

Dedicada a mis padres.

Este trabajo de tesis fue realizado en la cátedra de Inmunología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Se presenta como requisito para obtener el título de Licenciada en Ciencias Biológicas.

*Directora:* Dra. Cecilia R. Greco

*Co-directora:* Dra. Nancy Rodríguez

*Aprobado por el tribunal evaluador:*

Dra. Cecilia R. Greco

Dra. Adriana B. Vivas

Dra. Stella M. Castro

## Agradecimientos

---

- A las personas más importantes de mi vida, Rosa y Miguel, por su apoyo incondicional, amor, contención y por darme la posibilidad de hacer realidad mis sueños.
- A mis hermanos y cuñados. Marce y Edu, siempre van a ser mis ejemplos a seguir. Gracias por ser estar tan presentes. Los adoro.
- A Vale, Paz, Kei y Dai porque me hacen la tía más feliz del mundo.
- A la persona que elegí para compartir mi vida. Oscar, gracias por el amor que nos une infinitamente.
- A mis tíos Mirta, Alberto y Margarita, por su fiel compañía.
- A mi hermano del alma, Lucas, por enseñarme que nada es imposible.
- A mis compañeros de la carrera y a mis amigos de la vida: Ana F., Mali A., Maria R., Gaby M., Anahí B., Aye A., Ana Belén da S., Luciana B., Guille M. y muy muy especialmente a mi amiga Ayi N. Les agradezco por su hermosa amistad.
- A María, Anyi, Oscar, Marcela, Fernando, Daniela, Gastón, Cynthia, Abel y a Paloma por brindarme su cariño y hacerme sentir parte de su familia.
- A la Dra. Cecilia Greco por haber confiado en mí, por la formación académica que me brindó y por su calidez humana.
- A la Dra. Nancy Rodriguez, por aceptar ser codirectora y por su buena predisposición.
- A Guillermo Ashworth por realizar los muestreos necesarios para esta tesis.
- A Fabrisio, Natalia y Romina, por permitirme contar con Uds.
- A las Dras. Stella Castro y Adriana Vivas por sus sabias sugerencias como jurado.

Anexo

---

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis fueron comunicados en las siguientes reuniones científicas y objeto de los siguientes resúmenes publicados:

### REUNIONES CIENTÍFICAS

- **XXV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán.** Trabajo: “Parámetros de distrés pre y postdestete en sistemas de crianza porcina intensivo bajo galpón”. Modalidad de póster. Autores: Ashworth G., Berardo D., Rodríguez N., Mayer N., Alustiza F, García G., Sacchetta R., Gauna H., Vivas A. y Greco C. Lugar y fecha: Tafi del Valle, Tucumán. 8-10/10/08.
- **XVII Reunión Científica Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico.** Trabajo: “Marcadores fisiológicos en lechones destetados precozmente en un sistema de crianza intensiva bajo galpón”. Modalidad de póster. Autores: Ashworth G., García G., Sacchetta R., Ruffo M., Berardo D., Rodríguez N., Mayer N., Alustiza F., Vivas A., Greco C. Lugar y fecha: Santa Fe, 29-31/10/08.
- **XVII Jornadas de la Sociedad de Biología de Córdoba.** Trabajo: “Efecto del distrés postdestete sobre parámetros inmunes en sistema de crianza porcina intensiva bajo galpón”. Modalidad de póster. Autores: Sacchetta R., García G., Mayer N., Gauna H., Berardo D., Poloni L., Alustiza F., Vivas A., Ashworth G., Greco C., Rodríguez N. Lugar y fecha: Huerta Grande, 12-14/08/09.
- **IX Congreso latinoamericano de inmunología.** Trabajo: “Effect of early weaning on piglet’s humoral and cellular immunity in an indoor pig farm”. Presentación en modalidad de póster. Autores: García G., Rodríguez N. Ashworth G., Berardo D., Greco C. Lugar y fecha: Viña del Mar, Chile. 3-7/11/09.
- **XXVII Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán.** Trabajo: “IgG en suero de lechones postdestete y su relación con la transferencia pasiva de la inmunidad calostrual”. Modalidad de póster (expositor). Autores: García G., Rodríguez N., Mayer N., Ashworth G., Alustiza F, Vivas A. y Greco C. Lugar y fecha: Tafi del Valle, Tucumán. 13-15/10/10.
- **III Jornadas Científicas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria.** Trabajo: “Inmunoglobulinas y funcionalidad linfocitaria como indicadores de

competencia inmunológica en lechones precozmente destetados". Modalidad de póster. Autores: García G., Sachetta R., Rodríguez N., Mayer N., da Silva A., Ashworth G., y Greco C. Lugar y fecha: Bs. As. 01-02/11/10.

### RESÚMENES PUBLICADOS

- Ashworth G, Berardo D, Rodriguez N, Mayer N, Alustiza F, García G, Saccheta R, Gauna H, Vivas A, Greco C. Parameters of pre and post weaning distress in piglets housed in intensive indoor production systems. Biocell, Vol 33, N° 2, pág A175, 2009.
- Sacchetta R, García G, Mayer N, Gauna H, Berardo D, Poloni L, Alustiza F, Vivas A, Ashworth G, Greco C, Rodriguez N. Effect of post-weaning distress on immune parameters in intensive system raised swinish. Biocell, Vol 33, N° 3, pág A252, 2009.
- García G., Rodríguez N., Mayer N., Ashworth G., Alustiza F, Vivas A. y Greco C. Serum IgG in post-weaning piglets and its relationship with the passive transfer of colostral immunity. Enviado a publicar, 2010.

## Índice de Contenidos



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1. Producción porcina	3
1.1 Causas de mortalidad y estrategias de control	4
1.2 Establecimientos de cría	5
2. Características generales del sistema inmune	7
2.1 Inmunidad innata	8
2.2 Inmunidad adquirida	10
3. Secreciones de la glándula mamaria	15
4. Transferencia de la inmunidad pasiva porcina	18
4.1 Inmunidad calostrál	18
4.2 Inmunidad lactogénica	19
5. Destete	20
5.1 Estrés por destete	22
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
1. Establecimiento	27
2. Animales	27
3. Diseño experimental	28
4. Muestras de calostro	28
4.1 Separación de suero de calostro	29
5. Técnica en suero de calostro	30
5.1 Cuantificación de inmunoglobulinas	30
5.1.1 Cuantificación de IgG total	30
5.1.2 Cuantificación de IgA total	33

6. Muestras de sangre de lechones	33
7. Técnicas en sangre entera y en plasma sanguíneo	34
7.1 Recuento de leucocitos totales	34
7.2 Determinación de fórmula leucocitaria y relación N/L	34
7.3. Cuantificación de cortisol plasmático	34
7.4 Cuantificación de proteínas totales plasmáticas	35
7.5 Cuantificación de inmunoglobulinas plasmáticas	35
7.5.1 Cuantificación de IgG total	35
7.5.2 Cuantificación de IgA total	36
7.6 Estimulación <i>in vitro</i> de linfocitos porcinos con Con A	36
7.6.1 Separación de linfocitos periféricos porcinos por gradiente de densidad	36
7.6.2 Determinación de la viabilidad celular por exclusión con azul de Tripán	37
7.6.3 Estimulación linfocitaria <i>in vitro</i> con mitógeno (Con A)	37
7.6.4 Determinación del índice de proliferación (IP)	38
8. Análisis estadístico	39
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
1. Anticuerpos calostrales	39
1.1 Cuantificación de IgG e IgA	39
2. Respuesta inmune innata en lechones lactantes y postdestete	41
2.1 Leucocitos totales y fórmula leucocitaria	41
2.2 Comparación entre relación N/L y niveles de cortisol	43
3. Respuesta inmune adaptativa humoral en lechones lactantes y postdestete	46
3.1 Cuantificación de proteínas plasmáticas totales	46

3.2 Cuantificación de IgG e IgA en plasma de lechones	47
4. Respuesta inmune adaptativa celular en lechones lactantes y postdestete	50
4.1 Estimulación <i>in vitro</i> de linfocitos porcinos con Con A	50
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>53</b>

## Índice de Tablas y Figuras

<b>Tabla 1:</b> Concentración de inmunoglobulinas en las secreciones de la glándula mamaria porcina	15
<b>Tabla 2:</b> Concentraciones de inmunoglobulinas y relación IgA/IgG en calostro.	40
<b>Tabla 3:</b> Leucocitos totales y fórmula leucocitaria de lechones durante el pre y postdestete	42

---

<b>Figura 1.</b> Producción y consumo de los distintos tipos de carnes en el mundo	3
<b>Figura 2.</b> Distribución de porcinos en Argentina	4
<b>Figura 3.</b> Células del sistema inmune	8
<b>Figura 4.</b> Estructura de la IgG	13
<b>Figura 5.</b> Estructura de la IgA dimérica	13
<b>Figura 6.</b> Estructura de la IgM	14
<b>Figura 7.</b> Esquema representativo de la dinámica de los mecanismos de defensa del lechón durante las primeras semanas de vida y del momento de la ventana crítica	21
<b>Figura 8.</b> Diseño experimental desarrollado en este trabajo	28
<b>Figura 9.</b> Fotografía de un recipiente con calostro porcino	29
<b>Figura 10.</b> Esquema representativo de la separación de suero de calostro porcino desarrollada en el laboratorio	30
<b>Figura 11.</b> Curva estándar de la concentración de IgG	32
<b>Figura 12.</b> Curva estándar de la concentración de IgA	33
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de neutrófilos en LV y en LNV durante el pre y el postdestete	43
<b>Figura 14.</b> Relación N/L en LV y en LNV durante el pre y el postdestete	44
<b>Figura 15.</b> Niveles de cortisol plasmáticos en LV y en LNV durante el pre y el postdestete	45
<b>Figura 16.</b> Proteínas totales (mg/ml) en LV y en LNV durante el pre y el postdestete en la estación de invierno	46

<b>Figura 17:</b> IgG (mg/ml) en plasma de LV y en LNV durante el pre y el postdestete	49
<b>Figura 18:</b> IgA (mg/ml) en plasma de LV y en LNV durante el pre y el postdestete	49
<b>Figura 19:</b> Índice de proliferación en LV y en LNV durante el pre y el postdestete	51

Abreviaturas

---



**BcR.** receptor de células B  
**CNV.** cerdas no vacunadas  
**Con-A.** Concanavalina A  
**CPA.** Célula presentadora de antígenos  
**cpm.** cuentas por minuto  
**CV.** cerdas vacunadas  
**dIgA.** Inmunoglobulina A dimérica  
**ds.** desvío estándar  
**FcRn.** receptor neonatal para la porción Fc de la IgG  
**GC.** glucocorticoides  
**GM.** glándula mamaria  
**Ig.** Inmunoglobulina  
**IgA.** Inmunoglobulina A  
**IgD.** Inmunoglobulina D  
**IgE.** Inmunoglobulina E  
**IgG.** Inmunoglobulina G  
**IgM.** Inmunoglobulina M  
**IP.** Índice de proliferación  
**LB.** linfocito B  
**LNV.** lechones hijos de cerdas no vacunadas  
**LT.** linfocito T  
**LV.** lechones hijos de cerdas vacunadas  
**min.** minuto/s  
**N/L.** neutrófilos/linfocitos  
**NK.** Natural killer  
**SI.** sistema inmunológico  
**sIgA.** Inmunoglobulina A secretora  
**SNA.** sistema nervioso autónomo  
**SNC.** sistema nervioso central  
**Th.** T helper o colaborador

Resumen

---

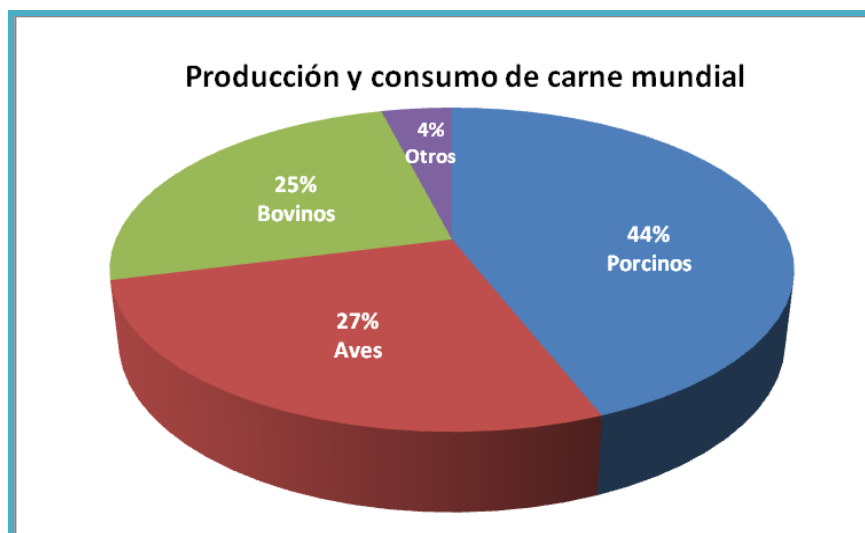
La alta competitividad de los mercados y la búsqueda de una mayor eficiencia económica conducen a la implementación de nuevas técnicas de manejo productivo, las cuales afectan la salud y el bienestar animal sometiéndolo a situaciones extremas de adaptación que aumentan la vulnerabilidad a enfermedades. La profilaxis en cerdas preñadas es una práctica común en criaderos intensivos para favorecer la transferencia pasiva de la inmunidad. En los últimos años, la disminución de la duración del período de lactancia ha sido poco caracterizada y se encuentra poco dilucidado el efecto que produce sobre el sistema inmune porcino. El objetivo de este trabajo fue determinar la inmunidad humoral y celular en lechones tempranamente destetados en un sistema de cría intensiva. Se estudiaron 10 cerdas preñadas multiparas (5 vacunadas y 5 no vacunadas) y 50 lechones provenientes de esas madres (5 por camada). Se conformaron dos grupos de 25 animales cada uno: LV (lechones hijos de cerdas vacunadas) y LNV (lechones hijos de cerdas no vacunadas). Todos los animales híbridos de base Landrace x Large White, con idéntica genética, alimentación y manejo sanitario, criados bajo galpón, con luz y temperatura ambiental controlada. El destete se realizó a los 14 días de vida. A todas las cerdas se les extrajo calostro, no más allá de 12 horas postparto y a los lechones una muestra de sangre heparinizada 48 hs previas al destete (12 días de edad) y a los 7 días posteriores al destete (21 días de edad). Se determinaron en calostro las concentraciones de IgG e IgA por ELISA (Pig IgG e IgA Quantitative ELISA Bethyl Laboratories USA). En los lechones pre y postdestete se cuantificaron leucocitos totales; fórmula leucocitaria y relación N/L; funcionalidad linfocitaria por métodos radioisotópicos; niveles de cortisol por RIA; proteínas totales e IgG e IgA. El estudio se realizó en las estaciones de verano e invierno. Las concentraciones de IgG e IgA en calostro se encontraron dentro de los valores esperados, sin diferencias atribuibles a la vacunación y muestran que la IgG es el isotipo predominante en esta secreción. En lechones luego del destete, se observó un aumento de leucocitos totales con neutrofilia y disminución de linfocitos y de monocitos, que podrían corresponderse parcialmente con un leucograma de estrés. El aumento de la relación N/L podría ser atribuido al estrés producido por el destete, ya que es un indicador de estrés a largo plazo. Por su parte, el cortisol se encontró dentro de los valores normales. La IgG en el postdestete disminuyó significativamente en los LNV, en comparación con los restantes grupos. Se podría inferir que la vacunación ayudaría a mantener las concentraciones de esta inmunoglobulina en el postdestete. La IgA estaba dentro los valores esperados sin modificaciones entre los grupos. Esta inmunoglobulina recibida pasivamente durante la lactación permanece en el intestino y su síntesis activa recién comienza. La funcionalidad de los linfocitos *in vitro* no mostró diferencias significativas entre los grupos. En conclusión, en sistemas de producción porcina intensiva con alta rentabilidad, el destete temprano genera una situación estresante en los lechones que activa mecanismos innatos como primera estrategia de defensa, disminuye la inmunidad humoral sistémica y no modifica la funcionalidad linfocitaria en las estaciones estudiadas. Por su parte, la vacunación profiláctica de las cerdas gestantes ayuda a mantener la inmunidad humoral en los lechones hasta el desarrollo de la inmunidad activa, atenuando el efecto del destete.

## Introducción

---

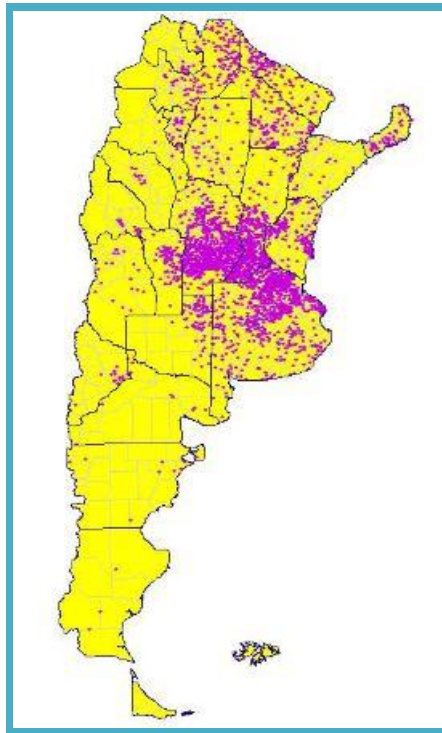
## 1. Producción porcina

En los últimos años, los porcinos alcanzaron el 44% del total de carnes producidas y consumidas en el mundo, seguido por el 27% y 25% para aves y bovinos, respectivamente (Figura 1). Además, existen perspectivas de crecimiento de la demanda principalmente impulsados por el aumento poblacional. En Argentina, la carne de cerdo ocupa un lugar secundario en la dieta (7,7 kg/habitante/año) y su mayor demanda es en forma de fiambres, chacinados y embutidos, a diferencia de otros países que consumen principalmente carne fresca.



**Figura 1:** Producción y consumo de los distintos tipos de carnes en el mundo.

Según el SENASA, al 31 de marzo de 2011, el 70% de la producción porcina en Argentina se concentra en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe (Figura 2). Esta distribución está asociada a las regiones del núcleo maicero, ya que es más económico transportar el animal terminado y no varias veces su peso en alimentos. En nuestra provincia, Río Cuarto se encuentra en el tercer lugar entre los departamentos con mayor producción.



**Figura 2:** Distribución de porcinos en Argentina. Cada punto representa 1000 porcinos. Fuente: SENASA, datos hasta el 31/03/2011.

### 1.1 Causas de mortalidad y estrategias de control

Durante las primeras semanas de vida y en el postdestete los lechones se transforman en el eslabón más sensible de la cadena productiva dada su incapacidad para resolver exitosamente procesos infecciosos, como la enterocolitis. Las pérdidas productivas que ocurren después del nacimiento son debidas a patologías respiratorias e intestinales, dentro de ellas las diarreas son la principal causa de morbimortalidad. Los principales agentes bacterianos asociados a esta afección son *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), Shigatoxigénica (STEC) y Enteropatógena Porcina (PEPEC) (Li *et al.* 2007), coccidia, rotavirus, virus de la gastroenteritis transmisible de los cerdos (GTC), enterovirus, parvovirus, etc. Todos ellos provocan en el lechón alteraciones en la flora normal, menor absorción de calostro e infecciones por gérmenes patógenos al

existir mayor contaminación. Entre las causas de las diarreas se encuentran, el tipo de instalación productiva, el manejo deficiente de los animales y el medio ambiente.

Para disminuir la incidencia de esta enfermedad se utilizan diferentes estrategias de control que en general consisten en el saneamiento del medio ambiente, modificación de las instalaciones, uso de antibióticos antes y/o después del destete para controlar enfermedades específicas e inmunización profiláctica materna durante la preñez para incrementar la transferencia pasiva de la inmunidad desde la madre a la cría. En condiciones normales de producción, las cerdas son inmunizadas con vacunas contra patógenos bacterianos y virales. Esta medida, favorece la producción de anticuerpos calostrales, los cuales son pasivamente transferidos a los lechones (Salmon *et al*, 2009). Otra estrategia consiste en el suministro de suero sanguíneo para mejorar los mecanismos de defensa inespecíficos de la cerda lactante, a este procedimiento se le ha denominado inmunidad suplementaria neonatal. Estas prácticas son de uso frecuente a campo y disminuyen la aparición de diarreas, aumentan la ganancia de peso y en consecuencia favorecen la rentabilidad productiva (Morilla González, 1991).

---

## 1.2 Establecimientos de cría

---

Hay descriptos en la bibliografía una amplia variedad de sistemas productivos para la cría porcina. De acuerdo a los índices de productividad, se clasifican en:

✓ Sistemas extensivos: se caracterizan por utilizar animales de razas rústicas y autóctonas, con un limitado poder de transformación, bajos índices reproductivos y como consecuencia menor rentabilidad.

- ✓ Sistemas intensivos: es una forma de explotación altamente tecnificada dirigida a situar al ganado porcino en condiciones tales que permitan obtener altos rendimientos productivos en el menor tiempo posible. Dentro de este sistema hay dos subtipos: de ciclo cerrado, que incluye todo el ciclo, maternidad, transición y engorde hasta el acabado; y de engorde hasta el acabado.
- ✓ Sistemas semi-extensivos o semi-intensivos: estos sistemas son una mezcla de los dos anteriores. Se realiza la planificación de cubriciones, parideras y destetes y durante el engorde el ganado mantiene una alimentación basada en recursos naturales.

La tendencia actual en producción porcina se dirige hacia instalaciones totalmente cerradas y con control ambiental. Éstas permiten la máxima eficiencia productiva en todas las épocas del año.

La importancia del tipo de sistema de explotación radica en la influencia que ejercen sobre los distintos parámetros inmunológicos (Rudine *et al*, 2007).



## 2. Características generales del sistema inmune porcino

Al igual que en muchos otros organismos, las células que forman el sistema inmune porcino son muy variadas tanto en su estructura como en su función. Todas proceden de una célula madre pluripotencial de la médula ósea, de la que se diferencian la línea mieloide y la línea linfoide (Figura 3).

❖ La línea mieloide es aquella de la que derivan los monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

❖ De la línea linfoide derivan tres tipos de linfocitos. Los linfocitos B (LB) se forman en la médula ósea y son responsables de la producción de anticuerpos. Las distintas poblaciones de linfocitos T (LT), derivados del timo y responsables de la colaboración en la producción de anticuerpos y de los mecanismos de la respuesta inmune celular, y las células Natural Killer (NK).

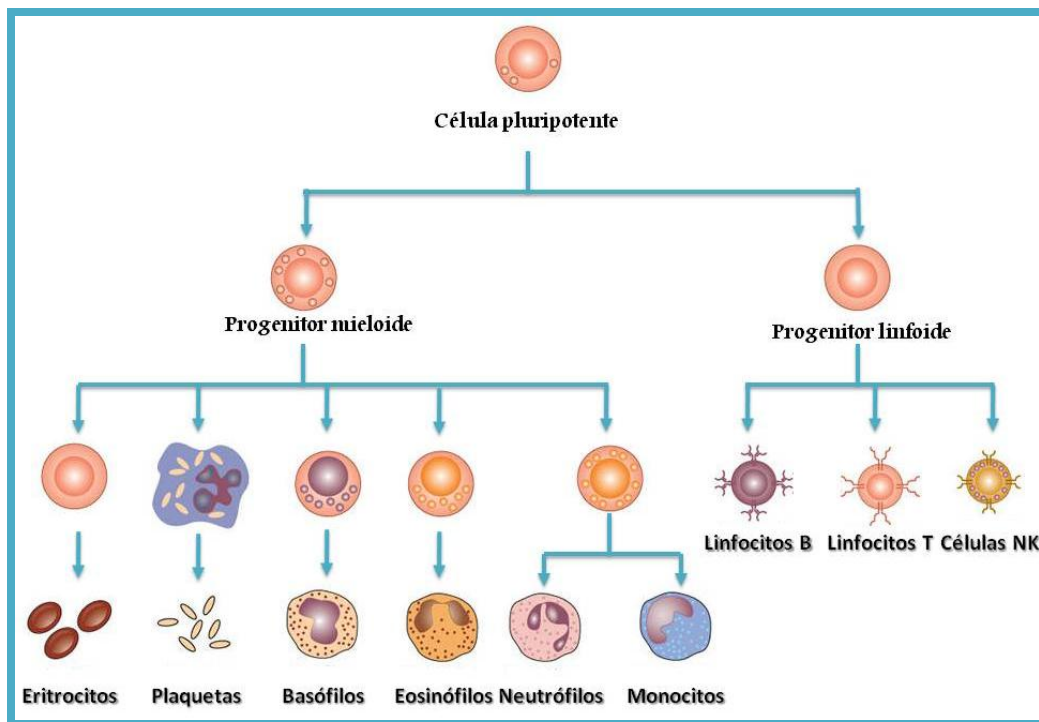


Figura 3: Células del sistema inmune. Roitt, 2008 modificado.

## 2.1 Inmunidad innata

Las células de la inmunidad innata juegan un papel esencial en la iniciación de la inmunidad adquirida. Estas células pueden actuar como células efectoras en algunos mecanismos inmunitarios.

El granulocito más abundante e importante en el cerdo es el **neutrófilo**. Estas células salen de la médula ósea, pasan al torrente circulatorio y de ahí al interior de los tejidos en el caso de una inflamación o permanecen como residentes. Tienen una vida media de pocos días y su función fundamental es la de capturar y destruir sustancias extrañas mediante el mecanismo de fagocitosis. Es una primera e importante línea de defensa, pero de corta duración.

El segundo grupo en importancia es el de los **eosinófilos**. Estas células se diferencian en la médula ósea y de allí pasan al torrente circulatorio. Su vida media es

muy corta, menos de una hora. Si bien sus gránulos no contienen lisozima, pero sí grandes cantidades de fosfatasa ácida y peroxidasa, su rol principal es la fagocitosis. Intervienen muy eficazmente en la defensa contra la parasitosis.

Por último los granulocitos menos abundantes son los **basófilos**, cuya actividad está ligada a la liberación de aminas vasoactivas, tales como la histamina y la serotonina. Así intervienen en la inflamación de carácter agudo y representan una señal de alarma para el sistema inmune.

En definitiva, aunque los granulocitos no reaccionan de forma específica con los antígenos, tienen una función muy importante en los procesos fagocíticos e inflamatorios, sobre todo en los de carácter agudo.

Las **células NK** intervienen en la respuesta innata y en porcinos son linfocitos pequeños o medianos agranulares, a diferencia de los humanos y murinos, en los que son linfocitos grandes y granulares. Estas células se encuentran en mayor proporción en sangre periférica en los animales jóvenes, disminuyendo a medida que el animal se va haciendo adulto, lo que indica que están más ligadas a los mecanismos de respuesta natural o innata y no a los mediados por estimulación antigénica específica (inmunidad adquirida).

Los **monocitos** se liberan de la médula ósea como células no diferenciadas y circulan en la sangre durante 2 ó 3 días. Cuando abandonan la circulación y son reclutados en los tejidos se diferencian a **macrófagos**. Los macrófagos son células con alta capacidad fagocítica y actúan como células presentadoras de antígenos (CPA). Esta última propiedad es compartida con las células dendríticas y los linfocitos B, quienes expresan en su superficie los antígenos de histocompatibilidad Swine Leucocyte Antigen (SLA) II y por lo tanto, son capaces de poder presentar antígenos a los linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup>.

Las **células dendríticas** producidas por la médula ósea a partir de progenitores mieloides y linfoides son CPA y por lo tanto, disponen de capacidad para la captación de antígenos en forma natural. Las células dendríticas, al igual que los monocito-macrófagos se localizan en los tejidos de captación (piel y mucosas) y en los de presentación (ganglios y bazo). Las células dendríticas de los epitelios cutáneos y mucosos son inmaduras, por lo tanto tienen capacidad de capturar y llevar los antígenos al ganglio más cercano, para su presentación a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En su tránsito hasta el ganglio linfático drenante, maduran y adquieren la capacidad de presentar antígenos (Uenishi *et al*, 2009; Sinkora *et al*, 2009; Gerner *et al*, 2009; Juul-Madsen *et al*, 2010).

---

## 2.2 Inmunidad adquirida

---

Al igual que en la mayoría de las especies, las células efectoras de la inmunidad adquirida son los linfocitos T y B.

Los **LT** del cerdo se producen en el timo y, en menor proporción, en las zonas T dependientes de los órganos linfoides secundarios. Estas células tienen un papel fundamental en la respuesta inmune, por un lado en los mecanismos de colaboración con los linfocitos B para la producción de anticuerpos y por otra parte como responsables de la inmunidad celular. En la membrana de los linfocitos T, además del SLA se pueden diferenciar dos tipos de receptores específicos para el antígeno, denominados TcR de las palabras inglesas “T cell receptor” (receptor de células T) o actualmente denominado Complejo TcR.

En porcinos existen importantes diferencias en cuanto a los LT, con respecto a los humanos y murinos. En sangre, tejidos linfoides y glándula mamaria están presentes cuatro subpoblaciones de linfocitos T:

- ❖ Linfocitos CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>.
- ❖ Linfocitos CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>.
- ❖ Linfocitos doble negativos CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>.
- ❖ Linfocitos doble positivos CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>.

Los **LB** del cerdo se producen en la médula ósea en una cantidad aproximada entre doscientos a cuatrocientos millones diarios. En sangre periférica, constituyen el 8 al 18% de los linfocitos totales. La membrana de los linfocitos B tiene un gran número de moléculas, entre ellas, el complejo BcR (B Cell Receptor) o receptor de células B. El BcR está formado por una inmunoglobulina M (IgM) de superficie asociada a un heterodímero Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  unido por puentes disulfuros. La función de la IgM es la de reaccionar con el antígeno específico, mientras que el heterodímero sirve para transmitir la señal al interior de la célula para iniciar la producción de anticuerpos (Cuello, 2006; Sinkora *et al*, 2009; Gerner *et al*, 2009; Juul-Madsen *et al*, 2010;).

Los anticuerpos son los efectores humorales de la inmunidad adquirida. En los porcinos se han descrito cinco isotipos de inmunoglobulinas (Igs), los cuales son: IgM, IgA, IgG, IgE e IgD. Aunque esta última no se encuentra determinada de manera contundente (Butler *et al*, 2006). La IgA se puede presentar como IgA secretora (sIgA) o como IgA dimérica (dIgA).

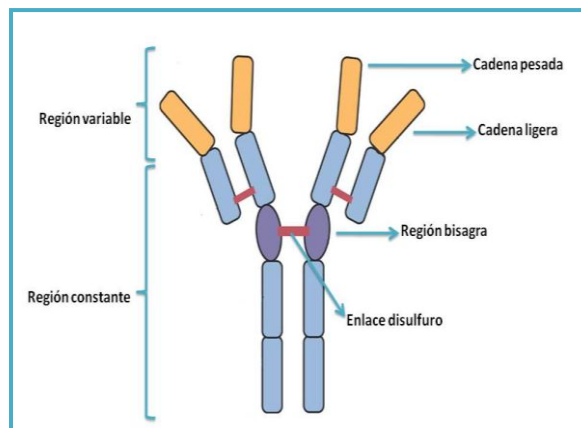
La **IgG** es la principal Ig presente en sangre y en calostro (Figura 4). En el cerdo se han descrito seis subisotipos diferentes: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgG<sub>5</sub>, IgG<sub>6</sub> (Butler *et*

*al*, 2009). Representa aproximadamente el 70% del total de Igs del organismo y se produce de manera muy intensa en pocas horas. Tiene gran afinidad por el antígeno y es la dominante en la respuesta inmune secundaria. Puede opsonizar, aglutinar y precipitar antígenos, así como activar la vía clásica y alternativa del complemento. Por otra parte, se puede unir a receptores específicos de células inmunes como macrófagos, mastocitos, polimorfonucleares neutrófilos y linfocitos para incrementar en ellos la capacidad de fagocitosis y la producción y liberación de factores solubles. Tanto durante un proceso de infección como de vacunación, los niveles de esta Ig se ven notablemente incrementados, sobre todo tras una segunda exposición al antígeno.

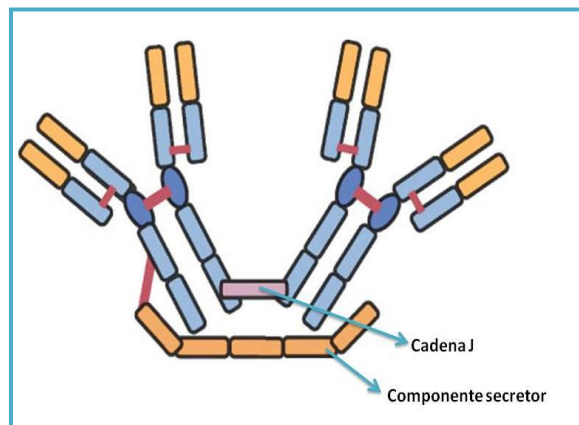
La **IgA** se encuentra en el suero y en las secreciones. En porcinos, el 50% de la IgA del suero es polimérica, a diferencia de lo que ocurre en otros organismos en los cuales es un monómero. En las secreciones se encuentra como dímero asociado a un componente secretor elaborado por las células epiteliales que permite la unión a las superficies mucosas formando la inmunoglobulina A secretora (sIgA) (Figura 5). Este es el principal isotipo presente en las mucosas, tanto del intestino como de las vías respiratorias superiores. Actúa básicamente en respuestas de la inmunidad local de las mucosas, siendo la primera línea de defensa frente a patógenos cuya invasión se produce a través de estas superficies, impidiendo la adhesión de los mismos al epitelio respiratorio.

La **IgM** es la primera Ig que se produce durante el desarrollo fetal y es el isotipo predominante en una respuesta primaria. Su presencia está casi exclusivamente restringida al espacio vascular y su síntesis y afinidad específica disminuyen a medida que aumenta la de IgG. Por su conformación de pentámero puede relacionarse con múltiples antígenos y activar el sistema complemento (Figura 6).

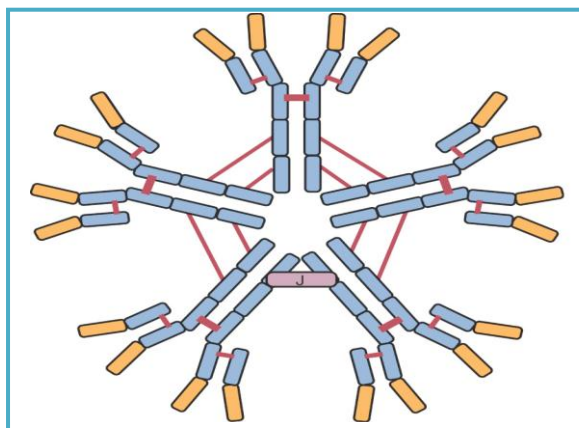
La **IgE** representa menos del 0,01% de las inmunoglobulinas séricas en el ganado porcino. Está involucrada en las respuestas de hipersensibilidad anafiláctica y juega un importante papel en las afecciones parasitarias.



**Figura 4:** Estructura de la IgG. (Fuente: Tizard, 2009 modificado).



**Figura 5:** Estructura de la IgA dimérica. (Fuente: Tizard, 2009 modificado).



**Figura 6:** Estructura de la IgM (Fuente: Tizard, 2009).



### 3. Secreciones de la glándula mamaria

La glándula mamaria es un tejido complejo altamente especializado involucrado en la nutrición del lechón. La primera secreción que esta glándula produce después del parto se llama calostro y aproximadamente 24 horas después comienza la producción de la *leche*.

El **calostro** es un líquido biológico complejo único en su composición y función, el cual ayuda al desarrollo de la inmunidad en el recién nacido (Uruakpa *et al*, 2002). Contiene niveles muy altos de IgG, relativamente bajos de IgA e IgM (Tabla 1), leucocitos, LT, LB y factores de crecimiento, entre ellos se pueden mencionar: factores de crecimiento análogo de insulina I y II (IGF I y II), factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGFβ). Estas biomoléculas cambian rápidamente durante las primeras 24 hs posparto y su función es estimular el desarrollo de la competencia inmunológica de las crías. (Rooke y Bland, 2002).

**Tabla 1:** Concentración de inmunoglobulinas en las secreciones de la glándula mamaria porcina.

	IgG (mg/ml)	IgA (mg/ml)	IgM (mg/ml)
<b>Calostro</b>	30-70	9.5-10	2,5-3,2
<b>Leche</b>	1-3	3-7	0,3-0,9

(Fuente: Tizard, 2009 modificado).

Estudios utilizando Igs marcadas radioactivamente mostraron que casi el 100% de la IgG, el 40% de la IgA y el 85% de la IgM presentes en el calostro son derivadas del suero de la cerda (Salmon *et al*, 2009). De los seis subisotipos de IgG descritos en porcinos, sólo la IgG<sub>1</sub> es selectivamente transportada en la última etapa de la preñez

desde el suero a las secreciones mamarias por el receptor neonatal para la fracción Fc (FcRn) y depende del control hormonal. El transporte de la IgA e IgM séricas al calostro está mediado por el receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR) en la glándula mamaria, con un predominio de la IgA dimérica (9.3S) sobre la IgA secretora (11S). Si bien los niveles de IgG en el calostro son variables, dentro de las primeras 5 horas se encuentran aproximadamente entre los 30-70 mg/ml para descender a valores de 30-10 mg/ml entre las 6 y 24 horas. (Wagstrom *et al*, 2000; Schnulle P. *et al*, 2003; Butler *et al*, 2008; Pinelli-Saavedra *et al*, 2008; Cervenak y Kacs Kovics, 2009).

La secreción de **leche** está regulada por glucocorticoides (GC), estas hormonas inician el proceso de generación de la leche y el comienzo de la producción láctea. La leche presenta características de alimento a diferencia del calostro, el cual es un sustituto inmunológico. A medida que el calostro se transforma en leche las concentraciones de los diferentes isotipos de Igs cambian. Hay un predominio de IgA sobre la IgG (Tabla 1). De acuerdo a Salmon *et al* (2009), la relación de IgA/IgG es de 2.1 a 6.96 en leche, muy superior a la del calostro, la cual se encuentra entre 0.16 y 0.22. En cuanto a la composición nutritiva de la leche contiene menos cantidad de sólidos totales y proteínas y más lactosa, grasa y cenizas. La mayoría de los anticuerpos presentes en la leche son el resultado de la síntesis local en la glándula mamaria. En esta glándula se sintetiza el 70 % de la IgG y más del 90% de la IgA e IgM. Dichos cambios en la composición reflejan la transición en las secreciones mamarias y el inicio de la lactogénesis. En las cerdas, hay una relación entre la glándula mamaria y el intestino (circuito entero-mamario) y la glándula mamaria y el tracto respiratorio superior. Por lo que, los anticuerpos IgA específicos protectores presentes en la leche se

sintetizan en respuesta a la estimulación antigénica a nivel del intestino y del tracto respiratorio.

La especificidad antigénica de la IgG y de la IgA refleja la exposición a antígenos medioambientales. La inmunidad adquirida a través del calostro y la leche protege a los lechones contra estos antígenos, no así frente a nuevos antígenos. (Klobasa *et al*, 1991; Wagstrom *et al*, 2000; Rooke, 2002; Troillet, 2005; Salmon *et al* 2009).

## 4. Transferencia de la inmunidad pasiva porcina

Para sobrevivir hasta alcanzar la competencia inmunológica, las crías porcinas dependen exclusivamente de la transferencia pasiva de anticuerpos maternos aportados por el calostro y la leche, ya que la placenta epiteliocorial de las cerdas, es impermeable a las Igs. El calostro aporta anticuerpos, principalmente del isotipo IgG<sub>1</sub>, la cual proporciona protección sistémica, mientras que la protección contra patógenos que afectan las mucosas intestinales y respiratorias, está asociada a la sIgA presente en la leche. Estas dos formas de transferencia pasiva se denominan “inmunidad calostrual” e “inmunidad lactogénica” respectivamente. (Rooke *et al*, 2003; Rothkotter, 2009).

### 4.1 Inmunidad calostrual

En las primeras 24-36 horas de vida, el intestino del lechón es capaz de absorber macromoléculas intactas, entre ellas las Igs. Este pasaje de IgG, IgM e IgA se realiza por diferentes rutas. A través del epitelio de las criptas intestinales se absorben IgA monomérica y dimérica e IgM mediante transporte activo por el pIgR. Por otra parte, en el epitelio veloso existe una permeabilidad selectiva para IgG mediada por el receptor FcRn. A pesar de la presencia de este receptor, es posible que la IgG también se transfiera por transcistosis (Salmon *et al*, 2009). Una vez que fueron absorbidas la IgA monomérica y dimérica, ésta última, puede sufrir transudación inversa desde la sangre del neonato hacia el intestino. En el intestino se une al componente secretor donde permanece para la protección local.

Tras este corto período de absorción, se produce el **cierre de la mucosa intestinal** al paso de macromoléculas intactas con lo que el lechón pierde esta vía de adquisición de la inmunidad (Wagstrom *et al*, 2000; Butler *et al*, 2008). El consumo de calostro inmediatamente después del parto, resulta esencial porque la capacidad del

intestino del neonato para absorberlas se pierde dentro de las primeras 24-36 horas después del nacimiento y además la concentración de Igs calostrales declina rápidamente (Benavides *et al.* 2005). La especificidad del calostro reflejan la inmunidad sistémica de la cerda y protege al lechón contra cualquier patógeno al que la madre haya estado expuesta o vacunada.

El consumo de calostro es muy variable de un lechón a otro, debido a factores relacionados con la cerda reproductora, el tamaño de la camada, el peso vivo del lechón al nacimiento, anormalidades físicas, factores ambientales, etc. Esto explicaría el éxito de algunos animales para sobrevivir o lograr un desarrollo superior condicionando el porcentaje de mortalidad en el predestete y por ende en la rentabilidad del establecimiento.

#### 4.2 Inmunidad lactogénica

Independientemente que la leche contiene IgG, IgM e IgA, la inmunidad lactogénica está principalmente asociada a la sIgA transmitida por la leche hasta el destete. Luego de la ingestión, esta Ig permanece *in situ* y da protección local contra microorganismos ambientales y antígenos de la dieta. Estos anticuerpos son muy resistentes a la degradación proteolítica y proporcionan inmunidad a la mucosa evitando la adherencia de bacterias y virus a la pared intestinal y su penetración posterior dentro de las células epiteliales (Salmon, 2002).

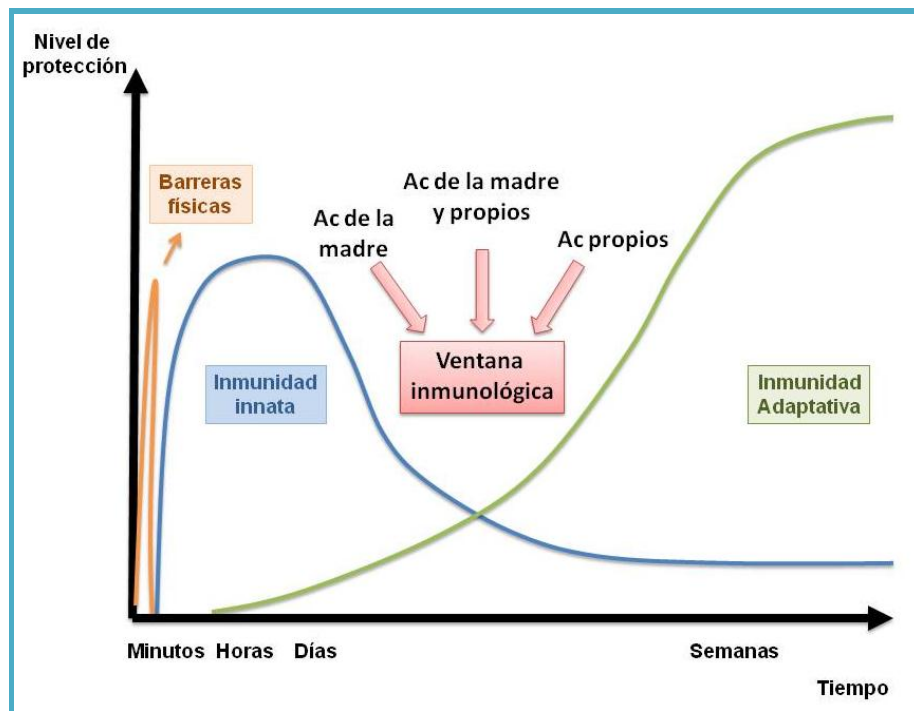
A partir de las cinco semanas de vida, el sistema linfóide del lechón alcanza un grado de madurez suficiente, lo que le permite producir sus propias Igs.

## 5. Destete

El destete es un período en el cual los mamíferos jóvenes deben hacer la transición de la dependencia materna y de la alimentación láctica hacia una independencia social y nutricional. Bajo condiciones naturales el destete es un proceso gradual y en los lechones no se completa hasta las 12-16 semanas de edad, este tiempo, permite amortiguar los cambios fisiológicos y psicológicos producidos en el animal. En sistemas productivos los lechones son destetados de manera abrupta y mezclados con otros lechones no hermanos, sin permitirles adaptarse al cambio.

Según el momento en que se los separa de la madre, se pueden diferenciar distintos tipos de destete. El destete convencional, se realiza a los 21 días, el destete temprano, a los 14 días de vida y el ultra temprano, a los 7 días de vida (Puppe *et al*, 1997; Lallés *et al*, 2007; Levast *et al*, 2010).

El destete se produce en un período clave de la vida del lechón, la “ventana crítica del desarrollo inmunológico”, durante la cual se desarrolla la inmunidad adaptativa conjuntamente con la inmunidad innata programada de manera intrínseca, mientras que el lechón recién nacido recibe ayuda a través de la inmunidad pasiva hasta el desarrollo de su propia competencia inmunológica (Figura 7) (Salmon *et al*, 2009; Levast *et al*, 2010).



**Figura 7:** Esquema representativo de la dinámica de los mecanismos de defensa del lechón durante las primeras semanas de vida y del momento de la ventana crítica. (Fuente: Tizard, 2009 modificado).

Numerosos autores que trabajan en el tema del destete plantean ventajas y desventajas con relación al momento en el que debe realizarse. Algunos sostienen que destetar tempranamente acorta el tiempo de producción de anticuerpos propios y disminuye la transmisión vertical de enfermedades, pero aumenta el riesgo de contraer enfermedades infecciosas digestivas y respiratorias. Además, un destete excesivamente temprano (menos de 7 días) exige excelentes instalaciones y muy buen manejo. Por el contrario, otros autores afirman que los anticuerpos adquiridos pasivamente durante un período de tiempo prolongado retardarían el desarrollo de la inmunidad activa de los lechones (Wagstrom *et al*, 2000; Rooke and Bland, 2002; Salmon *et al*, 2009).

---

## 5.1 Estrés por destete

---

En los sistemas de producción porcina actuales la exigencia de una mayor rentabilidad lleva a que los lechones sean generalmente destetados antes de haber desarrollado completamente su sistema inmune. La separación de la madre, el paso de una dieta líquida de tipo lácteo a una sólida y el traslado a un medio ambiente diferente, son factores que comprometen el estado inmunológico del lechón, volviéndolos más susceptibles a contraer enfermedades infecciosas. Por lo tanto, el destete produce cambios inmunológicos, sociales o psicológicos, nutricionales, medioambientales y microbianos debido a que es una situación estresante (Tizard, 2009)

En este tipo de sistemas productivos, no solamente los lechones están expuestos a situaciones estresantes, sino también sus madres. Se ha descrito que en las hembras pre-parturientas hay un aumento fisiológico de corticoides, los cuales podrían mantenerse elevados por estresores, como por ejemplo el calor, produciendo un deterioro en la calidad del calostro además de la finalización prematura de la calostrogénesis (Ashworth, 2006). Teniendo en cuenta esta situación cobra importancia en grado de bienestar del animal, para ello es adecuado medir indicadores hematológicos y serológicos de estrés tales como la relación N/L y los niveles plasmáticos de cortisol (Stull *et al*, 1999).

El efecto modulador del estrés sobre la respuesta inmunológica es diferente en los distintos animales y está relacionado al momento del desarrollo ontogénico del sistema inmunológico (SI), al tipo de variable en estudio y al organismo en estudio. En el cerdo, en donde el desarrollo ontogénico del SI es intrauterino, el comportamiento inmunológico del lechón durante las primeras semanas de vida está directamente



relacionado a las experiencias estresantes a las que la madre ha estado expuesta durante la gestación. En cambio en ratas, el SI se desarrolla principalmente después del nacimiento, por lo que el efecto inhibitorio del estrés es menor. (Merlot E. *et al*, 2008). Por su parte, la capacidad funcional de las células NK y de los linfocitos también varía en ratas y cerdos. Además, entre los cerdos el comportamiento del SI frente a situaciones estresantes también depende de las razas, siendo la más susceptible la Yorkshire (Sutherland *et al*, 2006).

La respuesta al estrés está controlada por el sistema nervioso central (SNC) y la coordinación que éste ejerce sobre los tres sistemas encargados de mantener la homeostasis del organismo, el sistema nervioso autónomo (SNA), el endócrino y el inmunológico. Se ha propuesto que la modulación fisiológica de estos sistemas por estímulos ambientales es un mecanismo que favorece la adaptación de las crías luego del parto. Esta adaptación puede ser afectada cuando estos estímulos exceden el rango de tolerancia o no concuerdan con las expectativas del animal que lo recibe, produciéndose un desbalance en el SI.

El SNC es un efector de la respuesta al estrés. La exposición del organismo a condiciones adversas hace que el hipotálamo sintetice hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual induce la secreción de la hormona adrenocorticotrofa (ACTH) por la hipófisis y el resultado final es la liberación de GC. El SNA en su división simpática es otro efector de la respuesta al estrés, generando la liberación de catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) al torrente sanguíneo.

Las células que participan en los mecanismos de defensa, los LB, LT, macrófagos y neutrófilos presentan receptores para los GC y las catecolaminas, por lo tanto regulan el funcionamiento del SI (Gómez González y Escobar, 2006).

El sistema inmune se comunica entre sí y con los otros sistemas a través de mediadores solubles denominados citoquinas. Hay citoquinas de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa. Las poblaciones de Th son los encargados de coordinar las diferentes respuestas inmunes. Estas células se clasifican en: Th1, Th2 y Th17, según el perfil de citoquinas que secretan. Los linfocitos Th1 que colaboran con la inmunidad celular, producen fundamentalmente IL-12, IL-2 e IFN- $\gamma$ . Los Th2, que modulan la producción de las diferentes clases de Igs secretan fundamentalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13. Mientras que los Th17 que relacionan la inmunidad innata con la adaptativa y favorecen las respuestas inflamatorias, secretan fundamentalmente IL-17 (Tizard, 2009).

Muchas de estas citoquinas son moduladas por los GC. El mecanismo de acción de los GC y de las catecolaminas sobre el perfil de citoquinas Th1/Th2 ha sido poco descrito y se sabe que inducen un desviación de los linfocitos Th1 hacia Th2 porque disminuyen la síntesis de IL-12, la cual tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  y aumenta la síntesis de IL-10 (Klinger *et al*, 2006).

Por lo anteriormente expuesto, es ya bien conocido que la alta competitividad de los mercados y la búsqueda de una mayor eficiencia económica conducen a la implementación de nuevas técnicas de manejo productivo, las cuales afectan la integridad del animal sometiéndolo a situaciones extremas de adaptación que aumentan la vulnerabilidad a las enfermedades. En los últimos años, la disminución de la duración del período de lactancia en porcinos ha sido poco caracterizada y se encuentra poco dilucidado el efecto que produce sobre el sistema inmune porcino. De allí la importancia de estudiar este proceso en sistemas de producción porcina de alta rentabilidad tal como el utilizado en este trabajo de tesis.

## Hipótesis y Objetivos

---

## Hipótesis

---

El destete temprano en sistemas de cría intensiva afecta el desarrollo de los mecanismos de defensa innatos y adaptativos de los lechones.

## Objetivo general

---

Evaluar la inmunidad humoral y celular en lechones tempranamente destetados en un sistema de cría intensiva.

## Objetivo específico

---

1) Determinar la concentración de inmunoglobulinas en calostro de cerdas vacunadas y no vacunadas durante las estaciones de verano e invierno.

2) Evaluar en lechones lactantes (12 días de edad) y destetados (21 días de edad) hijos de madres vacunadas y no vacunadas durante las estaciones de verano e invierno, los siguientes parámetros:

- ◆ Leucocitos totales.
- ◆ Fórmula leucocitaria y relación N/L.
- ◆ Cortisol plasmático.
- ◆ Proteínas plasmáticas totales.
- ◆ IgG e IgA plasmáticas.
- ◆ Estimulación linfocitaria frente a Con-A.

## Materiales y Métodos

## 1. Establecimiento

El presente trabajo se realizó en un establecimiento de cría intensiva porcina de la localidad de Santa Eufemia (Córdoba), en el cual los animales fueron criados bajo galpón con luz, temperatura ambiental, manejo sanitario controlado y con igual régimen de alimentación.

El establecimiento es un criadero modelo que tiene aprox. 1.200 madres con un nivel promedio de 2,55 pariciones por cerda al año. Está dividido en 3 sitios, los cuales se encuentran separados por más de un kilómetro de distancia uno del otro, por razones de bioseguridad. Las hembras paren en un ambiente de temperatura regulada, cercana a los 18 °C y los lechones recién nacidos reciben la temperatura que necesitan, 28 °C, gracias a lámparas especiales. Luego del destete los lechones son trasladados al sitio 2. Finalmente, los animales llegan al Sitio 3, el de engorde, donde permanecen desde los 68 a los 168 días de vida.

Como medida profiláctica, en el último tercio de la gestación, todas las cerdas se vacunan con una vacuna antibacteriana (incluye preferentemente cepas de *Escherichia coli* extraídas de lechones del mismo establecimiento que presentan diarrea).

## 2. Animales

El estudio se llevó a cabo en cerdas preñadas multíparas, 5 de ellas vacunadas y 5 no vacunadas y en sus lechones (5 por camada, elegidos al azar). Todos los animales híbridos de base Landrace x Large White.

De esta manera, quedaron conformados los siguientes grupos de animales:

- Cerdas vacunadas (CV)
- Cerdas no vacunadas (CNV)
- Lechones hijos de cerdas vacunadas (LV)
- Lechones hijos de cerdas no vacunadas (LNV).

Los lechones fueron destetados a los 14 días de vida. El estudio se realizó en las estaciones de verano e invierno.

### 3. Diseño experimental

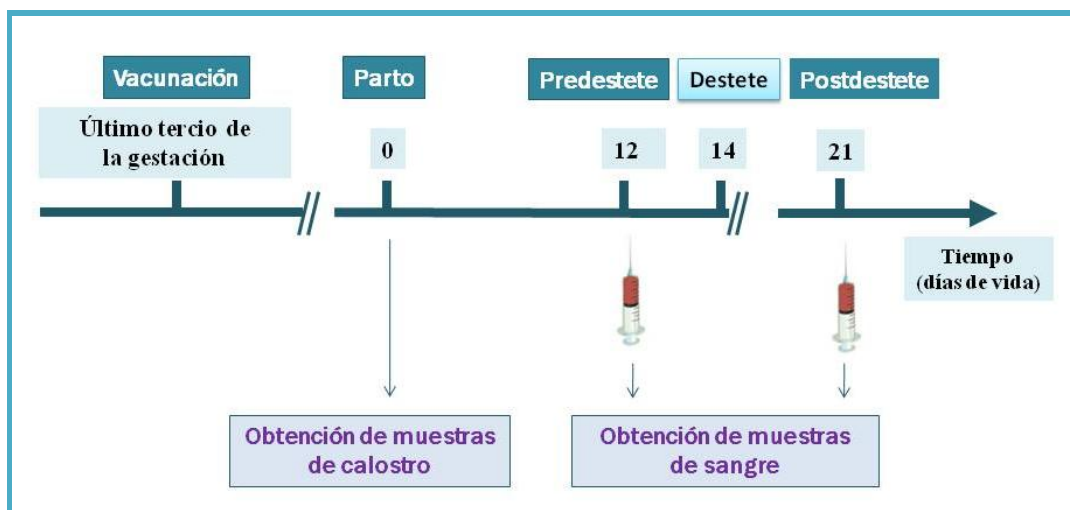


Figura 8: Diseño experimental desarrollado en este trabajo.

*Para cumplir el objetivo específico 1 las muestras y técnicas fueron:*

### 4. Muestras de calostro

A todas las cerdas se les extrajo calostro antes o durante el momento del parto y no más allá de 12 hs de producido el mismo. Se recolectaron muestras de 2 o más pezones en forma manual, previa higiene del pezón. Las muestras se trasladaron de manera refrigerada hasta el laboratorio de la universidad.



En la Figura 9 se distingue la capa lipídica del calostro. Tal como está descrito en la bibliografía, el calostro tiene un alto contenido de lípidos (Wagstrom *et al*, 2000; Salmón, 2002; Rooke and Bland, 2002; Lin *et al*, 2009), lo cual determinó que se realice el diseño y la aplicación de distintos protocolos para separarlos.



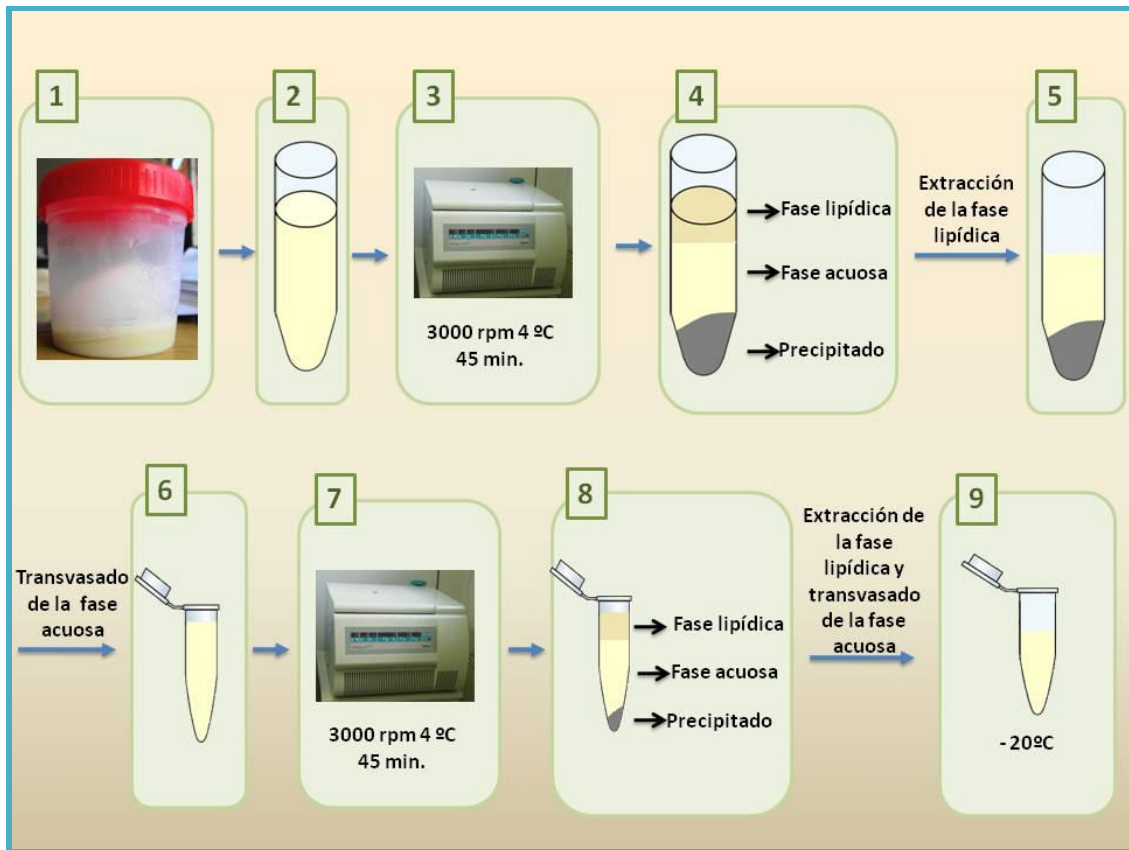
**Figura 9:** Fotografía de un recipiente con calostro porcino. La flecha señala la capa lipídica presente en esta secreción.

---

#### 4.1 Separación de suero de calostro

---

Se estandarizó la técnica para separar suero de calostro, tomando como base el protocolo descrito por Svendsen *et al* (2005). El calostro se colocó en tubos cónicos graduados de 15 ml y se los centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 45 min. Se obtuvieron tres fases diferentes: una superior que contenía la fracción lipídica, una capa intermedia con la fase acuosa conteniendo las Igs y el pellet o precipitado consistente en los elementos celulares del calostro. Se removió la capa de grasa de la parte superior. Posteriormente, se colocó la fase acuosa en tubos eppendorf y se procedió a la clarificación del suero por medio de una segunda centrifugación a 18.000 rpm a 4°C durante 90 min. Se obtuvieron las tres fases. Se descartó la fase lipídica y se extrajo la fase acuosa o suero y se lo conservó a -20 °C hasta su utilización (Figura 10).



**Figura 10:** Esquema representativo de la separación de suero de calostro porcino desarrollada en el laboratorio.

## 5. Técnica en suero de calostro

### 5.1 Cuantificación de inmunoglobulinas

#### 5.1.1 Cuantificación de IgG total

En suero de calostro se determinaron las concentraciones de IgG porcinas por ELISA utilizando un kit comercial Pig IgG Quantitative ELISA (Bethyl Laboratories Inc.USA). Independientemente de que en porcinos se han descrito seis subclases de IgG, no pueden ser separadas bioquímicamente y los anticuerpos monoclonales a menudo las reconocen como si fueran una sola (Butler et al, 2008).

Las concentraciones de la IgG en dichas muestras están en el orden de los miligramos y para cuantificarlas se utilizó un ELISA de alta sensibilidad que

determina las concentraciones en nanogramos. Por lo tanto, en este trabajo de tesis se estandarizaron las diluciones óptimas para las diferentes muestras, determinándose así una dilución de 1/100000 para el suero de calostro\*.

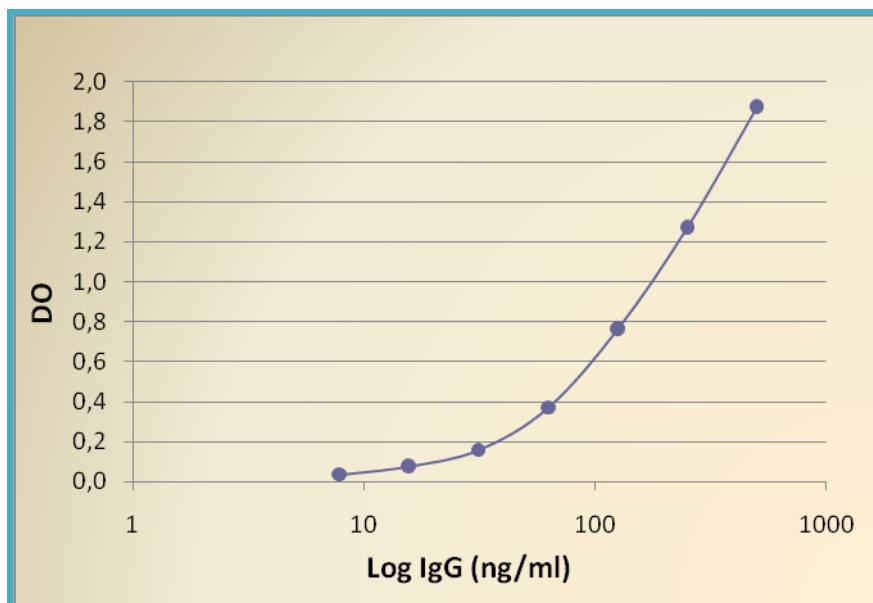
*Procedimiento:*

1. En cada pocillo de la policubeta, se colocaron 100 µl del anticuerpo de captura anti IgG porcina (Goat anti-Pig IgG; 1 mg/ml) diluido 1/100 en Buffer de captura (Carbonato bicarbonato 0,05 M, pH 9.6).
2. Se incubó la placa 60 min. a temperatura ambiente (TA).
3. Se lavó 3 veces la placa con solución de lavado (Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, Tween 20 0,05%, pH 8).
4. Se añadieron 200 µl de solución de bloqueo (Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, BSA 1%, pH 8).
5. Se incubó la placa 30 min. a TA.
6. Se lavó nuevamente 3 veces.
7. Se añadieron 100 µl de muestra diluída en diluyente de muestra (Tris 50 mM, NaCl 0,14, 1% BSA, Tween 20 0,05%, pH 8). Cada muestra se colocó por separado.
8. Se incubó 60 min. a TA. Se lavó 5 veces. Se colocaron 100 µl del anticuerpo marcado (Goat anti-Pig IgG-HRP conjugate) diluído 1/100.000 en diluyente de muestra.
9. Se incubó 60 min.
10. Se lavó 5 veces.
11. Se añadió 100 µl de la solución sustrato TMB a cada pocillo.

\*Las diluciones de calostro se realizaron de acuerdo a las concentraciones esperadas de IgG en esta secreción de manera que se encuentren dentro del rango de concentración de los estándares.

12. Se incubó la placa por 15 min. en oscuridad a TA.
13. Se agregaron 100  $\mu$ l de la solución de “stop” (ácido sulfúrico 2 M) a cada pocillo.
14. Dentro de los 30 min. posteriores se procedió a la lectura de la densidad óptica en un lector de ELISA Labsystems Multiskan MS a 450 nm.

Se consideraron las DO que presentaban una diferencia menor al 10% entre los duplicados. Se calculó el promedio. Una vez realizado el ELISA de acuerdo al protocolo desarrollado anteriormente se calcularon las concentraciones de IgG. Para ello se construyó una curva de calibración de acuerdo a los estándares entre 7,8 y 500 ng/ml de IgG, tal como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11:** Curva estándar de la concentración de IgG.

Una vez obtenida la curva estándar, se extrapolaron las DO de las muestras y se expresaron en mg/ml.

#### 5.4.2 Cuantificación de IgA total

Se realizó por la técnica de ELISA, utilizando un kit comercial Fig IgA Quantitative ELISA (Bethyl Laboratories Inc.USA). Se procedió de igual manera que para la cuantificación de IgG en calostro, modificando la dilución de la muestra de calostro a 1:50.000, dado que esta inmunoglobulina está en menor concentración, tanto en suero como en calostro. La curva de calibración de acuerdo a los estándares se encontró entre 15,62 y 1000 ng/ml de IgA, tal como se observa en la Figura 12.

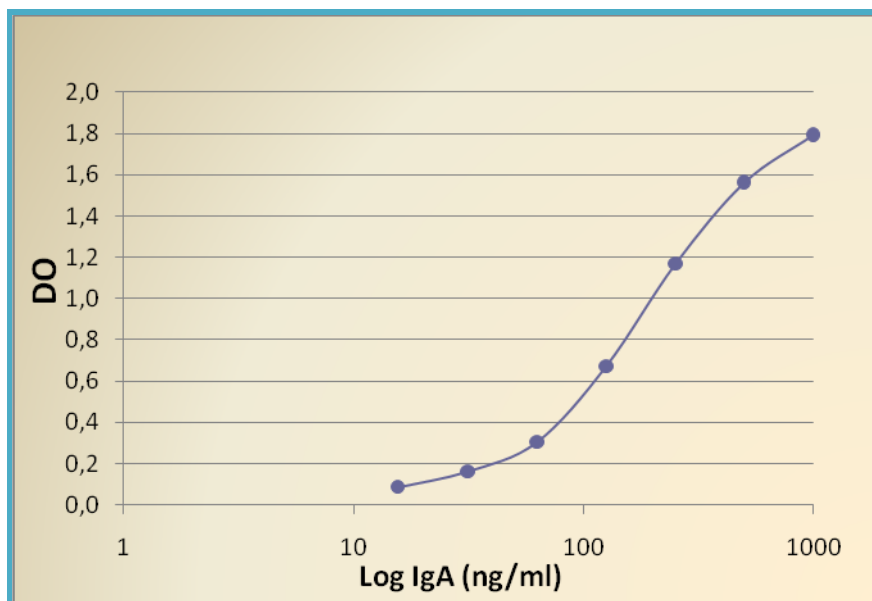


Figura 12: Curva estándar de la concentración de IgA.

*Para cumplir el objetivo específico 2 las muestras y técnicas fueron.*

### 6. Muestras de sangre de lechones

A todos los lechones se les extrajo sangre heparinizada por punción de la vena cava craneal 48 hs previas al destete (12 días de edad) y a los 7 días posteriores al destete (21 días de edad). Las muestras se trasladaron refrigeradas hasta el laboratorio. Se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 min. para obtener plasma sanguíneo y

posteriormente determinar la concentración de cortisol, proteínas totales e Igs. La sangre entera se utilizó para recuento de glóbulos blancos totales, determinación de la fórmula leucocitaria y proliferación linfocitaria.

## 7. Técnicas en sangre entera y en plasma sanguíneo

### 7.1 Recuento de leucocitos totales

Se realizó una dilución 1/20 de la sangre en líquido de Turk (Ácido Acético al 3%). Posteriormente se procedió al recuento de leucocitos totales microscópicamente en cámara hemocitométrica de Neubauer.

### 7.2 Determinación de la fórmula leucocitaria y la relación N/L

Se realizó la fórmula leucocitaria en extendidos sanguíneos, coloreados con May Grünwald-Giemsa. A partir de los valores porcentuales, se obtuvo la relación Neutrófilo/Linfocito (N/L).

### 7.3 Cuantificación de cortisol plasmático

Se midieron los niveles plasmáticos de cortisol por RIA, utilizando un kit comercial (Cortisol RIA DSL-2100, Diagnostic Systems Laboratories, Inc). Se realizó la cuantificación, siguiendo el protocolo provisto en el equipo comercial que consiste en un ensayo competitivo entre un antígeno radiactivo y otro no radiactivo por una cantidad fija de lugares de unión al anticuerpo. La cantidad de antígeno marcado con I-125 que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de antígeno no marcado presente. La separación del antígeno libre y el unido al

anticuerpo se realizó mediante decantación en los tubos recubiertos con anticuerpo. Los niveles de cortisol en cada una de las muestras se determinaron utilizando un contador gama Wizard.

---

#### 7.4 Cuantificación de proteínas totales plasmáticas

---

Se cuantificaron proteínas en plasma sanguíneo mediante la técnica de Bradford (1976). Para la curva de calibración se utilizó como standard una solución de seroalbúmina bovina (BSA) en una concentración de 1 mg/ml. Se realizaron diluciones para lograr concentraciones de 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0, mg/ml de proteína. Se realizó el ensayo por triplicado. Se colocó 2,5  $\mu$ l de cada estándar y de cada muestra, 50  $\mu$ l de NaOH, 47,5  $\mu$ l de agua destilada y 1 ml de reactivo de Bradford\*, luego de 20 min. a temperatura ambiente, se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 560 nm. Se construyó la curva patrón. Las concentraciones de proteínas en cada muestra se calcularon extrapolando las DO obtenidas con respecto a la curva patrón.

\* Reactivo de Bradford: Se disolvieron 100 mg de Azul Brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol. Se agregó 100 ml de ácido fosfórico y se lo llevó a 1 litro con agua destilada. Se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se filtró y se guardó en frascos color caramelo.

---

#### 7.5 Cuantificación de inmunoglobulinas plasmáticas

---

##### 7.5.1 Cuantificación de IgG total

La determinación en plasma sanguíneo de IgG total se realizó tal como fue descrito anteriormente para suero de calostro, variando solamente la dilución de la muestra, la cual fue de 1:60.000 para esta secreción.

### 7.5.2 Cuantificación de IgA total

La cuantificación de IgA en plasma sanguíneo se realizó siguiendo la misma metodología que la empleada para suero de calostro.

---

## 7.6 Estimulación *in vitro* de linfocitos porcinos con Con A.

---

### 7.6.1 Separación de linfocitos periféricos por gradiente de densidad

En tubos cónicos estériles de 15 ml se colocaron 5 ml de Histopaque® y 5 ml de sangre heparinizada de manera que quedaran formadas dos fases. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente a 1500 rpm 10 min. De esta manera, los eritrocitos y los granulocitos pasan a través del Histopaque® y las células mononucleares permanecen sobre él, formando un halo opaco. Después de la centrifugación se aspiró cuidadosamente con una pipeta Pasteur el halo opaco (monocitos, células NK y linfocitos) en tubos cónicos de 15 ml. El pellet se lavó tres veces con RPMI 1640 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 50 mM de 2-mercaptoetanol (2-ME), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (RPMI-1640 completo) durante 5 min. en cada oportunidad. En el caso de que hubiera contaminación con glóbulos rojos se procedió a lissarlos previo a la resuspensión en el medio, colocando 500 µl de agua helada en un tubo cónico conteniendo en pellet de células mononucleares. Se dejó actuar 5 min. y se llevó a 10 ml con RPMI 1640-10 completo. Se centrifugó y se lavó con RPMI 1640 completo.



### 7.6.2 Determinación de la viabilidad celular por exclusión con azul de Tripán

Luego de la separación de linfocitos con Histopaque®, se determinó la viabilidad celular por el método de exclusión Azul de Tripán (gota a gota). Este método se basa en la capacidad que poseen las células vivas con membranas celulares intactas de excluir Azul de Tripán, una célula viable muestra el citoplasma refringente, mientras que una célula no viable, al tener la membrana alterada, es penetrada por el colorante y su citoplasma se tiñe de azul.

Para realizar la técnica se mezcló una parte del colorante 0,4% con una parte de la suspensión celular. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. y luego se contaron las células en cámara de Neubauer las células viables (no coloreadas) y las no viables (coloreadas) hasta alcanzar un total de 100 células. El cálculo del porcentaje de células viables se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Células viables (\%)} = \frac{\text{Número total de cél. viables/ml de alícuota}}{\text{Número total de células/ ml de alícuota}} \times 100$$

Se utilizaron las suspensiones celulares que presentaron más del 80% de células viables. Luego se ajustó la concentración celular a  $1 \cdot 10^6$  cél./ml de RPMI 1640-10 completo con rojo fenol.

### 7.6.3 Estimulación linfocitaria *in vitro* con mitógeno (Con A)

Los linfocitos se cultivaron en policubetas de 96 pocillos de fondo plano por triplicado de acuerdo al siguiente diseño:

#  $1 \times 10^6$  células/ml + 200  $\mu$ l de RPMI-1640 completo

#  $1 \times 10^6$  células/ml + 5  $\mu$ g/ml Con-A + RPMI-1640 completo.

Las concentraciones óptimas del mitógeno se realizaron en base a los resultados obtenidos por Cuello (2007). Las células se incubaron durante 48 horas en estufa a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego se agregó 20 µl (1 µCi) de [<sup>3</sup>H]-TdR en cada pocillo, retornando la policubeta a la estufa de cultivo durante 72 horas. Se cosecharon las células sobre papel de fibra de vidrio tipo Whatmann® utilizando un cosechador de células semiautomático, el cual lisa las células con agua y precipita el ADN sobre el papel de fibra de vidrio, permitiendo que se elimine la [3H]-TdR no incorporada. Los círculos de papel de fibra de vidrio conteniendo el ADN marcado con [<sup>3</sup>H] timidina correspondientes a cada pocillo. Una vez secados en estufa a 37°C, fueron colocados en sendos viales a los que se les agregó 1 ml de líquido de centelleo, agitándola y dejándola reposar 24 horas. Se midió la radioactividad incorporada (cpm) en un contador de centelleo por radiación beta (Margni, 1996).

#### 7.6.4 Determinación del índice de proliferación (IP)

La actividad linfoproliferativa se determinó estableciendo el cociente entre las cuentas por minuto (dpm) de un cultivo estimulado (E) y un cultivo sin estimulación (C), mediante la siguiente fórmula:

$$IP = \frac{\text{cpm E} - \text{cpm C}}{\text{cpm E}}$$

cpm E: cuentas por minuto en cultivos de células estimuladas

cpm C: cuentas por minuto en cultivos de células control (sin estimulación).

IP ≥ a 0,5 se consideraron indicativos de estimulación celular.

## 8. Análisis estadístico

Debido a las características del diseño experimental, los datos fueron analizados utilizando diferentes métodos estadísticos y tamaños de muestra de acuerdo a la variable.

- ✓ **Parámetros hematológicos (n=10) y proliferación celular (n=3):** diseño de tres factores fijos (destete, vacunación y estación).
- ✓ **Proteínas en plasma de lechones (n=8):** diseño de medidas repetidas con 2 factores: destete (medida repetida) y vacunación.
- ✓ **Cortisol (n=8), IgG (n=15) e IgA (n=15) en plasma de lechones:** diseño de medidas repetidas con 3 factores: destete (medida repetida), vacunación y estación respectivamente.
- ✓ **IgG (n=8) e IgA (n=8) en calostro:** diseño de dos factores fijos (vacunación y estación).

Se tomaron dos niveles para factor:

- ✓ **Destete:** predestete y postdestete
- ✓ **Vacunación:** lechones hijos de cerdas vacunadas (LV) y lechones hijos de cerdas no vacunadas (LNV).
- ✓ **Estación:** verano e invierno.

Se realizó ANOVA multifactorial a un nivel de significancia  $p < 0,05$ . Cuando la interacción entre los factores fue significativa se realizaron pruebas a posteriori de Bonferroni. Se trabajó con el programa Statgraphics versión 6.0.

## Resultados y Discusión

---

## 1. Anticuerpos calostrales

### 1.1 Cuantificación de IgG e IgA en calostro

Los resultados obtenidos sobre las concentraciones de IgG e IgA en calostro de CV y CNV están dentro de los esperados para la secreción de la glándula mamaria y no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2). Estos resultados coinciden con los encontrados por Couret *et al* (2009) quienes utilizaron el mismo equipo comercial y no son totalmente coincidentes con los de Svendsen *et al* (2005) (59-109 mg/ml) y Krakowski *et al* (2002) (60 mg/ml). Estas diferencias podrían deberse a que la concentración de Igs en el calostro es altamente variable y depende de múltiples factores, tales como el momento en el que se obtiene la muestra de calostro.

En este trabajo de tesis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la relación IgA/IgG en calostro de cerdas vacunadas y no vacunadas. Esta relación se utiliza para mostrar las proporciones relativas de los dos isotipos de Igs predominantes en calostro. En coincidencia con Salmon *et al* (2009), nuestros resultados muestran que la IgG es el isotipo predominante en calostro porcino. No se observaron variaciones estacionales en las concentraciones de Igs calostrales (datos no mostrados).

**Tabla 2:** Concentraciones de inmunoglobulinas y relación IgA/IgG en calostro.

Animales	IgG <sup>•</sup> (mg/ml)	IgA <sup>•</sup> (mg/ml)	Relación IgA/IgG <sup>••</sup>
CV	39.56 ± 6.89 <sup>a</sup>	6.68 ± 2.19 <sup>a</sup>	0.10-0.27 <sup>a</sup>
CNV	39.79 ± 5.26 <sup>a</sup>	6.09 ± 1.75 <sup>a</sup>	0.10-0.21 <sup>a</sup>

\*Promedio ± desvío estándar. \*\*Rango de concentración. Los datos representan  $\bar{x} \pm ds$  (n=8). Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

## 2. Respuesta inmune innata en lechones lactantes y postdestete

### 2.1 Leucocitos totales y fórmula leucocitaria

En el postdestete se observó, un aumento estadísticamente significativo de los leucocitos totales con neutrofilia, disminución de los linfocitos y de los monocitos, sin modificaciones en los eosinófilos y basófilos (Tabla 3). Además, en el grupo LNV se encontró un aumento no significativo en el porcentaje de los neutrófilos con relación al grupo LV (Figura 13).

Estos resultados podrían corresponderse con un leucograma típico de estrés, sin embargo, no se detectó eosinopenia ni monocitosis. También habría que considerar en este análisis que, luego del destete, los lechones dejan de recibir inmunidad lactogénica, quedando más susceptibles a enfermedades infecciosas. Frente a esta situación, se observó tanto en el grupo LV como en el LNV, un aumento en el porcentaje de neutrófilos, lo cual podría indicar la necesidad de desarrollar una mayor inmunidad innata hasta alcanzar el desarrollo de la inmunidad adaptativa. Este aumento fue mayor en el grupo LNV, aunque no significativamente. Esto revelaría que las medidas profilácticas de manejo del establecimiento a través de la vacunación podrían estar influenciando el sistema inmune de los lechones (Rudine *et al*, 2007).

Cabe señalar que las variaciones en los glóbulos blancos totales y en la fórmula leucocitaria observadas fueron independientes de la estación del año en la cual se tomó la muestra.

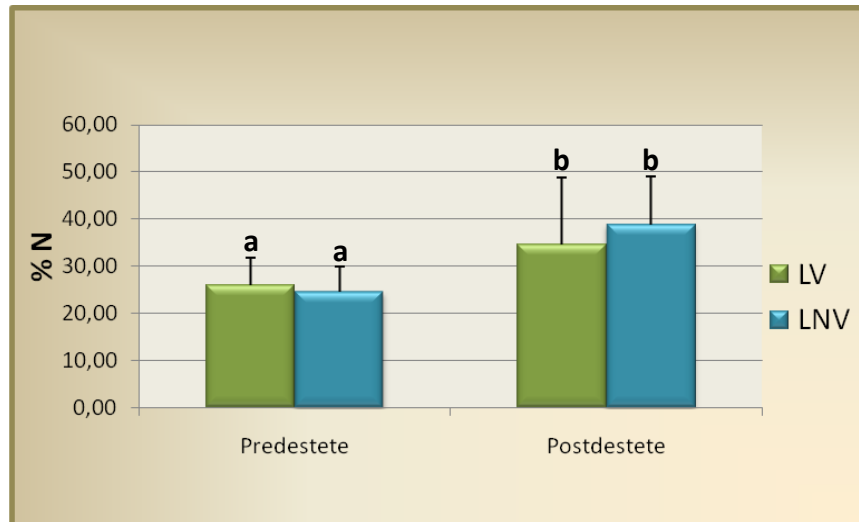
Tabla 3: Leucocitos totales y fórmula leucocitaria de lechones durante el pre y postdestete\*.

Variables Muestreo	Leucocitos/mm <sup>3</sup>	Fórmula leucocitaria				
		% Ne	% Li	% Eo	% Ba	% Mo
<b>Predestete</b>	8796,25 ± 3505,35 <sup>a</sup>	25,25 ± 5,59 <sup>a</sup>	72,47 ± 5,45 <sup>a</sup>	0,80 ± 1,15 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,48 ± 1,77 <sup>a</sup>
<b>Postdestete</b>	17327,5 ± 6228,72 <sup>b</sup>	36,80 ± 12,09 <sup>b</sup>	62,05 ± 12,33 <sup>b</sup>	0,85 ± 1,20 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,45 <sup>b</sup>

Ne: neutrófilos. Li: linfocitos. Eo: eosinófilos. Ba: basófilos. Mo: monocitos

\* Los datos representan  $\bar{x} \pm ds$  (n=40). Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas con un p<0,05.





**Figura 13:** Porcentaje de neutrófilos en LV y en LNV durante el pre y el postdestete. Los datos representan  $\bar{x} \pm ds$  (n=20). Letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

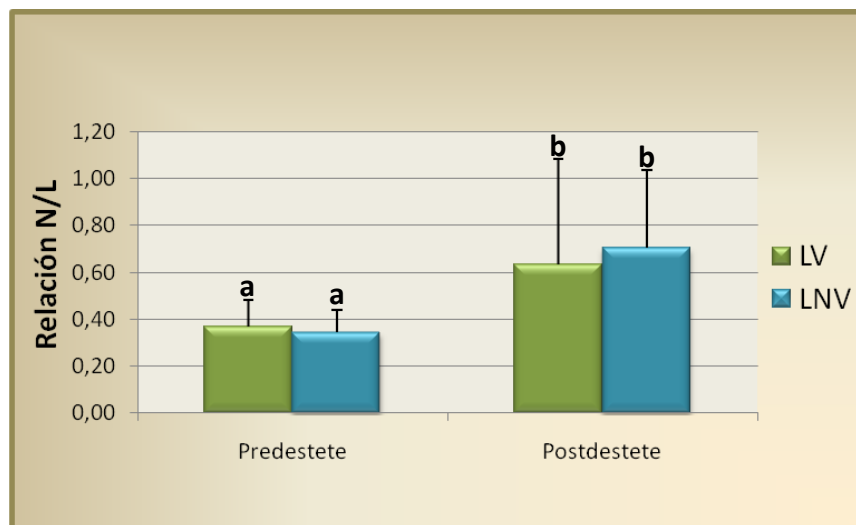
## 2.1 Comparación entre relación N/L y niveles de cortisol

En los lechones a los 7 días luego del destete (21-22 días de edad), se observó un aumento de la relación N/L (Figura 14), con niveles normales de cortisol plasmático (Figura 15). El cortisol y la relación N/L son indicadores hematológicos de estrés y del bienestar animal, sin embargo, no necesariamente se correlacionan entre sí debido a que evalúan estrés a corto y a largo plazo, respectivamente (Puppe, 1997). En nuestro diseño experimental, la relación N/L sería el parámetro más confiable para medir estrés a largo plazo. El incremento en la relación N/L observado en los lechones en el postdestete podría ser atribuido a diferentes causas: separación de la madre, competencia por el espacio con lechones de otras camadas, cambio de alimentación, alojamiento en un nuevo sitio, son situaciones que se acumulan al estrés producido sobre el lechón en el momento del destete, más aun siendo éste muy temprano.

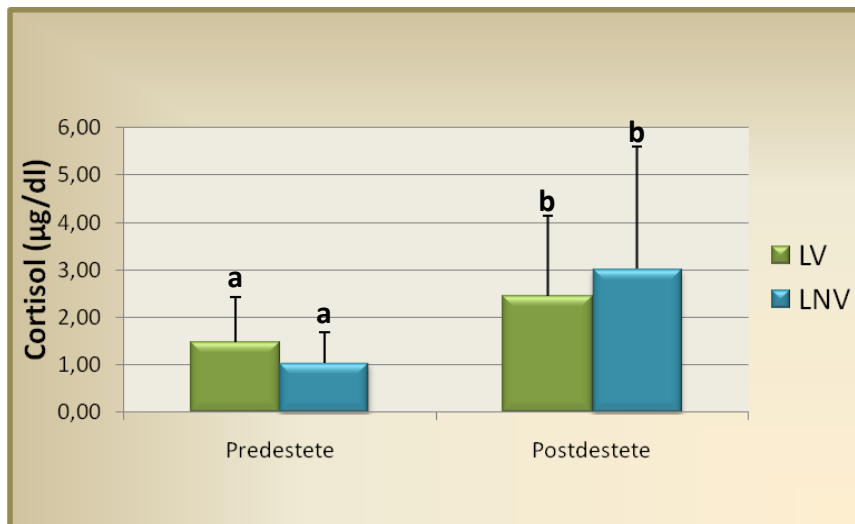
Se podría decir que en los tiempos medidos, las concentraciones de la hormona no son indicativas de estrés. Cabe señalar que de acuerdo a estudios previos en el día del destete en nuestro grupo de trabajo (datos no mostrados) se encontraron

concentraciones elevadas, dejando en evidencia que es un marcador a corto plazo. Además, como los valores encontrados están dentro del rango normal, podríamos decir que las características del establecimiento intensivo en estudio, (bajo galpón y con temperatura controlada) estarían contrarrestando el impacto de la temperatura ambiente como estresor y por ende favoreciendo el bienestar del animal. Estos resultados son coincidentes en parte con lo descripto por Becker *et al* (1995), quien encontró valores de cortisol no indicativos de estrés en lechones alojados en un ambiente de calor constante.

El comportamiento de las dos variables fue independiente de la estación del año en la cual se realizaron las determinaciones.



**Figura 14:** Relación N/L en LV y en LNV durante el pre y el postdestete. Los datos representan  $\bar{x} \pm ds$  (n=20). Letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

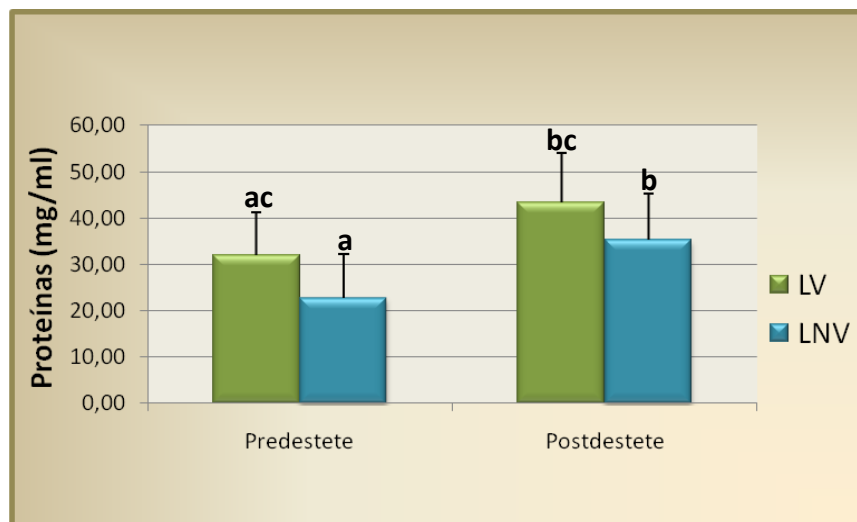


**Figura 15:** Niveles de cortisol plasmáticos en LV y en LNV durante el pre y el postdestete. Los datos representan  $\bar{x} \pm ds$  (n=16). Letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

### 3. Respuesta inmune adaptativa humoral en lechones postdestete

#### 3.1 Cuantificación de proteínas plasmáticas totales

Durante el postdestete se detectó un aumento significativo de las proteínas plasmáticas en la estación de invierno (Figura 16). Esta variación en el postdestete podría ser atribuida, entre otras causas, al cambio de alimentación. A pesar de las distintas variaciones encontradas con significación estadística entre los grupos estudiados, los valores se encontraron dentro del rango normal para la edad.



**Figura 16:** Proteínas totales (mg/ml) en LV y en LNV durante el pre y el postdestete en la estación de invierno. Los datos representan  $\bar{x} \pm ds$  (n=8). Letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

---

### 3.2 Cuantificación de IgG e IgA en plasma de lechones

---

Las concentraciones de IgG plasmática total en los lechones durante la lactación, no muestran diferencias significativas entre los grupos estudiados (Figura 17). Además en los LV, no se observaron diferencias en las concentraciones de IgG entre el predestete y el postdestete. Estos resultados coinciden con los de Tuchscherer *et al* (2002), quienes no observaron modificaciones en los niveles de IgG sérica en el período neonatal ni alteraciones en la captación de macromoléculas por parte del intestino delgado.

A los siete días postdestete, los niveles de esta inmunoglobulina están significativamente disminuidos en el grupo de LNV ( $p < 0,05$ ). Cabe señalar que en el momento en el que se tomaron las muestras (12 y 21 días de vida), los lechones estaban atravesando el “período de ventana inmunológica”, durante el cual disminuyen los anticuerpos aportados por la inmunidad maternal y todavía no comenzó la inmunidad activa (Figura 7).

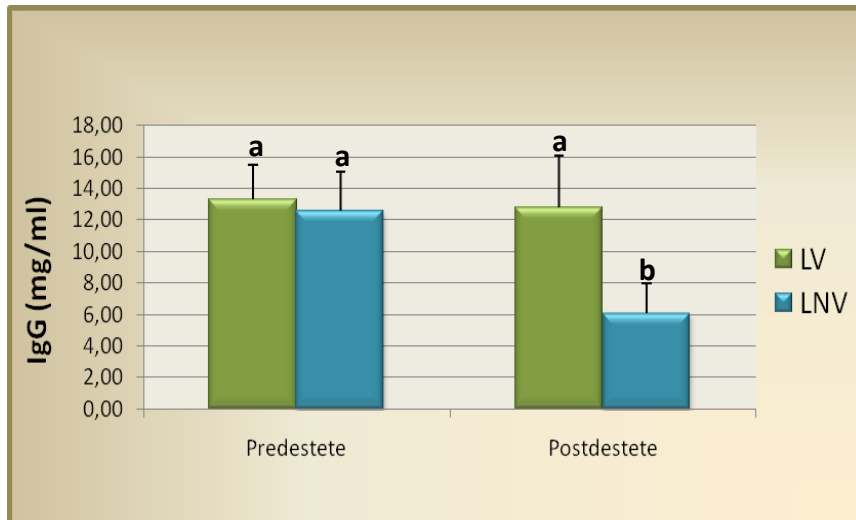
La disminución en los niveles de IgG plasmática en los lechones hijos de madres no vacunadas depende de numerosos factores tales como la cantidad de calostro ingerido, la concentración de IgG en calostro, la adecuada captación de IgG del calostro antes del cierre intestinal, el número de la camada, el peso al nacimiento, entre otros, lo cual coincide con Rooke and Bland (2002), Rooke *et al* (2003), Butler *et al* (2008) y Butler *et al* (2009), quienes indican que la concentración de IgG no estaría directamente relacionada al estrés.

Los valores de IgG calostrales entre CV y CNV, no mostraron diferencias (Tabla2). Sin embargo, es válido señalar que además de la IgG, el calostro contiene otros compuestos no inmunológicos bioactivos cuyas concentraciones cambian rápidamente en las primeras 24 horas después del parto, que también se transfieren

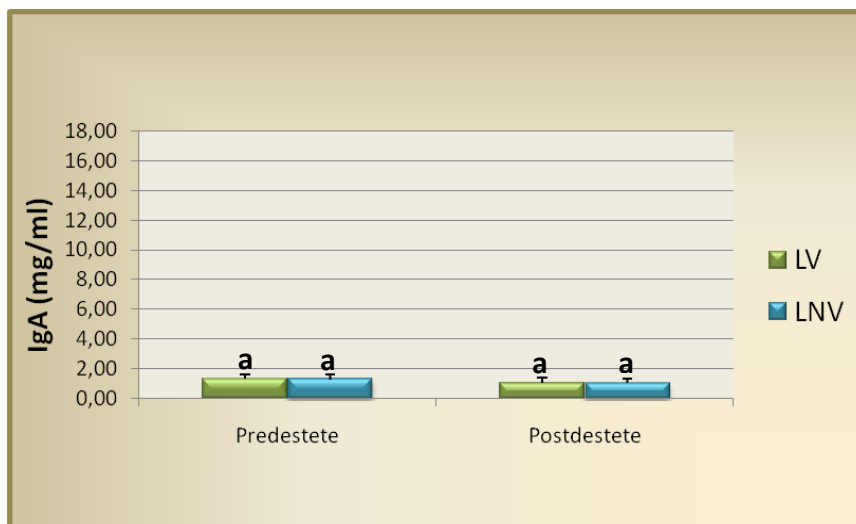
pasivamente e influyen los niveles de anticuerpos encontrados en las crías (Rooke and Bland, 2002; Salmon *et al*, 2009).

Analizando estos resultados en conjunto podríamos decir que la permanencia de anticuerpos de isotipo IgG en el suero de lechones provenientes de cerdas vacunadas podría en parte ser explicada por la vacunación de las cerdas que se realiza en este criadero como práctica profiláctica. Salmon *et al* (2009) informó que este tipo de estrategia, común en las explotaciones intensivas porcinas, favorecería la transferencia pasiva de anticuerpos de la madre a la cría.

En relación a las concentraciones de IgA plasmáticas no se observaron diferencias con respecto al destete ni a la vacunación entre LV y LNV (Figura 18). Durante la lactación, la IgA recibida pasivamente permanece en el intestino, mientras que en el postdestete, recién comienza la síntesis activa de esta inmunoglobulina. Por lo tanto, los niveles de esta inmunoglobulina en el plasma coinciden con los esperados para la edad de los lechones.



**Figura 17:** IgG (mg/ml) en plasma de LV y en LNV durante el pre y el postdestete. Los datos representan  $\bar{x} \pm ds$  (n=30). Letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .



**Figura 18:** IgA (mg/ml) en plasma de LV y en LNV durante el pre y el postdestete. Los datos representan  $\bar{x} \pm ds$  (n=30). Letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

## 4. Respuesta inmune adaptativa celular en lechones lactantes y postdestete

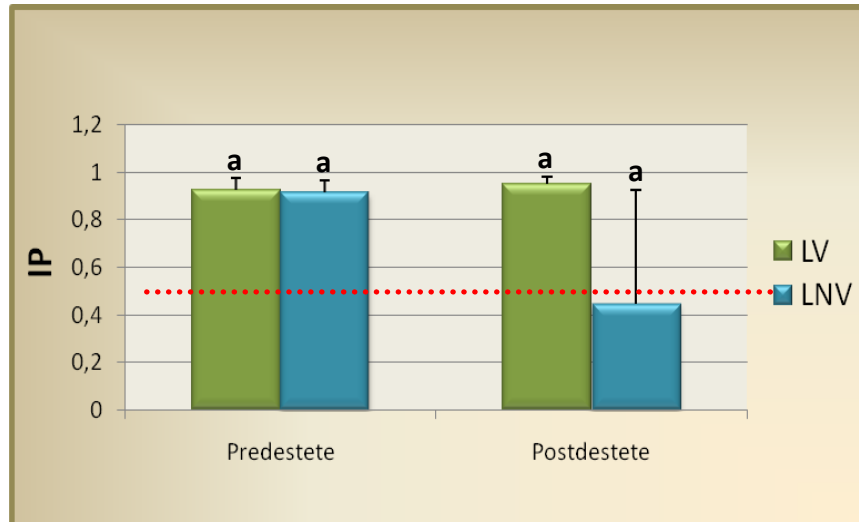
### 4.1 Estimulación *in vitro* de linfocitos porcinos con Con A

La proliferación linfocitaria inducida por mitógenos *in vitro* fue utilizada como un indicador de la función inmune celular. La Figura 19, muestra que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en la respuesta a la estimulación con Con A entre los grupos de animales estudiados. No obstante, durante el postdestete en los lechones hijos de madres no vacunadas se observó una disminución en el valor promedio del IP, aunque con un alto desvío estándar. Este resultado estaría mostrando que la respuesta al mitógeno en ese grupo es altamente variable y depende de numerosos factores.

De acuerdo a las investigaciones llevadas a cabo por diferentes autores, Tuchscherer *et al* (1998), Tuchscherer *et al* (2002) y Rudine *et al* (2007), condiciones inherentes al manejo, como son la reorganización social de la camada, el cambio de la alimentación, asociados en este caso a un destete temprano, son situaciones estresantes que podrían afectar los resultados obtenidos al determinar la respuesta inmune celular en los lechones. En este sentido, considerando al destete como un estresor, la disminución observada en la respuesta proliferativa de los LT en los LNV en el postdestete podría explicarse por una desviación de la inmunidad mediada por células hacia un perfil Th2. En el caso de los LV, la vacunación profiláctica de las madres estaría contrarrestando en parte, el efecto estresor del destete y mantendría el perfil Th1 con liberación de IFN- $\gamma$  e IL2, siendo esta última citoquina responsable de la proliferación linfocitaria *in vitro*. Otra posible explicación para la disminución en el IP en los LNV, es que hay un aumento en la proliferación espontánea (sin mitógeno)



que podría estar asociada a una falla o alteración en los LT reguladores (Couret *et al*, 2009).



**Figura 19:** Índice de proliferación en lechones LN y en LNV durante el pre y el postdestete. Los datos representan  $\bar{x} \pm ds$  (n=6). Letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .  $IP \geq 0,5$ : indicador de proliferación celular.

Conclusiones

---

✓ En sistemas de producción porcina intensiva con alta rentabilidad, el destete temprano genera una situación estresante en los lechones que activa mecanismos innatos como primera estrategia de defensa.

✓ El destete temprano disminuye la inmunidad humoral sistémica y no modifica la respuesta funcional linfocitaria en las estaciones estudiadas. Por su parte, la vacunación profiláctica de las cerdas gestantes ayuda a mantener la inmunidad humoral en los lechones hasta el desarrollo de la inmunidad activa, atenuando el efecto del destete.

## Bibliografia

---

- ◆ **Ashworth G. 2006.** Niveles de triyodotironina y progesterona en invierno y verano y su relación con el índice de concepción en cerdas bajo cría intensiva al aire libre. *Tesis de Maestría. UNRC.*
  
- ◆ **Becker B., Misfeldt M. 1995.** Effects of constant and cycling hot environments on mitogen-stimulated proliferation of peripheral blood lymphocytes from sows and litters. *Journal of Thermal Biology 20:485-488.*
  
- ◆ **Benavides A., Almansa J., Calderón A., Torres O., Delgado N., García G. 2005.** Caracterización de la inmunidad pasiva natural en granjas porcícolas y evaluación de un sistema para incrementar la transferencia de anticuerpos. *Nova 3:30-39.*
  
- ◆ **Bradford, M. 1976.** The Bradford assay. *Analytical Biochemistry. 72: 248-254.*
  
- ◆ **Butler J., Lager K., Splichal I., Francis D., Kacskovics I., Sinkora M., Wertz N., Sun J., Zhao Y., Brown W., DeWald R., Dierks S., Muyltermans S. Lunney J., McCray P., Rogers C., Welsh M., Navarro P., Klobasa F., Habe F., Ramsoondar J. 2009.** The piglet as a model for B cell and immune system development. *Development and Comparative Immunology 128:147-170.*
  
- ◆ **Butler J., Sun J., Wertz N., Sinkora M. 2006.** Antibody repertoire development in swine. *Developmental and Comparative Immunology 30: 199-221.*

- ◆ Butler J., Zhao Y., Sinkora M., Wertz N., Kacskovics I. 2008. Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Development and Comparative Immunology* 33:121-333.
- ◆ Cervenak J., Kacskovics I. 2009. The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG en livestock animals. *Veterinary immunology and immunopatology* 128:171-177.
- ◆ Couret D., Jamin A., Kuntz-Simon G., Prunier A., Merlot E. 2009. Maternal stress during late gestation has moderate but long lasting effects on the immune system of the piglets. *Veterinary immunology and immunopatology* 131:17-24.
- ◆ Cuello M. 2007. Inmunomodulación dependiente de progesterona sobre poblaciones linfocitarias en las primeras etapas de la gestación en porcinos. *Tesis de doctorado. UNRC.*
- ◆ Gerner W., Kaser T., Saalmuller A. 2009. Porcine T lymphocytes and NK cells-An update. *Developmental and Comparative Immunology* 33:310-320.
- ◆ Gómez González B., Escobar A. 2006. Estrés y sistema inmune. *Revista Mexicana de Neurociencia* 7:30-38.
- ◆ Juul-Madsen H., Jensen K., Nielsen J., Damgaard B. 2010. Ontogeny and characterization of blood leukocyte subsets and serum proteins in piglets before and after weaning. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 133:95-108.

- ◆ Klinger J., Herrera J., Díaz M., Jhann A., Ávila G., Tobar C. 2005. La psiconeuroinmunología en el proceso salud enfermedad. *Colombia Médica* 36:120-129.
- ◆ Klobasa F., Werhahn E., Habe F. 1991. Studies on the absorption of colostral immunoglobulins in newborn piglets. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 104:223-227.
- ◆ Krakowski L., Krzyzanowski J., Wrona Z., Kostro K., Siwicki A. 2002. The influence of nonspecific immunostimulation of pregnant sows on the immunological value of colostrums. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87:89-95.
- ◆ Lallés J., Bosi P., Smidt H., Stokes C. 2007. Weaning, a challenge to gut physiologists. *Livestock Science* 108:82-93.
- ◆ Levast B., de Monte M., Chevaleyre C., Melo S., Berri M., Mangin F., Zanello G., Lantier I., Salmon H., Meurens F. 2010. Ultra-early weaning in piglets results in low serum IgA concentration and IL 17 mRNA expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 137:261-268.
- ◆ Li Y., Qiu X., Li H., Zhang Q. 2007. Adhesive Patterns of Escherichia coli F4 in Piglets of Three Breeds. *Journal of Genetics and Genomics (Formerly Acta Genetica Sinica)* 34: 591-599.
- ◆ Lin C., Mahan D., Wu G., Kim S. 2009. Protein digestibility of porcine by neonatal pigs. *Livestock Production Science* 121:182-186.

- ◆ **Margni R. 1996.** Inmunología e Inmunoquímica. 5° edición. *Ed Médica Panamericana.*
  
- ◆ **Merlot E., Couret D., Offen W. 2008.** Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity 22:42-51.*
  
- ◆ **Morilla González A. 1991.** Control inmunológico de la diarrea en cerdos gestantes. *Ciencia Veterinaria 5:89-118.*
  
- ◆ **Pinelli-Saavedra A., Calderón de la Barca A. M., Hernández J., Valenzuela R. and Scaife J. R. 2008.** Effect of supplementing sow's feed with  $\alpha$ -tocopherol acetate and vitamin C on transfer of  $\alpha$ -tocopherol to piglet tissues, colostrums and milk. Aspects of immune status of piglets. *Veterinary Science 85: 92-100.*
  
- ◆ **Puppe B., Tuchscherer M., Tuchscherer A. 1997.** The effect of housing conditions and social environment immediately alter weaning on the agonistic behaviour, neutrophil/lymphocyte ratio, and plasma glucose level in pigs. *Livestock Production Science 48:157-164.*
  
- ◆ **Roitt. 2008.** Inmunología. Fundamentos. 11° Edición. *Editorial Panamericana.*
  
- ◆ **Rooke J., Carranca C., Bland I., Sinclair A., Ewen M., Bland V., Edwards S. 2003.** Relationships between passive absorption of immunoglobulin G by the piglet and



plasma concentrations of immunoglobulin G at weaning. *Livestock Production Science* 81: 223-234.

- ◆ **Rooke J., Bland I. 2002.** The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livestock Production Science* 78: 13-23.
  
- ◆ **Rothkotter H. 2009.** Anatomical particularities of the porcine immune system. A physician's view. *Developmental and Comparative Immunology* 33:267-172.
  
- ◆ **Rudine A., Sutherland M., Hulbert L., Morrow L., McGlone J. 2007.** Diverse production system and social status effects on pig immunity and behavior. *Livestock Science* 111:86-95.
  
- ◆ **Salmon H. 2002.** Mammary gland immunology and neonate protection in pig. Homing of lymphocyte into the MG. *Advances in Experimental Medicine Biology* 480:279-286.
  
- ◆ **Salmon H., Berri M., Gerdtz V., Meurens F. 2009.** Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Developmental and Comparative Immunology* 33:384-393.
  
- ◆ **Sutherland M., Niekamp S., Rodriguez-Zas S., Salak-Johnson J. 2006.** Impacts of chronic stress and social status on various physiological and performance measures in pigs of different breeds. *Journal of Animal Science* 84:588-596.

- ◆ **Schnulle P., Hurley W. 2003.** Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 91:227–231.
- ◆ **Sinkora M., Butler J. 2009.** The ontogeny of the porcine immune system. *Developmental and Comparative Immunology* 33:273–283.
- ◆ **Stull C., Kachulis C., Farley J., Koenig G. 1999.** The effect of age teat order on  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, neutrophil-to-lymphocyte ratio, cortisol, and average daily gain in commercial growing pigs. *American Society of Animal Science* 77:70–74.
- ◆ **Svendsen J., Westrom, B., Olsson A. 2005.** Intestinal macromolecular transmission in newborn pigs: implications for management of neonatal pig survival and health. *Livestock Production Science* 97: 183–191.
- ◆ **Tizard I. 2009.** Inmunología veterinaria. 6° Edición. *Editorial Elsevier*.
- ◆ **Trolliet J. 2005.** Productividad numérica de la cerda, factores y componentes que la afectan. *Tesis de Maestría. UNRC*.
- ◆ **Tuchscherer M., Kanitz E., Otten W., Tuchscherer A. 2002.** Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 86:195–203.
- ◆ **Tuchscherer M., Puppe B., Tuchscherer A., Kanitz E. 1998.** Effects of social status after mixing on immune metabolic and endocrine responses in pigs. *Physiology and behavior* 64:353–360.

- ◆ Uenishi H., Shinkai H. 2009. Porcine Toll-like receptors: The front line of pathogen monitoring and possible implications for disease resistance. *Developmental and Comparative Immunology* 33:353-361.
  
- ◆ Uruakpa F., Ismond M., Akobundu E. 2002. Colostrum and its benefits: a review. *Nutrition Research* 22:755-767.
  
- ◆ Wagstrom A., Yoon K., Zimmerman J. 2000. Immune components in porcine secretions. *Viral immunology* 13:383-397.
  
- ◆ [www.senasa.gov.ar/indicadores.php?d=3\\_Indicadores\\_Ganaderia\\_Porcina&in=1](http://www.senasa.gov.ar/indicadores.php?d=3_Indicadores_Ganaderia_Porcina&in=1)