



**RESPUESTA INMUNE CELULAR EN LECHONES
"CRIOLLOS MEXICANOS" AL DESTETE**

Por

Luis Alfonso Guerrero Quiroz

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(AREA DE INMUNOLOGÍA)**

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**

2000.



**RESPUESTA INMUNE CELULAR EN LECHONES
"CRIOLLOS MEXICANOS" AL DESTETE.**

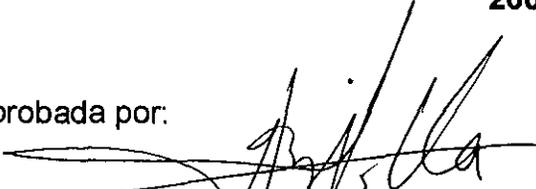
Por

Luis Alfonso Guerrero Quiroz
Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(AREA DE INMUNOLOGÍA)**

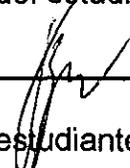
**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
2000**

Aprobada por:



Dr. Daniel A.F. Villagómez Zavala
Presidente del Comité Particular del estudiante

Fecha 14-Julio-2000



Dra. Galina Zaitseva Petrovna
Asesor del Comité Particular del estudiante

Fecha 20.06.00



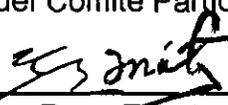
Dr. Jacinto Bañuelos Pineda
Asesor del Comité Particular del estudiante

Fecha 26 Junio-2000



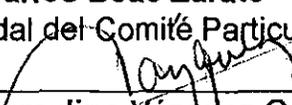
Dr. Alfonso E. Islas Rodríguez
Sinodal del Comité Particular del estudiante

Fecha 26 Junio 2000



Dr. Carlos Beas-Zarate
Sinodal del Comité Particular del estudiante

Fecha 29/JUNIO 2000



Dr. Marcelino Vázquez García
Coordinador de Posgrado del CUCBA

Fecha 24/Julio/2000



Dedicatorias

BIBLIOTECA CENTRAL

A mi familia por su gran apoyo durante toda mi vida en especial a mis padres porque han sido piedras fundamentales en el desarrollo de mi vida y por ser tan amorosos y comprensivos.

A mi hijo Luis Ángel a quien quiero con todo mi corazón y algún día quiero verlo también elaborando su tesis de maestría.

A mi hermano Ángel por sus valiosos consejos que me han servido y servirán de ejemplo toda la vida (con todo mi corazón en el recuerdo).

A mis hermanos; Dora por su gran apoyo y consejos; a Hilda por su amor y confianza; Rosana por su cariño y apoyo; a Mario por su hermandad y sonrisa y Alonso por toda su confianza, cariño y sobre toda su alegría en la vida.

A mi novia Paola y a alex por todo su amor, apoyo, comprensión, cariño y confianza que me han brindado y sobre todo por su alegría, sus bromas y su bonita sonrisa.

A mi cuñado Gonzalo por su gran apoyo familiar y por haber sido un gran ingeniero y trabajador (con todo mi amor en el recuerdo).

A mi cuñado Ramiro por todas esas muestras de cariño hacia mi familia y hacia mi persona y por su buen sentido del humor.

A mi cuñada Cristina por su cariño, por su apoyo y sus buenas bromas.

A mis sobrinos Ramiro, Rosana, Eric, Nidia, Cesar, Gonzalo, Itzel, Ángel Adrián, y a la niña más chiquita Legna, para que se realicen todos sus objetivos y sus metas, para que en sus carreras desarrollen su capacidad y su intelecto, mejorando siempre, ayudando a sus padres y siguiendo los buenos ejemplos.

A mi padre por tenerlo siempre a mi lado y por haber hecho de mí un estudiante, por su ejemplo de dedicación al trabajo y por ser un muy buen hombre (Esto te lo debo a ti Padre).

A mi madre por estar siempre a mi lado, por sus consejos, por su gran amor y por ser lo más sagrado en mi vida (Te dedico esta tesis con todo mi corazón y con todo mi amor, te amo)

Agradecimientos

A mi director de tesis el Ph. D. Daniel A.F. Villagómez Zavala por su gran apoyo en la realización de esta tesis, por sus consejos y su amistad.

A mis Asesores la Dra. Galina Zaitzeva Petrovna por toda su ayuda y colaboración en el proceso experimental y la realización de esta tesis.

Al Dr. Jacinto Bañuelos Pineda por su valiosa colaboración en la realización de este documento y todo su apoyo incondicional.

Al Dr. Alfonso E. Islas Rodríguez por su gran apoyo en la maestría y por sus valiosos consejos y amistad.

Al Dr. Carlos Beas Zarate por su valioso apoyo en mi formación durante la maestría, sus consejos y orientaciones.

Al Dr. Clemente Lemus Flores por su apoyo con el cerdo criollo mexicano y por su apoyo bibliográfico, así como sus muestras de amistad.

Al MVZ. Jorge Galindo por su gran apoyo en el rancho Cofradía, su amistad y confianza. Al M. en C. David Román Sánchez Chiprés por todo su apoyo y colaboración en el rancho Cofradía, sus consejos y amistad.

A mi amigo y compañero el MVZ. Antonio Mestas por su valioso apoyo en la toma de muestras, por su amistad, su alegría, su carisma y sus bromas.

Al MVZ. Alfredo Peña González por su gran apoyo en la toma de muestras y su disposición siempre de amigo.

A mi amigo y compañero de Laboratorio el MVZ. Miguel Ángel Ayala Valdovinos por su apoyo incondicional en el Centro de Biotecnología Animal, por su alegría, su sonrisa, amistad y compañerismo.

A mis compañeros de la maestría la QFB. Josefina Casas y al Biol. Ricardo Solís por su valiosa ayuda en el laboratorio y su apoyo incondicional.

A mis amigos, compañeros y colegas a los M. en C. Juan Jesús Roa Vidal y al M. en C. Armando Arévalo por su gran amistad, su alegría, compañerismo, y sobre todo por su gran fuerza y valor de seguir adelante siempre en el conocimiento y desarrollo de su intelecto.

A los miembros de los Departamentos de Biología Molecular y Celular, Producción Animal, Centro de Biotecnología Animal y Rancho Cofradía por todo su apoyo siempre positivo.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA ANIMAL DEL RANCHO COFRADÍA Y EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

Índice

Contenido:	Página
Índice de Cuadros.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Abreviaturas.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xi
I. Introducción	1
II. Antecedentes Científicos.....	5
III. Planteamiento del Problema.....	14
IV. Objetivos.....	15
V. Material y métodos.....	16
VI. Resultados.....	19
VII. Discusión.....	33
VIII. Conclusiones.....	36
IX. Bibliografía.....	37
X. Anexos.....	41
Anexo 1 Metodología para cultivo celular linfoproliferación en sangre periférica del cerdo.....	42
Anexo 2 Diagrama de flujo sintético cultivo celular	45
Anexo 3 Metodología para fagocitosis	46
Anexo 4 Diagrama de flujo sintético fagocitosis	48
Anexo 5 Preparación de medio de cultivo de <i>Cándida Albicans</i>	49
Anexo 6 Registro del Cerdo Criollo Mexicano y Comercial.....	50
Anexo 7 Fotografías de líneas de Cerdos Criollos Mexicanos.....	51

Lista de cuadros

- 1.- Respuesta proliferativa cuentas por minuto en el Cerdo Criollo Mexicano antes del destete.
- 2.- Respuesta proliferativa cuentas por minuto en el Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes del destete.
- 3.- Respuesta proliferativa cuentas por minuto en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace después del destete.
- 4.- Respuesta proliferativa índice de estimulación en el Cerdo Criollo Mexicano antes del destete.
- 5.- Respuesta proliferativa índice de estimulación en el Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes del destete.
- 6.- Respuesta proliferativa índice de estimulación en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace después del destete.
- 7.- Porcentaje de mortalidad del Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes y después del destete.

Lista de figuras

- 1.- Respuesta proliferativa (cpm) de linfocitos de Cerdos Criollos Mexicanos vs. Cerdos Comerciales F₁ Yorkshire x Landrace estimulados con PHA 20 $\mu\text{g/ml}$ antes y después del destete.
- 2.- Respuesta proliferativa (cpm) de linfocitos de Cerdos Criollos Mexicanos y Cerdos Comerciales F₁ Yorkshire x Landrace estimulados con PHA 20 $\mu\text{g/ml}$ antes vs. después del destete.
- 3.- Respuesta proliferativa (IE) de linfocitos de Cerdos Criollos Mexicanos vs. Cerdos Comerciales F₁ Yorkshire x Landrace estimulados con PHA 20 $\mu\text{g/ml}$ antes y después del destete.
- 4.- Respuesta proliferativa (IE) de linfocitos de Cerdos Criollos Mexicanos y Cerdos Comerciales F₁ Yorkshire x Landrace estimulados con PHA 20 $\mu\text{g/ml}$ antes vs. después del destete.
- 5.- Porcentajes de fagocitos activos en el Cerdo Criollo Mexicano vs. Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes y después del destete.
- 6.- Porcentajes de fagocitos activos en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes vs. después del destete.
- 7.- Índice de fagocitosis en el Cerdo Criollo Mexicano vs. Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes y después del destete.
- 8.- Índice de fagocitosis en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes vs. después del destete.
- 9.- Índice de ingestión en el Cerdo Criollo Mexicano vs. Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes y después del destete.
- 10.-Índice de ingestión en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes vs. después del destete.
- 11.-Índice de digestión en el Cerdo Criollo Mexicano vs. Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes y después del destete.
- 12.-Índice de digestión en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes vs. después del destete.

Lista de abreviaturas

CCM	Cerdo Criollo Mexicano.
CPM	Cerdo Pelón Mexicano
CCO	Cerdo Comercial.
DAID-IS	Domestic Animal Diversity Information System.
FAO	Organización para la Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas.
Ig	Inmunoglobulinas.
[³ H]	Timidina tritiada.
CD	Marcadores de superficie
ACTH	Hormona Adrenocorticotropa.
SARH	Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.
INIP	Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.
PHA	Fitoheماغلutinina.
ANOVA	Análisis de varianza ~
v/v	Volumen / volumen.
μl	Microlitros.
μg/ml	Microgramos por mililitro.
cpm	Cuentas por minuto.
IE	Índice de estimulación.
IF	Índice de fagocitosis.
II	Índice de Ingestión.
ID	Índice de digestión.
PA	Porcentaje de activos.

Resumen

El Cerdo Criollo Mexicano representa una población endémica que se encuentra en las costas del Océano Pacífico, Atlántico y en el Sureste de México, estos fueron traídos por los españoles durante los primeros años de la conquista del país. Esta población fue seleccionada naturalmente a varias condiciones ambientales, incluyendo factores infecciosos y nutricionales de México. El propósito de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune celular en lechones Criollo Mexicano durante la etapa de destete a través de dos técnicas inmunológicas: linfoproliferación y fagocitosis, caracterizando inmunológicamente este tipo de cerdo en comparación de cerdos comerciales (F1 Yorkshire x Landrace). Linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA a diferentes concentraciones para determinar la mejor actividad blastogénica. Se midió la actividad fagocítica de macrófagos. Los resultados mostraron una respuesta similar de linfoproliferación y fagocitosis en ambos tipos de cerdos, criollo mexicano y comercial antes y después de la etapa del destete. Sin embargo, existió una tendencia para una mejor respuesta inmune en el cerdo criollo mexicano. No obstante el porcentaje de fagocitos activos e índice de ingestión fue significativamente diferente entre grupos, siendo mejor la respuesta inmune del cerdo criollo mexicano ($p < 0.01$). No existieron diferencias significativas entre razas de cerdos sobre el índice de cuentas por minuto, como medida de linfoproliferación, e índice de digestión. Se observó un porcentaje de mortalidad similar durante el periodo de estudio para ambos tipos de cerdos.

Abstract

The "Mexican Criollo Pig" represent an endemic population that is found an the Pacific and Atlantic coast, and Southeastern part of Mexico, they were brought for the Spanish people during the first years of the country conquest. This population was naturally selected to several environmental conditions, including infectious and nutritional factors of Mexico. The aim of this work was to study the cellular immune response in criollo mexican piglets at the weaning phase, by means of two immunology techniques: lymphoproliferation and phagocytosis, characterizing immunologically this type of pig in comparison to commercial pigs (F1 Yorkshire x Landrace). Lymphocytes from peripheral blood were PHA stimulated at different concentrations in order to determine the best blastogenic activity. The phagocytosis activity of macrophages was measured. The results shown similar lymphoproliferation and phagocytosis response in both mexican criollo and commercial pigs before and after the weaning phase. However, there was tendency for a better immune response in the mexican criollo pig. Nevertheless, the percent of active phagocytes and ingestion index was significant different between groups, being better the mexican criollo pig's immune response ($p < 0.01$). There were not significant differences between pig breeds regarding the digestion index and disintegration per minute index a measure of lymphocyte proliferation response. Similar mortality percent was observed during the study phase for both type of pigs.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

I. Introducción

En México se han realizado pocos estudios para caracterizar al cerdo nativo que es conocido como Cerdo Criollo Mexicano. El Cerdo Criollo Mexicano (**CCM**) representa una población endémica que se localiza en las costas mexicanas del Océano Pacífico, del Atlántico y en el Sureste Mexicano (Baldizón, 1971).

Esta población fue originada a partir de animales introducidos por los españoles durante los primeros años de la conquista del país. Dicha población, con sus distintos biotipos, es probable que se hayan formado a partir de cerdos tipo Ibérico, Céltico y Napolitano con cerdos de tipo Asiático provenientes de China, Japón o Filipinas, por el comercio establecido después de la conquista (Flores, 1970).

Estos animales se volvieron silvestres, esparciéndose por el territorio nacional, la falta de control propició el cruzamiento entre estas razas, trayendo como consecuencia la creación de nuevos biotipos como el llamado Cerdo Pelón Mexicano (**CPM**). Así, de manera natural, esta población fue seleccionada a las distintas condiciones ecológicas, incluyendo factores infecciosos y nutricionales al menos por 500 años (Berruecos, 1972; Flores, 1992; Gallardo, 1941).

Actualmente estas poblaciones se localizan en el Golfo de México y costas del Pacífico; comprendiendo los estados de Oaxaca, sur de Veracruz, Chiapas, Guerrero, Tabasco, Yucatán y algunos estados hacia el occidente del país como Michoacán, Nayarit y Jalisco (Tello y Cisneros 1990).

En México, la porcicultura es una actividad que se encuentra en los tres primeros lugares de importancia en el ramo pecuario, teniendo la producción de traspatio o rural un gran interés de autoconsumo. Dentro de la producción de traspatio o rural, que es el sistema básico en regiones tropicales, el Cerdo Criollo Mexicano representa una importante alternativa de fuente de proteína de origen animal y de autosuficiencia económica (Lemus, 1999).

Estos animales son de gran rusticidad, aprovechan gran cantidad de granos, frutas, raíces y subproductos agrícolas, así como desperdicios domésticos generados en el núcleo familiar, razón por la cual son explotados bajo un sistema poco tecnificado y, por lo regular, no se tiene algún tipo de prevención contra las enfermedades bacterianas y parasitarias más comunes, por lo que muy probablemente presentan alta resistencia a las enfermedades de manera adaptativa (Cárdenas, 1966; Baldizón, 1971).

Por lo anterior, estas poblaciones pueden ser el origen de determinantes genéticos de resistencia natural a diversas enfermedades, habilidades digestivas para consumir subproductos fibrosos y tolerancia a condiciones tropicales (Nájera, 1989).

Dentro de la producción porcina en México, se encuentra la explotación del Cerdo Criollo Mexicano (Aoporto y Trujillo, 1986; Castellanos y Gómez, 1984; Pérez, 1985), reconociéndose tres tipos por el DAD-IS (*Domestic Animal Diversity Information System*) de la Organización para la Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO): El **Birich**, el **Cascote** y el **Cuino** que corresponden al Cerdo Pelón Mexicano, Pata de Mula y Cuino, respectivamente. Sin embargo, la FAO carece de información precisa, no menciona las fuentes de información y no reporta algún tipo de intento de conservación in-situ o ex-situ.

Debido a la constante introducción de razas mejoradas de cerdos en las explotaciones porcícolas, el CCM está siendo absorbido con riesgo inminente de extinguirse, sin embargo, debemos considerar que su germoplasma es un patrimonio único, no renovable. Una variante del CCM, el **Cuino**, es considerada por la FAO como en estado de riesgo crítico con menos de 100 individuos (Loftus y Sherf, 1992).

El Cerdo Pelón Mexicano fue el único criado en México hasta finales del siglo pasado. En la actualidad sin datos precisos, el número de este tipo de cerdos es menor del 30% del total de la población porcina (Flores, 1978), considerada hasta 1993 en 11 millones de cerdos (FAO, 1993).

El **Cerdo Pelón Mexicano** tiene la cabeza y cara rectilínea, orejas de tamaño mediano, semierectas, dorso un tanto rectilíneo con ancas completamente caídas, el cuerpo está parcial o totalmente desprovisto de pelo, su color es grisáceo o combinado con blanco y son de talla mediana, teniendo una alzada de 72 cm y una longitud de 1.4 a 1.5 m (Castellanos y Gómez, 1984; Flores, 1992), es el mas abundante, difundido y estudiado, tiene semejanza con el cerdo Ibérico.

El **Cerdo Pata de Mula** se identifica por la presencia de sindactilia dominante sobre pezuña normal, teniendo presencia de pelo con coloración variable, es de tamaño mediano y de perfil variable mas bien cóncavo (Flores, 1992).

El **Cerdo Cuino** tiene el pelo sumamente rizado, pero puede estar desprovisto de él, el color mas frecuente es el negro, pero los hay rojos e incluso pintos, alcanzan a lo sumo 49 ± 9 Kg. de peso con 53 a 65 cm de alzada, ya que su tipo de cuerpo es pequeño con marcada tendencia a acumular grasa, presentando un tipo de cara cóncava y hocico corto, con abundante grasa en los músculos maceteros, es poco prolífico (Flores, 1992).

El Cerdo Pelón Mexicano es el cerdo criollo mas difundido, no se tiene un censo oficial sobre su número y distribución geográfica (Flores,1992). Estos animales son criados en comunidades rurales en explotaciones de tipo familiar, no se puede hablar de una raza pura, ya que generalmente están cruzados, pero conservan una elevada proporción de características de la raza (Cárdenas, 1966; Cabello,1969).

Al pretender conservar este biotipo de Cerdo Pelón Mexicano, es importante conocer sobre su diversidad y distancias genéticas para tomar decisiones sobre que conservar. En el caso de que sea reducida la diversidad genética entre los diversos grupos poblaciones, entonces con conservar individuos provenientes de un solo grupo, sería más que suficiente para garantizar la preservación de este germoplasma (Lemus, 1999).

Aunque se ha estudiado su comportamiento productivo, poco se conoce sobre su diversidad genética. Actualmente se estudia que tan homogéneos son los distintos grupos poblacionales, para obtener datos precisos que nos lleven a conocer si estas poblaciones son genéticamente distantes y que tanta variabilidad existe en ellas, también se investiga a nivel molecular su origen a través de metodologías como marcadores genéticos hipervariables, huellas genéticas de DNA (*DNA fingerprinting*), minisatélites, microsátélites locus-específicos y DNA mitocondrial (Lemus, 1999).

Aunque el cerdo es un modelo excelente para estudiar las enfermedades del humano, las dos especies obviamente son diferentes. Muchos aspectos del sistema inmune difieren, reflejando diversidad evolutiva. Diferencia anatómica (la estructura rara de nódulos de la linfa del porcino), fisiológica (el número elevado de linfocitos T) y genética (la diversidad extrema dentro del gen del receptor de linfocitos T), son algunas de las diferencias más notables. Aunque el sistema inmune del cerdo ha estado bajo estudio por muchos años, los conocimientos todavía son escasos (Tumbleson et al., 1996).

El análisis de estas diferencias, de los rasgos heredables y su respuesta a organismos patógenos específicos proporcionará una área fructífera para la investigación del futuro y podría beneficiar en gran medida a los productores de cerdos.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

II. Antecedentes Científicos

En estudios inmunológicos realizados con cerdos de líneas comerciales se conoce que el lechón, al nacimiento, se encuentra prácticamente desprovisto de anticuerpos, esto es debido a las seis capas de tejido que contiene la placenta del cerdo, por lo que la transferencia de la inmunidad pasiva es adquirida por medio del calostro al ingerir anticuerpos maternos (Newby et al., 1982).

En la placenta no existe traslado alguno de inmunoglobulinas maternas por circulación fetal, por consiguiente, el calostro mantiene a los lechones en un ambiente libre de gérmenes por lo que estos son un excelente modelo para diferenciar entre reacciones inmunes innatas y estímulos a los antígenos externos (Tlaskalowa-Hogenova et al., 1994).

Como es bien sabido, la producción de calostro dura unas pocas horas, de manera que los anticuerpos así ingeridos serán la única protección frente a microorganismos patógenos, hasta que el sistema inmune del lechón sea capaz de producir sus propios anticuerpos (Durán, 1990).

La transferencia de inmunoglobulinas de madre a lechones se realiza a través de la succión del calostro en las primeras 3-6 horas de vida absorbiéndose por vía intestinal y pasando posteriormente al suero (Porter, 1969; Bourne, 1973).

Se han descrito en el cerdo cuatro isotipos de inmunoglobulinas, la IgM, IgG, IgA e IgE y la posible existencia de la IgD porcina que todavía no se ha podido demostrar en forma concluyente (Sánchez, 2000).

La concentración de las inmunoglobulinas porcinas en la leche materna es: IgG 1.3, IgM 0.3-0.9, IgA 3-7 mg/ml y en el calostro de 30.70, 2.5-3.2 y 9.5-10 mg/ml, respectivamente. La IgE que representa sólo el 0.01% se ha podido determinar mediante métodos funcionales, incluso inducida por la presencia de virus como el de la Peste Porcina Africana (Sánchez, 2000).

La fracción Fc de la IgE presenta un fragmento con gran afinidad para unirse a la membrana de los basófilos donde reaccionará con el antígeno permitiendo la liberación de los diferentes productos inflamatorios contenidos en los gránulos de estas células, fundamentalmente en el cerdo se libera gran cantidad de histamina sobre todo a nivel intestinal y del tracto respiratorio, estos mecanismos de defensa son de gran importancia en las infecciones parasitarias (Sánchez, 2000).

La IgM es la primera inmunoglobulina en producirse tras una respuesta inmune y es el isotipo predominante en la respuesta primaria, la IgM es la segunda inmunoglobulina en concentración en suero, después de la IgG representando entre 10 y un 12% del total de inmunoglobulinas porcinas ya que la IgG proporciona el 80% del total, mientras que la IgA el 7.09% y la IgE menos del 0.01%, siendo sólo un componente menor (Sánchez, 2000).

El papel de la IgM es de gran importancia como primera inmunoglobulina de defensa en la respuesta humoral y aunque su grado de afinidad para reaccionar con el antígeno es inferior al de la IgG, su formación pentamérica le permite unirse de forma múltiple con diferentes antígenos y poder activar el Complemento, una sola molécula de IgM pentamérica unida a antígeno es capaz de iniciar la activación del Complemento y la fagocitosis, la IgM es una inmunoglobulina particularmente efectiva frente a un gran número de bacterias gram negativas y puede neutralizar agentes virales, no se han descrito diferentes subclases de IgM en el cerdo, aunque sí se ha podido observar una variante alotípica en algunos animales, debido a su gran tamaño la IgM se encuentra fundamentalmente en el suero sanguíneo (Sánchez, 2000).

La IgA es la más importante en la inmunidad de las mucosas y la principal en la lactancia, se han descrito dos subclases en el cerdo IgA1 e IgA2, la actividad de la IgA en las mucosas actúa a tres niveles diferentes evitando la penetración de los antígenos en la pared del intestino, neutralizando la actividad de algunos virus, dentro de las células epiteliales y fuera de ellas (Sánchez, 2000).

La IgG es el isótipo principal en el cerdo, es el anticuerpo más importante en la respuesta secundaria, se han descrito, al menos, cinco subclases de IgG: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4, sin embargo, el estudio de ADN ha puesto en evidencia que existen ocho genes que codifican la región constante C γ , el papel de esta inmunoglobulina en la respuesta humoral es vital, presenta un elevado índice de afinidad por los antígenos, pudiendo opsonizarlos para facilitar la fagocitosis, aglutinarlos o precipitarlos (Sánchez, 2000).

A partir de la tercera semana de vida, el lechón comienza a ser inmunocompetente, es decir comienza la propia producción de anticuerpos, y no es hasta la sexta u octava semana de vida cuando ya completo su maduración inmunológica (Buxadé, 1996).

Datos recientes han destacado las similitudes entre la señal de reconocimiento al patógeno y los mecanismos efectores en la inmunidad innata: que se refiere a la organización de la primera línea de defensa que sirve para limitar la infección en etapas tempranas después de la exposición a microorganismos, así, en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* y en mamíferos se señala que existe un linaje común de estas defensas (Hoffmann et al., 1999).

Además de su papel en la fase temprana de defensa, la inmunidad innata en mamíferos parece jugar un papel muy importante en la estimulación subsecuente de la respuesta de inmunidad adaptativa (Hoffmann et al., 1999).

Las diferentes funciones de la inmunidad innata son claramente identificables, es un componente esencial de defensa contra la infección y se encuentra en la escena cuando se requiere, la inmunidad innata puede controlar la infección hasta que la respuesta inmune adaptativa tome el control, diferencia entre lo propio y lo no propio perfectamente, asimismo, la inmunidad innata es esencial para la inducción y dirección de la respuesta inmune adaptativa (Janeway, 2000).

El sistema inmune innato comprende los monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, células natural killer, además de linfocitos intraepiteliales de la superficie mucosal, entre otros, este sistema es un requisito previo para una eficaz inmunidad adaptativa (Fox y Harrison, 2000).

Al contacto con la mayoría de microorganismos se activa el reconocimiento al patógeno producto de un juego de receptores, estos receptores, reconocen modelos moleculares compartidos por grupos grandes de microorganismos y no sólo descubren su presencia sino también determinan el tipo de patógeno que infecta, estos receptores activan y controlan la expresión de genes en la respuesta inmune (Medzhitov y Janeway, 2000)

Por otro lado, a escala anatómica, se demostró que la estructura del ganglio linfático del cerdo es diferente a otras especies con una inversión aparente, estando el tejido cortical del ganglio en el interior y el tejido medular en el exterior, sin embargo, el principio de la mezcla de corrientes celulares es el mismo que para la oveja, por lo que los linfocitos específicamente sensibilizados de distintos orígenes se ponen en contacto con antígenos y microorganismos llegados a los ganglios linfáticos de lugares periféricos, tales como la piel (Outteridge, 1985).

Ciertamente no existe evidencia de que el cerdo se encuentre en desventaja con otras especies por esta inversión de los ganglios linfáticos en referencia a su resistencia a los microorganismos invasores, las diferencias anatómicas y fisiológicas de los ganglios linfáticos del cerdo probablemente arrancan de cambios sufridos en el ganglio del cerdo durante la evolución, el elevado número de linfocitos en la sangre del cerdo es probablemente una resultante fisiológica predecible de una recirculación linfocitaria inusual y una similar variación en la estructura del ganglio linfático (Outteridge, 1985).

En el cerdo, como en otras especies, el tamaño de los órganos linfoides y sus diferentes compartimentos son principalmente dependientes de la edad y estado medio ambiental del animal en forma individual (Rothkotter et al., 1991; Joling et al., 1994), por ejemplo, los nódulos pequeños sin centros germinales de la linfa están presentes en animales libres de gérmenes, considerando que el buen desarrollo de los nódulos grandes de la linfa se encuentran en cerdos convencionales.

También el número absoluto de linfocitos por gramo de tejido y por órgano linfoide entero se puede utilizar como referencia para un experimento que trata de alteraciones en el sistema inmune. La estructura invertida del nódulo de la linfa del cerdo es peculiar, pero no restringida a los cerdos; se encuentra esta estructura anatómica también en el elefante, rinoceronte, delfín, hipopótamo y nódulos de la linfa del jabalí (Binns, 1982).

La medula del ganglio linfático es mucho más grande que en otras especies, y contiene gran cantidad de macrófagos, eosinófilos y células plasmáticas. A pesar de esta estructura invertida las demás funciones del nódulo de la linfa de cerdos es similar a otras especies (Binns, 1982).

La estructura peculiar de los órganos linfoides, el efecto de edad, cría y número de linfocitos se debe tomar en consideración en estudios integrales cuantitativos en el sistema inmune en cerdos.

Por muchos años las células del porcino fueron principalmente identificables por adhesión al nylon-lana, células B y ausencia de adherencia al nylon-lana, células T, (Binns, 1982).

En el cerdo, las células T se han identificado con exactitud utilizando dextran para estimular la aglutinación (Binns, 1982), esto se ha logrado en la sangre, timo, ganglios linfáticos y bazo. Utilizando este método se obtiene una pureza mayor del 90% de células linfocíticas de sangre de cerdo. Los datos existentes sobre la dosis optima del mitógeno PHA en el experimento de linfoproliferación para las distintas especies reportadas por diferentes autores son muy diversas y varían entre 5 y 100 $\mu\text{g/ml}$, por lo que en cada estudio respectivo debe realizarse la estandarización de éste parámetro metodológico (Barrete, 1990).

Los anticuerpos anti-inmunoglobulinas se han utilizado también para estimular las células B del cerdo, y la respuesta puede medirse por el consumo celular de timidina tritiada [^3H] a través de cuentas por minuto (Binns, 1982).

Las células fagocíticas pueden ser identificadas por la habilidad de ingerir partículas, tal como el látex (Pescovitz et al., 1984).



La estructura anatómica funcional de órganos linfoides y el número de células linfoides y no-linfoides se han analizado en órganos del cerdo extensivamente (Binns, 1982; Binns et al., 1986; Binns y Pabst, 1988, 1994), además de los órganos linfoides de los compartimentos diferentes del pulmón del cerdo (Pabst y Binns, 1994) y la piel, los cuales se sabe contienen gran cantidad de linfocitos (Fritz, et al., 1990).

Johnson et al., (1980), realizaron varios intentos para preparar células con antisuero policlonal contra células T en los porcinos y quizá fueron los que mejor lo caracterizaron. Sin embargo, los primeros anticuerpos monoclonales contra marcadores de leucocitos en el porcino se volvieron disponible hasta 1984 (Percovitz et al., 1984).

Los primeros estudios en cerdos de los marcadores de superficie de las células inmunocompetentes (CD; del inglés cluster differentiation), se realizaron por Lunney, et al., (1992), fue seguido 3 años más tarde por Saalmuller, (1995). De los trabajos de estos dos autores se establecieron marcadores de CD para cerdos.

Actualmente están disponibles el CD18 (Lunney et al., 1994) y CD2, CD11b, CD21, CD47, CD49e (VLA), CD49f (VLA), CD79b, CD80 (B7), CD90-thy-1 (Liston et al., 1996) y CD86 (Davis et al., 1996), la lista de reactivos con estos marcadores celulares cambia con frecuencia, los resultados han sido publicados por Saalmüller (1996).

En el último simposium de diferenciación de células del sistema inmune porcino celebrado en 1998 se definieron tres anticuerpos monoclonales para estudiar macrófagos porcinos, que se denominaron como SWC de las palabras inglesas Swine Workshop Cluster más un número, así, actualmente se utilizan los SWC1 y SWC9 que diferencian fundamentalmente monocitos y macrófagos y el SWC3 que reacciona tanto con monocitos, como con macrófagos diferenciados y con granulocitos (Sánchez, 2000).

El tamaño del cerdo habilita los procedimientos quirúrgicos, la selección de los nódulos de la linfa, bazo, timo y médula ósea, y permiten el estudio de la producción de linfocitos y migración sin ruptura de la estructura de estos órganos linfoides (Pabst y Binns, 1986).

Varios estudios etiquetan al cerdo como un modelo experimental para reacciones inmunes, por el tamaño grande de la camada y la disponibilidad de animales libres de gérmenes patógenos específicos.

Por otro lado, en los mamíferos se presenta un proceso normal y paulatino en las jóvenes crías que se le conoce como destete; que es el transcurso por medio del cual los animales comienzan a ingerir alimentos sólidos de forma simultánea con la reducción de la producción láctea de la madre, de tal modo que, gradualmente, el joven animal suprime su dieta láctea. Ante esta realidad, el lechón se enfrenta a una situación de estrés, la respuesta se traduce en una actividad del eje hipotálamo-hipofisiario y de las glándulas adrenales, con la consiguiente liberación de las hormonas adrenocorticotropa (ACTH), cortisol, adrenalina, noradrenalina y dopamina (Selye, 1976).

Cualquier cambio dentro de un área de confinamiento de producción animal puede traducirse en estrés, produciendo alteraciones agudas de la flora intestinal y conduciendo al desarrollo de enteritis y diarreas en los cerdos (Selye, 1976).

El lechón está naturalmente preparado para ingerir el carbohidrato presente en la leche de la cerda (lactosa) por medio de la hidrólisis enzimática, que la transforma en glucosa y galactosa, pero además, la lactosa favorece el desarrollo de una flora bacteriana de carácter beneficioso, representada principalmente por los lactobacilos.

Esta flora presenta la propiedad de convertir la lactosa en ácido láctico, lo cual produce una tendencia a la acidificación del contenido intestinal. Este carácter ácido del medio impide, o por lo menos dificulta, el crecimiento de muchas bacterias patógenas, convirtiéndose, en un efecto antibiótico natural.

Al destete, sin embargo, este efecto positivo desaparece al reducirse el aporte de lactosa (Whittemore, 1993).

Conforme al manejo, el cerdo joven, suele ser destetado en forma optima a los 30 días de edad y las consecuencias del destete suelen comprometer tanto la situación sanitaria, como reducir intensamente el consumo de nutrientes. Al recuperarse del estrés del destete, se produce una fase de crecimiento acelerado (Whittemore, 1993).

En lo que se refiere a la caracterización del Cerdo Criollo Mexicano, en México, los estudios han sido muy pocos teniendo en cuenta que no se han realizado estudios inmunológicos del cerdo nativo.

En 1971 Baldizón realizó un estudio sobre parámetros hematológicos del Cerdo Criollo Mexicano, estudiando 38 Cerdos Pelones Mexicanos antes del sacrificio, encontrando que los valores hemáticos son similares a los reportados en otras razas de cerdos por otros autores, los valores del hematocrito, hemoglobina y eritrocitos se encontraron ligeramente aumentados. Los valores encontrados por otros autores en líneas de cerdos comerciales son: hematocrito de 32-50%, hemoglobina de 10-16 gm/dl, recuento de hematíes 5 a 8 ($10^6/\mu\text{l}$) y 16 grupos sanguíneos, valores normales de leucocitos, 7-20, neutrofilos, 3.2-10, linfocitos, 4.5-13, eosinofilos, 0.5-2 y monocitos, 0.25-2, todos a una concentración de ($10^3/\text{mm}$).

En estudios de laboratorio Rodríguez et al., (1993,1994) reportaron que la morfología cromosómica corresponde a la característica de la especie *Sus scrofa domesticus* con 38 cromosomas. Se reporta un cariotipo igual al de otras razas de cerdos domésticos, sin observar aberraciones cromosómicas.

En el estado de Yucatán México de 1977 a 1981 y en 1983, se realizaron algunas investigaciones del Cerdo Pelón Mexicano por medio de la Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) estudiando el comportamiento productivo, de la ganancia de peso y eficiencia alimenticia, (González, 1974; Rojas, 1994), así como sus ventajas sobre otras razas criollas (Cenobio, 1993; Robles, 1967; Richards y Rejón, 1983), sosteniendo que la producción con Cerdo Pelón Mexicano podría ser redituable.

En otro estudio, en comparación con los cerdos nativos hindúes (Castro,1981; Cenobio, 1993; Rojas, 1994), se reporta que los valores en características reproductivas de los cerdos nativos hindúes son inferiores a los reportados por el Cerdo Pelón Mexicano, por lo que indica una mejor adaptación de este cerdo.

En el Estado de Nayarit, al estabular el **CPM** no se encontraron diferencias en conversión alimenticia, días de gestación, días destete a primer servicio y porcentaje de sobrevivencia en lactancia en comparación con razas comerciales (Tello y Cisneros, 1990).

Otros estudios han reportado mutaciones genéticas indeseables como la Hipertermia Maligna o Síndrome de Estrés Porcino que está presente en el 20% en poblaciones porcinas americanas y canadienses (Fujii et al.,1991), mientras que en el cerdo criollo no se ha reportado este síndrome (Villagómez, D.A.F, comunicación personal)

Esta reducción genética en los germoplasmas comerciales resalta aún mas la importancia de las variedades nativas de cerdos como el criollo mexicano que pueden representar reservorios de diversidad genética que podrían enriquecer en un futuro el germoplasma comercial del cerdo.

Por lo tanto, el rescate y aprovechamiento de recursos genéticos nativos como el CCM podría ser una área fructífera de investigación por muchos años, estimulando el desarrollo de industrias nacionales sustentables, acordes a necesidades socioeconómicas y de mercado.

El estudio de este tipo de germoplasma nativo, a través del uso de metodologías actuales en biotecnología animal, eventualmente permitirá la identificación y el aprovechamiento de genes que participen en características con valor comercial, como lo es la resistencia a enfermedades, adaptación a climas tropicales, habilidad materna y capacidad digestiva por forrajes no convencionales. El estudio, conservación y explotación de estos recursos genéticos podría participar en el desarrollo económico nacional.

Por estas razones se realizó el presente estudio inmunológico que nos permite valorar la respuesta inmune celular en el Cerdo Criollo Mexicano y compararla con los cerdos comerciales F₁ Yorkshire-Landrace en el período crítico del destete.

III.- Planteamiento del Problema

El Cerdo Criollo Mexicano puede ser el origen de determinantes genéticos de resistencia natural a diversas enfermedades, ciertas habilidades digestivas para consumir subproductos fibrosos y tolerancia a condiciones tropicales (Lemus,1999).

No se han encontrado mutaciones genéticas indeseables en el Cerdo Criollo Mexicano como la Hipertermia Maligna y el Síndrome de Estrés Porcino (Villagómez, D. A. F, comunicación personal) que esta presente en el 20% de los cerdos comerciales (O' Brien et al., 1993).

Existe además en el Cerdo Criollo Mexicano una mayor resistencia a las enfermedades más comunes como la Fiebre Porcina Clásica, afecciones neumónicas e intestinales en el momento del destete que el cerdo comercial (Cárdenas, 1966; Baldizón, 1971).

Al iniciar el estudio de la respuesta inmune celular de este biotipo de Cerdo Criollo Mexicano podríamos establecer el nivel de respuesta inmunológica antes y después del destete en comparación con la línea comercial F₁ Yorkshire x Landrace como un parámetro de resistencia a enfermedades.

VI. Objetivos

Objetivo General:

Evaluar la respuesta inmune celular de lechones del biotipo Cerdo Criollo Mexicano (CCM) en comparación con animales del Cerdo Comercial (CCO) F₁ Yorkshire x Landrace en el periodo del destete.

Objetivos Particulares:

- 1.- Establecer la dosis optima de mitógeno (PHA) para la respuesta proliferativa celular en lechones CCM y CCO.
- 2.- Comparar la actividad blastogénica de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA en lechones de CCM y CCO.
- 3.- Comparar la actividad fagocítica de macrófagos en sangre periférica en lechones de CCM y CCO.
- 4.- Comparar el nivel de la respuesta inmune celular especifica e inespecifica en el CCM y CCO en el periodo del destete.
- 5.- Determinar el porcentaje de mortalidad en el periodo critico del destete en el CCM y CCO.

VII. Material y Métodos

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Biotecnología Animal en las instalaciones del Rancho Cofradía que se encuentra en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga ubicado por la carretera Guadalajara-Morelia a la altura del Km. 23 con latitud norte de 20° 28' longitud oeste 103° 27' y una altura sobre el nivel del mar 1,575 mts. La temperatura media anual oscila entre 20 y 22° C, la dirección de los vientos es muy variable y la precipitación pluvial media anual es de 900mm³, el clima se considera semi-seco y semi-húmedo de acuerdo a la clasificación Koepen de climas del mundo; y en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara que está ubicado en la carretera Guadalajara a Nogales Km. 15.5 Las Agujas, Nextipac. Zapopan, Jalisco, México.

Animales

Se utilizaron dos cerdas progenitoras de primer parto de la raza Criollo Mexicano (CCM) cruzadas con un semental de la misma raza procedente de una población animal ubicada en el municipio del Tamarindo en el Estado de Nayarit; y dos cerdas progenitoras de primer parto de la raza comercial F₁ Yorkshire x Landrace (CCO) apareadas con sementales de la misma raza procedentes del Rancho Cofradía de la Universidad de Guadalajara.

Se seleccionaron 16 lechones hijos de CCM y 14 de CCO teniendo en total un número de 30 lechones muestreados, se realizaron dos pruebas inmunológicas: Cultivo celular (respuesta proliferativa) y fagocitosis por el método de adherencia al vidrio de Cunninham.

Muestreo

Las muestras fueron tomadas con tubos al vacío extrayendo 6 ml de la vena yugular de los cerdos en estudio, un día antes y un día después del destete a una edad de 30 días siguiendo los mismos lineamientos del sistema de producción intensivo para la cría del cerdo.

El sistema de alimentación para las hembras gestantes consistió en un concentrado a base de sorgo y soya proporcionándoles 2.5 kg. diarios con un 13% de proteína, los lechones estuvieron alimentándose de sus madres durante un periodo de 30 días, después, en el periodo del destete se les proporcionó alimento peletizado a libre acceso durante las siguientes tres semanas con un 21% de proteína, los lechones machos no fueron castrados y ningún cerdo fue vacunado.

Cultivo Celular (Respuesta proliferativa).

Se realizó el estudio de cultivo celular de linfoproliferación en sangre periférica en el laboratorio para determinar la prueba de viabilidad de los linfocitos, con el conteo de células en la cámara de Newbauer.

Se sembraron los linfocitos, se incubaron y se cultivaron, al termino de este tiempo se pulsó con 0.5 Ci de [methyl-³H] Thymidine (Amersham, 37 Mbq/ml).

Se cosechó en papel filtro, se cortaron en cuadros uniformes y se colocaron en viales de vidrio (frascos especiales de vidrio con tapón para el aparato de contador de centelleo) posteriormente se colocaron en el contador de centelleo de radiaciones β (Beckman, USA LS6000SE), para la medición de la síntesis de ADN lograda, marcando los cultivos con timidina tritiada [³H-Tdr], el cual es un precursor de los nucleósidos que se incorporan al ADN recién sintetizado. Los resultados sobre linfoproliferación de la ³H-Tdr incorporada se expresaron en cuentas por minuto (cpm). La transformación blastoide es usada como medición estándar de la respuesta linfocitaria, se expresa basándose en cpm no estimuladas en los cultivos control dividida entre las cpm estimuladas, lo cual proporciona un cociente referido como el Índice de Estimulación IE (Jakoby y Pastan, 1979; Morgan y Darling, 1995). Ver anexo1 y 2.

Fagocitosis (Método de adherencia al vidrio de Cunninham).

Se realizó el estudio de fagocitosis en el laboratorio analizando los mismos cerdos que en el experimento de linfoproliferación, utilizando la metodología descrita por Cunningham (Morgan y Darling., 1993).

Se contaron un máximo de 100 macrófagos en cada placa, contando el número de levaduras ingeridas dentro del fagostoma teñidas de azul intenso dentro de la célula. Las levaduras digeridas se observan vacías dentro del fagostoma, las cuales son llamadas fantasmas, también se cuantificaron los fagocitos que no fueron activos.

Se obtuvo el Índice de Fagocitosis (**IF**) que es el promedio de levaduras ingeridas entre el número de células cuantificadas:

$$\text{IF} = \frac{\text{Promedio de levaduras ingeridas}}{\text{Numero de fagocitos contados}}$$

También se obtuvo el Índice de Digestión (**ID**) que es el promedio de levaduras digeridas entre el número de fagocitos contados:

$$\text{ID} = \frac{\text{Promedio de levaduras digeridas}}{\text{Numero de fagocitos contados}}$$

Además el Porcentaje de Activos (**PA**) que se obtiene por medio de una regla de tres simple (Ver anexo 3 y 4).

Análisis estadístico

El modelo estadístico utilizado para comparar la respuesta proliferativa de los cerdos y para comparar los porcentajes de fagocitos activos así como los diferentes índices de fagocitosis, fue el análisis de varianza (Anova) considerando un 95% de nivel de confianza, los resultados obtenidos para estas dos pruebas se graficaron conforme a la media y error estándar.

XIII. Resultados

Por medio del ensayo de linfoproliferación y bajo el estímulo mitogénico, se caracterizó el estado funcional de linfocitos en sangre periférica de las dos líneas de cerdos: Criollo Mexicano y Comercial F1 Yorkshire x Landrace, comparando sus promedios de cuentas por minuto e índice de estimulación antes y después del destete.

Los resultados de los datos obtenidos fueron ordenados conforme se desarrollaron, siendo los siguientes:

Comparación de los promedios de cuentas por minuto, en los cerdos Criollos Mexicanos antes del destete con relación a las concentraciones de mitógeno (PHA 5, 10 y 20 microgramos por mililitro).

Se observó que la aplicación de la PHA 20 fue mejor con un promedio de cuentas por minuto de 1418.17 (con un error estándar de; $e=132.82$) existiendo diferencia significativa de $p<0.05$ en la comparación con la PHA 5 que obtuvo un promedio de 947.90 ($e=44.44$). Se analizaron 21 muestras en este experimento (Cuadro 1).

Para el Cerdo Comercial se siguió el mismo procedimiento. El resultado fue parecido, aquí la PHA 20 también fue ligeramente mejor con un promedio de cuentas por minuto de 1321.02 (con un error estándar de; $e=126.04$) más que la concentración de PHA 10 y 5 con promedios de 1277.7 ($e=148.95$) y 959.06 ($e=37.79$), respectivamente, en el análisis de varianza no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones. Se analizaron 18 muestras en total (Cuadro 2).

Con respecto a la comparación de los promedios de cuentas por minuto en los Cerdos Criollos Mexicanos y los Cerdos Comerciales después del destete con relación a la concentración de PHA 20, ya que resultó ser la concentración de mitógeno que mejor resultado obtuvo, se analizaron en total 14 y 13 muestras respectivamente no existiendo diferencia significativa en el análisis de varianza, con un promedio de 1263.61 ($e=89.08$) contra 1246.50 ($e=645.80$) (Cuadro 3).

En la comparación de los promedios de cuentas por minuto en los Cerdos Criollos Mexicanos vs. Cerdos Comerciales F₁ Yorkshire x Landrace con la aplicación de la PHA 20 antes y después del destete, los resultados fueron de 1418.17 ($e=132.82$) antes y de 1246.50 ($e=65.80$) después del destete en el Cerdo Criollo Mexicano contra 1321.02 ($e=126.04$) antes y de 1263.61 ($e=89.08$) después del destete en el cerdo comercial. En dicha comparación, los promedios se inclinaron a favor del CCM antes del destete y a favor del CCO después del destete aunque en el análisis de varianza no se encontró diferencia significativa por lo que podemos establecer que son similares, esto se ilustra en la Figura 1.

Para la comparación de los promedios de cuentas por minuto en las dos líneas de cerdos en los periodos antes vs. después del destete con la concentración de PHA 20, los promedios fueron de 1418.17 ($e=132.82$) antes contra 1246.50 ($e=65.80$) después del destete en el cerdo criollo y de 1321.02 ($e=126.04$) antes contra 1263.61 ($e=89.08$) después del destete en el cerdo comercial teniendo cierta tendencia a ser mejor la respuesta en ambos casos antes del destete, estos resultados son ilustrados en la Figura 2.

Por otra parte la comparación de las concentraciones de mitógeno óptimas para los índices de estimulación en el Cerdo Criollo Mexicano antes del destete, en este período obtuvo ligeramente mejor resultado la concentración de PHA 20 con un promedio de 1.08 ($e=0.10$), no encontrando diferencias significativas entre las diferentes concentraciones con un total de 21 muestras analizadas (Cuadro 4).

También se comparó las concentraciones de mitógeno en el cerdo comercial donde fue ligeramente mejor la concentración de PHA 10 obteniendo un promedio de índice de estimulación de 1.29 ($e=0.12$), no encontrándose diferencias significativas entre las diferentes concentraciones en el análisis de varianza. Se analizaron 18 muestras en total (Cuadro 5).

También se compararon los porcentajes de fagocitos activos antes contra después del destete en las dos líneas de cerdos, donde los porcentajes fueron mejores después del destete en ambos casos ya que obtuvieron 87 ($e=3.62$) contra 73 ($e=3.04$); y de 79 ($e=3.95$) contra 72 ($e=3.60$) del Cerdo Criollo Mexicano y cerdo comercial, respectivamente, siendo en el criollo estadísticamente significativo con una $p < 0.01$. Se compararon en total 44 muestras (24 para el criollo y 20 para el comercial) datos ilustrados en la Figura 6.

Con respecto a la comparación de los índices de fagocitosis (IF) en el Cerdo Criollo Mexicano vs. cerdo comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes y después del destete, los resultados fueron ligeramente mejores en el CCM ya que se obtuvieron promedios de 2.45 ($e=0.33$) contra 2.16 ($e=0.38$) antes y de 3.36 ($e=0.48$) contra 3.51 ($e=0.61$) después del destete. En el análisis de varianza no se encontró diferencia significativa. Esto se ilustra en la Figura 7.

Se compararon también los promedios de índice de fagocitosis antes contra después del destete en las dos líneas obteniendo mejores valores después del destete en ambos casos con promedios de 3.36 ($e=0.48$), contra 2.45 ($e=0.33$) en el Cerdo Criollo, y de 3.51 ($e=0.61$) contra 2.16 ($e=0.38$) en el Cerdo Comercial, no encontrándose diferencia significativa en el análisis de varianza, datos que se ilustran en la Figura 8.

En la comparación de los índices de ingestión (II) en el Cerdo Criollo Mexicano contra el cerdo comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes y después del destete, los resultados fueron mejores después del destete en el CCM con promedio de 2.67 ($e=0.47$) contra 2.49 ($e=0.53$); y en el CCO antes del destete con promedios de 1.42 ($e=0.31$) contra 1.36 ($e=0.21$), respectivamente, no encontrándose diferencias significativas en ambos casos. Datos que se ilustran en la Figura 9.

Se comparó también los índices de ingestión antes vs. después del destete en las dos líneas de cerdos donde fue mejor después del destete en ambos casos ya que tuvieron promedios de 2.67 ($e=0.47$) contra 1.36 ($e=0.21$) en el Cerdo Criollo y de 2.49 ($e=0.53$) contra 1.42 ($e=0.31$) en el cerdo comercial, encontrándose diferencia significativa en el CCM con un valor en el análisis de varianza de $p<0.01$. Promedios que se ilustran en la Figura 10.

En el caso de la comparación de los índices de digestión (ID) en el Cerdo Criollo Mexicano vs. cerdo comercial F1 Yorkshire x Landrace antes y después del destete, los resultados fueron mejores en el CCM antes del destete con promedios de 1.08 ($e=0.17$) contra 0.80 ($e=0.11$) y después del destete el CCO obtuvo mejores resultados con promedios de 0.97 ($e=0.23$) contra 0.68 ($e=0.07$), no existiendo diferencias significativas en el análisis de varianza. Valores que se ilustran en la Figura 11.

Se compararon también los índices de digestión antes vs. después del destete en las dos líneas de cerdos donde obtuvo mejor resultado antes del destete en el cerdo criollo con un valor de 1.08 ($e=0.17$) y después del destete en el cerdo comercial con un valor de 0.97 ($e=0.23$) contra 0.80 ($e=0.11$), respectivamente, no encontrando diferencias significativas entre los periodos de ambos. Esto se ilustra en la Figura 12.

Por último se comparó el porcentaje de mortalidad en el Cerdo Criollo Mexicano y el cerdo comercial F1 Yorkshire x Landrace antes y después del destete, el resultado fue que no existió diferencias significativas en el análisis de varianza entre el CCM y el CCO antes y después del destete, aunque se encontró cierta tendencia del CCM a tener una menor mortalidad en comparación con el CCO. Estos datos se ilustran en el (Cuadro 7).

Cuadros

Cuadro 1 Respuesta proliferativa (cuentas por minuto) en el Cerdo Criollo Mexicano antes del destete.

Concentraciones de mitógeno	PHA 5	PHA 10	PHA 20 *	
Promedios	947.90	1076.91	1418.17	
Desv. estándar	± 88.87	± 345.00	± 351.41	
Error estándar	44.44	109.10	132.82	
Núm. de muestras	4	10	7	Total 21

Anova PHA 5 vs. 10 $p=0.484$ * PHA 5 vs. 20 $p=0.030$ PHA 10 vs. 20 $p=0.065$
significativo

Cuadro 2 Respuesta proliferativa (cuentas por minuto) en el Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes del destete.

Concentraciones de mitógeno	PHA 5	PHA 10	PHA 20	
Promedios	959.06	1277.70	1321.02	
Desv. estándar	± 65.45	± 364.86	± 378.13	
Error estándar	37.79	148.95	126.04	
Núm. de muestras	3	6	9	Total 18

Anova PHA 5 vs. 10 $p=0.190$ PHA 5 vs. 20 $p=0.141$ PHA 10 vs. 20 $p=0.829$
No se encontró diferencia significativa

Cuadro 3 Respuesta proliferativa (cuentas por minuto) en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace después del destete.

Concentraciones de mitógeno	CCM PHA 20	CCO PHA 20	
Promedios	1246.50	1263.61	
Desv. estándar	± 246.20	± 321.19	
Error estándar	65.80	89.08	
Núm. de muestras	14	13	TOTAL 27

Anova

$p=0.877$

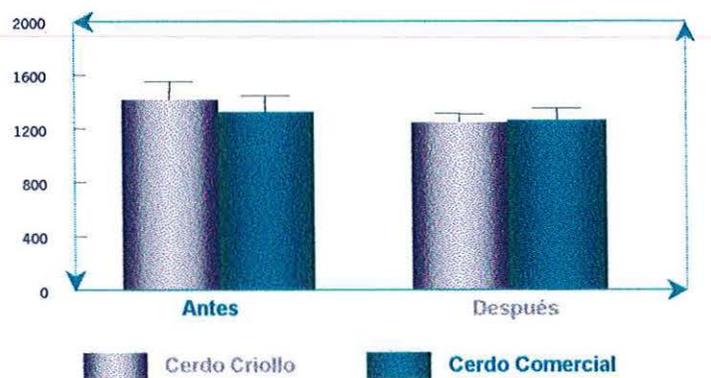
No se encontró diferencia significativa

CCM.- Cerdo Criollo Mexicano

CCO.- Cerdo Comercial

Figuras

Figura 1 Respuesta proliferativa (cpm) de linfocitos de Cerdos Criollos Mexicanos vs. Cerdos Comerciales F1 Yorkshire x Landrace estimulados con PHA 20 µg/ml antes y después del destete.



Antes			Después		
Cerdo	CM	CO	Cerdo	CM	CO
Promedio	1418.17	1321.02	Promedio	1246.50	1263.61
Error st.	132.82	126.04	Error st.	65.80	89.08

Anova $p=0.495$

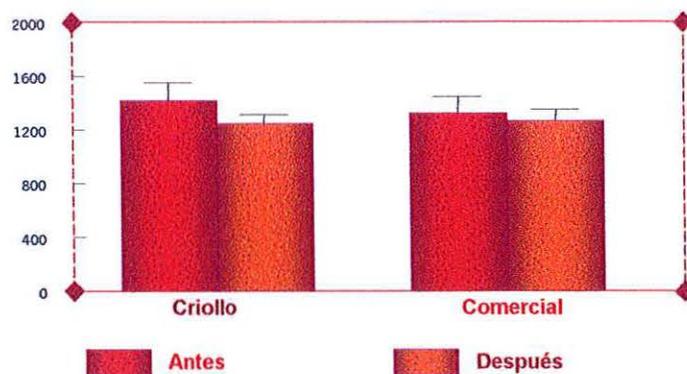
No significativo

$p=0.877$

CM.- Criollo Mexicano

CO.- Comercial

Figura 2 Respuesta proliferativa (cpm) de linfocitos de Cerdos Criollos Mexicanos y Cerdos Comerciales F1 Yorkshire x Landrace estimulados con PHA 20 µg/ml antes vs. después del destete.



Criollo			Comercial		
Cerdo	Antes	Después	Cerdo	Antes	Después
Promedio	1418.17	1246.50	Promedio	1321.02	1263.61
Error st.	132.82	65.80	Error st.	126.04	89.08

Anova

$p=0.207$

No significativo

$p=0.933$

Cuadro 4 Respuesta proliferativa (Índice de estimulación) en el Cerdo Criollo Mexicano antes del destete.

Concentraciones de mitógeno	PHA 5	PHA 10	PHA 20	
Promedios	0.89	1.04	1.08	
Desv. estándar	± 0.06	± 0.16	± 0.26	
Error estándar	0.03	0.05	0.10	
Núm. de muestras	4	10	7	Total 21

Anova PHA 5 vs. 10 $p=0.099$ PHA 5 vs. 20 $p=0.192$ PHA 10 vs. 20 $p=0.699$
No se encontró diferencia significativa

Cuadro 5 Respuesta proliferativa (Índice de estimulación) en el Cerdo Comercial F₁ Yorkshire x Landrace antes del destete.

Concentraciones de mitógeno	PHA 5	PHA 10	PHA 20	
Promedios	0.98	1.29	1.15	
Desv. estándar	± 0.08	± 0.35	± 0.28	
Error estándar	0.05	0.12	0.11	
Núm. de muestras	3	9	6	Total 18

Anova PHA 5 vs. 10 $p=0.171$ PHA 5 vs. 20 $p=0.351$ PHA 10 vs. 20 $p=0.428$
No se encontró diferencia significativa

Cuadro 6 Respuesta proliferativa (Índice de estimulación) en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F₁ Yorksihre x Landrace después del destete.

Concentraciones de mitógeno	CCM PHA 20	CCO PHA 20	
Promedios	1.17	1.09	
Desv. estándar	± 0.19	± 0.20	
Error estándar	0.05	0.06	
Núm. de muestras	14	13	Total 27

Anova $p=0.297$

No se encontró diferencia significativa

CCM.- Cerdo Criollo Mexicano

CCO.- Cerdo Comercial

Figura 3 Respuesta proliferativa (IE) de linfocitos de Cerdos Criollos Mexicanos vs. Cerdos Comerciales F1 Yorkshire x Landrace estimulados con PHA 20 µg/ml antes y después del destete.

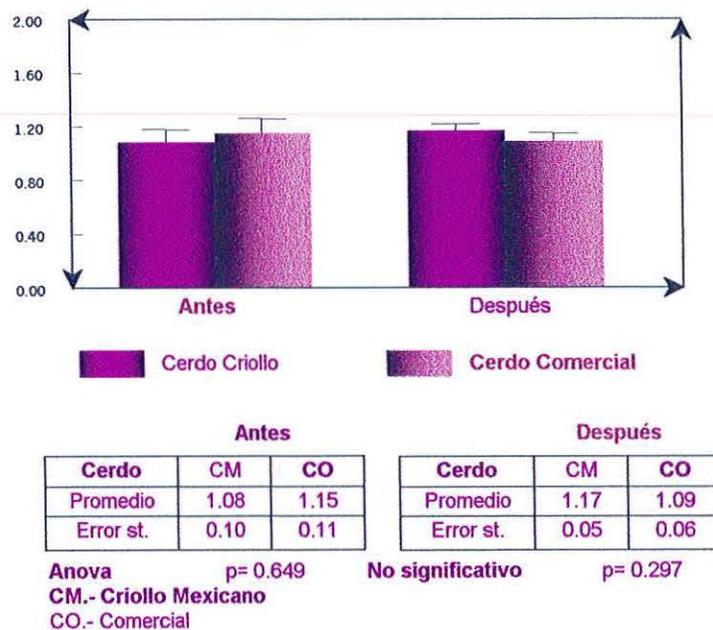
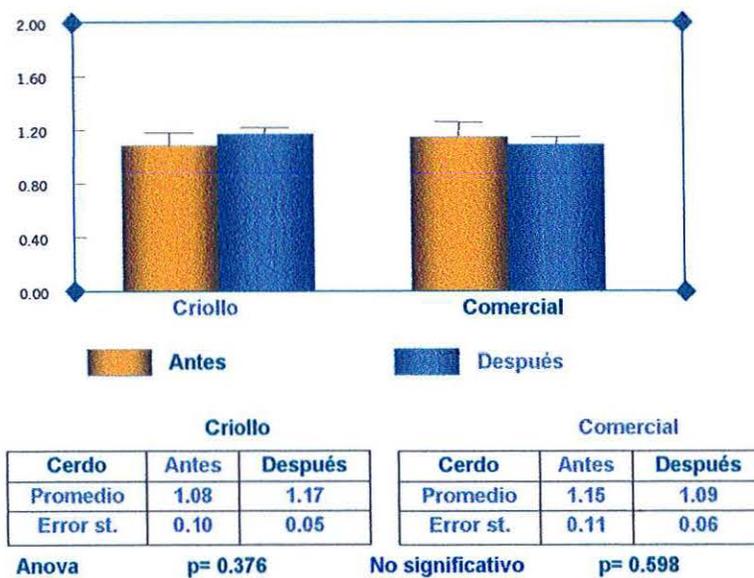
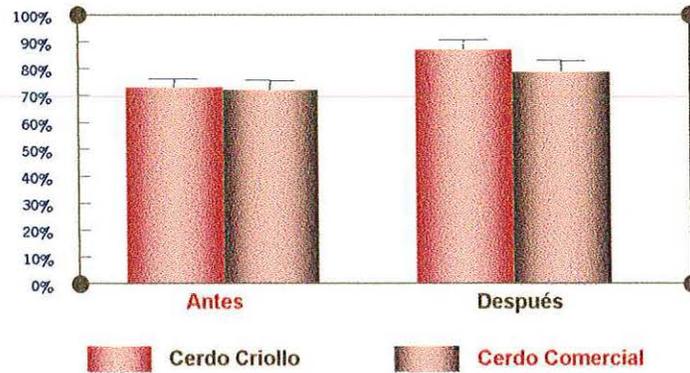


Figura 4 Respuesta proliferativa (IE) de linfocitos de Cerdos Criollos Mexicanos y Cerdos Comerciales F1 Yorkshire x Landrace estimulados con PHA 20 µg/ml antes vs. después del destete.



Fagocitosis

Figura 5 Porcentaje de fagocitos activos en el Cerdo Criollo Mexicano vs. Cerdo Comercial F1 Yorkshire x Landrace antes y después del destete.

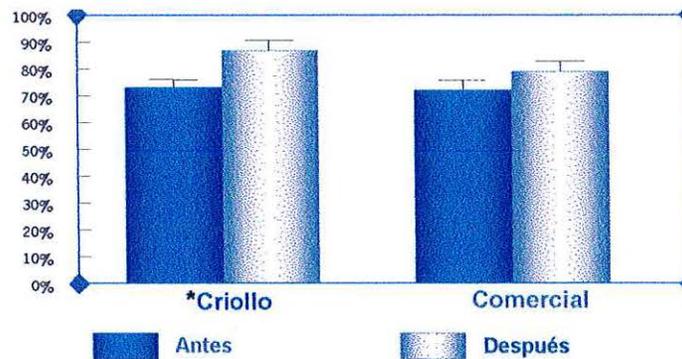


Antes			Después		
Cerdo	CM	CO	Cerdo	CM	CO
Promedio	73	72	Promedio	87	79
Error st.	3.04	3.60	Error st.	3.62	3.95
No muestras	24	20	No muestras	24	20

Anova $p=0.832$ No significativo $p=0.143$



Figura 6 Porcentaje de fagocitos activos en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F1 Yorkshire x Landrace antes vs. después del destete.



Criollo			Comercial		
Cerdo	Antes	Después	Cerdo	Antes	Después
Promedio	73	87	Promedio	72	79
Error st.	3.04	3.62	Error st.	3.60	3.95
No muestras	24	24	No muestras	20	20

Anova * $p=0.005$ significativo $p<0.01$ $p=0.198$

Figura 7 Índice de fagocitosis (IF) en el Cerdo Criollo Mexicano vs. Cerdo Comercial F1 Yorkshire x Landrace antes y después del destete.

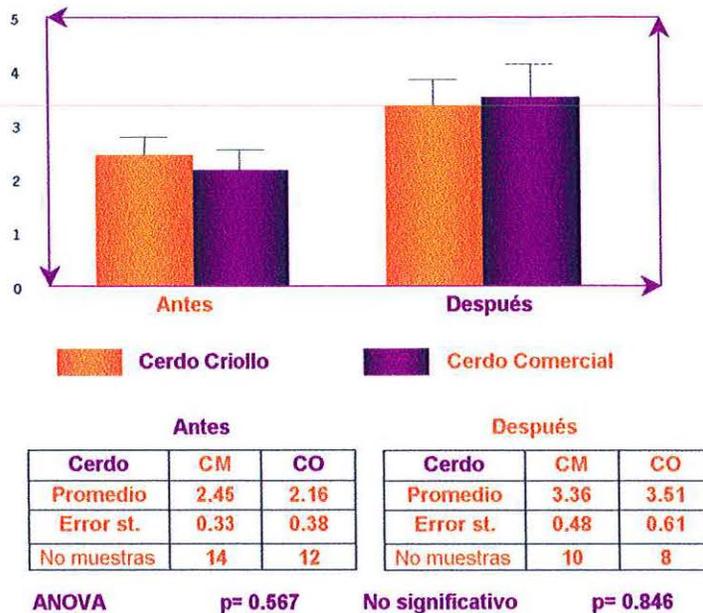


Figura 8 Índice de fagocitosis (IF) en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F1 Yorkshire x Landrace antes vs. después del destete.

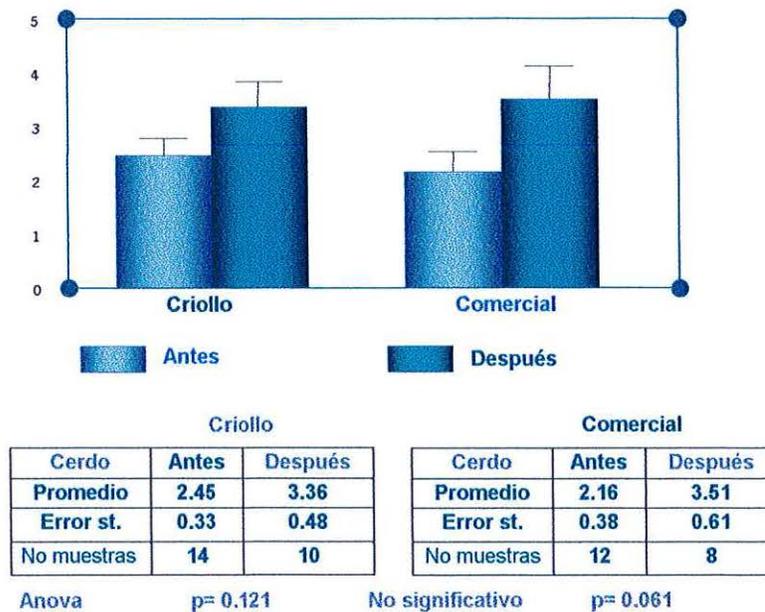
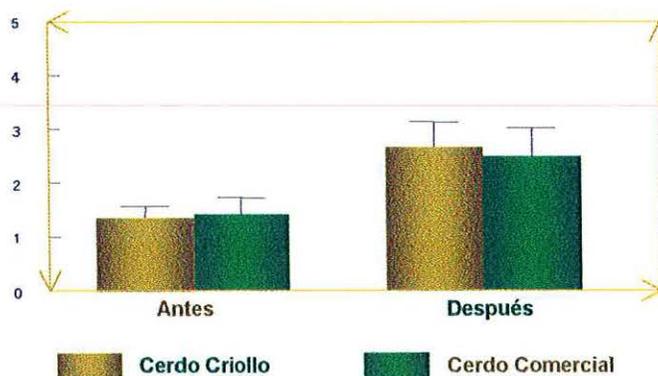


Figura 9 Índice de Ingestión (II) en el Cerdo Criollo Mexicano vs. Cerdo Comercial F1 Yorkshire x Landrace antes y después del destete.

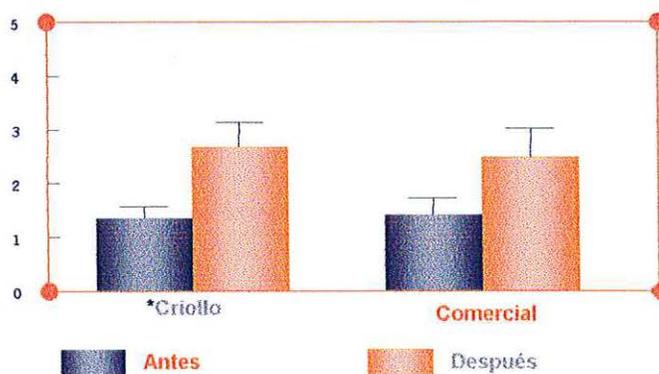


Antes			Después		
Cerdo	CM	CO	Cerdo	CM	CO
Promedio	1.36	1.42	Promedio	2.67	2.49
Error st.	0.21	0.31	Error st.	0.47	0.53
No muestras	14	12	No muestras	10	8

Anova p= 0.871 No significativo p= 0.803



Figura 10 Índice de Ingestión (II) en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F1 Yorkshire x Landrace antes vs. después del destete.



Criollo			Comercial		
Cerdo	Antes	Después	Cerdo	Antes	Después
Promedio	1.36	2.67	Promedio	1.42	2.49
Error st.	0.21	0.47	Error st.	0.31	0.53
No muestras	14	10	No muestras	12	8

Anova * p= 0.010 significativo p<0.01

p= 0.078

Figura 11 Índice de digestión (ID) en el Cerdo Criollo Mexicano vs. Cerdo Comercial F1 Yorkshire x Landrace antes y después del destete.

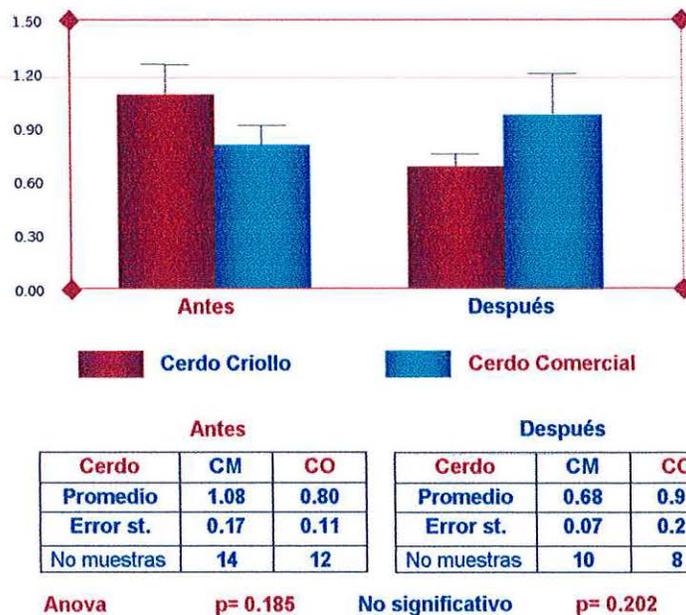
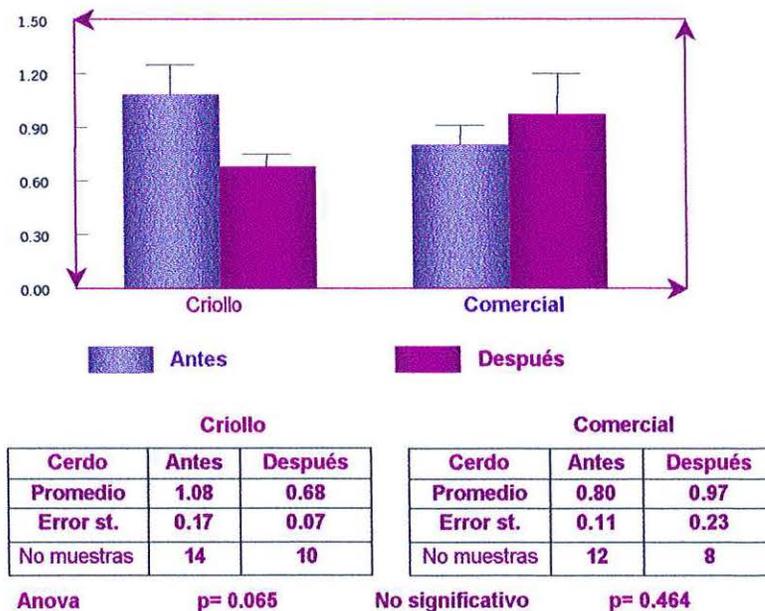


Figura 12 Índice de Digestión (ID) en el Cerdo Criollo Mexicano y Cerdo Comercial F1 Yorkshire x Landrace antes vs. después del destete.



Cuadro 7 Porcentaje de mortalidad del Cerdo Criollo Mexicano vs. el Cerdo Comercial F1 Yorkshire x Landrace antes y después del destete

Cerdos	Criollo		Comercial	
	Hembra 1	Hembra 2	Hembra 1	Hembra 2
Lechones nacidos vivos	9	10	11	9
Bajas antes del destete	2	1	1	1
Lechones vivos antes del destete	7	9	10	8
Porcentaje de mortalidad antes del destete	15.79%		10.00%	
Bajas posteriores al destete	0	1	1	1
Porcentaje de mortalidad después del destete	6.25%		11.11%	

Anova

No se encontró diferencia significativa



IX. DISCUSION

Actualmente se están realizando estudios comparativos en las líneas de Cerdos Criollos Mexicanos con el cerdo comercial con relación a sus parámetros productivos como lo son: Ganancia de peso diario, eficiencia alimenticia, rendimiento en canal entre otros. El presente trabajo fue enfocado al estudio de la respuesta inmune en las líneas mencionadas en condiciones de destete, estandarizando varios parámetros inmunológicos.

La dosis optima de mitógeno en el ensayo de linfoproliferación para las distintas especies reportadas por diferentes autores son muy diversas y varían entre 5 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (Morgan and Darling, 1993), en el cerdo no encontramos ningún dato al respecto, los estudios mencionan que se debe realizar la estandarización de este parámetro metodológico.

Nosotros utilizamos concentraciones de mitógeno 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ para determinar la dosis optima en el cerdo, tomando en cuenta los reportes que se tienen sobre la dosis optima en el humano, que es de PHA 10 (Roitt, 1996), ya que el cerdo es un mamífero al igual que el humano. Anteriormente en una prueba piloto se descartó el uso de dosis de PHA 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ por no tener buena respuesta.

Encontramos que la dosis optima es de 20 $\mu\text{g/ml}$ en ambos grupos de cerdos en la linfoproliferación (cpm), aunque la diferencia significativa solo se encontró en el CCM (Cuadro 1).

La concentración optima de PHA encontrada para el cerdo no difiere mucho de los datos reportados en los mamíferos (Roitt, 1996), por lo que podemos suponer que la PHA actúa en los linfocitos porcinos de modo similar que en el ratón y en el humano, uniéndose a los receptores N-acetil-D-galactosamina presente en las células T.

En la actividad blastogénica de linfocitos de sangre periférica no se encontró diferencia significativa entre ambos cerdos en estudio antes del destete, (Figura 1 y 3) posiblemente esto se deba a que proceden de un tronco común a escala evolutiva.

La actividad fagocítica en lechones de CCM muestran una cierta tendencia a mayores índices de fagocitosis e índices de digestión debido posiblemente a la resistencia a enfermedades en forma natural por su gran adaptación al medio ambiente, ya que no se encuentran estabulados y también se conoce que los Cerdos Criollos son alimentados en las costas mexicanas con subproductos agrícolas y desperdicios domésticos estando así en mayor contacto con diferentes antígenos (Cárdenas, 1966; Baldizón, 1971).

La respuesta inmune celular específica (linfoproliferación en cpm) se encontró disminuida después del destete en ambos grupos (Figura 2), debido a que el cambio dentro de un área de confinamiento de producción animal puede traducirse en estrés (Selye, 1976). En los últimos 20 años se ha postulado que existe una correlación bidireccional entre el Sistema Nervioso Central y el Sistema Inmune (Roitt, 1996). El efecto inmunosupresor del estrés sobre la respuesta inmune se atribuye principalmente al aumento de la secreción de glucocorticoides por la estimulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (Álvarez, 1992; Stratakis, 1995). Además, Stratakis (1995) también menciona la involución temporal del timo y hasta una disminución de masa de los órganos linfoides en el caso de estrés notable.

Debido a lo anterior, no podemos descartar que uno de los mecanismos involucrados en la disminución significativa de la actividad blastogénica de los linfocitos del cerdo estresado es la inmunosupresión por la producción elevada de corticoesteroides, como ocurrió en ambos cerdos después del destete, principalmente en el cerdo comercial (Figura 4), ya que tiene tendencia a sufrir más estrés que el Cerdo Criollo Mexicano por su baja adaptación al medio ambiente y posiblemente por poseer en un 20% de los casos el gen del síndrome de estrés porcino (Fujii et al., 1991).

La respuesta inmune celular inespecífica (fagocitosis) se incrementó en ambas líneas de cerdos, siendo significativa estadísticamente ($p < 0.01$) en la respuesta del CCM en referencia al porcentaje de macrófagos activos e índice de ingestión en comparación con el CCO (Figura 6 y 10).

Esto podría ser debido al contacto mayor con antígenos en el momento del cambio de alimentación, ya que los macrófagos desarrollan un mayor trabajo por antígenos ingeridos después del destete en las mucosas digestiva y pulmonar (Tizard, 1998).

Los cerdos en el periodo del destete son muy susceptibles a sufrir enfermedades, tanto digestivas como pulmonares (Selye, 1976; Wittemore, 1993), desencadenando así en una mayor mortalidad.

En referencia al porcentaje de mortalidad entre el CCM y el CCO no se encontró diferencia significativa en el análisis de varianza antes y después del destete, aunque se encontró cierta tendencia a tener una menor mortalidad el CCM en comparación con el CCO (Cuadro 7).

La mortalidad de los lechones se presentó por los cambios de alimentación sufridos en el destete, y probablemente porque los cerdos no fueron vacunados en el momento de la realización de este experimento.

Por último cabe mencionar como limitaciones del trabajo, que la determinación de la respuesta inmune se realizó con dos parámetros celulares solamente (linfoproliferación y fagocitosis), por lo que en el futuro se sugiere el medir las subpoblaciones de linfocitos, la cantidad de macrófagos y polimorfonucleares en sangre periférica así como también la respuesta inmune humoral principalmente el análisis de las inmunoglobulinas, ya que el presente estudio sobre la respuesta inmune celular no es definitiva para elucidar las diferencias entre las dos líneas de cerdos.

X. CONCLUSIONES

- Con base a los diferentes resultados observados en el presente estudio, se sugiere que la respuesta inmune del Cerdo Criollo Mexicano tiende a ser mejor en comparación con la del Cerdo de la línea Comercial F₁ Yorkshire x Landrace.
- La dosis optima de mitógeno de fitohemaglutinina en linfoproliferación (cpm) para el CCM y para el CCO en nuestro estudio fue de **20µg/ml**, ya que se encontró diferencia significativa a favor de esta concentración cuando se comparó con la concentración de PHA 5 antes del destete con un valor de **p<0.05**.
- La actividad blastogénica de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA 20µg/ml fue similar en ambos grupos de cerdos antes del destete.
- La actividad fagocítica en los lechones de CCM mostró una cierta tendencia a mayores índices de fagocitosis e índices de digestión que en los lechones de CCO.
- La respuesta inmune celular específica (linfoproliferación en cpm), se encontró ligeramente disminuida después del destete en ambos grupos de cerdos en estudio y sin decremento de IE en el CCM.
- La respuesta inmune celular inespecífica (macrófagos) se incrementó en ambas líneas porcinas siendo significativa en porcentaje de macrófagos activos e índice de ingestión en el CCM.
- El porcentaje de mortalidad en el CCM fue menor después del destete mientras que en el CCO fue antes del destete, aunque no se encontró diferencias significativas en el análisis de varianza entre las dos líneas de cerdos.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Álvarez, M. y García, J. 1992. Desarrollo de la respuesta del sistema inmune. Ediciones Omega Cap. 3 p.69.
- Aoport, A. y Trujillo, J.M. 1986. Análisis y perspectiva de la porcicultura en México. Síntesis Porcina. No. 5. p. 17-21.
- Baldizón, S.O. 1971. Contribución a la determinación de algunos valores hemáticos normales del Cerdo Pelón Mexicano Tesis de licenciatura FMVZ-UNAM. México, D.F.
- Barrete, T.J. 1990. Inmunología Médica. Editorial Interamericana. Mc.Graw.Hill. Quinta Edición. México, D.F. p.70
- Batten, P., Yacoub, M. H., Rose, M. L. 1996. *Effect of human cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4) on porcine endothelial cells: induction of MHC and adhesion molecules and functional significance of these changes, Immunology* **87**, 127-133.
- Berruecos, J.M. 1972. Mejoramiento genético del cerdo. Primera edición. Editorial Arana, México D.F. p. 23
- Binns, R.M. 1982. *Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. Vet. Immunol. Immunopath.* **3**, 95-146
- Binns, R., Pabst, R., Licence, S.T. 1986. *The behavior of pig lymphocyte populations in vivo. In Swine in Biomedical Research* (ed. Tumbleson, M.E.), Vol. 3, pp. 1837-1852. Plenum Press, New York, USA.
- Binns, R.M., Pabst, R. 1988. *Lymphoid cell migration and homing in the young pig: alternative immune mechanisms in action. In Migration and Homing of Lymphoid Cells. Vol. II* (ed. Husband, A. J.), pp 137-174. CRC Press, Boca Raton, FL. USA.
- Binns, R.M., Pabst, R. 1994. *Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig. Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**, 79-87.
- Bourne, F.J. 1973. *The immunoglobulin system of the suckling pig. Proc. Nutr. Soc.* **32**, 205-215.
- Buxadé, C.C. 1996. Zootécnica. Bases de Producción animal. Tomo VI Mundi Prensa. Barcelona España pp. 175.
- Cabello, F.F.T. 1969. Comportamiento en el trópico de cerdos de raza pura, híbridos y Pelón Mexicano. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM.
- Cárdenas, P.C. 1966. Introducción al estudio zoométrico del Cerdo Pelón Veracruzano. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM. México D.F.
- Castellanos, R.A. y Gómez, A.R. 1984. Retrospectiva y perspectiva sobre la raza de Cerdo Pelón Mexicano. Coordinación Regional de Investigaciones Pecuarias. S.A.R.H. Mérida Yucatán.
- Castro, G.E.M. 1981. Importancia que ejercen algunos factores ambientales y el efecto del semental sobre el tamaño y peso de la camada al nacimiento y al destete en el Cerdo Pelón Mexicano. Tesis de Licenciatura. UNAM.
- Cenobio, S. L. 1993. Evaluación del comportamiento reproductivo de un lote de Cerdas Pelón Mexicano en la etapa de lactancia en el Altiplano. Tesis de Licenciatura. UNAM.

- Davis, T. A., Craighead, N., Williams, A. J., et al. 1996. *Primary porcine endothelial cells express membrane-bound B7-2 (CD86) and a soluble factor that co-stimulate cyclosporin A-resistant and CD28-dependent human T cell proliferation. Int. Immunol. 8*, 1099-1111.
- Durán, R. 1990. Aspectos fisiológicos del destete en el lechón. Mundo Ganadero N° 10. México D.F.
- Flores, J.A. 1970. Síntesis histórica y breve análisis de la especie porcina en la República Mexicana. El libro azul para el Médico Veterinario. Editado por Química Hoechst de México.
- Flores, J.A. 1992. Enciclopedia Técnica del Ganado Porcino. Edit. LIMUSA. Cuarta reimpresión. México, D.F.
- Flores, M.J. 1978. Distribución probable de los Cerdos Mexicanos de acuerdo a sus diferentes razas, tipos y variedades. Porcira. 6 (63): 8-10 (1978).
- Flores, M.J. 1992. Cría y explotación, enfermedades e industrializaciones. Ganado Porcino I. Edit. Limusa. México.
- Fox, A., Harrison, L.C. 2000. *Innate immunity and graft rejection. Immunological Reviews Vol. 173*: 141-147.
- Fritz, F.J., Pabst, R., Binns, R.M: 1990. *Lymphocyte subsets and their proliferation in a model for a delayed-type hypersensitivity reaction in the skin in the pig. Immunology 71*, 508-516.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V. K., Weiler, J. E., O'Brien, P.J., and MacLennan, D.H. 1991. *Identification of a mutation in porcine Ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia Science, 253*: 448-451.
- Gallardo, R.A. 1941. Contribución al mejoramiento del Cerdo Criollo en México. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM. México D.F.
- González, M.J.H: 1974. Contribución al estudio del Cerdo Pelón Mexicano en el municipio del Naranjal. Ver. Tesis de Licenciatura. FMVZ, Universidad de Tamaulipas México.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F.C., Janeway Jr. C.A., Ezekowitz, R.A.B. 1999. *Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. Science 284* 1313-1317.
- Jakoby, W.B., Pastan I.H. 1979. Cell Culture. Methods in Enzymology. Academic Press. Inc. San Diego, California p. 466-477.
- Janeway, Jr. C.A. 2000. The Road Less Traveled by: *The Role of Innate Immunity in the Adaptive Immune Response. Immunological reviews Vol.173* 539-544.
- Joling, P., Bianchi, A. T. J., Kappe, A. L., Zwart, R. J. 1994. *Distribution of lymphocyte subpopulation in thymus, spleen, and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age. Vet. Immunol. Immunopathol. 40*, 105-117.
- Johnson Jr, H., Lunney, J. K., Sachs, D. H., et al. 1980. *Preparation and characterization of an antiserum specific for T cells of pigs. Transplantation 29*, 447-483.

- Lemus, F.C. 1999. Estudio molecular de la diversidad genética del Cerdo Pelón Mexicano (*Sus scrofa*). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nayarit, México.
- Loftus, R. and Scherf (1992) *Word watch list for domestic animal diversity*. FAO. Rome.
- Lunney, J. K., Walker, K., Goldman, T. 1994. *Analyses of anti human CD monoclonal antibodies for cross reactions with swine cell antigens*. *Vet Immunol. Immunopathol.* **43**, 207-210.
- Lunney, J. K., Walker, K., Goldman, T., et al. 1994. *Overview of the First International Workshop to define swine leukocyte cluster differentiation (CD) antigens*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**, 193-206.
- Morgan, S.J., Darling, D.C. 1993. Cultivo de células animales. Editorial Acribia Zaragoza España p,41-45.
- Medzhitov, R., Janeway, Jr. C. 2000. *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. *Immunological reviews*. Vol. **173**: 89-97.
- Najera, O.H. 1989. Alternativas de investigación y su aplicación animal en las zonas marginales del trópico de Chiapas. *Las profesiones en México* Vol.1, núm. 2, Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F.
- Newby, T.J., Stokes, C.R., Bourne, F.J. 1982. *Inmunological activities of milk*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **3**, 67-94.
- O'Brien, P.J., Shen, H., Cory, R., Zhang, X. 1993. *Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome malignant hypertermia un10,000 breeding swine*. *JAVMA*, **203**: 842-851.
- Outteridge, P.M. 1985. *Inmunología Veterinaria*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. pp. 215-219.
- Pabst, R., Binns, R. M. 1986. *Comparison of lymphocyte production and migration in pig lymph nodes, tonsils, spleen, bone marrow and thymus*. In *Swine in Biomedical Research, Vol. 3 (ed. Tumbleson, M.E.)*, pp. 1865-1871. Plenum Press, New York, USA.
- Pérez, E.R. 1985. Aspectos económicos en la porcicultura en México: 1960-1985, Instituto de Investigaciones Económicas. Asociación Americana de la soya. pp. 45-46.
- Pescovitz, M. D., Lunney, J. K., Sachs, D. H. 1984. *Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL*. *J. Immunol.* **133**. 368-375.
- Porter, P. 1969. *Transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM to lacteal secretions in the parturient sow and their absorption by the neonatal pig*. *Biochem. Biophys. Acta* **181**, 381-392.
- Richards, M., Rejon, M. 1983. Diagnostico del sistema porcino ejidal en la zona henequera de Yucatán. F.M.V.Z. Universidad de Yucatán. México.
- Robles, R. T. 1967. Contribución al estudio de los Cerdos lampiños o Pelones Mexicanos (Costa de Jalisco). Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

- Rodríguez, L., Hernández, G.R., Trujillo, O.M.E. 1993. Estudio comparativo de la morfología cromosómica del cerdo (*Sus Scrofa domesticus*) bajo tres diferentes inhibidores mitóticos: colchicina, colcemid y vinblastina. Memorias del XXVIII Congreso AMVEC. Cancún, Qroo. pp. 152-154
- Rodríguez, L., Hernández, G.R., Trujillo, O.M.E., Rodarte, C.L.F. 1994. Estudio de la morfología cromosómica del Cerdo Pelón Mexicano. Genética y mejoramiento animal. *Animal Breeding and Genetics*. pp. 276.
- Roiit, M. I., Brostoff, J. 1996. *Immunology*. 4th Edition. Academia Press. London.
- Rojas, A. C. 1994. Comparación del comportamiento productivo durante la lactancia entre Cerdos de raza Pelón Mexicano e híbridos de Yorkshire con Pelón Mexicano en el Altiplano. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1994.
- Saalmüller, A. 1996. *Characterization of swine leukocyte differentiation antigens*. *Immunol. Today* **17**, 352-354.
- Saalmüller, A., Pauly, T., Hohlich, B.J., Ptaff, E. 1999. Characterization of porcine T lymphocytes and their immune response against viral antigens. *J. Biotechnol.* Aug 20; **73** (2-3) 223-2331.
- Sanchez, V.J.M. 2000. Curso de Introducción a la inmunología porcina. Capítulo 3 p. 2. 4 p.1-4
- Sasaki, K., Pabst, R., Rothkötter, H. J. 1994. *The unique ultrastructure of high-endothelial venules in inguinal lymph nodes of the pig*. *Cell tissue Res.* **276**. 85-90.
- Selye, H. 1976. *The Stress of Life*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Stratakis, C.A. and Chrousos, G.P. 1995. Neuroendocrinology and Pathophysiology of the stress system. Washington 2-15.
- Tello, R. A., Cisneros G.A.A. 1990. Evaluación del comportamiento alimenticio y reproductivo del CPM en estabulación. Tesis de Licenciatura UAN México.
- Tizard, I.R., 1998. Inmunología Veterinaria. Quinta Edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. Capítulo 4 p 34,35.
- Tlaskalová H., Hogenová, H., Mandel, L., Trevichavsky, I., Kováru, F., Barot, R., Sterzl, J. 1994. *Development of immune response in early pig ontogeny*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**, 135-142.
- Tumbleson, M., Schook, L.B. 1996. *Advances in swine in biomedical research*. *Advances in Swine in Biomedical Research* (eds Tumbleson, M., Schook, L. B.), pp 1-4 Plenum Press, New York, USA.
- Vázquez, P.C.G. 1973. Historia de los animales domésticos de México, su origen autóctono o su introducción al país. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de México. México, D.F.
- Whittemore, C. 1993. Ciencia y práctica de la producción porcina. Editorial Acibia, S.A. Zaragoza España. pp. 121-124.

Anexos



Metodología para cultivo celular (linfoproliferación) en sangre periférica en el cerdo.

En la prueba de linfoproliferación se utilizó el **medio de cultivo RPMI-1640** (medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chem. Co. R-6504) suplementado con suero fetal bovino (SBF) al 10% y 0.1 ml de mitógeno PHA con una concentración de 5,10 Y 20 µg/ml (Sigma Chem. Co. L9132).

Obtención de linfocitos en sangre periférica

Se tomó una muestra de sangre de 6 ml en la vena yugular de los cerdos en estado séptico con un tubo al vacío con heparina, en el laboratorio se le agregó solución salina balanceada de Hanks (SSBH;v/v), se le adicionó dextran al 15% (v/v) lentamente por las paredes del tubo cónico, se colocó la muestra en un ángulo de 45° en un recipiente a baño María a una temperatura de 37°C durante 40 minutos. Posteriormente se centrifugo a 2,500 revoluciones por minuto durante 10 minutos a una temperatura de 10°C. Se tomó el sobrenadante del tubo y se completó el volumen con SSBH (Jakoby y Pastan, 1979; Morgan y Darling, 1995).

Enseguida se adicionó el limphoprep (v/v) lentamente por las paredes del tubo al sobrenadante con SSBH, se centrifugo a 1200-1500 revoluciones por minuto en un periodo de 30 minutos, se separó el anillo de linfocitos por gradientes de densidad. Después se tomó con una pipeta el anillo de linfocitos y se colocó en un tubo completando el volumen con SSBH, se centrifugo a 1,200-1500 rpm durante 15 minutos (1ª lavada), se obtuvo el botón de linfocitos por decantación y se completó el volumen con SSBH (2ª lavada), se centrifugo a 1,200-1,500 rpm durante 15 minutos. El botón celular obtenido se resuspendió en 1 ml de medio RPMI-1640, de esta suspensión celular se diluyó 1:2 para realizar la prueba de viabilidad de los linfocitos, la cual se determinó por medio de la exclusión del colorante azul tripano al 0.4% (Sigma Chem. Co. T 8154), con el conteo de células en la cámara de Neubauer.

Siembra de los cultivos

Se sembró en un volumen de 0.1 ml de esta suspensión celular 2×10^5 linfocitos en cada pozo, los cuales se realizaron por triplicado en cajas de cultivo de 96 pozos con un volumen de 0.37ml, (Corning Glass Works, 25861, New York 14831) adicionándoles 0.1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% y 0.1 ml de mitógeno (PHA 5,10 y 20 $\mu\text{g/ml}$), se incubó (estufa CO₂, Model 302, NAPCO E series) a 37°C 1 atm, 5% de CO₂, 95% de aire durante 48 horas, al termino de este tiempo se pulsó con 0.5 Ci de [methyl-³H] Thymidine (Amersham, 37 Mbq/ml) a cada pozo y se incubó nuevamente por 24 horas.

Cosecha de los cultivos

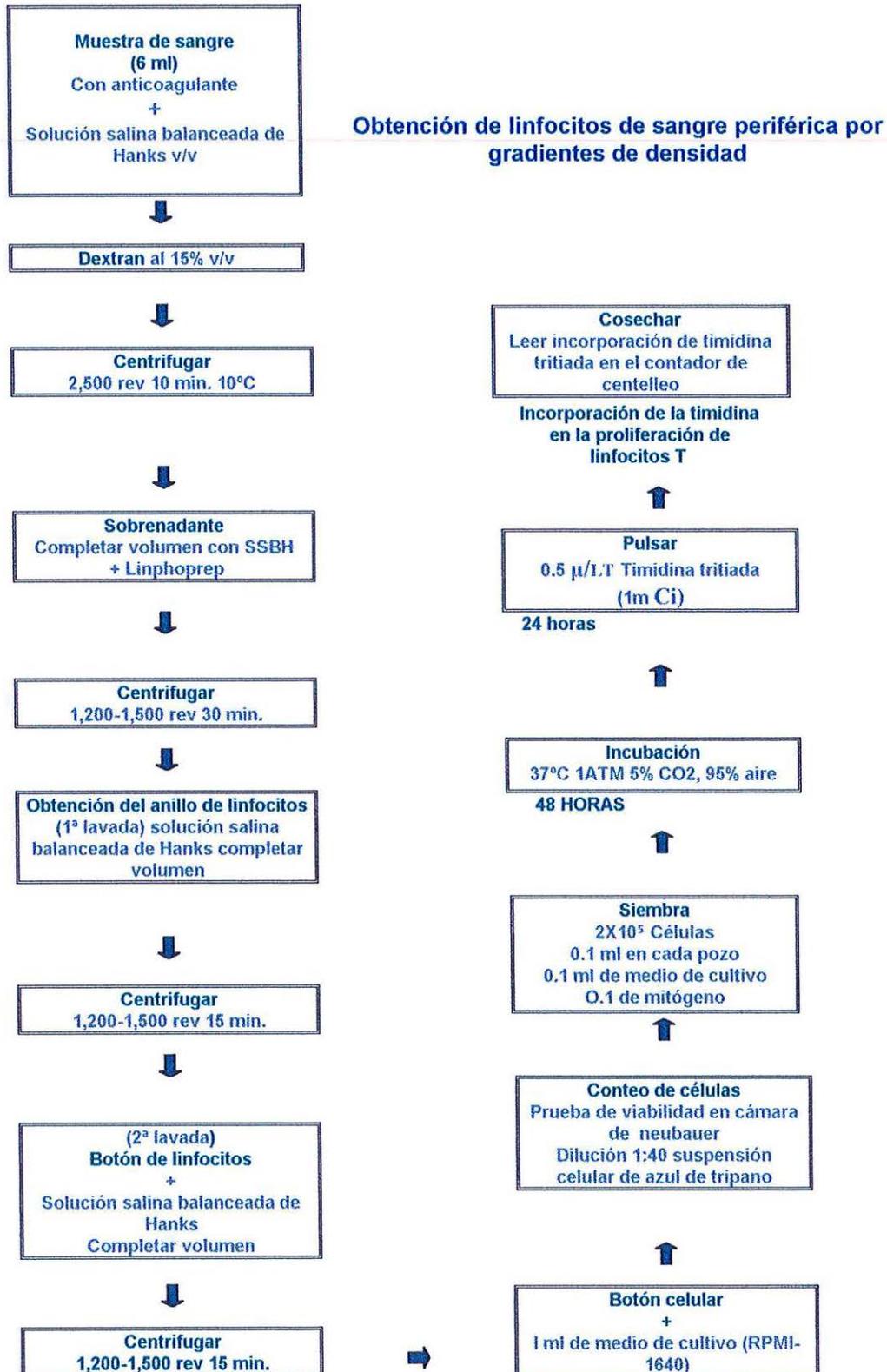
Se cosechó en papel filtro, se dejó secar el papel 24 horas, se lavó el papel filtro con ácido tricloroacético (J.T. Baker Analyzed, 0414-01) al 70% a 4°C, se agitó por un lapso de 5 minutos y se desecho el líquido, se agregó nuevamente el ácido tricloroacético, se agitó por un lapso de 5 minutos y se desecho el líquido nuevamente, se le agregó alcohol (metanol) al 70% a 4°C y se le agitó por un lapso de 5 minutos y también se desecho el líquido, se realizó otra lavada con alcohol y agitación por 5 minutos, se dejaron secar los papeles separados durante 24 horas, se cortaron en cuadros uniformes de 2x2 cm y se colocaron en viales de vidrio (frascos especiales de vidrio con tapón para el aparato de contador de centelleo líquido) se le adicionó 3 ml de líquido de centelleo; [PPO 2-5 difenil oxazol (Sigma Chem. Co. D-4630), tritón X100 (Sigma Chem. Co.6517), etilenglicol (J.T. Baker Analyzed 21766), etanol absoluto (Merck UN1177WGKO) y xilol (Sigma Chem. Co. 917)], posteriormente se colocaron en el contador de centelleo de radiaciones β (Beckman, USA LS6000SE), para la medición de la síntesis de ADN lograda, marcando los cultivos con timidina tritiada [³H-Tdr], el cual es un precursor de los nucleósidos que se incorporan al ADN recién sintetizado. Los resultados sobre linfoproliferación de la ³H-Tdr incorporada se expresaron en cuentas por minuto (cpm).

La transformación blastoide es usada como medición estándar de la respuesta linfocitaria, se expresa sobre la base de las cpm no estimuladas (en los cultivos control) dividida entre las cpm estimuladas, lo cual proporciona un cociente referido como el Índice de Estimulación, **IE**, (Jakoby y Pastan, 1979; Morgan y Darling, 1995).

Análisis estadístico

El modelo estadístico utilizado para comparar la linfoproliferación fue el análisis de varianza (ANOVA) considerando un 95% de nivel de confianza y los resultados se graficaron conforme a la media y error estándar, con el programa de computación slide write plus (untitled) y Word 2000 (Microsoft).

**Diagrama de flujo (procedimiento sintético)
Cultivo celular
Linfoproliferación**



Fagocitosis (Método de adherencia al vidrio de Cunningham)

Animales

Se analizaron los mismos cerdos que en el experimento de linfoproliferación.

Muestras

Se realizó la extracción de sangre en cada uno de los cerdos por punción de la vena yugular con un tubo al vacío sin heparina, tomando 6 ml aproximadamente en cada muestra, agregándoles después 3 o 4 perlas de vidrio, para desfibrinar la sangre, con la continua agitación de las perlas dentro del tubo, en un tiempo aproximado de 3 a 5 minutos, realizándolo en el momento de la toma de la muestra.

Medio de cultivo

Se preparó un cóctel de plasma con un millón de levaduras de *Cándida Albicans* por ml y 20% de solución salina balanceada de Hanks con albúmina Humana a 37°C (SSBH-AH) al 0.002%.

Procedimiento:

Se montaron cubreobjetos en un tapón de hule con resina sintética, previamente desengrasados con alcohol. Se preparó una cámara húmeda a una temperatura de 37°C en la estufa bacteriológica. Se colocó 150 a 200 µl de sangre desfibrinada en los cubreobjetos, se pusieron en la cámara húmeda previamente introducida a la estufa bacteriológica a 37°C y se incubó por 40 minutos con la tapa bien cerrada.

La sangre restante se centrifugó a una velocidad de 1,500 a 2,000 revoluciones por minuto para obtener el plasma.

Se lavó con SSBH-AH a 37°C para eliminar las células no adheridas al cubreobjeto. Inmediatamente después del lavado se agregó el cóctel al cubreobjetos y se incubó en la cámara húmeda a 37°C durante 20 minutos.

Se lavó con SSBH-AH a 37°C y se incubó con la misma solución durante 20 minutos en la cámara húmeda. Se lavó de nuevo con SSBH-AH y se dejó secar al ambiente durante uno o dos minutos. Después se tiñeron los cubreobjetos con colorante de Wright por 30 segundos, se lavaron con agua corriente y posteriormente con agua destilada, dejándolos secar al ambiente. Los cubreobjetos se despegaron del tapón y se montaron con resina sintética en portaobjetos desengrasados (Morgan y Darling., 1993).

Lectura de placas

Sé contaron un máximo de 100 macrófagos en cada placa, contando el numero de levaduras ingeridas dentro del fagostoma teñidas de azul intenso dentro de la célula. Las levaduras digeridas se observan vacías dentro del fagostoma, las cuales son llamadas fantasmas, también se cuantificaron los fagocitos que no fueron activos.

Se obtuvo el Índice de Fagocitosis (**IF**) que es el promedio de levaduras ingeridas entre el número de células cuantificadas.

$$\text{IF} = \frac{\text{Promedio de levaduras ingeridas}}{\text{Numero de fagocitos contados}}$$

También se obtuvo el Índice de Digestión (**ID**) que es el promedio de levaduras digeridas entre el número de fagocitos contados.

$$\text{ID} = \frac{\text{Promedio de levaduras digeridas}}{\text{Numero de fagocitos contados}}$$

Además el Porcentaje de Activos (**PA**) que se obtiene por medio de una regla de tres simple.

Análisis estadístico

El modelo estadístico utilizado para comparar los porcentajes de fagocitos activos así como los diferentes índices, fue el análisis de varianza (Anova) considerando un 95% de nivel de confianza, donde los resultados se graficaron conforme a la media y error estándar.

Diagrama de flujo (procedimiento sintético)

Fagocitosis



Preparación de medio de cultivo de *Cándida Albicans*

La levadura *Cándida Albicans* (patógeno oportunista) es aislada de pacientes con candidiasis mucocutánea, es sembrada en medio de cultivo de agar Sabouroud, se incuba a 37°C por 72 horas, posteriormente son sembradas en Infusión Cerebro Corazón (ICC) a 37°C por 24 a 48 horas.

El cultivo de *Cándida Albicans* en ICC se centrifuga a 2500 revoluciones por minuto durante un periodo de 15 minutos, se decanta el medio y se resuspende en solución salina balanceada de Hanks con albúmina Humana (SSBH-AH) lavándose 3 veces con esta solución y centrifugando a 2500 revoluciones por minuto.

Se realiza un conteo en la cámara de Neubauer y se obtiene una alícuota para concentrar 1×10^6 levaduras sobre ml de SSBA-AH.

Se prepara un cóctel compuesto por la suspensión de cándida, plasma autólogo y SSBH-AH, manteniendo el porcentaje de los volúmenes constantes, el plasma y la suspensión de cándida forman un volumen del 80% y el 20% restante lo constituye la SSBH-AH.

El eje de las proporciones lo constituye el volumen de la suspensión de cándida, que no cambia, v.g. para obtener un volumen de cóctel de 250 μ l y teniendo un volumen de cándida de 12.6 μ l se requiere:

Suspensión de cándida.....	12.64 μ l
Plasma	187.36 μ l
SSBH-AH	<u>50 μl</u>
	Total 250 μ l

Otro ejemplo:

Se requiere mas volumen de cóctel para cubrir mas superficie del cubreobjetos:

Suspensión de cándida.....	12.64 μ l
Plasma	387.36 μ l
SSBH-AH	<u>100 μl</u>
	Total 500 μ l

En ambos ejemplos la suspensión y el plasma aportaron un volumen del 80% mientras que la SSBH-AH contribuyó con el 20%.

Material que fue requerido para una preparación previa:

1. Se sembró *cándida albicans* en ICC 24 horas a 37°C antes de la realización de la prueba.
2. Se metió la cámara húmeda un día antes o algunas horas antes a la estufa bacteriológica para que se saturara de humedad.
3. Se preparo la SSBH mas albúmina humana al 0.002% y se mantuvo a 37°C en la estufa bacteriológica.
4. Se cortó y montó los cubreobjetos en los tapones de hule de # 000 con resina sintética.

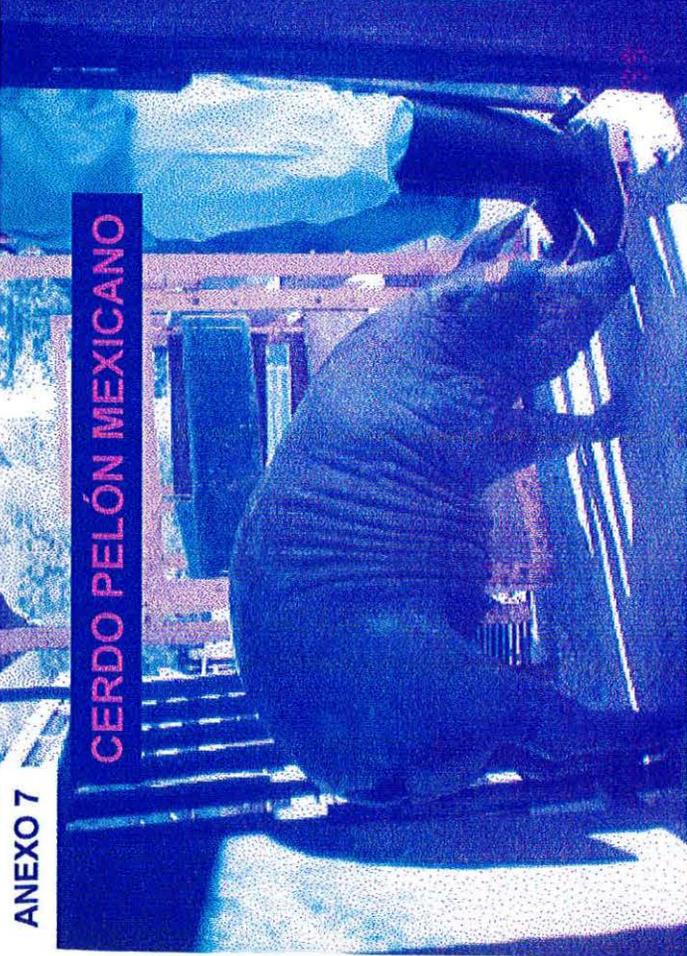
**Registro del Cerdo Criollo Mexicano y
Cerdo Comercial F1 Yorkshire x Landrace**

Maternidad

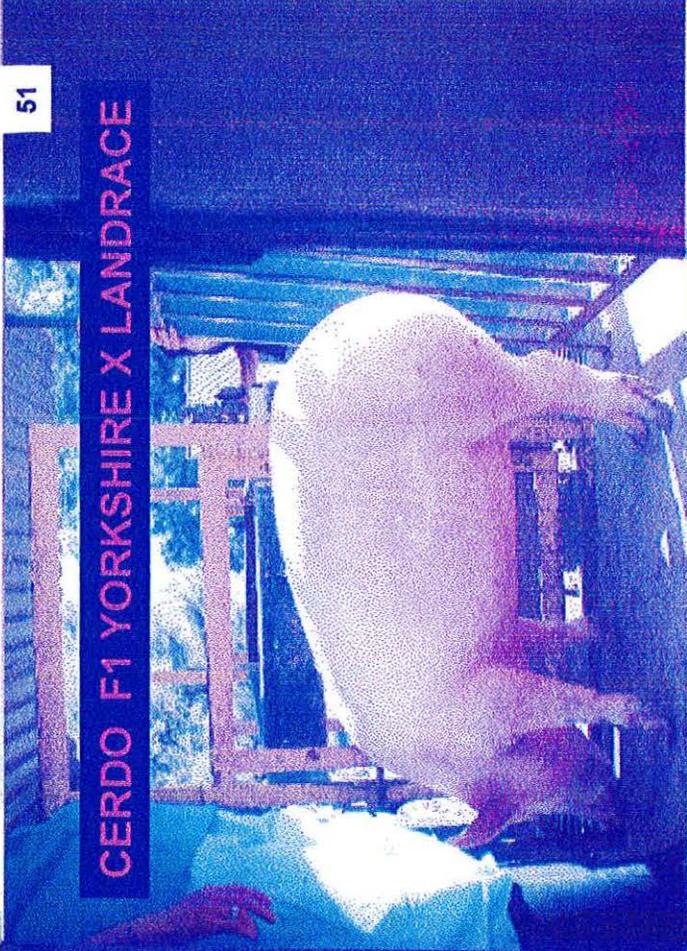
Progenitor H	Progenitor M	LNV	Bajas antes del destete	Bajas después del destete	Peso camada	Peso lechón	Peso destete	Camada	H	M
002	Pelón	9	2	0	10.4	1.15	6.11	103	4	3
816	Pelón	10	1	1	10.3	1.03	5.17	105	5	4
304	2799	11	1	1	16.7	1.51	7.20	102	6	4
243	620	9	1	1	15.0	1.66	7.50	106	4	4

*Las muestras sanguíneas fueron tomadas antes y después del destete

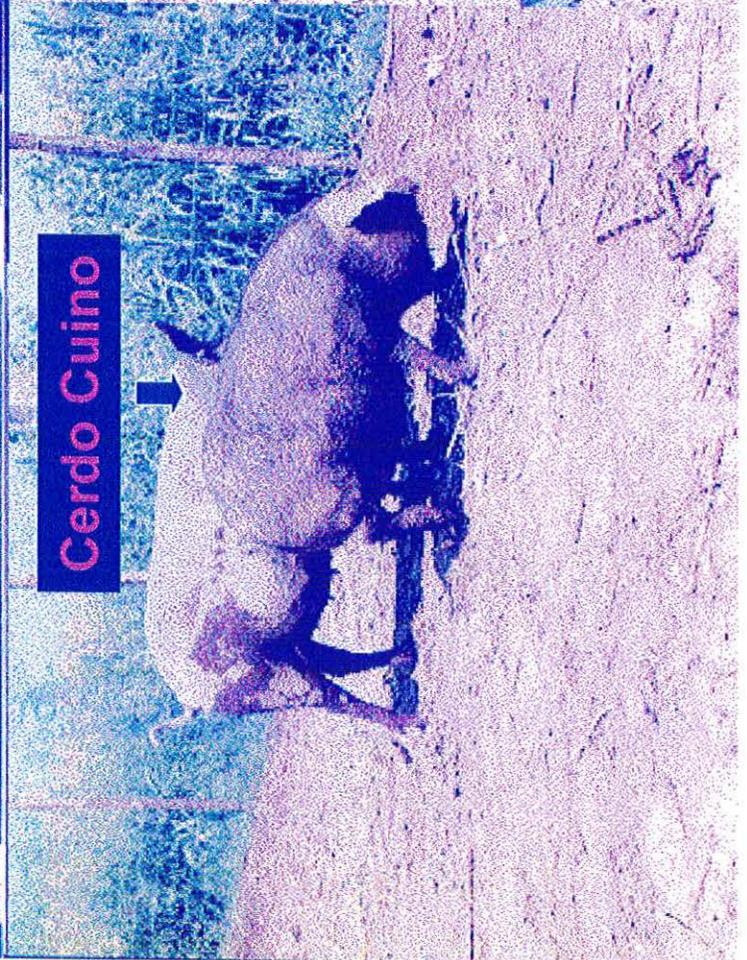
CERDO PELÓN MEXICANO



CERDO F1 YORKSHIRE X LANDRACE



CERDO CUINO



CERDO PATA DE MULA

