



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS EN TEJIDO  
PULMONAR DE CERDOS RECIÉN NACIDOS CLÍNICAMENTE  
SANOS”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MEDICA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**P R E S E N T A:**

MARÍA DE JESÚS GONZÁLEZ BÚRQUEZ

**ASESOR: DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ**  
**COASESOR: M.F. GERMÁN ISAURO GARRIDO FARIÑA.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Este trabajo fue apoyado por los proyectos:**

**UNAM –DGAPA- PAPIIT IN 209701, PAPIIT IN 203106-3,UNAM - DAGAPA-  
PAPIME EN 216603.FES Cuautitlán Proyecto PACIVE .GVC-11.**

**Y se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en las instalaciones del campo Cuatro en los laboratorios de Histología de la Sección de Ciencias Morfológicas y el Laboratorio de Microbiología (6) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria**

***“ Tratat de dejar este mundo en mejores condiciones de cómo lo encontréis”***



*"El hombre que mira hacia adelante y rema activamente su propia canoa, modela su porvenir."*

*Naden Powell y Gilwell*

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

### **A mi papi.**

#### **Luis González Romero.**

Sacrificio voluntario que te agradezco infinitamente, no por la comprensión, si no por estar simplemente presente en todos mis actos y mis pensamientos, por presentarte como el hombre con más fortaleza y de gran corazón, por mostrarme la conciencia que siempre se hace presente y los valores que toda mi vida me acompañarán, simplemente... por ese espíritu de lucha que tienes para nunca rendirte, por moldearme a la mujer que he llegado a ser y por demostrarme que aunque te hieran debes salir adelante...

Simplemente... Gracias Papá.

### **A mis Hermanos.**

#### **Patty y Huicho.**

Con adversidades y caprichos la conciencia se apodera de nuestros pensamientos, el crecer en adversidad nos ha motivado y enseñado a estar juntos en los momentos más complicados, en donde todo ha parecido nublarse la unión de la sangre es la que sale a flote, a mis ejemplos, mis compañeros, mis amigos, mis cómplices, mis consejeros, MIS HERMANOS... los amo... Gracias por todo su apoyo, y gracias por creer en mí.

### **A mis amores.**

#### **Jimbo, Brownny y Firpo.**

Por ser fuente de mi inspiración, compañeros en la soledad y en la alegría, por enseñarme que los problemas cotidianos no son un obstáculo para continuar, por mostrarme que un amigo simplemente calla y se mantiene a tu lado, esperando una caricia de recompensa, por enseñarme la sensibilidad de mi ser, por las desveladas, por las sonrisas que ocasionaron y ocasionan en mí, por mostrarme que en algún lugar siempre hay un ser limpio e inocente que tiene mucho que enseñar al mundo... así de simple, sin decir una palabra.

**Al Amor de mi Vida.  
Kótick Humberto Rivera Moreno.**

Foquita, agradecerte con todo el corazón el tiempo, la comprensión, la paciencia y todo tipo de apoyo que me has brindado para lograr llegar a este camino que tan lejano se veía y en el que por fin me encuentro de pié, gracias por que cuando me sentía cansada sin ganas de seguir caminando tocaste mi rostro y me ayudaste a levantar, por que cuando tenía tanto sudor y lágrimas de desesperación me brindaste tu hombro, es cierto, llegaste a mi vida de una manera inesperada, pero hermosa, y me veo en este momento tomada de tu mano y quiero continuar por que nos espera un camino lleno de aventuras y momentos únicos, por que así es como somos ¡únicos!, Humberto, gracias por creer en mí.

**Te Amo.  
Puelk-¡Libre!**

**A mis amigos:**

Eloisa y a todos los que me apoyaron desde mi ingreso a la licenciatura y que siguen a mi lado en esta etapa tan bonita, gracias.

**Claudia:** Gracias por todos los buenos momentos que pasamos juntas, y los malos también, gracias por estar a mi lado en los momentos en que creía que solo tu me comprendías y por demostrarme que sonreír es una buena manera de continuar, AMIGA, gracias por hacer mágica gran parte de mi estancia en esta etapa que tenemos la dicha de compartir y por confiar en mí, recuerda... deja algo para la imaginación... pos q ch.....

**A mis Asesores.**

**Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez y Germán Isauro Garrido Fariña.**

Por el tiempo, la dedicación y las finísimas enseñanzas que me brindaron, por la confianza que se ha depositado en mí, por ser ejemplo de sabiduría, de trabajo, de perseverancia y de inteligencia.

**A la Universidad Nacional Autónoma de México y a mi queridísima Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.**

Por cobijarme en su regazo, por brindarme los medios y el espacio para poder llegar a ser orgullosamente parte de la historia como universitaria y como Médico Veterinario.

## ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción e Historia.....	2
1.2. Anatomía del aparato respiratorio del cerdo.....	3
1.3. Sistema Inmune del cerdo recién nacido.....	4
1.4. Inmunidad de las Mucosas.....	5
1.5. Características de los linfocitos porcinos.....	7
1.5.1. Linfocitos T.....	7
1.5.2. Células NK.....	7
1.5.3. Linfocitos B y Células Plasmáticas.....	8
1.6 Marcadores de superficie de linfocitos B y linfocitos T.....	9
1.6.1 Marcadores de superficie de linfocitos T.....	9
1.6.2 Marcadores de superficie de linfocitos B.....	10
2. Objetivos.....	11
2.1. Objetivo general.....	11
2.2. Objetivo Particular.....	11
3. Metodología.....	12
3.1. Diseño experimental.....	12
3.2. Material biológico.....	13
3.3. Tinción hematoxilina –eosina.....	14
3.3.1. Observación y toma de imágenes.....	15
3.4. Tinción Verde Metil Pironina.....	15
3.4.1. Cuantificación de células plasmáticas.....	16
5. Resultados.....	17
6. Discusión.....	22
7. Conclusiones.....	24
8. Literatura Citada.....	26



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución y función de los marcadores de superficie de los linfocitos B (CD).....	10
---	----

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Promedio de células plasmáticas en tonsila, linfonodo y pulmón.....	13
Gráfica 1. Distribución de células plasmáticas en linfonodo, tonsila y P. Izquierdo.....	18

## INDICE DE FIGURAS

Fig. A. Diseño experimental.....	12
Fig. 1. Corte histológico de lechón clínicamente sano con Tinción verde Metil Pironina y Hematoxilina Eosina. Linfonodo traqueobronquial.....	19
Fig.2. Corte histológico de lechón nacido clínicamente sano con Tinción Verde Metil Pironina y Hematoxilina Eosina. Tonsila.....	20
Fig.3. Corte histológico de lechón clínicamente sano con Tinción Verde Metil Pironina y Hematoxilina Eosina. Parénquima pulmonar Izquierdo.....	21

## RESUMEN

En la presente investigación se observó la histología normal de tonsila, linfonodo traqueobronquial y pulmón derecho e izquierdo de lechones clínicamente sanos libres de Auyesky y PRRS. Con el fin de conocer la cantidad de células plasmáticas (CP) en estos órganos, se tomaron las muestras de 4 lechones con media hora de vida. Todas las muestras obtenidas fueron procesadas por el método de parafina. Se obtuvieron 2 laminillas por órgano de las cuales una fue teñida con H.E y la otra con Verde Metil Pironina (VMP) para identificar y cuantificar a las células plasmáticas. Se cuantificaron las células plasmáticas de los cerdos recién nacidos mediante la tinción de VMP y la observación morfológica en H.E. Las células plasmáticas encontradas fueron escasas, realizando la cuantificación de manera aleatoria en 10 campos con 40X, los promedios obtenidos de los 4 lechones fueron graficados en el programa excel y analizados en el programa estadístico Graph pad Prism por la prueba de ANOVA, el linfonodo traqueobronquial presentó el mayor número de CP (5.25). Entre las diferentes regiones pulmonares ordenadamente obtuvimos del Pulmón Derecho parte craneal (1.75), Pulmón Derecho parte caudal (1.75), Pulmón Derecho accesorio (1.5), P.I craneal (1.5), P.I caudal (2). El linfonodo presentó un promedio de (5.25) mostrando diferencia estadística con la tonsila de ( $p < 0.01$ ) y comparado con las demás regiones pulmonares la diferencia estadística fue de ( $p < 0.001$ ). Esto se presentó principalmente debido a que la tonsila forma parte del sistema inmune de las mucosas a nivel respiratorio y digestivo, en comparación con el número que presentó el linfonodo siendo mayor su número de CP es relacionado a la función que tiene dicho órgano pues ocurre la maduración y diferenciación de las células B y células plasmáticas.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 HISTORIA

Las células plasmáticas fueron estudiadas por primera vez en 1890 por Santiago Ramón y Cajal, de la Universidad de Barcelona, España, quien las denominó como cianófilas y mencionó que se originaban a partir de los linfocitos. Posteriormente, estas mismas células fueron descritas en 1891 por Paul Gerson Unna, renombrado dermatólogo de Hamburgo, quien utilizó el término plasmocito para referirse a las células redondeadas con citoplasma basófilo observadas en el tejido conectivo de la dermis, particularmente en los casos de lupus crónico, y que podrían ser diferenciadas fácilmente de otras células. (Soyano, 2003, Anaya, 2002)

En 1941, Albert H. Coons mediante la técnica de inmunofluorescencia demostró que el citoplasma de las plasmáticas era rico en anticuerpos específicos contra determinados antígenos. (Soyano, 2003)

Fragaeus demostró que los plasmocitos presentaban un alto contenido citoplasmático de ribonucleóidos, una característica típica de células que sintetizan proteínas. (Soyano, 2003)

Las pruebas sobre la función de los plasmocitos demuestran que son células productoras de anticuerpos y fueron presentadas en 1957 por G.J.V Nossal quien utilizó la técnica de la gota colgante para aislar las células individuales a partir de los linfonodos de ratas inmunizadas con una proteína, así demostró que un plasmocito sólo se produce anticuerpos de una sola especificidad, es decir, contra un solo antígeno. (Soyano, 2003)

## 1.2. ANATOMÍA DEL APARATO RESPIRATORIO DEL CERDO

El aparato respiratorio del cerdo comprende como en todas las especies las vías respiratorias de conducción y el área de intercambio gaseoso.

A.- Vías aéreas de conducción.

1. Componentes

- a. cavidad nasal, senos paranasales y órgano vomeronasal.
- b. nasofaringe
- c. laringe
- d. tráquea
- e. pulmones (bronquios y bronquiolos)

2. Funciones

- a. conducción del aire hacia y desde la zona de intercambio gaseoso en los pulmones
- b. acondicionamiento del aire (limpieza, modificación de la temperatura y humedad)
- c. producción de sonidos
- d. olfato

B.- Área de intercambio gaseoso (respiratoria)

1. Componentes

- a. alveolos pulmonares
- b. vías aéreas terminales
  - (1) Bronquiolos respiratorios
  - (2) Conductos alveolares
  - (3) Sacos alveolares

## 2. Funciones

- a. Intercambio gaseoso respiratorio
- b. Remoción de partículas
- c. Secreción de surfactante pulmonar

### 1.3 Sistema Inmune del cerdo recién nacido.

El tipo de placentación de la cerda (epiteliocorial) mantiene varias capas tisulares entre la circulación materna y la fetal, lo cual impide la transferencia de anticuerpos. En la cerda, como en las demás especies domésticas, la transferencia pasiva de anticuerpos ocurre a través del calostro. La concentración de anticuerpos en el calostro de la cerda ocurre en los últimos días de gestación. Estos anticuerpos son transferidos a través de las células intestinales intactas a la circulación del recién nacido. (Roth,1999)

La inmunidad del recién nacido está limitada por la cantidad y calidad de anticuerpos en calostro y por la cantidad que el neonato sea capaz de absorber(Holland,1990), además de que el repertorio de anticuerpos está restringido en aquellos antígenos para los cuales la cerda ha desarrollado células B de memoria (Chappuis, 1998). La absorción máxima de inmunoglobulinas ocurre en el intestino del lechón durante las primeras 4 a 12 horas después del nacimiento. Las inmunoglobulinas son absorbidas a través del epitelio yeyunal por los vasos linfáticos y entran a la circulación sistémica por el conducto torácico (Porter, 1986). En general, la permeabilidad del epitelio intestinal es mayor inmediatamente después del nacimiento y declina rápidamente dentro de las primeras 24 horas debido a la maduración de las células intestinales, así como por el establecimiento de la flora intestinal. (Chappuis,1998, Rooke, 2002)

## 1.4 INMUNIDAD DE LAS MUCOSAS

Las mucosas juegan un papel muy importante en la defensa inmunológica del cerdo, ya que un gran número de agentes patógenos utilizan las mucosas como vía de entrada.

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 son: flora bacteriana normal, actividad motriz mucosa, sustancias como ácido gástrico y sales biliares intestinales, secreciones mucosas y factores humorales innatos.

Una segunda función del sistema inmunitario de las mucosas es evitar la entrada de antígenos de la mucosa a la circulación y proteger así al sistema inmunitario sistémico de exposición antigénica adecuada. <sup>(Parslow,2002)</sup>

El tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) forma parte del sistema inmune aunque, con cierta independencia del sistema sistémico. Es el encargado de proteger las mucosas del cerdo del ataque de los agentes patógenos, tanto en una respuesta primaria como secundaria. Está formado por nódulos de tejido linfoide que, según su localización, se denominan: GALT y BALT.

La denominación GALT proviene de las palabras inglesas "Gut Associated Lymphoid Tissues" y cuya traducción sería: Tejido linfoide asociado al intestino. El GALT está formado por todo el tejido linfoide que se encuentra en las paredes intestinales (ganglios, placas de Peyer, folículos linfoides aislados). (órganos linfoides secundarios)

La denominación BALT tienen su origen en las palabras inglesas "Bronchus Associated Lymphoid Tissues" en español: tejido linfoide asociado a los bronquios. Está formado por todo el tejido linfoide (tonsilas, ganglios, folículos

linfoides) localizado en las mucosas respiratorias, desde las fosas nasales hasta los pulmones.

Una particularidad del BALT en la especie porcina, a diferencia de los roedores o de la especie humana, es la gran presencia, en los pulmones, de macrófagos intravasculares que presentan gran actividad.

Este tejido linfoide se distribuye de forma estratégica en las siguientes zonas:

- Zonas de procesamiento e inicio de la respuesta inmune. Zonas Inductoras.
- Zonas de respuesta (humoral y celular) denominadas. Zonas efectoras.

Las zonas de inicio o inductoras de la respuesta inmune de las mucosas, disponen de elementos semejantes a los componentes del sistema inmune sistémico para realizar la captación de los antígenos e iniciar la respuesta inmune. Con la única diferencia de las células M, que son unas células epiteliales especializadas en el transporte de antígenos, los demás componentes (células presentadoras, linfocitos T y linfocitos B) actúan de forma similar al sistema sistémico. Estos componentes celulares están localizados en: las tonsilas, placas de Peyer, ganglios y en el tejido linfoide difuso. En definitiva, tanto en las zonas GALT como las BALT (**órganos secundarios del cerdo**) tiene lugar el contacto con el antígeno, transporte, procesamiento y presentación a los linfocitos T y B. en las zonas efectoras también pueden presentarse antígenos, aunque el mecanismo de entrada suele ser diferente al de las zonas inductoras ya que el antígeno puede acceder por endocitosis, mediante las células epiteliales o atravesar las zonas o uniones estrechas. (Tizard, 2002, Sánchez Vizcaíno, 2004)

## 1.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS LINFOCITOS PORCINOS

### 1.5.1 Linfocitos T

Los precursores de estas células proceden de la médula ósea, migran y llevan su maduración en el timo. <sup>(Abbas,2004)</sup> Son la población linfocítica circulante que predomina, y representa hasta el 80% de los linfocitos en sangre periférica. Existen dos tipos de linfocito T que son los linfocitos T cooperadores y los linfocitos T citotóxicos. <sup>(Tizard,2002)</sup>

### 1.5.2. Células NK

Los linfocitos NK (Células Asesinas “Naturale Killer”) presentan una actividad citotóxica frente a células infectadas por virus y células tumorales, aunque no las reconocen por un estímulo antigénico específico. Sus mecanismos de activación se inician al reconocer, de forma natural, células que no expresan adecuadamente el SLA, como ocurre en la mayoría de las células infectadas por virus. Por otra parte, liberan mediadores solubles (**Citoquinas**), tales como: Factor de Necrosis Tumoral (TNF), Interferón gamma, lo que permite la estimulación de diferentes mecanismos linfocitarios. Los linfocitos NK intervienen en la respuesta inmune natural o innata. Estas células se encuentran en mayor proporción en los animales jóvenes, disminuyendo a medida que el animal se va haciendo adulto, lo que indica que el papel de los linfocitos NK parece estar más ligado a los mecanismos de respuesta natural o innata y no a los mediados por estimulación antigénica específica (inmunidad adquirida). Constituyen el 15% de los linfocitos sanguíneos y no expresan los receptores de antígeno de células B y T. <sup>(Sánchez, Vizcaíno, 2004, Roitt, 2001)</sup>



### 1.5.3. Linfocitos B y células plasmáticas.

Constituyen entre el 5 y el 15% del conjunto de linfocitos circulantes, y se caracterizan por la presencia de inmunoglobulinas de superficie. Estas inmunoglobulinas marcadoras son sintetizadas por la propia célula y se encuentran insertadas en la propia membrana celular, en donde actúan como receptores específicos de antígenos. (Roitt, 2001)

Se originan en la médula ósea, aunque maduran en los linfonodos y bazo, y en la pulpa marginal de la pulpa blanca esplénica. Sintetizan inmunoglobulinas los descendientes de un linfocito B activado pueden diferenciarse ya sea en linfocitos B de memoria o en células plasmáticas.

Las células plasmáticas son ovoides y miden de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. Poseen abundante citoplasma rico en retículo endoplásmico rugoso, su núcleo es redondo, con distribución desigual de cromatina, puede llegar a parecer carátula de reloj o una rueda de carreta. Estas células se originan de linfocitos B estimulados por antígeno. Se encuentran distribuidas por todo el cuerpo pero se localizan en mayor cantidad en el bazo, médula de linfonodos y médula ósea. (Tizard, 2002, Roitt, 2001, Cruze, 2004) Con frecuencia migran a la médula ósea donde algunas de ellas pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo una vez inducida la respuesta inmune incluso eliminado el antígeno. (Abbas, 2004)

Las células plasmáticas sintetizan y secretan aproximadamente 10,000 moléculas de inmunoglobulinas por segundo tales como IgG, IgA, IgM e IgE. La inmunoglobulina producida por una célula plasmática tiene idéntica especificidad de unión a antígeno que el BCR (Receptor de células B) original del linfocito B progenitor.

## **1.6 Marcadores de superficie de linfocitos B y linfocitos T.**

Los linfocitos expresan un gran número de moléculas de superficie, que se pueden utilizar para identificar los diferentes estadios de estas poblaciones celulares. <sup>(Roitt,2001)</sup> Se ha desarrollado un método sistémico de nomenclatura, denominado sistema CD (cluster of differentiation) que está determinado por la estirpe celular y el grado de diferenciación, de maduración o de activación. <sup>(Rojas- espinosa, 2001)</sup>

### **1.6.1 Marcadores de superficie de linfocitos T**

Todas las células T tienen moléculas TCR (T-cell receptor), que es el receptor que reconoce los complejos péptido-molécula del MCH. La molécula CD3 es un complejo pentamolecular asociado al TCR y relacionado con la trasducción de señales. Otros marcadores importantes son; CD2, CD4, CD8, CD25 y CD45, cada uno desempeña una función diferente en los linfocitos T. <sup>(Bullido,1999, Zuckerman,1998)</sup>

### 1.6.2 Marcadores de superficie de linfocitos B

Al igual que otras células, los linfocitos B exhiben moléculas o antígenos de diferenciación, algunos de los cuales son exclusivos de los linfocitos B, en tanto que otros se encuentran también en otras células. Algunos de estos antígenos son el CD34, CD10 <sup>(Stites,1993)</sup>, CD40 <sup>(Roitt,2001)</sup>, CD1 y CD21 <sup>(Boersman,2001)</sup>. Asimismo, los linfocitos B tienen en su membrana celular receptores para C3b, uno de los componentes del sistema del complemento. <sup>(Rojas- Espinosa,2001)</sup>

En las muestras por inclusión en parafina y teñidas con Verde Metil Pironina (VMP) se puede observar el RNA de manera intensa ya que en esta técnica se une de manera específica a este y lo permite observar de color rosa intenso, esto se relaciona con la célula que está desarrollando una síntesis intensa de proteína. <sup>(Estrada, 1982; Cortès,2003)</sup>

**Tabla 1. Distribución y función de los marcadores (CD) de las células B en los cerdos.**

Marcador	Distribución	Función respuesta
CD1c	Todos los linfocitos B	interviene en la presentación de antígenos no peptídicos.
CD1C	En células pro-B	Endopeptidas neutra, se expresa transitoriamente en los progenitores menos diferenciados.
CD21	Todos los linfocitos B	Receptor de complemento
CD34	Células progenitoras	Molécula de adhesión y marcador de células madre.
CD40	Células pre-B hasta células B de memoria	La unión de CD40 al receptor de CD40 permite que la célula T cooperadora active a la célula B de memoria y en células plasmáticas, permanece toda la vida.

(Bullido, 1999, Chun, 1999, Shailubhai, 1997).

## **2. OBJETIVOS.**

### **2.1. Objetivo general:**

- ✚ Cuantificar la cantidad de células plasmáticas en linfonodo traqueobronquial, tonsila, pulmón derecho región craneal, región caudal, accesorio y pulmón izquierdo región craneal y región caudal de cerdos recién nacidos clínicamente sanos mediante la tinción de Verde Metil Pironina.

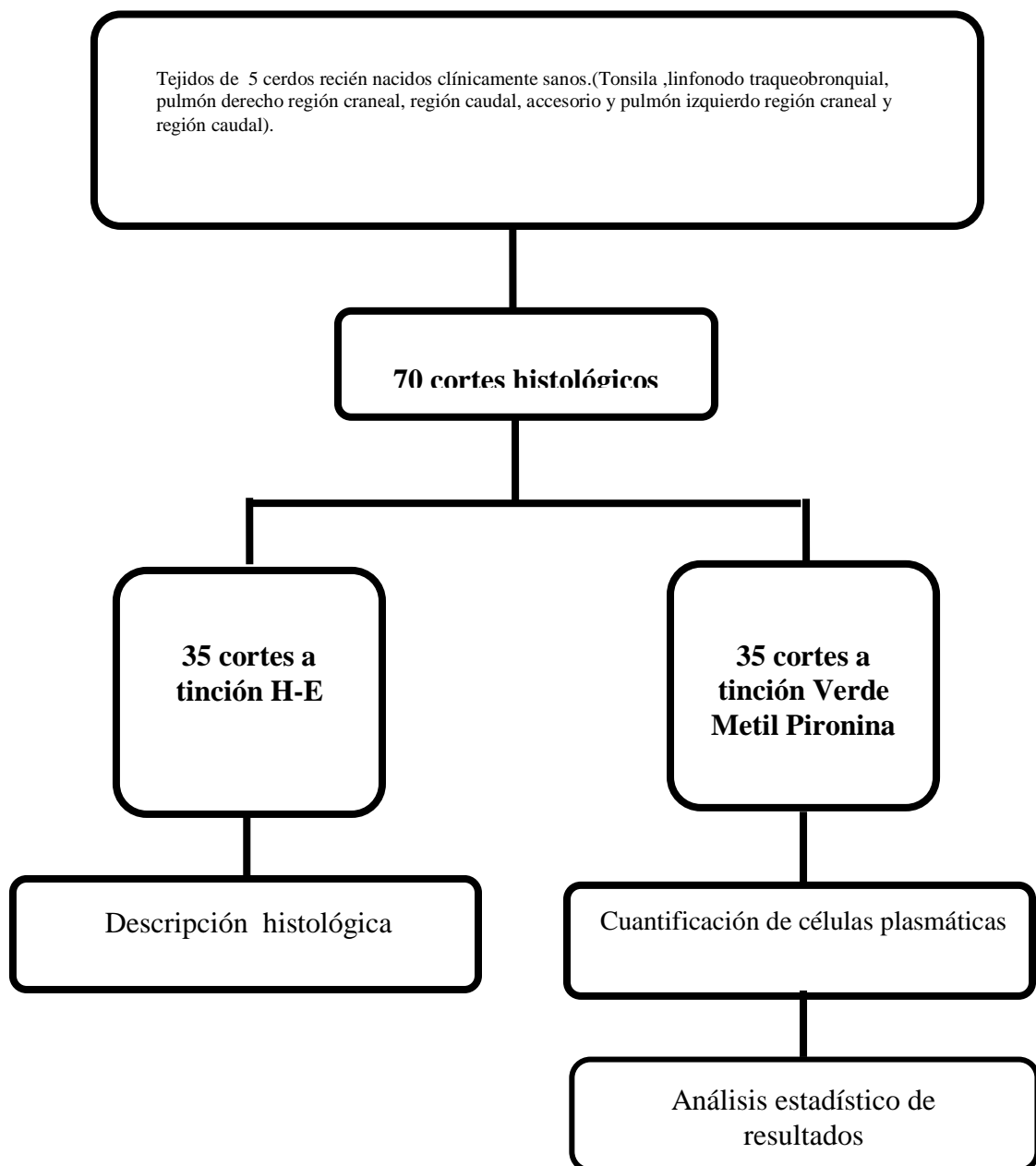
### **2.2. Objetivos Específicos:**

- ✚ Observar mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina las características histológicas de linfonodo traqueobronquial, tonsila, pulmón derecho, accesorio y pulmón izquierdo.
- ✚ Establecer la distribución y cuantificación de células plasmáticas en de linfonodo traqueobronquial, tonsila, pulmón derecho, accesorio y pulmón izquierdo, de cerdos recién nacidos clínicamente sanos.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Diseño experimental.

Figura A.



### 3.2. Material Biológico.

Se obtuvieron bloques parafinados de las siguientes regiones anatómicas: linfonodo traqueobronquial, tonsila, pulmón derecho región craneal, caudal, accesorio y pulmón izquierdo región craneal y región caudal del tracto respiratorio de 4 cerdos recién nacidos clínicamente sanos, de un peso promedio de 500 gramos, estos animales se encontraban libres *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRR y Aujeszky.

#### Cuadro 1

Diferentes muestras estudiadas.

<i>Animales</i>	1 (Tonsila)	2 (P.D Craneal)	3 (P.D Caudal)	4 (P.D Accesorio)	5 (P.I Craneal)	6 (P.I Caudal)	7 (Linfonodo)
<b>Cerdo F</b>	2	2	1	1	1	2	4
<b>Cerdo I</b>	4	2	1	2	4	3	7
<b>Cerdo J</b>	3	2	2	2	1	1	5
<b>Cerdo K</b>	2	1	3	1	0	2	5
<b>SUMA</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>21</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>2.75</b>	<b>1.75</b>	<b>1.75</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>	<b>5.25</b>

Esta parte del trabajo se realizó en el laboratorio de histología bajo la supervisión del M.F Germán Isauro Garrido Fariña.

Se realizaron cortes en el microtomo (Leica RM 820) a un grosor de 5u.

Se montaron los cortes en portaobjetos y se procedió a la realización de la tinción respectiva.

### 3.3. Tinción Hematoxilina-Eosina.

- ✓ Se desparafinaron las muestras en Xileno por 5 min. En dos pasos.
- ✓ Se procedió a la rehidratación de la muestra.
  - ❖ Alcohol etílico al 100% I 5 min.
  - ❖ Alcohol etílico al 100% II 5 min.
  - ❖ Alcohol etílico al 96% I 5 min.
  - ❖ Alcohol etílico al 96% II 5 min.
  - ❖ Alcohol etílico al 80% 5 min.
  - ❖ Alcohol etílico al 70% 5 min.
  
- ✓ Se realizó el lavado en agua destilada durante 5 min.
- ✓ Teñido con Hematoxilina de Harris durante 8 min.
- ✓ Lavado con agua corriente.
- ✓ Decolorado en alcohol ácido.
- ✓ Lavado con agua corriente.
- ✓ Estabilización en carbonato de litio.
- ✓ Lavado con agua corriente.
- ✓ Lavado con agua destilada durante 5 minutos.
- ✓ Teñido con Eosina de Carnegy durante 3 minutos.
- ✓ Lavado con agua corriente para quitar el excedente de colorante.
- ✓ Deshidratación en alcohol etílico al 96% I.
- ✓ Deshidratación en alcohol etílico al 96% II.
- ✓ Deshidratación en alcohol etílico al 100% I.
- ✓ Deshidratación en alcohol etílico al 100% II.
- ✓ Aclarado en Xileno en dos pasos.
- ✓ Montado en resina sintética.

### 3.3.1. Observación y Toma de Imagen.

Todas las preparaciones histológicas que fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina fueron observadas para su estudio morfológico en un microscopio óptico modelo Leyca DME con cámara fotográfica a 10X, 20X y 40X en el laboratorio 6 de la unidad de investigación multidisciplinaria de la Facultad de estudios Superiores Cuautitlán C4. De cada una de las laminillas que se observaron fueron seleccionados campos microscópicos representativos, cuidando tanto tinción como morfología.

Los campos seleccionados fueron tomados digitalmente por el programa de cámara, mediante el programa Studio 9 Quick-start y fueron procesados electrónicamente mediante el programa Imagen .Pro Plus TM.

Algunas de las imágenes fueron descritas en cuanto a sus detalles histológicos por lo que se aportaron 3 fotografías para la observación histológica de los tejidos.

### 3.4. Tinción Verde Metil Pironina.

Preparación de Verde Metil Pironina:

Verde metilo.....	0.15 g.
Pironina B.....	0.25 g.
ROH 96.....	2.5 ml.
Fenol.....	0.5 g.
Glicerina.....	20 ml.
Agua destilada.....	c. b. p. 100 ml



- 1) Desparafinado e hidratado de acuerdo a la técnica descrita anteriormente.
- 2) Teñido con Verde Metil Pironina durante 5 minutos.
- 3) Lavado con agua corriente.
- 4) Decolorado con acetona.
- 5) Deshidratación en alcohol absoluto en dos pasos.
- 6) Aclarado en Xileno en dos pasos.
- 7) Montado con resina sintética.

### **3.4.1. Cuantificación de Células Plasmáticas**

Para llevar a cabo la determinación de las células plasmáticas objeto de nuestro interés se realizó conteo en campos tomados aleatoriamente en un microscopio de luz con epifluorescencia (Carl Zeiss, Axioscop 40) con cámara fotográfica Evolucion VF (Cibernetica Media) De estos se seleccionaron 10 campos con objetivo de 40x por laminilla cuantificando el número de células plasmáticas identificadas por la reacción a la pironina sobre el ARN de la célula el cuál se distinguía de color rojo intenso.

Con los resultados finalmente obtenidos se obtuvo un promedio para crear una base de datos, los promedios obtenidos de los 5 cerditos recién nacidos fueron analizados mediante el programa estadístico Graph Pad Prisma versión 4 por la prueba de ANOVA por medio de computadora.

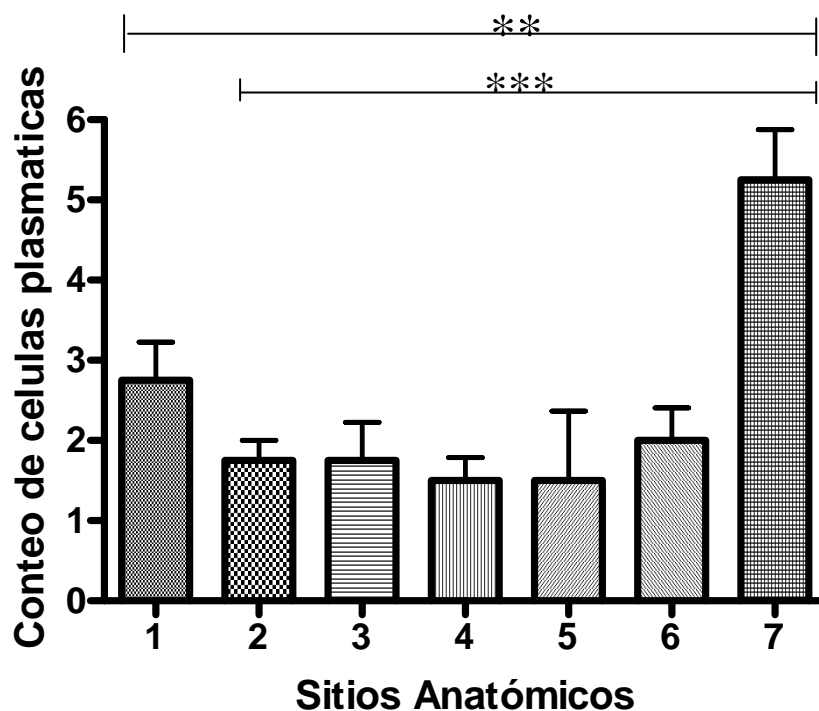
## 5. RESULTADOS

Los cerdos recién nacidos no mostraron lesiones microscópicas a la revisión de la histología (Tinción H-E). El número de células plasmáticas encontradas se encuentran en el cuadro 1 y en la grafica 1.

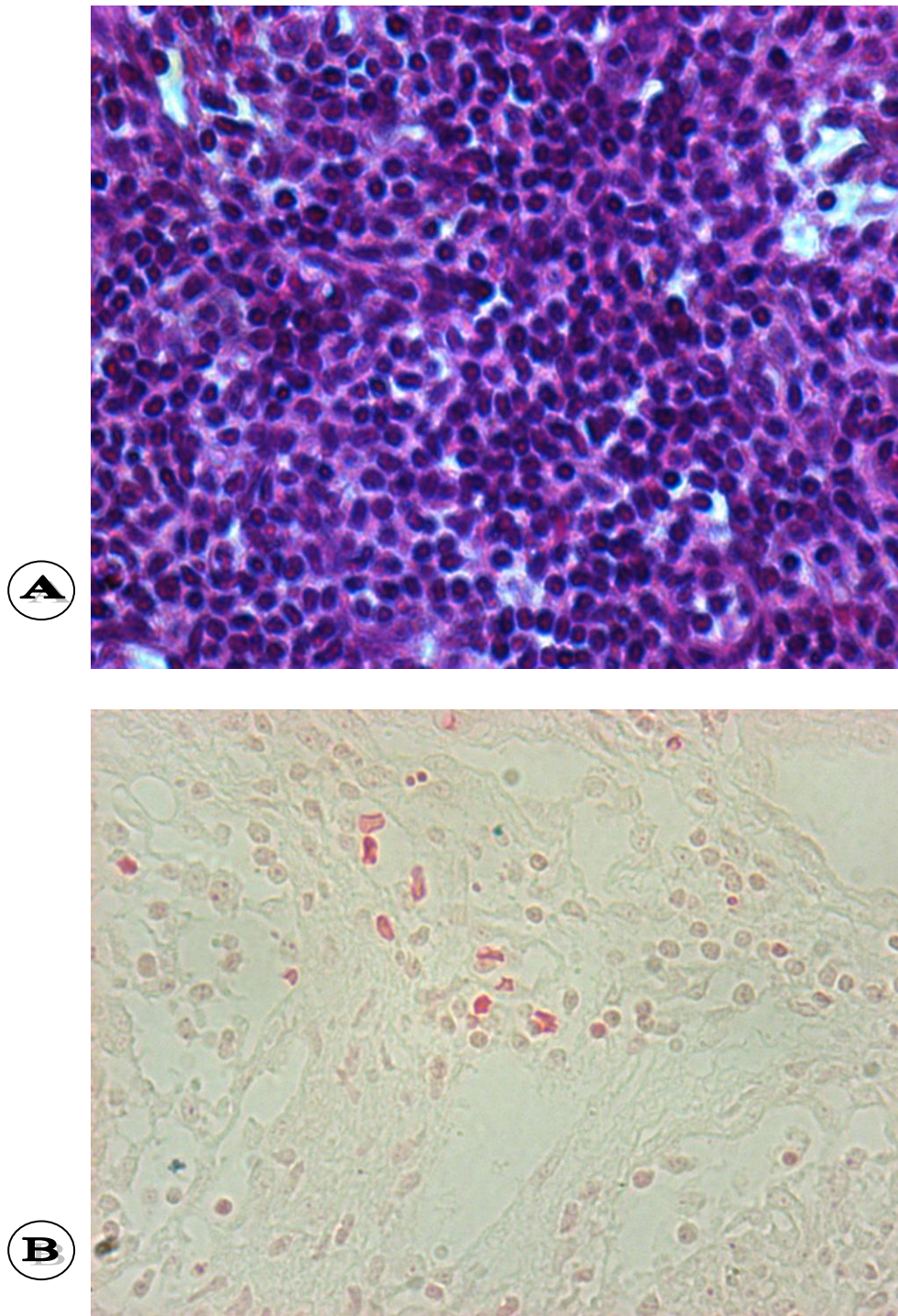
**Cuadro 1.** Suma de células plasmáticas (CP) por laminilla, equivalente a 10 campos microscópicos en tonsila, regiones pulmonares y linfonodo traqueobronquial de los cerdos recién nacidos (n =4).

<b>Animales</b>	<b>1 (Tonsila)</b>	<b>2 (P.D Craneal)</b>	<b>3 (P.D Caudal)</b>	<b>4 (P.D Accesorio)</b>	<b>5 (P.I Craneal)</b>	<b>6 (P.I Caudal)</b>	<b>7 (Linfonodo)</b>
<b>Cerdo F</b>	2	2	1	1	1	2	4
<b>Cerdo I</b>	4	2	1	2	4	3	7
<b>Cerdo J</b>	3	2	2	2	1	1	5
<b>Cerdo K</b>	2	1	3	1	0	2	5
<b>SUMA</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>21</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>2.75</b>	<b>1.75</b>	<b>1.75</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>	<b>5.25</b>

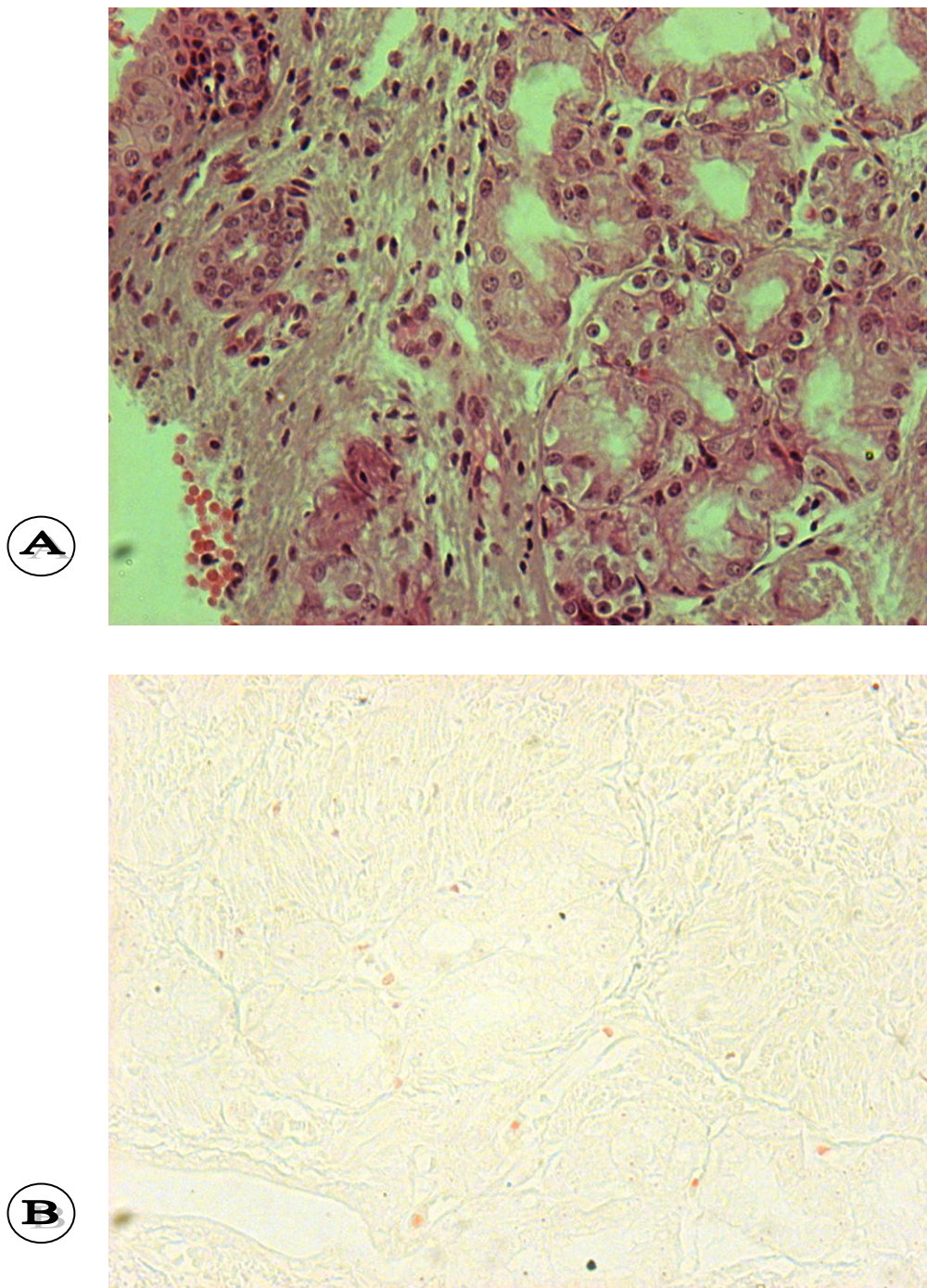
Gráfica 1.



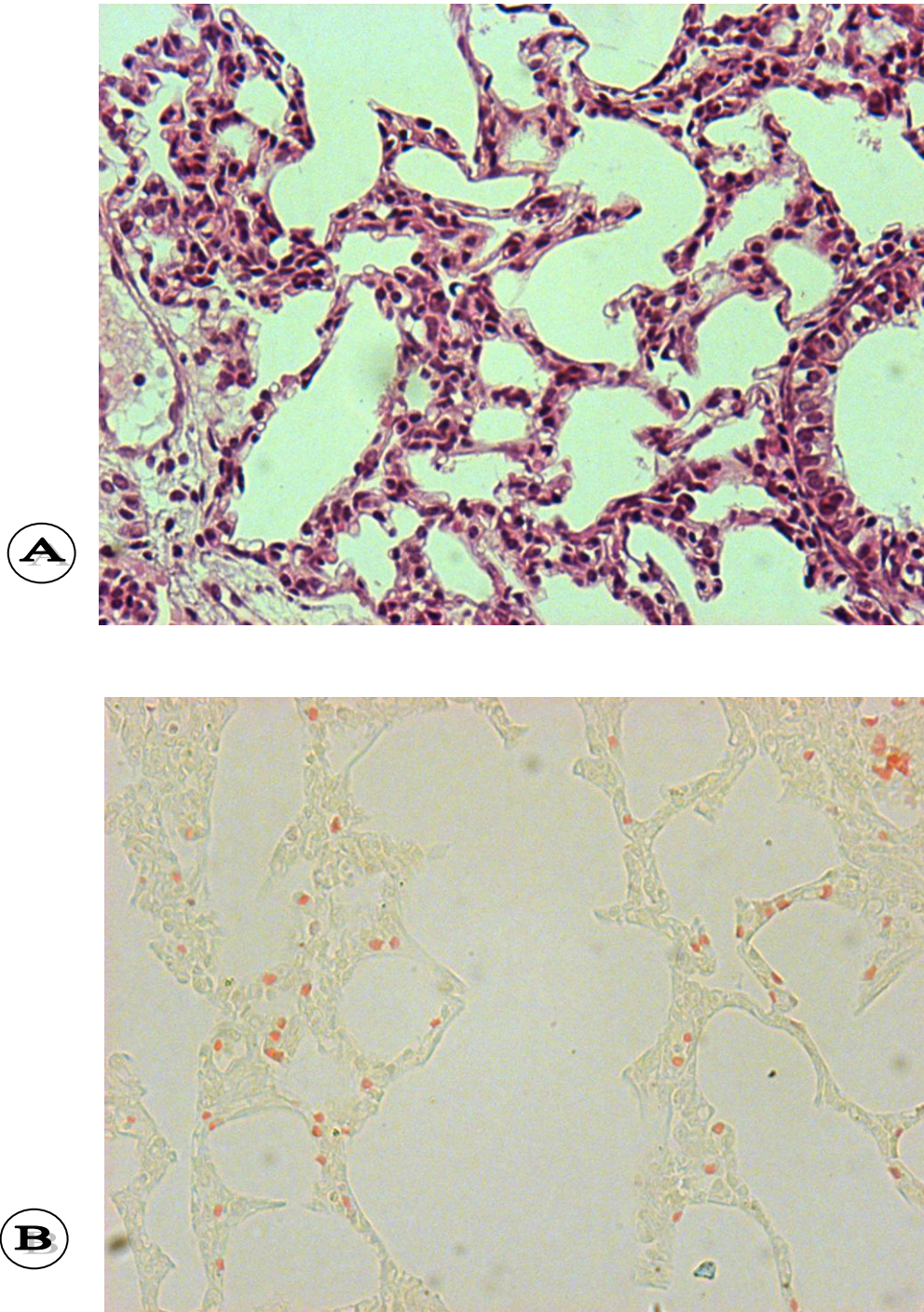
Número de células plasmáticas en diferentes regiones anatómicas en el tracto respiratorio del cerdo recién nacido (n=4). Las barras representan la media y la desviación estándar de células posibles mínimo de 10 campos microscópicos por animal, 1:Tonsila, 2:P.D lóbulo craneal, 3: P.D lóbulo caudal, 4: P.D lóbulo accesorio, 5: P.I lóbulo craneal, 6: P.I lóbulo caudal, 7: Linfonodo traqueobronquial, Las barras representan +/- el error estándar de los campos estudiados en cerdo recién nacido (\*\*P<0.01), (\*\*\*)P<0.001). Prueba estadística de ANOVA.



**Fig. 1.** Sección de linfonodo traqueobronquial. **A.** Tinción de Hematoxilina Eosina. **B.** Se muestran células plasmáticas (células rojas) mediante la tinción de Verde Metil Pironina. (40x)



**Fig.2.** Sección de tonsila. **A.** Tinción de Hematoxilina Eosina. **B.** Se muestran células plasmáticas (células rojas) mediante la tinción de Verde Metil Pironina. (20x)



**Fig.3.** Sección de pulmón izquierdo. **A.** Tinción de Hematoxilina Eosina. **B.** Se muestran células plasmáticas (células rojas) mediante la tinción de Verde Metil Pironina. (40x)

## 6. DISCUSIÓN.

Existe poca información bibliográfica referente a la distribución de las células plasmáticas en cerdos, sólo se conocen trabajos de células productoras de anticuerpos ante la presencia de infecciones, por lo que se analizó la población de estas células en regiones específicas del aparato respiratorio porcino empleando la tinción de Verde Metil Pironina para evidenciar la presencia de estas células y la tinción de H.E para observar la histología de los tejidos utilizados.

En base a los datos obtenidos se encontró que en los cerdos recién nacidos hay un mayor número de células plasmáticas en linfonodo traqueobronquial, en comparación con los diferentes sitios anatómicos estudiados, obteniéndose diferencia estadística significativa sobre la media de ( $p < 0.01$ ) con la tonsila y ( $P < 0.001$ ) con pulmón.

En base a las investigaciones se sabe que las células plasmáticas son productoras de inmunoglobulinas y por lo mismo se esperaría que no habiendo presencia de patógenos el número de las mismas sea muy bajo, cabe mencionar que ya existiendo un trabajo previo en donde se realizó el conteo de células plasmáticas en cerdos adultos la presencia de CP se ve incrementada notablemente debido a la exposición que ha tenido el animal a los diversos agentes patógenos, en este caso la exposición es casi nula por lo mismo el resultado obtenido y graficado es bajo, pero es importante recalcar que la población de células plasmáticas es escasa aun en presencia de antígenos.

Posiblemente la cantidad células plasmáticas que se encuentran en linfonodo traqueobronquial está determinada por la función del órgano; al retener los antígenos que puedan llegar a través de la linfa y proceder a su presentación y procesamiento antigénico mediante la colaboración de los macrófagos y los linfocitos que los componen, un linfonodo contiene una región de células B

(córtes), una región de células T (paracórtes) y médula central, en la que aparecen cordones celulares que contiene células T, células B, células plasmáticas y macrófagos.

La presencia de células plasmáticas en tonsila constituye en condiciones normales una población escasa ya que aunque se pudo tener contacto con antígenos por la vía de entrada es interesante reconocer que los cerdos son recién nacidos y que es poco probable que se haya tenido contacto con algún agente patógeno, esto nos puede indicar que es una población normal de la tonsila del recién nacido pues son acumulaciones de tejido linfoide y tienen la función de drenaje.

La población de células plasmáticas encontradas en las regiones pulmonares son muy escasas ya que el promedio mas alto lo presentó el P. Izquierdo Lóbulo Caudal, del resto de las regiones pulmonares no mostraron desviación significativa, esto podría deberse a que es raro encontrar células plasmáticas circulantes, ya que constituyen menos del 0.1% de la población linfocitaria total. La literatura marca que suelen estar confinadas en los órganos linfoides secundarios, aunque también son abundantes en médula ósea.



## 7. CONCLUSIONES

**Los órganos estudiados presentaron una población escasa de células plasmáticas, estos resultados se pueden entender por que existe según estudios una disminución en el número de linfocitos que presenta el porcino en el periodo que abarca del nacimiento a los cinco días de edad y a la baja o nula exposición a antígenos.**

La identificación de células plasmáticas se realizó mediante la tinción de VMP ya que nos permitió la identificación de las mismas por la interacción que tiene la pironina con el RNA en las células.

La histología normal de los tejidos se realizó mediante la tinción de H.E lo cual nos ayudó a evitar un conteo abundante de células plasmáticas en caso de algún proceso infeccioso y descartarlo de la investigación.

La mayor cantidad de células plasmáticas se encontraron en linfonodo traqueobronquial, con un promedio de 5.25 CP, esto se debe a la función que realiza el órgano y debido a su constitución natural de poblaciones de células B.

La presencia de células plasmáticas en tonsila constituye en condiciones normales una población escasa por lo tanto el resultado obtenido nos puede indicar que es una población normal de la tonsila del recién nacido pues son acumulaciones de tejido linfoide y tienen la función de drenaje, obteniendo un promedio de 2.75 CP en el estudio realizado.

En las regiones pulmonares estudiadas la presencia de células plasmáticas es extremadamente escasa ya que como se sabe la población de células plasmáticas circulantes es mínima además que depende de la presencia de

agentes patógenos para poder encontrarlas en abundancia en algunos órganos. En el estudio se encontró que la región pulmonar en donde se encontraron mayor cantidad de células plasmáticas fue en pulmón izquierdo lóbulo caudal, encontrando un promedio de 2 CP en comparación con el resto de las regiones pulmonares estudiadas como fue pulmón derecho craneal y caudal cuyo promedio fue de 1.75 CP, en cuanto al pulmón accesorio y el pulmón izquierdo región craneal el promedio obtenido fue de 1.5 CP.

La distribución de células plasmáticas encontradas en los órganos estudiados son compatibles con lo encontrado en la poca información que marca la literatura si tomamos en cuenta la función de los órganos y la etapa de los animales que se estudiaron.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A.K. Lichman, H., Inmunología celular y molecular, 5ta edición,. España, Elseiver España S.A., 2004.
2. Garner, L.P. Hiait, J.L. Texto Atlas de histología, 2<sup>a</sup> edición, McGraw-Hill interamericana, México. 2002.
3. Bancroft, D. Theory and practice of Histological techniques. 6ta. edition Elsevier, 2008.
4. Boersma, W.J.A, Zwart, R J, Sumary of workshop findings for porcine B-cell markers. Veterinary Immunology and inmunopatghology. 2001.
5. Bullido R., Domenech, N., Ezquerra, A., Dominguez J., Monoclonal antibodies 2F6/8 recognize a porcine antigen, expressed on B cells and activated T cell. Journal of Inmunological Methods 222:1:11 (1999).
6. Castillo, P.G.A., “Plasma cell Distribution in the respiratory Sistem of Pig” FES-Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Edo. De México, 2009.
7. Chappus, G., Neonatal immunity and unmunization in early age: lesson from veterinary vaccine 16:1468-1472 (1998).
8. Cordero, H.M., “Determinación de los linfocitos B y T en órganos Linfoides de cerdos Recién Nacidos”, Tesis de licenciatura. FES-Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Edo. México, 2004.
9. Cortes, F.N., “Identificación de linfocitos afectados durante la infección experimental en el conejo por *Escherichia coli* enterohemorrágica. Tesis de licenciatura. FES Cuautitlán, UNAM, 2003.

10. Dellman, H.D., "Textbook of veterinary histology", 4ª. edición, Intermédica, Argentina, 2006.
11. Dyce, K. W. Et. Al., "Anatomía Veterinaria" 3ra. edición, Manual Moderno, México, 1999.
12. Fradson, R.D. et.al., "Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos", 5ª edición. Interamericana McGraw Hill, México, 1995.
13. Getty, R.S., "Anatomía de los animales domésticos", 5ta. edición, Salvat Editores S.A., España, 2000.
14. Halliwell, R.E.W., Gorman, N.T., "Inmunología Clínica Veterinaria", Acribia S.A. España, 1992.
15. Cruse, M.J., "Atlas of immunology", Press. 2da edición, Edit. CRC 2004.
16. Montaráz, J.A., "Introducción a la Inmunología" 1ra. edición, Cuautitlán Izcalli, Edo. México. FESC-1997.
17. Garrido F.G.I., Cornejo, C.M.A., "Manual de colorantes para laboratorios de ciencias biológicas", 1ra edición, UNAM, FESC. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2003.
18. Parslow, T.G., et.al., "Inmunología Básica y Clínica", 10ª. edición, El Manual Moderno, México, DF., 2002.
19. opesko, P. "A colour of the anatomy of small laboratory animals", Tomo II, Salvat Editores S.A. España, 2002.
20. Rojas E. O., Inmunología. 2ª edición, Médica Panamericana, México. 2003.
21. Roitt, I., Brostoff, J., "Inmunología" 4ta. edición. Harcourt. Madrid, 1998.

22. Rooke, J.A., The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livestock production Science* 78:13-23, 2002.
23. Roth, J.A., The immune system". En; Straw B.E, D'Allaire D.S. I Taylor B.J *Dieases of swine* 8<sup>th</sup> edition, Iowa State university press, Ames, Iowa 1999.
24. Sánchez Vizcaíno J.M., "Curso de Introducción a la Inmunología porcina", 2<sup>a</sup> edición, Laboratorio Hipra S.A., Madrid ,2004.
25. Soyano, A.,, Cap. 8 "El renacimiento de la inmunología celular", 2003 <http://cea.ivic.ve/topicoimmunologia/CAP%2008.oeipdf.16mayo2006>
26. Stites D.P., "Inmunología Básica y Clínica", 7<sup>a</sup> edición, El Manual Moderno, México, D.F., 1993.
27. Tizard Ian R., "inmunología Veterinaria", 6ta. Edición, McGraw-Hill Interamericana,México,2002.
28. Wayne, W. D., "Bioestadística, Base para el análisis de las Ciencias de la Salud", Limusa. 4ta. edición. México, 2009.
29. Cruse, M. J.L.," Atlas of immunology" second edition, ACA Press USA. 2004.
30. Ogra, L. P., "Mucosal Immunology". Second edition, ACA Press, USA. 1999.
31. Goldsby. A. R., "Kuby Immunology", fourth edition. New York, 2000.