

PERFIL INMUNOLOGICO DE LOS CERDOS DE DOS MESES DE EDAD\*

DOLORES GONZALEZ-VEGA Y AGUIRRE \*\*

MA. ISABEL CISNEROS MORALES \*\*

ANGEL GERMAN MARTINEZ SOSA \*\*

VICTOR MANUEL ZENDEJAS BUITRON \*\*

ANTONIO MORILLA GONZALEZ \*\*

El grado de madurez inmunológica se ha evaluado en humanos y animales por medio del perfil inmunológico, el cual se basa en la cuantificación de los diferentes leucocitos y subpoblaciones de linfocitos circulantes, en la capacidad fagocitaria y microbicida de los leucocitos y en la respuesta intradérmica a antígenos (Shimizu y col., 1976; Higgins, 1981; Katz, 1985). En el cerdo el perfil se conoce en parte, por ejemplo, se han dado como valores normales para linfocitos T de 30 a 45% pero no se conocen las concentraciones de los linfocitos T de alta afinidad (Taa) que son maduros, o los linfocitos T autólogos (Taut) o inmaduros; por lo que respecta a los linfocitos B que poseen inmunoglobulina en su superficie, se consideran valores normales de 16 a 27% y que corresponden a linfocitos con receptor para la región Fc (Bfc) de las inmunoglobulinas y B con receptor para complemento (BC); por último, existen los linfocitos Null, que no son B ni T, y que en cerdos adultos se consideran alrededor del 30% (Shimizu y col., 1976; Joroskova y

\* Proyecto financiado en parte por CONACyT.

\*\* Proyecto Inmunología Experimental del Cerdo. Centro Nacional de Investigaciones en Microorganismos, INIFAP-SARH. Carr. México-Toluca, Km. 15.5. México, D.F., C.P. 05110.

Téc. Pec. Méx. Vol. 25, No. 2 (1987).

Kovaru, 1978; Binns, 1980; Outteridge y col., 1982; Muller, 1984).

Con respecto a la capacidad fagocitaria y microbicida de las células adherentes de la sangre periférica, se ha encontrado en humanos, cobayos y bovinos que desde el nacimiento hasta los dos meses de edad es paulatina la adquisición de la respuesta fagocitaria (Miller, 1979; Weeks, 1979; Hauser y col., 1986). En cerdos no se han hecho este tipo de estudios.

Para evaluar la respuesta inmune celular en humanos, cerdos y otras especies domésticas se han utilizado la prueba intradérmica con diversos antígenos, tales como el dinitrofluorobenceno, la varidasa, el PPD, la fitohemaglutinina, entre otros (Katz, 1985; Mann y Hargis, 1985).

El objetivo de este trabajo fue determinar los valores normales de los leucocitos circulantes, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y las subpoblaciones de linfocitos; la capacidad fagocitaria, el mecanismo oxidativo por reducción del nitroazul de tetrazolio y el índice fagocitario de los leucocitos, así como la respuesta a la prueba intradérmica con fitohemaglutinina, en cerdos de ocho semanas de edad que es cuando son aptos para

responder a todas las vacunas (Morilla, 1983).

Se usaron 16 cerdos cruce de Yorkshire y Landrace de alrededor de ocho semanas de edad, con un peso promedio de  $10 \pm 0.300$  kg a los que se les proporcionó alimento producido en la misma granja. En dicha granja se destetan los cerdos a las cuatro semanas de edad.

La metodología fue la siguiente:

La biometría hemática se determinó por los métodos convencionales (Bentinck-Smith, 1969).

La determinación de subpoblaciones de linfocitos, se realizó de acuerdo a la técnica de rosetas descrita por Salmon y col., (1975) y Vega y col., (1986) con utilización de glóbulos rojos de borrego y glóbulos rojos de cerdo. Se consideró como roseta al linfocito cubierto con tres o más eritrocitos (Binns, 1978).

La prueba de fagocitosis y de reducción del nitroazul de tetrazolio se efectuó según la técnica descrita por Gómez y col., (1980). Para su desarrollo se obtuvo sangre venosa sin anticoagulante, se depositaron tres gotas de sangre sobre un cubreobjetos, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 h y el coágulo se desprendió mediante lavado de cubreobjetos con solución salina fisiológica; las células se cubrieron con Medio Esencial Mínimo<sup>1</sup> y se le adicionó 1 ml de levaduras por cada fagocito ( $5 \times 10^6$  levaduras/ml). A la mitad de los cubreobjetos, además de las levaduras, se les añadió 1 ml de nitroazul de tetrazolio<sup>2</sup> al 0.1%, se incubaron 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y se lavaron con solución salina fisiológica. Las células que sólo fagocitaron las levaduras fueron teñidas con el colorante Wright<sup>3</sup> y a las que se les añadió el nitroazul de tetrazolio se les tñió con safranina<sup>2</sup>.

1 GIBCO, Grand Island, N.Y., U.S.A.

2 Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. U.S.A.

3 Merk Sharp and Dohme. Rahway, N.J., U.S.A.

Por medio del microscopio se contó tanto el número de células que fagocitaron a las levaduras como las que redujeron el nitroazul de tetrazolio; los valores se expresaron como porcentajes.

Para la prueba intradérmica se inyectó en la cara interna de la pierna 0.1 ml de fitohemaglutinina M<sup>1</sup> en una dilución 1:2 en solución salina amortiguada de fosfatos (SSAF) pH 7.4. Con un vernier se midió el grosor de la piel a las 0, 24, 48 y 72 h después de la inoculación. Como testigo se inoculó 0.1 ml de SSAF pH 7.4.

Los resultados de la concentración de leucocitos, la fórmula diferencial y las subpoblaciones de linfocitos se presentan en los Cuadros 1 y 2. En relación a los leucocitos se encontró que en promedio el 78% (rango 60-87%) de las células adherentes de la sangre periférica fagocitaron a las levaduras y el 75% (rango 70-81%) redujeron el nitroazul de tetrazolio, con una ingestión promedio de 2.7 (rango 1.9-4.5) levaduras por fagocito.

Los animales fueron positivos a la prueba intradérmica de fitohemaglutinina, en la que mostraron la mayor reactividad a las 24 h (Figura 1).

Los resultados obtenidos en este trabajo, en lo que se refiere a los diferentes tipos de leucocitos y a las subpoblaciones de linfocitos, son semejantes a los encontrados por otros autores (Bentinck-Smith, 1969; Kolb, 1976; Salmon, 1979; Binns, 1980), lo cual indica que a las ocho semanas de edad los cerdos tienen valores de adulto y es probable que estén aptos para desarrollar una buena respuesta inmune. Además, a esta edad los animales dieron una respuesta positiva a la inyección intradérmica con fitohemaglutinina.

Con respecto a la funcionalidad de las células fagocitarias circulantes, se encontró que el mismo porcentaje de

Cuadro 1

Concentración total y diferencial de leucocitos circulantes en cerdos de 8 semanas de edad

Leucocitos	Células/mm <sup>3</sup> *	%
Leucocitos	16,000 ± 1698	100.0
Monocitos	1072 ± 114	6.7
Neutrófilos segmentados	4896 ± 520	30.6
Neutrófilos en banda	480 ± 51	3.0
Eosinófilos	240 ± 25	1.5
Linfocitos	9137 ± 969	57.1

\* Promedio y error estandar de 16 cerdos

Cuadro 2

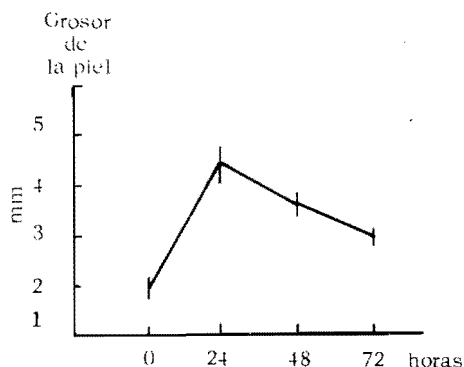
Concentración de subpoblaciones de linfocitos circulantes en cerdos de 8 semanas de edad

Subpoblaciones	Células/mm <sup>3</sup> *	%
T Totales	3782 ± 402	41.4
1. T alta afinidad	1029 ± 109	27.2
2. T autólogos	28 ± 3	0.7
Bfc	2531 ± 268	27.7
Bc	668 ± 71	26.4
Null	2860 ± 304	31.3

\* Promedio y error estandar de 16 cerdos.

Figura 1

Respuesta de la piel a la inoculación intradérmica con fitohemaglutinina



células que fagocitan cuenta con capacidad reductora, lo que indica una buena capacidad microbicida, así como un índice fagocítico similar al encontrado en cerdos adultos (datos no publicados). Estos valores no se habían notificado en el cerdo; por otra parte son semejantes a los obtenidos en humanos de edades entre 24 y 26 años a pesar de que en proporción a ellos los cerdos son más jóvenes (Basurto Celaya y col., 1985).

Cuando se compara el perfil inmunológico de los cerdos en las primeras semanas de vida (Haye y Kornegay, 1979; McCauley y Hartmann, 1984; Cisneros, 1985) con el obtenido a las ocho semanas, se observa que durante las tres primeras semanas de vida el sistema inmune está inmaduro y hasta los dos meses de edad tiene la suficiente madurez para desarrollar una buena respuesta inmune. Es por este motivo que se considera entre la sexta y la octava semana de edad el período más adecuado para vacunar a los cerdos.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Joaquín Becerril, Director de la Granja Experimental Porcina "Zapotitlán" de la Facultad de

Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, su ayuda en la realización del presente trabajo al permitirnos hacer uso de las instalaciones y del material biológico de dicha granja.

## LITERATURA CITADA

BASURTO CELAYA, G., SANTOS ARGUMENTO, L., SANCHEZ, T. y ARREDONDO, J.L., 1985. Estandarización de una técnica para evaluar la función fagocítica en infantes. Resúmenes del XVI Congreso Nacional de Microbiología en la Asociación Mexicana de Microbiología. Durango, Dgo. México.

BENTINCK SMITH, J., 1969. Hematology. En A textbook of Veterinary Clinical Pathology. Editado por W. Medway, J.E. Prier y J.S. Wilkinson. Publicado por The Williams and Wilkins Co. Baltimore, Ma, U.S.A. p. 205.

BINNS, R.M., 1978. Sheep erythrocyte rosettes in pigs, sheep, cattle and goats demonstrated in the presence of dextran. *J. Immunol. Meth.* 21:197.

BINNS, R.M., 1980. Pig lymphocyte, behaviour, distribution and classification. *Monogr. Allergy*, 66:19.

CISNEROS, M.I., 1985. Valores normales de las subpoblaciones de linfocitos en cerdos de 1, 2, 3 y 10 semanas de edad. Tesis de licenciatura en Medicina Veterinaria y Zoot. Fac. de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. de México.

GOMEZ, E.E., RAMOS, D.M.E. y VAZQUEZ, E.C., 1980. Actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares humanos a diferentes temperaturas. *Arch. Invest. Med.* 11:65.

HAUSER, A.M., KOOB, D.M. and ROTH, A. J., 1986. Variation of neutrophil function with age in calves. *Am. J. Vet. Res.* 47:152.

HAYE, S.N. and KORNEGAY, E.T., 1979. Immunoglobulin G, A and M and antibody response in sow-reared and artificially-reared pigs. *J. Animal Sci.*, 48:1116.

HIGGINS, D.A., 1981. Markers for T and B lymphocytes and their application to animals. *Vet. Bull.* 51:925.

- JAROSKOVA, L. and KOVARU, F., 1978. Identification of T and B lymphocytes in pig by combined E-rosette and surface Ig labeling, *J. Immunol. Meth.*, 22:253.
- KATZ, P. 1985. Valoración clínica y de laboratorio del sistema inmunitario. *Clínicas Médicas de Norteamérica*, 3:481.
- KOLB, E., 1976. Fisiología Veterinaria, Ed. *Acribia*, España, p.465.
- MANN, D. and HARGIS, J.W., 1985. Intradermal testing of swine to monitor changes in delayed hypersensitivity response. *Am. J. Vet. Res.*, 46:2363.
- McCAULEY, I. and HARTMANN, P.E., 1984. Changes in piglet leukocytes, after weaning. *Res. Vet. Sci.* 37:234.
- MILLER, E.M., 1979. Phagocyte function in the neonate; selected aspects. *Pediatrics*, 64.
- MORILLA, G.A., 1983. Mecanismos de resistencia del lechón. *Porcrama*, 95:58.
- MULLER, G., 1984. Enumeration of B and T lymphocytes in cattle and swine, *Arch. Exper. Vet. Med.* 38:555.
- OUTTERIDGE, P.M., BINNS, R.M. and LICENCE, S.T., 1982. Subpopulations of pig blood E-rosette forming lymphocytes and thymus-dependent null cells; Separation by nylon wool columns, rosette formation and macrophage-dependent mitogen and antigen responsiveness. *Internat. Arch. All. Appl. Immunol.*, 67:18.
- SALMON, H., RIVIER, Y., GOUERE, P. et GORET, P., 1975. Technique d'identification des sous-population lymphocytaires porcines. *Bull. Acad. Vet.* 48:199.
- SALMON, H., 1979. Surface markers of porcine lymphocytes and distribution in various lymphoid organs. *Int. Arch. All. Appl. Immun.*, 60:262.
- SHIMIZU, M., PAN, I.C. and HESS, W.R., 1976. T and B lymphocytes in porcine blood. *Am. J. Vet. Res.*, 37:309.
- VEGA, M.A., RICO, J. y SANCHEZ HIDALGO, C., 1986. Determinación de linfocitos T y B. En, Manual de Inmunología. Editado por A. Morilla y C.R. Bautista. *Editorial Diana*. México, p. 275.
- WEEKS, B.E., 1979. Effects of age and nutrition on macrophage function. *J. Retic. Soc.* 26:459.