

Perfil inmunológico de los cerdos durante las primeras diez semanas de edad

Dolores González Vega*
Isabel Cisneros Morales*
Marco Antonio Vega López*
Antonio Morilla González*

Resumen

Se muestraron semanalmente 14 animales para determinar el perfil inmunológico de los cerdos durante las primeras diez semanas de vida. Durante la lactancia, de la primera a la cuarta semana de edad, fue evidente una baja concentración de leucocitos, linfocitos T totales (TE), T de alta afinidad (Taa) y B con receptor Fc (Bfc), determinados por rosetas con eritrocitos de borrego. Asimismo, se incrementó la respuesta intradérmica a la fitohemaglutinina (PHA). En la cuarta semana los animales fueron destetados; entre la quinta y sexta semana de edad continuó el incremento de leucocitos y linfocitos TE, Taa y Bfc y disminuyeron los linfocitos Null. Sin embargo, hubo una disminución marcada de la respuesta in tradérmica a la PHA. A partir de la octava semana de edad, los valores que se encontraron en las subpoblaciones celulares y la respuesta intradérmica fueron semejantes a los que se informan en adultos. Se concluye que el sistema inmune de los cerdos madura durante las primeras ocho semanas de vida, aunque durante el destete hubo cambios drásticos en las concentraciones de las subpoblaciones celulares y se hicieron anérgicos a la prueba in tradérmica, lo que sugiere una inmunosupresión transitoria.

Introducción

Durante las diez primeras semanas de edad los cerdos sufren cambios en su sistema inmunitario. En la etapa de lactancia los lechones son protegidos pasivamente de los agentes externos por medio del calostro y la leche de la cerda mientras maduran sus sistemas de defensas;²⁵ a partir de la cuarta semana son separados de la madre y de la séptima semana en adelante empieza el periodo de la preengorda. El destete representa un cambio agudo en la fisiología del animal pues, aunado al retiro de los elementos protectores de la leche materna, hay un cambio drástico de alimentación y un estrés causado por las nuevas condiciones ambientales a las

que es sometido el animal. Según las condiciones higiénicas y de manejo de la granja, durante las primeras dos semanas de edad y en menor grado al destete, existe un aumento notable en la morbilidad y mortalidad de los lechones: ello podría indicar que sus mecanismos adaptativos de defensa contra agentes externos no funcionan eficazmente.

Se sugiere que, durante la lactancia, los lechones tienen un sistema inmune deprimido, pues poseen bajas concentraciones de linfocitos T, By Null (no T, no B) circulantes.^{P: 14. J7.22} así como niveles elevados de substancias inmunosupresoras como cortisol y alfaproteína.¹ Sin embargo, los lechones producen anticuerpos como respuesta a la inoculación parenteral con antígenos inactivados después de los 10 días de edad² y pueden ser inmunizados con virus de la Fiebre Porcina Clásica desde el primer día de edad,³ por lo que la capacidad inmune de los lechones aún es tema de controversia.

Al momento del destete, el animal presenta un decremento de la respuesta *in vitro* de los linfocitos circulantes a los mitógenos, una menor concentración de anticuerpos contra antígenos inoculados, una reducción en la respuesta inflamatoria intradérmica a mitógenos y una mayor frecuencia de problemas neumónicos y diarreicos.^{3,4,12} Estas alteraciones sugieren una inmunosupresión transitoria que se asocia al estrés que los animales sufren durante ese periodo.^{15,26} Dicha inmunosupresión revierte entre la séptima y octava semanas de edad, cuando la concentración de linfocitos T y B, las respuestas intradérmicas a la fitohemaglutinina (lectina del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, PHA) y mitogénica de los linfocitos, así como la protectora producida con las vacunas de la Fiebre Porcina Clásica, enfermedad de Aujeszky y bacterinas, se asemejan a las obtenidas en el cerdo adulto.¹⁰

Con objeto de tener una visión continua de la maduración de algunos parámetros del perfil inmunológico del cerdo, en los periodos de la lactancia y el destete, se realizó este trabajo, donde se determinaron los cambios en el número y proporción de linfocitos circulantes, subpoblaciones de linfocitos y los cambios de la respuesta intradérmica a la PHA durante las primeras 10 semanas de edad. Estos resultados permiten comprender mejor la biología del cerdo para realizar un manejo más adecuado de los animales en esas etapas.

Recibido para su publicación el 17 de febrero de 1993

* Departamento de Inmunología, CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. SARH, km 15.5, Carretera México-Toluca, Palo Alto, 05110, México, D.F.

Material y métodos

Animales. Se utilizaron 14 cerdos de la misma edad, con peso similar pero de diferentes camadas, los que fueron muestreados cada semana durante 10 semanas. El destete se realizó entre los 27 y 32 días de edad, lo que correspondió a la cuarta semana de edad.

Biometría hemática. Se extrajo sangre con heparina de la vena cava anterior y se determinó la concentración de leucocitos sanguíneos por métodos convencionales.¹

Subpoblaciones de linfocitos. Las subpoblaciones de linfocitos fueron cuantificadas por el método de rosetas descrito por Salman *et al.*,¹⁸ con modificaciones publicadas en la literatura.² La sangre se desfibrinó y se centrifugó en un gradiente de Ficoll/Hypaque para obtener la capa de células mononucleares que se resuspendió en solución salina balanceada de Hanks (SSBH) con suero fetal bovino. Las células se contaron y se utilizaron para determinar las subpoblaciones de linfocitos: T totales (TE), T de alta afinidad (Taa), T autólogos (Taut), B con receptor Fe (Bfc), B con receptor de complemento (Be) y linfocitos nulos (Null).

Para los linfocitos TE y Taa, 0.25 mL de linfocitos ($4 \times 10^6/\text{mL}$) se mezclaron con glóbulos rojos de borrego (GRB) al 5%; la mezcla se incubó por 30 minutos a 37 °C para Taa, o 18 horas a 4 °C para TE. Para cada muestra se contaron 200 células mononucleares para determinar el número de rosetas. Se definió como roseta el linfocito que tenía al menos tres GRB adheridos a su membrana. Para determinar Taut, se usó una suspensión de GR de cerdo al 1% en vez de los GRB.

Para la cuantificación de los linfocitos Bfc, los GR se sensibilizaron previamente con anticuerpos de conejo contra los GR (hemolisina) (eritrocitos EA, eritrocito-anticuerpo). Las rosetas se prepararon mezclando 0.25 mL de EA al 0.5% con 0.25 mL de linfocitos ($4 \times 10^6 \text{ cs/mL}$) y se incubaron 30 minutos a 37 °C después de los cuales se realizó la cuenta de rosetas. Para enumerar los linfocitos

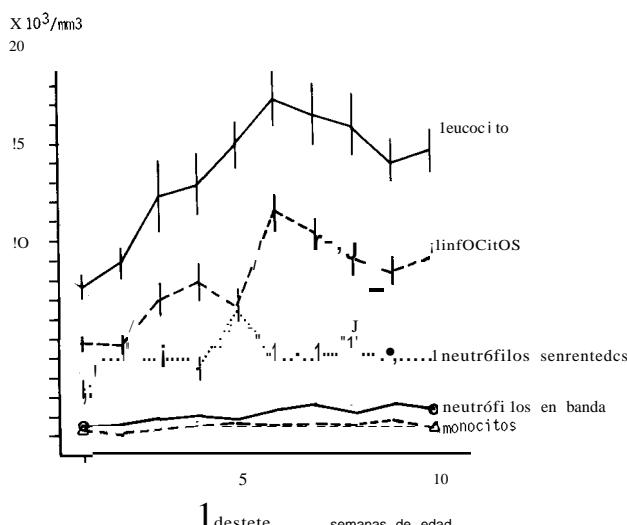


Figura 1. Concentración de leucocitos en cerdos de una a diez semanas de edad

Cuadro 1
PORCENTAJE DE CELULAS SANGUINEAS EN CERDOS
DE 1 A 10 SEMANAS DE EDAD

Semana	LinJ	Neutr. Segm.	Neuir. Banda	Mono.	Eosin.
1	61	29	4	5	1
2	52	40	2	5	1
3	56	33	2	7	2
4	59	27	4	7	3
5	44	44	5	6	1
6	66	23	3	7	1
7	62	23	4	9	2
8	57	31	3	7	2
9	59	25	4	11	1
10	60	27	3	8	2

Be, los GRB se sensibilizaron con hemolisina de conejo, se lavaron 3 veces con SSBH y se mezclaron con suero fresco de conejo diluido 1:10 como fuente de complemento (eritrocitos EAC, eritrocito-anticuerpo-complemento). La prueba se hizo mezclando 0.25 mL de EAC con 0.25 mL de linfocitos ($4 \times 10^4 \text{ cs/mL}$), se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 200 x g durante 1 minuto. El paquete fue resuspendido y las rosetas contadas. La posible unión inespecífica de los GRB con los linfocitos T se consideró restando las células Taa al resultado obtenido en las rosetas Bfc y BC.²³

El porcentaje de linfocitos Null se obtuvo de acuerdo con la fórmula descrita por Vega *et al.*²³

$$\% \text{ Null} = 100 - (\% \text{ TE} + \% \text{ Bfc}).$$

Los grupos se compararon estadísticamente con la prueba t de Student.

Prueba intradérmica

Cada lechón fue inyectado por vía intradérmica con 0.1 mg de fitohemaglutinina (PHA, GIBCO, EVA) diluida en PBS estéril pH 7.4 en la parte interna de la pata trasera. El grosor de la piel fue medido con un vernier a las 0 y 24 horas después de la inyección, lo que se ha informado en la literatura como el mejor tiempo para la lectura de la prueba en cerdos.²⁴ El valor de las 0 horas fue restado del de las 24 horas.

Resultados

Los valores de leucocitos aumentaron de manera constante de la primera hasta la décima semana de edad, con cambios marcados al destete (Figura 1). Además, los porcentajes de los diferentes leucocitos entre la primera y la décima semanas de edad fueron muy similares, con algunas variaciones al destete (Cuadro 1).

Los cambios de TE, Taa Y Null se muestran en la Figura 2, donde se nota el incremento constante de la población linfocítica T, con cambios acusados después del destete que tienden a estabilizarse a partir de la

octava semana de edad. La concentración de células Bfc y Bc se muestra en la Figura 3. También aquí se evidencia el aumento paulatino, con el tiempo, en el número de células B y de nuevo se nota un efecto a partir del destete, aunque en menor grado que en los linfocitos T. En el Cuadro 2 se presentan los porcentajes de TE, Taa, Bfc y Be. Los resultados de la concentración y el porcentaje de Taut se muestran en el Cuadro 3.

La respuesta intradérmica al nacimiento fue de 0.9 ± 0.1 mm y se incrementó a 4.8 ± 0.7 mm a la cuarta semana de edad ($P < 0.05$); una semana después del destete disminuyó a 1.9 ± 0.6 ($P < 0.05$) incrementándose de nuevo a 2.8 ± 0.4 a la décima semana de edad (Figura 4).

Discusión

La maduración del sistema inmune del cerdo durante las primeras 10 semanas de edad es un evento continuo en el que se establecen tres etapas. La primera etapa correspondió a las cuatro semanas de edad iniciales; en la primera semana, los lechones tuvieron niveles bajos de leucocitos como señalaron previamente McCauley y Hartmann.¹⁷ Estas bajas cuentas leucocitarias se reflejan en las subpoblaciones de linfocitos TE, Taa y Bfc, inferiores a los valores obtenidos para animales de diez semanas. En las siguientes tres semanas hay un incremento importante de células, probablemente producido por diferentes factores entre los que se encuentran la maduración fisiológica, la influencia de factores del calostro, la exposición a antígenos del ambiente, el establecimiento de la flora normal y la desaparición de sustancias inmunosupresoras circulantes, como cortisol y alfafetoproteína.¹⁸ Estos resultados son semejantes a

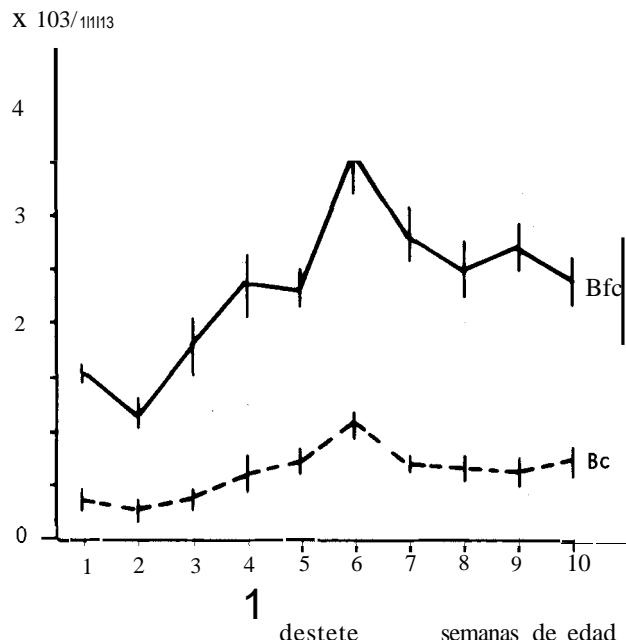


Figura 3. Concentración de linfocitos sanguíneos Bfc y Bc de cerdos de una a diez semanas de edad

los comunicados por Reyero *et al.*¹⁷ en cerdos y por Frymus y Schollenberger¹⁹ en potros. Se sugiere que los linfocitos Taut probablemente pertenecen a una población de linfocitos inmaduros;²⁰ este parece ser el caso, ya que su número y proporción fue mayor al nacimiento y disminuyeron paulatinamente a la cuarta semana (Cuadro 3), en la cual se encuentran valores semejantes a los de adultos.¹ Lo opuesto ocurrió con los linfocitos Taa, cuyos niveles se incrementaron con la edad. Estos linfocitos se consideran como una población madura de células que se incrementa después de la inmunización.²¹

La respuesta intradérmica a la PHA fue baja al nacimiento en comparación con los valores de la décima semana de edad. Este resultado sugiere varias hipótesis, como que a esa edad los linfocitos tienen mayor actividad supresora,²² la respuesta inflamatoria está deprimida, o que los bajos niveles de células circulantes podrían

Cuadro 2
PORCENTAJE DE LINFOCITOS TE, Taa, Bfc, Bc y Null EN CERDOS DE 1 A 10 SEMANAS DE EDAD

Semana	TE	Taa	Bfc	Be	Null
1	33	17	33	24	34
2	39	18	24	24	37
3	35	18	26	22	39
4	33	21	30	22	36
5	44	32	35	31	21
6	57	32	32	30	12
7	52	31	27	25	21
8	41	27	28	26	31
9	48	34	32	24	20
10	47	30	28	27	25

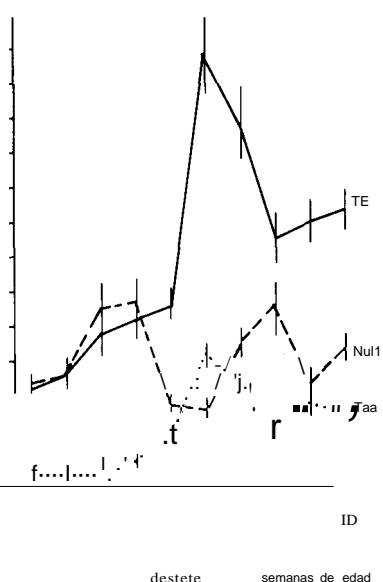


Figura 2. Concentración de linfocitos sanguíneos TE, Taa y Null de cerdos

Cuadro 3
CONCENTRACION YPORCENTAJE DE LINFOCITOS Taut EN CERDOS DE I A IO SEMANAS DE EDAD

Semana	Concentración (c.s/mm ³)	Porcentaje
1	64±6	4.0
2	33±3	1.8
3	56±8	2.3
4	7±1	0.3
5	0	0
6	18±2	0.3
7	46±4	0.9
8	28±3	0.7
9	11±1	0.3
10	33±3	0.8

ser insuficientes para montar una adecuada respuesta tanto localizada como sistémica. Deben realizarse otros experimentos para ahondar en esta cuestión. La respuesta a PHA se incrementó en las siguientes cuatro semanas, probablemente debido a la desaparición de las substancias inmunosupresoras circulantes," la maduración de la respuesta inflamatoria y la aparición de linfocitos T cooperadores.

La segunda etapa corresponde a las tres semanas siguientes al destete, en la que la maduración del sistema inmune muestra cierta alteración. Hubo un incremento en el número de linfocitos TE, Taa, Taut, Bfc y Bc y una disminución marcada en el número de linfocitos Null. Las células Null en cerdos se asemejan a los linfocitos T porque desaparecen con la timectomía, no se recuperan en cerdos timectomizados después de la radiación total del cuerpo, no son adherentes cuando se pasan a través de columnas de nailon y no responden a la PHA.² Estos cambios probablemente se debieron al estrés del destete. Durante esta etapa, los animales fueron separados de sus madres y fueron mezclados con otros cerdos con los cuales tuvieron que pelear para establecer la jerarquía social; además, su-

frieron cambios en la alimentación y el medio. Se informa que durante los períodos de estrés hay un incremento en la concentración de glucocorticoides y catecolaminas que pueden destruir a los linfocitos inmaduros del timo y alteran la proporción de células circulantes.^{2,5,19}

Junto con las alteraciones en la concentración y proporción de células, otro efecto aparente del destete fue la fuerte inhibición de la respuesta inflamatoria en piel a la PHA, una semana después del destete (5 semanas de edad). Esta respuesta anérgica ya fue señalada por Blecha *et al.*⁴ en lechones destetados a las tres o cuatro semanas de edad. Se eligió la prueba intradérmica con PHA porque los cerdos menores de diez semanas de edad no responden a antígenos como la tricofitina, candidina, coccidioidina y varidasa, probablemente porque a estas edades los animales no han desarrollado aún una respuesta inmune celular contra esos antígenos ubicuos, mientras que los cerdos de seis meses o adultos sí son capaces de responder. La respuesta intradérmica a la PHA es considerada como una respuesta de linfocitos T en los cerdos:⁷ sin embargo, también determina la respuesta inflamatoria inespecífica. Luego, la anergia pudo deberse a la disminución de la actividad de los linfocitos T de hipersensibilidad retardada o a la disminución de la respuesta inflamatoria debido al incremento de los niveles de cortisol,¹ prostaglandinas,² serotonina³ y catecolaminas⁴ inducido por el estrés.²⁴

La tercera etapa corresponde a la preengorda, que empieza a la octava semana de edad. En este caso, la concentración celular y la respuesta intradérmica fueron similares a las que se observan en animales de 6 meses y adultos; por tanto, podría decirse que el perfil inmunológico del cerdo de ocho semanas guarda muchas semejanzas con el de adulto, por lo que su maduración completa podría empezar a esa edad. En cerdos adultos los valores de linfocitos circulantes son de 30 a 45% de linfocitos T, 16 a 27% de B y 30% de Null.²

De acuerdo con estos resultados, durante las primeras diez semanas de edad, las células circulantes del sistema inmune se encuentran en un proceso acelerado de maduración, sólo afectado por el destete, como se ha demostrado en otras especies.² Por esta razón, no ha sido exitoso el uso de adyuvantes oleosos o levamisol como inmunoenestimulantes para incrementar la resistencia o el peso de lechones.^{1,2}

En conclusión, es altamente recomendable mantener a los cerdos en las mejores condiciones posibles de higiene y alimentación durante las primeras ocho semanas de vida y específicamente durante el destete, mientras su sistema inmune supera esta etapa crítica de cambios acelerados y alcanza las características encontradas en los animales adultos. Estos datos confirman los argumentos en favor de establecer calendarios de vacunación acordes con el desarrollo del animal, para evitar fallas en la protección de la piara debido a una inadecuada inmunización.

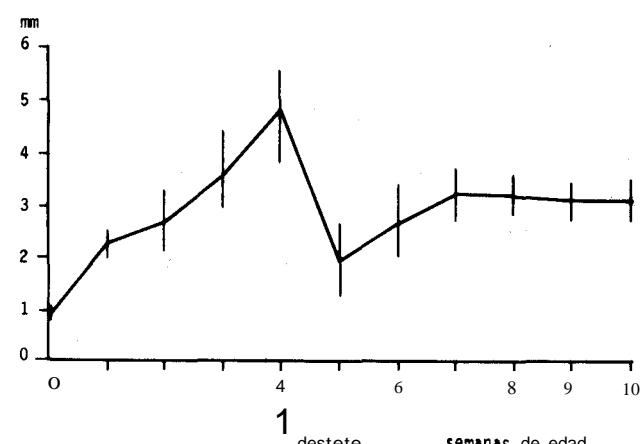


Figura 4. Respuesta inflamatoria de la piel a fitohemaglutinina en cerdos de una a diez semanas de edad

Abstract

In order to study the pig immune profile during the first ten weeks of age, 14 animals were used. During the suckling period, 0-4 weeks of age, it was shown that the piglets had low counts of leucocytes, including total T lymphocytes (TE), high affinity T lymphocytes (Taa) and Fc receptor positive B cells (Bfc). Their response to intradermal PHA inoculation was poor until the fourth week when all the other parameters were increased. All piglets were weaned at that time. Between the fifth and sixth week of age, both the leucocyte and lymphocyte counts increased, except for Null cells that were reduced. The skin response to PHA was also significantly diminished and only up to the eighth week, all immune parameters reached adult values. These results indicate that the pig immune system gradually matures during the first eight weeks of age until it reaches adult values. The weaning period represents an important disturbance in gradual maturity; therefore, it is advisable to improve animal care during that critical period until the immune system reaches values similar to those present in adult animals.

Literatura citada

1. Bentinick-Smith, J.: Hematology, In: A Textbook of Veterinary Clinical Pathology. Edited by: Medway, W., Prier, J.E., Wilkinson, J.S., 205-207. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, 1969.
2. Binns, R.M.: Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Vet Immunol. Immunopathol.*, 3: 95-146 (1982).
3. Blecha, F. and Kelley, K.W.: Effects of cold and weaning stressors on the antibody-mediated immune response of pigs. *J Anim. Sci.*, 53: 440-447 (1981).
4. Blecha, F., Pollmann, D.S. and Nichols, D.A.: Weaning pigs at early age decreases cellular immunity. *J Anim. Sci.*, 56: 396-400 (1983).
5. Bliznakov, KG.: Serotonin and its precursors modulators of the immunological responsiveness in titus. *J. Med.*, 11: 81-90 (1980).
6. Breazile, J.E.: The physiology of stress and its relationship to mechanisms of disease and therapeutics. *Vet Clin. North. Am.*, 4: 441-480 (1988).
7. Coba, M.A., Báez, R.A., Anaya, A.M. y Correa, P.: Protección conferida por la vacuna contra el cólera porcino (CP) PAV-250 en lechones de 1 a 7 días de edad. Memorias del XXIII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. León, Guanajuato, México. 1988. 104-106. AMVEC. León, Guanajuato, México (1988).
8. Fryrnus, T. and Schollenberger, A.: Circulating B and T lymphocytes in foals during the first five months of life. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B.*, 26: 722-728 (1979).
9. Fujimoto, T., Hara, A., Maede, Y. and Namioka, S.: Serum concentration and properties of u-fetoprotein and serum level of albumin in suckling piglets. *Res. oet. Sci.*, 36: 212-216 (1984).
10. Goodwin, J.S., Bromberg, S., Staszak, C., Kaszubowski, P.A., Messner, R.P. and Neal, J.F.: Effect of physical stress on sensitivity of lymphocytes to inhibition by prostaglandin E2. *J Immunol.*, 127: 518-527 (1981).
11. González-Vega, D., Cisneros, M.I., Martínez, AG., Zendejas, V. y Morilla, A.: Perfil inmunológico de los cerdos de dos meses de edad. *Téc. Poco »U«*, 25: 233-237 (1987).
12. Hay, S.N. and Kornegay, E.T.: Immunoglobulin G, A and M and antibody response in sow-reared and artificially-reared pigs. *J. Anim. Sci.*, 48: 1116-1122 (1979).
13. Jaroskova, L. and Kovaru, F.: Identification of T and B lymphocytes in pig by combined E-rosette and surface Ig labelling. *J. Immunol. Method.*, 22: 253-257 (1978).
14. McCauley, I. and Hartmann, P.E.: Changes in the proportion and absolute number of T lymphocytes in piglets from birth after weaning and in adults. *Res. voto Sd.*, 37: 52-57 (1984a).
15. McCauley, I. and Hartmann, P.E.: Changes in piglet leukocytes, B lymphocytes and plasma cortisol from birth to three weeks after weaning. *Res. voto Sci.*, 37: 234-241 (1984b).
16. Morilla, A.: Non-specific immunologic protection of the diarrheic syndrome of suckling pigs. In: Biotechnology in the Feed Industry. Edited by: Lyons, T.P., 241-261. Alltech Technical Publications, Kentucky, 1990.
17. Reyer, C., Thalhammer, J.G., Reszler, G. and Stockl, W.: Development of peripheral B and T lymphocytes in piglets. *Z. Immunitätsforsch.*, 154: 409-415 (1979).
18. Salmon, H., Rivier, Y., Gouere, P. et Goret, P.: Technique d'Identification des sous-populations lymphocytaires porcines. *Bull. Acad. Veto Fr.*, 48: 199-205 (1975).
19. Salnon, H.: Rosette-formation of pig thymic lymphocytes with sheep and pig erythrocytes. II. Markers for cortical and medullary thymocytes. *Thymus*, 5: 105-113 (1983).
20. Stanton, H.C. and Mueller, R.L.: Sympathoadrenal neurochemistry and early weaning of swine. *Am. J. voto Res.*, 37: 779-784 (1976).
21. Suganuma, A., Ishizuka, A., Sakiyama, Y., Maede, Y. and Namioka, S.: B lymphocyte differentiation and suppressor activity by T lymphocytes derived from neonatal and suckling piglets. *Res. voto Sci.*, 40: 400-405 (1986).
22. UPCOlt, D.H., Herbert, C.N. and Robins, M.: Erythrocyte and leukocyte parameters in fetal and neonatal piglets. *Res. voto SS.*, 15: 8-12 (1973).
23. Vega, M.A., Rico, J. y Sánchez-Hidalgo, C.: Determinación de linfocitos T y B. En: Manual de Inmunología. Editado por: Morilla, A., Bautista, C.R., 275-293. Diana, México, D.F., 1986.
24. Westly, B.J. and Kelly, K.W.: Physiologic concentrations of cortisol suppress cell-mediated immune events in the domestic pig. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 177: 156-164 (1984).
25. Wilson, M.R.: Immunologic development of the neonatal pig. *J. Anim. SS.*, 38: 1018-1021 (1974).
26. Worsae, H. and Schmidt, H.: Plasma cortisol and behavior in early weaned piglets. *Acta. voto scand.*, 21: 640-657 (1980).
27. Wybran, J.: The active T rosette test: Its significance and its use. In: Cell Biology and Immunology of Leukocyte Function. Edited by: Quastel, M.R., 745-752. Academic Press, London, 1979.