Agis, F Wimazal, M Baghestanian, A Rezaie-Majd, WR Sperr, K Lechner, and P Valent, 2001. Detection of tryptase in cytoplasmic granules of basophils in patients with chronic myeloid leukemia and other myeloid neoplasms, *Blood* 98(8): 2580-2583.
126. Sánchez VJM, 2004. Curso de introducción a la Inmunología Porcina, 2^a edición, Laboratorio Hipra SA. Madrid.
127. Sanderson I, G Slavin, TJ Walker-Smith, 1985. Density of mucosal mast cells in the lamina propria of the colon and terminal ileum of children *J Clin Pathol.*, 38:771-773.

128. Sanjuan MA, CP Dillon, SW Tait, S Moshiaich, F Dorsey, S Connell, M Komatsu, K Tanaka, JL Cleveland, S Withoff, DR Green, 2007. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis, *Nature* 450: 1253-1257.
129. Schercher NM, D Slavin, RD Fetter, GS Lazarus, JE Fraki, 1998. Purification and identification of two seine class proteinases from dog mast cells biochemically and immunologically similar to human proteinases tryptase and chymase, *Arch Biochem Biophys*, 262: 232-244.
130. Sechi S, PP Roller, J Willette-Brown, JP Kinet, 1996. A conformational rearrangement upon binding of IgE to its high affinity receptor, *J Biol Chem*, 271: 19256-19263.
131. Shimosato T, Kitasawa H, Kato S, Tomioka Y, Karima R, Ueha S *et al.*, 2003. Toll-like receptor 9(1) recognizes CpG motifs of human cell stimulant. *Biochim Biophys Acta*, 1627:56-61.
132. Simon C, E Dondi, A Chaix, P Sepulveda, TJ Kubiseski, 2008. Lnk adaptor protein down-regulates specific Kit-induced signaling pathways in primary mast cells, *Blood*, 112(10): 4039-4047.
133. Singh LK, X Pang, N Alexacos, R Letourneau, TC Theoharides, 1999. Acute Immobilization Stress Triggers Skin Mast Cell Degranulation via Corticotropin Releasing Hormone, Neurotensin, and Substance P: A Link to Neurogenic Skin Disorders, *Brain, Behavior, and Immunity*, 13 (3): 225-239.
134. Stefanov IS, A Vodenicharov, R Dimitrov, 2007. Density, shape and dimensions of mast cells in Canine anal canal. *Bulg. J. Vet. Med.*, 10(2) :77-82.
135. Supajatura V, H Ushio, A Nakao, K Okumura, C Ra and H Ogawa, 2001. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 167: 2250–2256.
136. Supajatura V, H Ushio, A Nakao, S Akira, K Okumura, C Ra and H Ogawa, 2002. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest.* 109, 1351–1359.

137. Takeda K and S Akira. 2005. Toll-like receptor in innate immunity, *International Immunobiology*, 17(1):1-14.
138. Thacker RL, BJ Thacker, BH Janke, 2001. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol*, 39:2525-2530.
139. Thomson AJ, JF Telfer, A Young, S Campbell, JR Stewart, IT Cameron, IA Greer and JE Norman, 1999. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process, *Human Reproduction* 14(1): 229–236.
140. Thorlacius H, J Raud, S Rosengren-Beezley, MJ Forrest, P Hedqvist, L Lindbom, 1994. Mast cell activation induces P selectin-dependent leucocyte rolling and adhesion in postcapillary venules in vivo, *Biochem Biophys, Res Commun*, 203: 1043-1049.
141. Tilley SL, VA Wagoner, CA Salvatore, MA. Jacobson and BH. Koller, 2000. Adenosine and inosine increase cutaneous vasopermeability by activating A3 receptors on mast cells *The Journal of Clinical Investigation*, 105(3): 361-361.
142. Tizard, RI, 2009. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*, 8va. Edición, Elsevier, España.
143. Tkaczyk C, Y Okayama, MR Woolhiser, DD Hagaman, AM. Gilfillan and DD Metcalfe, 2002. *Molecular Immunology*, 38(16-18): 1289-1293.
144. Tupin E, Y Kinjo and M Kronenberg, 2007. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms, *Nature reviews, Microbiology* 5: 405-417
145. Veall F, 1993. Estructura y funcionamiento de mataderos medianos en países en desarrollo, Roma, Col Estudio FAO Producción y Salud Animal: 97.
146. Vega LMA, 2007. *Inmunobiología de las mucosas, un nuevo enfoque de la protección y la adaptación al medio de nuestro organismo*, Cinvestav: 1-5.
147. Villaseñor GH, RE Leville, SR Anzaldúa, M Pérez, 1999. Distribución de mastocitos del estro mamario de la perra (*Canis familiaris*), en periodos activo e inactivo, *Vet.Méx.*, 30(4): 318-320.
148. Vodenicharov A, 2008. Mast cells in autonomic ganglio and nerves and in small blood vessels in the renal hilus of domestic swine, *Bulg. J. Vet. Med.*, 11(1):31-36

149. Vodenicharov A, R Leiser, M Gulubova and T Vlaykova, 2005. Morphological and Immunocytochemical Investigations on Mast Cells in Porcine Ureter, *Anat. Histol. Embryol.* 34:343-349
150. Welle M, 1997. Development, significance and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase, *Journal of Leukocyte Biology*, 61(3): 233-245.
151. Whiteside TL, 2001a. Isolation of human NK cells and generation of LAK activity. *Curr. Protoc. Immunol.* May. Chapter 7: Unit 7.7.
152. Whiteside TL, 2001b. Measurement of cytotoxic activity of NK/LAK cells. *Curr. Protoc. Immunol.* May. Chapter 7: Unit 7.18.
153. Wilkes LK, C Mc Menamin and PG Holt, 1992. Postnatal maturation of mast cell subpopulations in the rat respiratory tract. *Immunology*, 75: 535-541.
154. Xu LR, MM Carr, AP Bland and GA Hall, 1993. Histochemistry and morphology of porcine mast cells, *Histochemical Journal* 25: 516-522.
155. Yamanaka N, H Matsu yama, Y Harabuchi and A Katura, 1992. Distribution of Lymphoid Cells in Tonsillar Compartments in Relation to Infection and Age: A Quantitative Study Using Image Analysis. *Acta Oto-laryngologica*, 112(1): 128-137.
156. Yong LCJ, 1997. The mast cell: origin, morphology, distribution and function, *Exp Toxic Pathol*, 49: 409-424.
157. Yu M, I Luo, W Yang, Y Wang, M Mizuki, Y Kanakura, P Besmer, BG Neel and H Gu, 2006. The scaffolding adapter Gab2, via Shp-2, regulates Kit-evoked mast cell proliferation by activating the Rac/JNK pathway. *J Biol Chem.*, 281:28615-28626.
158. Zweiman B, M Anne and CV Allmen, 1998. Comparison of Inflammatory Events during Developing Immunoglobulin E-Mediated Late-Phase Reactions, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(4): 57

Thomson Scientific
3501 Market Street
Philadelphia, PA 19104 USA
Tel +1 215 386 0100 1-800-523-1850
Fax +1 215 243 2236
scientific.thomson.com



March 6, 2008

Dr. Muhammad Sohail
Medwell Online
Ansinet Building, 308-Lasani Town
Sargodha Rd
Faisalabad, 38090 Pakistan

Dear Dr. Sohail,

I am pleased to inform you that *Journal of Animal and Veterinary Advances* has been selected for coverage in Thomson Scientific products and services. Beginning with V.6 (1) 2007, information on the contents of this publication will be indexed in:

- ◆ Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®)
- ◆ Journal Citation Reports/Science Edition

This coverage is in addition to existing inclusion in:

- ◆ Zoological Record

If possible, please mention in the first few pages of the journal that it is covered in these Thomson Scientific services.

Thank you very much.

Sincerely,

Marian Hollingsworth
Director of Publisher Relations

Med well ^ Journals

Help Con
Search in ASCI

Published

Rejected

Tools

Q Welcome C

Submission & "Cracking System Home

New Submission In Process

Papers: In Process 1869-JAVA-MJ

B 1869-JAVA-MJ

Download Corner

- [Acceptance](#)
- [Invoice](#)
- [Receipt of Pavment](#)
- [Interna! Evaluation](#)
- [External Evaluation](#)
- [Galley Proof](#)
- [Acrobat Reader](#)

TOe Distribution of mast cells in the respiratory tract of the pig at three stages of development

Payment Clear

Status Article in Publication Process

Send Revised Copy Send Galley Proof Corrections

Message Board for 1869- JAVA-MJ

Query

POST

<http://medwelljournals.com/medtrack/inprocess.php>

09/09/2009

Medwell Journals

Submission & Tracking System

August 25, 09

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México
(UNAM) Unidad de Investigación
Interdisciplinaria. Km. 2.5 Carretera
Cuautitlán-Teoloyucan Cuautitlán Izcalli,
Estado de México, México 54700.

Subject: Acceptance letter for Article No. 1869-JAVA-MJ

Dear TONATIUH CRUZ SÁNCHEZ,

It's a great pleasure for us to inform you that below mentioned manuscript has been accepted for publication in "Journal of Animal and Veterinary Advances" on the recommendation of the reviewers.

| | |
|------------------------|---|
| Title: Author's | Distribution of mast cells in the respiratory tract of the pig at three stages of development |
| Name: | Guadalupe Azucena Castillo Peña, Germán Isauro Garrido Fariña, Gilberto Ochoa Uribe, Carlos Gerardo García Tovar, Tonatiah A. Cruz Sánchez. |
| Received on: | 2009-06-24 |
| Accepted on: | 2009-08-25 |

Regards

Muhammad Sohail Director Publication

Medwell Journals

Submission & Tracking System

August 25, 2009

Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán Universidad Nacional Autónoma
de México (UNAM) .Unidad de
Investigación Interdisciplinaria. Km. 2.5
Carretera Cuautitlán Teoloyucan
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México
54700.

Subject: Payment Receipt for Article No. 1869-JAVA-MJ

Received a sum of US \$ 450.00 via Credit Card with thanks from TONATIUH CRUZ
SÁNCHEZ as publication cost of Article # 1869-JAVA-MJ .

Regards

Muhammad Sohail
Director Publicaion
Medwell Journals
Journal of Animal and Veterinary Advances

file://C:\Documents and Settings\pcl\Mis documentos\VARTICULO CC- LUPITA\pago re... 09/09/2009