



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“DETECCION Y CUANTIFICACION DE MASTOCITOS (CELULAS CEBADAS) EN PULMON DE CERDOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON Mycoplasma hyopneumoniae”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
SOCORRO SANDRA MARTINEZ ROBLES

DIRECTOR DR. TONATIUH CRUZ SANCHEZ
ASESORES: M.V.Z. GERMAN ISAURO GARRIDO FARINA
DR. JORGE TORTORA PEREZ
DR. MARCO ANTONIO VEGA LOPEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# PAGINACION DISCONTINUA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO  
CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Detección y cuantificación de mastocitos (células cebadas) en pulmón  
de cerdos infectados experimentalmente con Mycoplasma hyopneumoniae".

que presenta la pasante: Socorro Sandra Martínez Robles  
con número de cuenta: 8813442-0 para obtener el título de :  
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de julio de 1 2002

PRESIDENTE MVZ. José Alberto Chávez Enríquez  
VOCAL Dr. Tonatíuh Alejandro Cruz Sánchez  
SECRETARIO MVZ. Gilberto Ochoa Uribe  
PRIMER SUPLENTE MVZ. Mario A. Velasco Jiménez  
SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Jesús A. Sandoval Romero

(B)  
[Firma]  
[Firma]  
[Firma]  
[Firma]

**Este trabajo forma parte del Programa de Apoyo a Proyectos de  
Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN209701)**

"Análisis de las poblaciones celulares del sistema inmune del tracto respiratorio  
porcino ante la infección experimental de *Mycoplasma hyopneumoniae*."

## **DEDICATORIAS**

A Coco y Gigí.

Por su apoyo y comprensión durante todo el tiempo que ha llevado mi formación profesional

A Martín Cortés Jiménez, mi padre, por su ejemplo de tenacidad y fortaleza.

A D. F. S. Por su incondicional apoyo, sin el cual no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

A mis hermanas todas, especialmente Dora y Maribel por echarme la mano siempre que la he necesitado sin excusa alguna.

A Dana, esperando que el presente trabajo sea un motivación para ella.

## **AGRADECIMIENTOS**

Dr. Tona, quien me ha respaldado en todo aquello que me ha hecho falta durante estos casi 12 meses.

Dr. Tórtora por aguantar tanta presión por tanto tiempo, por su gentileza y generosidad al compartir sus conocimientos conmigo.

A Germán Garrido, por la paciencia, apoyo y comprensión durante el tiempo que estuve en el laboratorio de histología.

A Jesús Gabriel. Por ser tan "chiquibello" y estar siempre en todo momento.

A Jesús por proporcionarme las herramientas e ideas necesarias en este trabajo

## **AGRADECIMIENTOS ESPECIALES**

Al Dr. Leopoldo Flores Romo, del laboratorio No. 9 de Patología Celular del CINVESTAV; por el tiempo y atención al presente trabajo.

Al M. en C. Crisóforo Mercado Márquez laboratorio 17 biología experimental del CINVESTAV, por su imaginación y destreza en el manejo de las imágenes

Al M. en C. Gerardo García Tovar, del laboratorio de Anatomía Comparada por toda la atención recibida.

Al Ing. Juan R. Garibay Bermúdez, por su apoyo en el análisis estadístico

A los miembros del Jurado

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BALT = Tejido linfoide nodular asociado a mucosas
- CC = Célula cebada
- CM = Células domo
- CMH = Complejo mayor de histocompatibilidad
- CT = Linfocitos T
- FcRI = Fracción cristalizable de unión para IgE
- KL = c-kit ligando (desarrollo celular)
- M. h.* = *Mycoplasma hyopneumoniae*
- MCct = Célula cebada de tejido conectivo
- MCm = Célula cebada de mucosas
- MCT = Célula cebada tisular
- PRRS = Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino
- SCF = Factor de origen celular
- Th<sup>2</sup> = Linfocito cooperador 2

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>a</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>b</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>c</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>d</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b> Género micoplasma .....	<b>1</b>
<b>1.2</b> <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> . Características .....	<b>1</b>
<b>1.2.1</b> <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> . Inmunopatogenia .....	<b>2</b>
<b>1.3</b> Sistema inmune del aparato respiratorio del cerdo .....	<b>3</b>
<b>1.3.1</b> Complemento .....	<b>3</b>
<b>1.3.2</b> Fagocitosis mononuclear .....	<b>3</b>
<b>1.3.3</b> Inmunidad de las mucosas .....	<b>4</b>
<b>1.3.4</b> Mecanismos de defensa del recién nacido .....	<b>4</b>
<b>1.3.5</b> Hipersensibilidad .....	<b>4</b>
<b>1.3.6</b> Inmunodeficiencia e inmunosupresión .....	<b>4</b>
<b>1.3.7</b> Agentes infecciosos Inmunosupresores .....	<b>5</b>
<b>1.3.8</b> Tejido linfóide de la mucosa bronquial .....	<b>5</b>
<b>1.4</b> Célula cebada .....	<b>6</b>
<b>1.4.1</b> Precursores de la célula cebada .....	<b>6</b>
<b>1.4.2</b> Origen y desarrollo .....	<b>6</b>
<b>1.4.3</b> El papel del protooncogen c-kit y el factor de origen celular (SCF) ..	<b>7</b>
<b>1.4.4</b> Apoptosis de la célula cebada .....	<b>8</b>
<b>1.4.5</b> Heterogeneidad de la célula cebada .....	<b>8</b>
<b>1.4.6</b> Desarrollo de la citocinas en la célula cebada .....	<b>9</b>
<b>1.4.7</b> Migración de la célula cebada .....	<b>9</b>
<b>1.4.8</b> Moléculas de adhesión .....	<b>10</b>
<b>1.4.9</b> Receptores de activación (FcγRIII) .....	<b>10</b>
<b>1.4.10</b> Receptores de inhibición (FcγRII) .....	<b>10</b>
<b>1.4.11</b> Participación de la célula cebada en asma .....	<b>11</b>
<b>1.4.12</b> Actividad de la célula cebada en presencia de bacterias .....	<b>12</b>
<b>1.4.13</b> Fagocitosis y eliminación de la bacteria por la célula cebada ..	<b>13</b>

<b>2</b>	<b>Objetivo</b> . . . . .	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Metodología</b> . . . . .	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Material biológico</b> . . . . .	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Grupos experimentales y diseño experimental</b> . . . . .	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Método estadístico</b> . . . . .	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Resultados</b> . . . . .	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>Discusión</b> . . . . .	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Conclusiones</b> . . . . .	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>Literatura citada</b> . . . . .	<b>30</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

1. Clasificación de los micoplasmas. . . . .	1
2. Micoplasmas aislados en el porcino. . . . .	4
3. Mediadores de la célula cebada y su efecto fisiológico <i>in vivo</i> . . . . .	12
4. Relación de sacrificio: grupos/días. . . . .	18
5. Distribución de animales en grupos. . . . .	19
6. Relación de cerdos y laminillas con el día de sacrificio. . . . .	20
7. Promedio de las tres lecturas independientes . . . . .	23
8. Estadísticas descriptivas de las células cebadas cuantificadas en bronquiolos de cerdos infectados y control. . . . .	26
9. Estadísticas descriptivas de las células cebadas cuantificadas en parénquima de cerdos infectados y control. . . . .	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. E. coli adheridas a la superficie de MMc, bacterias en el momento de ingestión y ruffling. . . . .	14
2. Vénula con 2 células cebadas, una unida a la capa adventicia. . . . .	21
3. Epitelio de bronquiolo, células cebadas en el parénquima adyacente . .21	
4. Panorámica de 2 bronquiolos y vénulas . . . . .	22
5. Bronquiolo con células cebadas en la capa adventicia. . . . .	22
6. Comparación de los resultados obtenidos en los bronquiolos. . . . .	24
7. Comparación de los resultados obtenidos en el parénquima. . . . .	24
8. Resultados de los cerdos infectados. . . . .	24
9. Resultados de los cerdos control. . . . .	24
10. Estadísticas descriptivas de los bronquiolos de cerdos infectados. . . . .	25
11. Estadísticas descriptivas de los bronquiolos de cerdos control. . . . .	25
12. Estadísticas descriptivas del parénquima de cerdos infectados. . . . .	25
13. Estadísticas descriptivas del parénquima de cerdos control. . . . .	25

## RESUMEN

En cortes de pulmones de cerdo incluidos en parafina y mediante una técnica de tinción de azul de toluidina ácida, se observaron las células cebadas (CC) de los bronquiolos pulmonares, bronquiolos respiratorios, alrededor de los vasos sanguíneos y el tejido conectivo. Dichas células presentaron morfología ahusada (20-30 $\mu$ m) y al microscopio de luz se caracterizaron por un citoplasma lleno de gránulos que se tiñeron metacromáticamente de color rojo púrpura.

Se cuantificaron las células cebadas (CC) en pulmones de cerdos normales e infectados experimentalmente con *Mycoplasma hyopneumoniae*. Se infectaron 18 cerdos intratraquealmente con la cepa 194 de *M. Hyopneumoniae* en una suspensión de 10 ml con 10<sup>6</sup> UCC/ml. Se sacrificaron los días 0, 4, 8, 12, 16 y 20 posinfección. Los cortes de pulmón se colorearon con azul de toluidina y se visualizaron por metacromacia en las CC. En los bronquios las CC fueron escasas y se presentaron relacionadas con las glándulas mucosas. El número de CC se incrementó en bronquiolos, entre el tejido conectivo externo y la capa muscular, algunas células se observaron en mucosa bronquiolar. Se cuantificaron las CC en bronquiolos de diámetro entre 60 y 320 micras. Los bronquiolos de menor diámetro presentaron más CC. En las vénulas adyacentes se presentaron hasta 3 células. En bronquiolos las mayores cuentas ocurrieron los días 8, 16 y 20 ( $p < 0.05$ ) y en el tejido pulmonar los días 8 y 20 ( $p < 0.05$ ). Los datos sugieren la degranulación de células en los primeros días posinfección y su reclutamiento en dos picos a los 8 y 20 días, considerando que la reacción metacromática es dada por los gránulos de las CC.

## SUMMARY

### **Detection and counting of mast cells in pig's lung infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*.**

Mast cells (MC) were counted in lung tissue of pigs in health and experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* type 194 suspended in a 10ml. With  $10^4$  UCC/ml solution. 18 pigs intratracheally infected and slaughtered the days 0, 4, 8, 12, 16 and 20 within infection. Identified MC with toluidine blue dye through metachromatic granules reaction, a few MC found related to mucosal glands, closely to blood vessel ; there were a MC rise in bronchioli, laying between external connective tissue and muscular layer, some MC have been seen in bronchiole mucosa, MC counted in bronchiolus 60-320 micron; lesser bronchiolus contained several MC and in venules existed even 3 MC in muscular layer also.

Counts in bronchi showed a peak the days 8, 16 and 20 ( $p < 0.05$ ); in pulmonary tissue (alveoli) 8 ad 20 ( $p < 0.05$ ). data suggests degranulation within firsts days after infection and a recruitment in 8 and 20 infetion day presenting 2 peaks, considering metachromatic reaction giving by MC granules.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Género *Mycoplasma*

Los *Mycoplasmas* son los más simples y diminutos organismos procariontes de vida libre que separan a las eubacterias (Cuadro 1) en una clase diferente: Los Mollicutes *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.h.), es una de las especies más importantes en cerdos por causar Neumonía Enzootica, enfermedad infecciosa del tracto respiratorio. (Ciprián, Mendoza, Cruz, 2001)

Cuadro 1  
Clasificación de los *Mycoplasmas*

Orden	<i>Mycoplasmatales</i>
Familia 1	<i>Mycoplasmataceae</i> (Necesidad de esterol) Hábitat: hombre y animales
Género I	<i>Mycoplasma</i> (64 especies)
Género II	<i>Ureaplasma</i> (2 especies) actividad ureasa
Familia 2	<i>Acholeplasmataceae</i> (sin necesidad de esterol ) Hábitat: hombre y animales
Género I	<i>Acholeplasma</i> (7 especies)
Familia 3	<i>Spiroplasmataceae</i> (morfología espiral, necesidad de esterol) Hábitat: plantas, insectos
Género I	<i>Spiroplasma</i> (3 especies)
Géneros afines	<i>Thermoplasma</i> y <i>Anaeroplasma</i> (particularmente en rumiantes)

Cruz, 2001

### 1.2 *Mycoplasma hyopneumoniae*. Características

Este microorganismo no pasa filtros de 0.22 micras, por microscopía electrónica se aprecian la presencia de pequeños filamentos (tipo fimbria) y la presencia de una cápsula.

Es de crecimiento lento, tarda de 7 a 10 días en crecer y su mayor crecimiento ocurre en medios líquidos, sobre todo aquellos que contienen suero equino, es uno de los organismos más exigentes del género *mycoplasma*. En medios sólidos se desarrollan colonias de 0.5mm de diámetro, caracterizándose por presentar la protuberancia central típica que le da apariencia de huevo estrellado. Por carecer de pared celular adquieren formas diversas, cuando se tiñe con Giemsa, se observan cocobacilos delgados de 0.1 a 0.2 micrómetros de diámetro con pequeñas ramificaciones de 0.1 a 0.2µm de grosor. En cultivos celulares crece formando grupos difusos como cocos de 0.5µm de diámetro en cadenas cortas o anillos de aproximadamente 3µm de diámetro (Ciprián, Mendoza, Cruz, 2001)

### 1.2.1 *Mycoplasma hyopneumoniae*. Inmunopatogenia

La enfermedad es transmitida de la hembra a sus lechones en forma directa o por las secreciones que se expulsan mediante la tos, existiendo otros padecimientos provocados por diversos micoplasmas (cuadro 2). Dependiendo de la extensión de las lesiones la neumonía enzoótica puede reducir la ganancia diaria de peso hasta en un 17% e incrementa el índice de conversión alimenticia alrededor de un 14%. En algunos casos resulta mortal; *Mycoplasma* alcanza la vía aérea traqueal, se implanta en los cilios de la misma, una vez que la infección alcanza el pulmón causa áreas de consolidación gris-rojiza redondeadas en los lóbulos craneales, debido a el colapso alveolar subsecuente, el cerdo empieza a carecer de aire y otros patógenos llegan como infección secundaria, posteriormente el cerdo sucumbe a la carga bacteriana y viral. (Hamada, Nimi. 1999)

Cuadro 2  
Micoplasmas aislados en el porcino

Enfermedad	Mycoplasma
Neumonía	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
Artritis	<i>Mycoplasma hyorhinis</i> <i>Mycoplasma hyosinoviae</i>
Incierto	<i>Mycoplasma flocculare</i> <i>Mycoplasma suis</i> <i>Acholeplasma axanthum</i> <i>Acholeplasma granularum</i>

Cruz 2000

En las infecciones naturales por micoplasmas es notoria la respuesta de inmunidad celular, a causa de la escasa antigenicidad de estos microorganismos y a la naturaleza crónica de la enfermedad. (Ciprián, Mendoza, Cruz.2001)

Ocurre primero, una interacción entre *M. hyopneumoniae* y los mecanismos de respuesta celular específicos en el aparato respiratorio, como los macrófagos alveolares y el tejido linfóide nodular asociado a mucosas (BALT) y los linfonodos bronquiales, ocurriendo la presencia de Inmunoglobulinas en secreciones traqueobronquiales en una cantidad elevada a las 2 semanas post infección, posteriormente se han observado células con inmunoglobulinas específicas en su superficie contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en tejidos linfoides y pulmón a las 3 y 4 semanas post infección. Un dato significativo es que la presencia de anticuerpos coincide con la aparición de las lesiones neumónicas. (Cruz,2000)

En una infección con *M. hyopneumoniae* se observa que la proporción de células que contienen IgA:IgG es de 1:3 en mucosa nasal y en linfonodos retrofaríngeos, cambiando esta proporción a 1:15 en Linfonodos bronquiales, en éstos nodos a las

3 semanas post infección se encuentra la clase IgG, que aparece desde la primera semana. <sup>(Cruz, 2000)</sup>

Los anticuerpos séricos tienen un comportamiento diferente al observado en las secreciones traqueobronquiales. Estos anticuerpos se detectan a las 5 semanas post infección, siendo las IgG las más importantes <sup>(Ciprián, Mendoza, Cruz.2001)</sup>.

Una característica común de las infecciones por micoplasmas es la tendencia a infectar la superficie de la mucosa y producir con frecuencia una enfermedad de curso subclínico. La infección puede ser confinada a la mucosa, donde el sitio de ataque es el epitelio ciliado del aparato respiratorio. <sup>(Ciprián, Mendoza, Cruz.2001)</sup>

Los mecanismos inmunes locales son estimulados como consecuencia de esta infección de la mucosa y en los anticuerpos producidos en las secreciones se ha encontrado predominantemente IgA e IgG. <sup>(Ciprián, Mendoza, Cruz.2001)</sup>

En la infección de *M. hyopneumoniae* la respuesta inmune celular ha sido medida por las técnicas de transformación blastoide, la de hipersensibilidad cutánea y la determinación de los tipos celulares por inmunohistoquímica <sup>(Cruz, 2000)</sup>

### 1.3 SISTEMA INMUNE DEL APARATO RESPIRATORIO DEL CERDO

Aún cuando en el aparato respiratorio se manifiestan los mecanismos de defensa inespecíficos y específicos, en esta parte se describen solo los aspectos inmunológicos que tienen relevancia en el pulmón del cerdo o bien en la interacción con la célula cebada.

#### 1.3.1 Complemento

El complemento es muy importante como mediador de la inflamación y en el control de la infección bacteriana, juega un papel en las alergias y la hipersensibilidad, el camino clásico se activa principalmente por la unión antígeno anticuerpo (IgA, IgE), por ciertos productos bacterianos como las endotoxinas, y las proteasas liberadas por el tejido dañado. <sup>(Straw, 1999)</sup>

#### 1.3.2 Fagocitosis mononuclear

Este sistema lo llevan a cabo los macrófagos libres y los fijos o histiocitos. Los macrófagos se producen en la médula ósea y son liberados al torrente sanguíneo donde circulan antes de convertirse en macrófagos. Los macrófagos tisulares se encuentran alrededor del endotelio de los capilares (particularmente en los pulmones) <sup>(Straw, 1999)</sup>

Los macrófagos alveolares se encuentran normalmente en el alveolo del pulmón, migran dentro del alveolo y fagocitan partículas inhaladas así como bacterias. Después de ingerirlas abandonan el alveolo ya sea por las vías aéreas utilizando el aparato mucociliar o bien atravesando los epitelios respiratorios hasta alcanzar el drenaje linfático hacia los linfonodos locales ahí presentan el antígeno a los linfocitos para iniciar la respuesta inmune. <sup>(Straw, 1999)</sup>

Los macrófagos fijos perivasculares se encuentran adheridos a las células endoteliales en los vasos del pulmón, se cree que en los cerdos son muy

importantes para la fagocitosis y remoción de agentes infecciosos de la sangre que pasan a través del pulmón especialmente bacterias gram negativas libres de endotoxinas, es por eso que en septicemias son considerados un mecanismo efectivo que protege al pulmón.<sup>(Straw, 1999.)</sup>

### 1.3.3 Inmunidad en las mucosas

Un grupo de células epiteliales especializadas llamadas células domo o células M, se encuentran formando agregados que cubren el tejido linfóide asociado al intestino (placas de Peyer) o en su caso, el bronquiolo. Estas células endocitan el antígeno y lo transportan a través del epitelio; el antígeno es llevado a las células presentadoras y a los linfocitos T y B.<sup>(Straw, 1999)</sup>

### 1.3.4 Mecanismos de defensa del recién nacido

Los macrófagos alveolares de un cerdo de 1 día de nacido tienen reducida quimioluminiscencia, a los 7 días los macrófagos han alcanzado la actividad propia de cerdos adultos. De la misma manera los recién nacidos tienen bajos porcentajes en macrófagos fijos intravasculares que se incrementan al doble alrededor de los 30 días de edad.<sup>(Straw, 1999)</sup>

### 1.3.5 Hipersensibilidad

La hipersensibilidad es una condición en la que ocurre una respuesta excesiva al antígeno al cual el animal ha sido previamente expuesto, los signos clínicos se deben a la respuesta inmune más que a la acción directa del antígeno. La hipersensibilidad se divide en 4 grupos de acuerdo a su mecanismo de acción, sin embargo la interacción de la célula cebada es evidente en el:

- Tipo I (hipersensibilidad inmediata) involucra la síntesis de IgE específica citotrópica, la IgE se une a los receptores Fc de la superficie de las células cebadas. Cuando el mismo antígeno se encuentre a la IgE en la superficie de la célula cebada (si es que hay suficiente concentración de IgE específica para el antígeno), provocará que la célula cebada libere mediadores de la respuesta inflamatoria como Histamina, serotonina, cininas, prostaglandinas etc. que provocan los signos clínicos; La hipersensibilidad del tipo I puede ser local o sistémica (anafilaxia).<sup>(Straw, 1999)</sup>

### 1.3.6 Inmunodeficiencia e Inmunosupresión

Puede ser primaria o secundaria la inmunodeficiencia incrementa la susceptibilidad de los animales a enfermedades infecciosas. La inmunodeficiencia primaria se define como un desorden del sistema inmune donde, las bases genéticas están a prueba o suspendidas. La inmunodeficiencia secundaria es un desorden en donde el animal es genéticamente capaz de funcionar, pero factores secundarios impiden la respuesta:

1. Enfermedades causadas por organismos que generalmente son de baja patogenicidad o por una vacuna viva atenuada.
2. Enfermedades recurrentes que son difíciles de controlar.
3. Falla en la respuesta adecuada a una vacunación.
4. Enfermedades neonatales inexplicables y muerte que afecte a más de un animal en una camada.
5. Una variedad de enfermedades o síndromes que ocurren frecuentemente en una piara. (Straw, 1999)

### 1.3.7 Agentes infecciosos inmunosupresores

Algunos agentes infecciosos son capaces de suprimir la respuesta inmune y determinar que el animal sea más susceptible a infecciones secundarias, tal es caso de *M. hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Fiebre Porcina Clásica, PRRS, y *Pasteurella multocida*.

Mycoplasma altera la función de los neutrófilos porcinos. El virus de la pseudorrabia se replica en los linfocitos y en los macrófagos alveolares reduciendo su población y la capacidad de respuesta inmune. (Delves, 1998)

### 1.3.8 Tejido Linfoide de la Mucosa Bronquial

La función del tejido linfoide bronquial es responder en la mucosa a los antígenos inhalados, es por esto que éste tejido es una unidad integrada a los mecanismos que aseguran la entrada de aire estéril al sitio de intercambio gaseoso, esta unidad recibe el nombre de Tejido linfoide nodular asociado a la mucosa bronquial (BALT), es te tejido es muy similar a las placas de Peyer localizadas en el intestino de todas las especies domésticas. (Bienenstock, 1999)

El BALT se desarrolla en los primeros estadios post natales en todas las especies sin ser necesaria la estimulación antigénica, sin embargo en los cerdos la infección con *M. hyopneumoniae* se asoció a una respuesta hiperplásica temprana del BALT (Chu, 1993)

El BALT se identifica microscópicamente como agregados concentrados alrededor de las bifurcaciones de los bronquios y en la periferia de los bronquiólos, sitios de impacto de partículas inhaladas. (Bienenstock, 1999)

El epitelio que rodea al BALT esta infiltrado de linfocitos y células M similares a las presentes en la placas de Peyer; las células del BALT forman un domo bajo el epitelio y el centro germinal solo es visible posterior a estimulación antigénica (Bienenstock, 1999).

Alrededor de el centro germinativo se observan células T, células plasmáticas y células dendríticas, además de vasos linfáticos eferentes. (Bienenstock, 1999).

Asociadas al BALT y al epitelio bronquial, Se encuentran linfocitos granulares y células cebadas formando una asociación estructural, lo cual es muy importante porque en presencia de un antígeno inhalado, hay un incremento de estas células influenciado por células T (Ahlstedt, 1993).

Finalmente existe un mecanismo secundario para activar al BALT mediante la transportación de un antígeno inhalado asociado a un macrófago, este mecanismo

requiere a su vez de citocinas que activan a los linfocitos T bajo la regulación de la IgE<sup>(thomas, 1974)</sup>.

## 1.4 CÉLULA CEBADA

### 1.4.1 Precursores de la célula cebada

Aún cuando la célula cebada tiene su origen en la médula ósea y expresa marcadores hematopoyéticos de superficie no circula en la sangre como una célula cebada madura, en humanos el precursor de la célula cebada expresa el epítipo CD34 y puede ser diferenciado *in vitro* debido a la metacromasia positiva que de la triptasa bajo la influencia de SCF, tanto la línea sanguínea como las células mononucleares del hígado fetal son una fuente de precursores de células cebadas, pero, la identidad de los precursores no ha sido aún claramente dilucidada y se sabe muy poco de las rutas de diferenciación que conducen a la maduración de las células cebadas tisulares.<sup>(Peraray, 1999)</sup>

### 1.4.2 Origen y Desarrollo

Los mastocitos (*mastung*) o células cebadas provienen de células madres de origen hematopoyético pluripotenciales; éstas también dan origen a linfocitos, eritrocitos, megacariocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos<sup>(Delves, 1998)</sup>.

Aunque se reconocen al menos tres poblaciones de células cebadas todas provienen de una célula progenitora que es evidenciada por los marcadores: CD34<sup>+</sup>, c-kit<sup>+</sup>, Ly-1, CD14<sup>+</sup> y CD17; esta se diferencia a célula cebada al entrar en un tejido particular influenciada por el micro ambiente y por características fenotípicas particulares. Es una célula grande de forma redondeada (20-30  $\mu\text{m}$ ), tiene gran cantidad de proyecciones largas y delgadas parecidas al "villi", su núcleo es redondeado, posee algunas mitocondrias, pero el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi no son prominentes, los gránulos son heterogéneos, no específicos algunos tienen apariencia de tirabuzón, otros tienen una matriz amorfa<sup>(Delves, 1998)</sup>.

Estas células hacen evidentes sus gránulos con tinción metacromática con colorantes del tipo del azul de toluidina.

En roedores y humanos forman dos poblaciones diferenciables con base a sus orígenes y sus funciones, una población se encuentra en el tejido conectivo y la otra adyacente a las superficies mucosas. Las células cebadas del tejido conectivo se originan de precursores que proceden del hígado fetal y de la médula ósea. Su número aumenta lentamente en los tejidos y la agresión puede causar proliferación local. Las células cebadas del tejido conectivo pueden tener muchos gránulos uniformes, son ricas en histamina y heparina presentan vida media de seis meses<sup>(Tizard, 1992)</sup>.

Las células cebadas de las mucosas se diferencian de las que se ubican en el tejido conectivo en que tienen pocos gránulos de tamaño variable. Los gránulos de estas células contienen sulfato de condroitina, en lugar de heparina<sup>(Tizard, 1992)</sup>.

### 1.4.3 El papel del protooncogen c-kit y el factor de origen celular (SCF)

Los ratones mutantes del fenotipo w/w y SI/SI carecen de células cebadas maduras y exhiben anemia hipoplástica, hipopigmentación y esterilidad. El locus W codifica el proto oncogen c-kit un miembro de la subfamilia de inmunoglobulinas dentro de la familia del receptor tirosinacinas; el locus SI codifica el ligando de c-kit, también conocido como c-kit ligando (KL) o factor de origen celular (SCF).

Kitamura y colaboradores<sup>(1978)</sup> han demostrado que un trasplante de médula ósea de un ratón normal +/- o un ratón mutante curado de la deficiencia de célula cebada SI/Sid, en un ratón deficiente W/Wv, refleja una alteración hematopoyética en el linaje de la célula cebada. La deficiencia en los mutantes SI, no pudo ser curada con trasplantes de médula ósea demostrando que el defecto en este caso se encuentra en el microambiente no hematopoyético, las mutaciones en W y SI afectan profundamente la línea de células cebadas indicando que tanto c-kit como SCF son cruciales para el desarrollo de la célula. La proliferación, diferenciación, quimiotaxis y función secretora de la célula cebada tanto en el humano como en el ratón están afectadas por la interacción entre c-kit y SCF.<sup>Castells, 2000)</sup>

Estudios *in vivo* realizados por Galli y colaboradores<sup>(1993)</sup> en primates no humanos tratados subcutáneamente con SCF recombinante en un periodo de 21-28 días han mostrado un incremento en el número de células cebadas en diversos órganos, la hiperplasia de la célula cebada varía de acuerdo al sitio de localización anatómica predominando en bazo, médula ósea y Linfonodos en una relación 100/gr/día; la mastocitosis ocurrió en el sitio de inyección, médula ósea, Linfonodos mesentéricos, hígado y bazo con un patrón similar al observado en individuos con mastocitosis sistémica, cuando las inyecciones se descontinuaron y los monos se mantuvieron así por 15 días, el número de células cebadas decreció al punto en que eran indistinguibles con el grupo control no tratado, la expansión y contracción sistémica de la célula cebada ocurrió sin que se observaran efectos colaterales, datos *in vitro* sugieren que SCF promueve la supervivencia de la célula cebada suprimiendo la apoptosis.

Los puntos de mutación del dominio de la tirosina del receptor del protooncogen c-kit han manifestado un factor de desarrollo independiente en las células cebadas de rata y ratón; la línea de célula cebada del ratón P815 y la de la rata RBL-2H3 sustituye una asparagina por una tirosina en los aminoácidos 814 y 817 respectivamente; ambas líneas celulares han demostrado poseer una cinasa activada c-kit y no necesitan SCF para crecer y sobrevivir.<sup>(Thankavel, 1997)</sup>

#### 1.4.4 Apoptosis de la célula cebada

Durante el desarrollo el número de células cebadas es regulado por el balance entre el rango de proliferación celular ( $10/10^5$  en ratón y  $68/10^5$  en humanos) y la muerte celular<sup>(Bochner, 2001)</sup>.

La muerte de la célula cebada puede ocurrir por necrosis o apoptosis, bajo condiciones fisiológicas. La apoptosis puede ser iniciada por diversos estímulos externos incluyendo la interacción del ligando fas/fas, privación de factores de crecimiento celular como SCF, IL-3 exposición a radiación e ionización, acción de inductores intracelulares incluyendo el supresor tumoral p53, los proto oncogenes p53, c-myc y bax; a su vez, la apoptosis se puede suprimir por el proto oncogen bcl-2. la apoptosis es regulada por factores microambientales involucrando la interacción de los protooncogenes antes mencionados<sup>(Bochner, 2001)</sup>.

#### 1.4.5 Heterogeneidad de la célula cebada

La morfología y la metacromasia han sido los dos criterios fundamentales para identificar a la célula cebada en los tejidos, la descripción de la célula cebada como una célula mononuclear metacromática necesita ser cambiada; tanto en el humano como en el ratón se han detectado células de núcleos multilobulados, estas células expresan el fenotipo de proteasas normal de la célula cebada así como c-kit y su estructura es similar a la de la célula cebada mononuclear, vista en microscopio electrónico. La metacromasia se detecta en la célula madura, en la célula precursora, inmadura agranular y atípica, puede ser escasa o nula, aún cuando expresen proteínas específicas en la membrana.

La evidencia bioquímica de la heterogeneidad de las células cebadas en los humanos se basa en la presencia de proteasas, que son la mayor parte del contenido granular. Aún cuando Schwartz y col.<sup>(1989)</sup> indicaban la presencia de solo 2 tipos de células cebadas, ahora es claro que existen al menos tres tipos de células cebadas maduras basados en estudios inmunohistoquímicos.<sup>(Castells, 2000)</sup>

Las células cebadas que contienen solo triptasa y son llamadas MCT (Tissue Mast Cell) predominan en la mucosa intestinal y en los alvéolos, y su núcleo es en forma de tirabuzón, las células cebadas que contienen triptasa, quimasa y carboxilpeptidasa son denominadas MCct (Connective Tissue Mast Cell), predominan en piel y submucosa intestinal y tienen núcleo como celosía y contienen gránulos amorfos; el tipo menos frecuente de células cebadas es el MCM (Mucosal Mast Cell) que solo contiene quimasa y se encuentra en la mucosa intestinal, urogenital y en la mucosa nasal. MCct intestinal, decrece en SIDA y en diversas inmunodeficiencias, mientras que MCct no muestra cambios en estas enfermedades, esto indica que existe dependencia de MCT a las células T CD4<sup>+</sup><sup>(Castells, 2000)</sup>

Las MCT de diversos tejidos pueden presentar poblaciones heterogéneas ya se han aislado diferentes transcriptores de triptasa<sup>(Xia, 1995)</sup>. La heterogeneidad de la célula cebada esta siendo demostrando en este momento a nivel de transcripción y traslación de citocinas. Estudios de hibridación *in situ* de RNA han permitido

demostrar las interleucinas IL-4, IL-5 e IL-6 y el RNAm en la piel y en el tejido nasal y bronquial de humanos. La IL-4 se encuentra predominantemente en el grupo MCTc; IL-5 e IL-6 se encuentran en MCT solamente. Estos descubrimientos son consistentes, con diferentes perfiles de generación y liberación de citocinas, dependiendo de la localización de la célula cebada y sugiere funciones biológicas específicas para los diversos subtipos de células cebadas. <sup>(Castells,2000)</sup>

En cultivos de células cebadas humanas productoras solo de quimasa, el fenotipo de la célula puede variar enormemente dependiendo del ambiente, las células cebadas provenientes del pulmón, la piel, el intestino y el útero son morfológica y funcionalmente diferentes, esto es más evidente en sus gránulos, existen gránulos con forma de tirabuzón, gránulos cristalinos, gránulos pequeños; en el pulmón son muy comunes los gránulos con forma de tirabuzón, aunque también hay presencia de gránulos pequeños <sup>(Peraray,1999)</sup>.

Al variar el contenido de los gránulos en proteasinas y citocinas, es posible que intervengan en parte a la heterogeneidad de la célula cebada. <sup>(Peraray,1999)</sup>

#### 1.4.6 Desarrollo de las citocinas en la célula cebada

Gracias a los experimentos de Kitamura <sup>(1978)</sup> al reconstituir ratones con deficiencia de células cebadas mediante trasplante de médula ósea estimuladas en cultivos con IL-3 se demostró que la influencia de factores tisulares sobre un precursor común podría influir en el crecimiento de todos los tipos de células cebadas maduras y diferenciadas. (cuadro 3)

Se ha identificado que numerosas citocinas influyen en la expresión *in vitro* de las proteasas en la población de células cebadas maduras encontradas en hígado y bazo. <sup>Castells,2000</sup>

#### 1.4.7 Migración de la célula cebada

En pacientes con rinitis alérgica se observó una modificación en la distribución de células cebadas, antes de la estación de "polen" presentaban células en el tejido conectivo de la mucosa nasal, pero durante la estación de "polen", ocurrió un incremento de células cebadas en el epitelio que se encuentra en íntimo contacto con la superficie nasal, sin embargo, el número total de células no sufrió cambio indicando que el alérgeno motivó la migración de las mismas.

Por otra parte, en ratones infectados con *trichinella spiralis* se observa que las células cebadas secuencialmente expresan diferentes proteasas conforme van apareciendo progresivamente en la submucosa del intestino, lámina propia y en el epitelio de la mucosa según la intensidad de la infección; ya en la recuperación de la enfermedad la célula cebada migró a la vellocidad y a la submucosa y alteró su fenotipo de proteasa para reacomodarse a el específico fenotipo del tejido. Queda claro entonces que la célula cebada puede alterar reversiblemente el fenotipo de sus gránulos, pero no hay estudios disponibles que indiquen que estructuras de la membrana están directamente involucradas en la migración, y que ligandos actúan directamente en ello. <sup>Castells,2000</sup> Las integrinas de la familia  $\beta 2$  están involucradas en interacciones célula-célula en la migración a través del endotelio. <sup>(Mora,2002.)</sup>

### 1.4.8 Moléculas de adhesión

Los fenotipos de las células cebadas son influidos por factores tisulares que afectan no sólo la expresión de las proteasas de los gránulos y los mediadores de membrana sino también, la expresión de moléculas de superficie. Las moléculas de superficie y adhesión celular que median la unión de la célula cebada a la matriz proteica extracelular, son factores importantes durante la diferenciación, migración y arribo de la célula<sup>(Mora,2002.)</sup>.

En el tejido conectivo la célula cebada interactúa con la matriz extracelular proteica o sea fibronectina, laminina y vitronectina y residentes celulares como los fibroblastos. La adherencia de la célula cebada a los fibroblastos es en parte mediada por la interacción de la membrana y el SCF junto con el receptor c-kit. La célula cebada se adhiere espontáneamente a la vitronectina, pero necesita la activación del FcRI para adherirse a la fibronectina y laminina<sup>(Castells 2000)</sup>. Las integrinas  $\beta 1$  median adhesión a proteínas de la matriz extracelular e inducen activación de genes importantes en inflamación<sup>(Mora,2002.)</sup>.

### 1.4.9 Receptores de activación (FcRI y Fc $\gamma$ RIII)

La activación de la célula cebada puede darse por la agregación de FcRI con la IgE y el antígeno pero, la IgG también tiene la capacidad de activar a la célula cebada. La naturaleza de los receptores de membrana Fc $\gamma$ R presentes en las células cebadas muestran afinidad baja sobre IgG; los receptores Fc $\gamma$ RIIb1, Fc $\gamma$ RIIb2 y Fc $\gamma$ RIII son específicos para IgG1, IgG2a e IgG2b, sin reacción cruzada con IgE. Estos receptores están compuestos de 3 cadenas transmembranales, una alfa y 2 gamma. La función de estas cadenas asociadas es fundamentalmente acoplar los receptores para que se originen señales que permitirán la fosforilación de las cinasas; cuando los receptores son ocupados y se propaga el flujo de señales se comprometen substratos específicos, ocurre entonces la liberación de los gránulos.<sup>Castells, 2000</sup>

### 1.4.10 Receptores de inhibición (Fc $\gamma$ RII)

Al interferir la función de la IgG, ocupando los dominios de unión de la FcRI con la IgG, la Fc $\gamma$ RII evita la liberación de serotonina, esta unión puede ser reversible al romperse la unión con la molécula Fc $\gamma$ RII, además se ha descubierto una subfamilia de glucoproteínas denominadas gp49A, gp49 B1 y gp49B2 que al unirse con la FcRI inhiben la exocitosis de mediadores.<sup>Castells, 2000</sup>

**CMH clase II.**

El CMH clase II se requiere para presentar el antígeno al linfocito T por el macrófago y generar una respuesta de la célula T cooperadora (Tc).

La expresión del CMH clase II por la célula cebada depende de su estimulación primaria por el lipopolisacárido (LPS) y secundariamente a la exposición de IL-3, el Tc induce la producción de IL-2 por la célula cebada, se sabe que anticuerpos anti-CMH II se puede evitar esta función, esto se ha visto en células de linfoma B, interfiriendo con la apropiada estimulación entre linfocito Tc y célula cebada<sup>(Castells, 2000)</sup>

**Síntesis de IgE y el ligando CD40L.**

Para que los linfocitos B produzcan IgE, se necesita la recombinación de cadenas pesadas, para que esta recombinación ocurra son necesarias las citocinas IL-4 e IL-13 y la interacción directa con Cd40L, las citocinas pueden provenir de las células cebadas en ausencia de linfocito Tc, esto ha demostrado respuesta en células cebadas en pulmón, sitios donde hay alergias e inflamación<sup>(Castells, 2000)</sup>.

**1.4.11 Participación de la célula cebada en asma**

Las células cebadas son, en orden cronológico, las primeras células efectoras y se presentan como iniciadoras, amplificadoras y causantes de la progresión de las reacciones inflamatorias alérgicas.<sup>(Holgate, 1999)</sup>

El Asma es una enfermedad alérgica, de tipo inflamatorio de las vías aéreas del pulmón, caracterizada por broncoconstricción, hipersecreción de moco e hiperreactividad de la musculatura lisa frente a distintos estímulos no solo específicos ( el alérgeno al cual el sujeto está sensibilizado) sino también no específicos ( agentes diversos como el aire frío, ejercicio).

Las constricciones intermitentes de las vías respiratorias dan los típicos síntomas asmáticos: respiración dificultosa, a intervalos más cortos y jadeo, presión en el pecho y tos. Al final, y con el paso del tiempo, los bronquiolos se fibrinizarán limitándose así el flujo aéreo lo cual puede llegar a ser crónico.<sup>(Holt, 1999)</sup>

La Alergia es el factor de mayor riesgo para el desarrollo del asma: el 90% de los asmáticos son atópicos además de la existencia de un amplio número de estudios epidemiológicos que demuestran una fuerte correlación entre asma y niveles de IgE en suero. Basándose en ello, la inhalación del alérgeno conduce a toda una cascada de eventos secuenciada en el tiempo lo cual hará posible dividir al asma en distintas fases.

Quizás las más potentes células presentadoras de antígeno en el pulmón sean las células Dendríticas residentes en la mucosa bronquial, entre el tejido subepitelial

de la mucosa respiratoria y el mismo epitelio bronquial. La consecuencia del encuentro e ingestión del alérgeno por parte de la célula dendrítica iniciará la primera fase del asma: la fase aguda o fase reactiva inmediata ( "early phase reaction")<sup>(Holgate, 1999)</sup>.

La expresión de estas moléculas en la célula dendrítica, hará que cada vez esta célula adquiera mayor capacidad presentadora, exprese más FcRI en su superficie (receptor de alta afinidad para IgE) e inductora del fenotipo Th2.

Este mayor nivel de IgE en suero hará que un mayor número de moléculas de IgE alcance los receptores de alta afinidad para IgE presentes en la superficie de las células cebadas localizadas estratégicamente en la zona fronteriza entre el entorno exterior y el interior del pulmón, distribuidas por el tejido conectivo y situadas adyacentemente a los vasos sanguíneos y linfáticos, debajo de las superficies epiteliales de las vías respiratorias. Todo hace que el alérgeno sea captado por esta IgE más eficazmente, activando así a la célula cebada y conduciendo a su degranulación, liberación de distintos mediadores y síntesis de nuevos. La liberación de mediadores es lo que origina la fase reactiva inicial<sup>(Holgate, 1999)</sup>.

Las células cebadas son, en orden cronológico, las primeras células efectoras y se presentan como iniciadoras, amplificadoras y causantes de la progresión de las reacciones inflamatorias alérgicas debido a la liberación de citocinas.

Pero a las 4-8 horas después del encuentro con el alérgeno se entra en esta siguiente fase cuyas principales características son el edema perivascular en las vías aéreas, taponamiento por exceso de mucus y presencia de linfocitos tipo Th2 activados (HLA-DR incrementado) con expresión de VLA-4 también incrementada. Estas Th2 van a ser la principal fuente de citocinas de esta fase y serán las responsables directas del reclutamiento sostenido y la activación de los eosinófilos, segundas células efectoras en orden cronológico, y de todo el infiltrado celular compuesto por monocitos, neutrófilos, plaquetas y más linfocitos T. Realmente los linfocitos Th2 van a actuar aquí como los auténticos directores de las células efectoras, las Th2 juegan un importantísimo papel en el reconocimiento del alérgeno: a partir de aquí inducirán la síntesis de IgE específica, la cual será captada por los receptores FcεRI de la superficie de la célula cebada que se activará estallando en una liberación de mediadores...repetiéndose el ciclo, incrementándose la concentración de todos los mediadores y amplificándose y perpetuándose la inflamación<sup>(Holt, 1999)</sup>.

#### **1.4.12 Actividad de la célula cebada en presencia de bacterias**

Las actividades de la célula cebada son numerosas, debido a que posee gran cantidad de mediadores (Cuadro3) que intervienen en funciones cardiopulmonares, en anafilaxia, orquestando la respuesta inmune, ayudando directamente al CMH clase II, en el proceso de inflamación, secreción de sustancias, vasodilatación, contracción de músculo liso. Pero en este trabajo interesa abordar la actividad que realiza la célula cebada en presencia de una bacteria.<sup>(Thankavel, 1997)</sup>

La célula cebada puede ser activada por una gran cantidad de bacterias gram positivas y gram negativas, se han hecho ensayos *in vitro* e *in vivo* en los que se ha observado la liberación de histamina en presencia de bacterias, en la actualidad se conoce un receptor monosilado que provoca una estrecha unión entre la célula cebada y el patógeno pulmonar *Klebsiella pneumoniae* y otros patógenos que expresan fimbrias en su superficie, y es el gen fimH que induce la unión. Adicionalmente a esto la célula posee receptores que pueden unirse a la bacteria tales como Fc $\epsilon$ R, Fc $\gamma$  y CR3, que potencialmente facilitan la activación de la célula cebada cuando la bacteria esta cubierta con IgE<sup>s</sup>, IgG<sup>s</sup>, o moléculas del complemento. Algunas toxinas o componentes de la membrana bacteriana, pueden activar a la célula, en este caso no es necesario un íntimo contacto con la bacteria. Como efecto de estas relaciones ocurre la liberación de mediadores que tienen actividad de repercusión en todo el organismo.<sup>(Thankavel, 1997)</sup>

**Cuadro 3**  
**Mediadores de la célula cebada y su efecto fisiológico *in vivo***

<b>MEDIADOR</b>	<b>EFEECTO BIOLÓGICO</b>
<b>Mediadores presentes</b>	
Histamina	Incrementa la permeabilidad vascular, la contracción de músculo liso, la fibrosis pulmonar y la quimiotaxis hacia los eosinófilos.
Serotonina	Causa rápida contracción de músculo liso e incrementa la permeabilidad vascular.
Proteasas séricas	Reparación tisular, acción fibrinolítica, activan la procologenasa y broncoconstricción.
Heparina	Anticoagulación inhibe la función de las plaquetas, inhibe la activación de los linfocitos, coadyuva a el incremento vascular e incrementa la permeabilidad vascular.
TNF- $\alpha$	Atrae y activa a los neutrófilos y atrae eosinófilos, anorexia y caquexia.
<b>Mediadores liberados en la degranulación</b>	
<b>Metabolitos del ácido araquidónico.</b>	
<b>Leucotrienos.- Slow Reactin Substance (SRS) Sustancia de reactivación retardada, son liberados por interacciones serológicas con IgE e IgG en la membrana.</b>	
LTC <sub>4</sub>	Vasoconstricción, incremento en la secreción de mucina, incremento en la permeabilidad vascular.
LTB <sub>4</sub>	Quimiotaxis para neutrófilos y eosinófilos, permite la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales.
PGD <sub>2</sub>	Broncoconstricción, vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria, incrementa la permeabilidad vascular.
TXB <sub>2</sub>	Agregación plaquetaria.

Factor Activador de Plaquetas (PAF)	Es de 100 a 1000 veces más potente que la histamina, contrae músculo liso y altera la permeabilidad vascular.
<b>Citocinas</b>	
TNF- $\alpha$	Quimiotáxis para neutrófilos, aparecen posteriormente a un estímulo bacteriano, plógeno, emaciación y anorexia.
IL-1	Activación linfocitaria, estimulación de los macrófagos, pirexia.
IL-2	Proliferación y diferenciación de células T, activación de linfocitos citotóxicos.
IL-3	Proliferación y diferenciación de células cebadas.
IL-4	Incrementa la producción de IgE, la proliferación de fibroblastos, proliferación de células cebadas, expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II.
IL-5	Diferenciación y activación de los eosinófilos.
IL-8	Quimiotáxis a neutrófilos, formación de superóxidos, aumento transitorio de calcio celular.
IL-12	Inducción de el IFN- $\gamma$ .
IL-13	Incrementa la producción de IgE, la proliferación de los fibroblastos, proliferación de células cebadas expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II.

Soman, N. 1997.

La célula cebada a través de estos mediadores tiene la capacidad de activar y modular las diversas líneas de defensa del hospedero en el pulmón durante el ataque bacteriano. (Thankavel, 1997)

#### 1.4.13 Fagocitosis y eliminación de la bacteria por la célula cebada

Adicionalmente a la liberación de los mediadores químicos, la célula cebada tiene la capacidad de englobar y digerir a la bacteria opsonizada, esto se demostró en un modelo con *Klebsiella pneumoniae*, que expresa la adhesina FimH, permitió la observación (Figura 1) de la célula cebada interactuando con la bacteria, la célula cebada ondula su membrana e introduce gradualmente a la bacteria dentro de vesículas, en promedio la total internalización ocurre en 20 minutos. Una vez dentro de la célula, la bacteria reduce su viabilidad hasta en un 50% aproximadamente en una hora, la célula cebada efectivamente tiene un efecto de lisis. El número de células cebadas que fagocitan bacterias en el sitio de infección es pequeño comparado con otras células fagocíticas, por tanto su contribución es mínima, sin embargo, es posible que la célula cebada juegue un papel dentro de la

inmunidad análogo al de la célula dendrítica (Morio, 1997). Estas células se localizan en diversos sitios del cuerpo, tales como intestino, vías respiratorias, piel y aparato genitourinario, su función principal es presentar el antígeno a los linfocitos T vírgenes mediante CMH I<sup>(Hornes, 2002)</sup>.

A partir de aquí se generan linfocitos T citotóxicos en respuesta a los antígenos bacterianos. Existen reportes de que las integrinas  $\beta 2$  participan en la fagocitosis. (Mora, 2002.)

Figura1

E. coli adheridas a la superficie de MMC

Bacterias en el momento de la ingestión y "Ruffling"



Microscopia de barrido 1000X Soman N. 1997

Para determinar la actividad de la célula cebada en una infección pulmonar, se llevó a cabo un experimento en ratones genéticamente deficientes en célula cebada (W/Wv) y en controles normales (+/+), desafiados con el patógeno *Klebsiella pneumoniae*. 6 horas después de la inoculación intranasal cada grupo de ratones fue sacrificado, se removieron los pulmones asépticamente y se procesaron para determinar el número de bacterias sobrevivientes. El número de bacterias viables por pulmón (W/Wv) fue al menos 10 veces más alto que el correspondiente a (+/+), lo que implica que la deficiencia de células cebadas limita la habilidad del animal para eliminar la infección. En ratones (W/Wv) reconstituidos con células cebadas y sometidos al mismo proceso, como la población (+/+). Al microscopio se observaron células cebadas en el parénquima pulmonar, en los bronquiolos cerca del cartilago de los bronquios y alrededor de las vénulas (Malaviya, 2001).

La célula cebada tiene mediadores que atraen neutrófilos, uno de ellos es el TNF $\alpha$ , en el mismo estudio con *K. pneumoniae* se observó el comportamiento de este mediador con un pico de neutrófilos que migraron durante las 6 horas que duró el experimento, lo que indica que la célula cebada puede modular esta respuesta (Malaviya, 2001).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La célula cebada tiene actividad broncoconstrictora durante el asma, sin embargo tiene otras funciones patofisiológicas en el organismo, es decir, durante la interacción con la bacteria puede contribuir a las secuelas de una infección. los mediadores pro inflamatorios  $TNF\alpha$  y los superóxidos aniónicos son beneficiosos para el hospedero porque promueven la llegada de los neutrófilos y son bactericidas, pero además, si son liberados en cantidades excesivas y en tiempo inadecuado, provocan que el patógeno evada o resista la respuesta inflamatoria y utilice a su favor la agresiva carga de la célula cebada, diseminándola indiscriminadamente causando un daño mayor en el tejido.<sup>(Thankavel, 1997)</sup>

En el presente trabajo se intentó demostrar la influencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* sobre la migración, presencia y degranulación de la célula cebada. Mediante la tinción de azul de toluidina que tiene la característica de hacer evidente la metacromacia que es el cambio de color de un colorante catiónico (azul de toluidina), sobre sustancias de peso molecular elevado, las sustancias que sufren metacromasia son los mucopolisacáridos de las células cebadas adquiriendo un color rojo mientras que los demás tejidos permanecen azules.<sup>Carleton, 1957)</sup>

## **2. OBJETIVO.**

**Determinar la presencia de células cebadas en cerdos después de una infección experimental con *Mycoplasma hyopneumoniae***

### 3. METODOLOGÍA

Este trabajo se derivó de una investigación sobre los efectos de la infección experimental con *Mycoplasma hyopneumoniae* y la respuesta inmune, de manera que se procesaron para estudio histopatológico<sup>(Appendini, 2000)</sup> bloques de parafina de pulmón de los cerdos experimentales para continuar la investigación.

#### 3.1 Material Biológico

1. Se utilizaron animales entre 4 y 6 semanas de edad de una granja ubicada en el Municipio de Zumpango, Estado de México, productos de hembras de más de tres partos o de 2 años de edad. Los cerdos eran negativos serológicamente a *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*.
2. Inóculo de la cepa 194 de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una suspensión de 10 ml con un título de  $10^4$  UCC/ml.

#### 3.2 Grupos experimentales y diseño experimental

Se formaron seis grupos experimentales de 2 cerdos inoculados, de 4 semanas de edad cada uno, los cerdos se mantuvieron en adaptación y observación durante una semana antes de iniciar el experimento. Se tuvieron aislados en el Bioterio de la Unidad de Posgrado de la FES Cuautitlán (U.N.A.M.) los grupos formados fueron sacrificados cada 4 días, del 0 hasta el día 20 post infección, que es el periodo aproximado de desarrollo de la enfermedad (Cuadro 4).

Cuadro 4  
Relación de sacrificio: Grupos/días

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Día 0	Día 4	Día 8	Día 12	Día 16	Día 20

A cada lechón del grupo inoculado se le administró una suspensión de 10 ml de *Micoplasma hyopneumoniae* cepa 194, con un título de  $10^4$  UCC/ml por vía endotraqueal con una sonda nasofaríngea, para lo cual el cerdo fué previamente sedado con azaperona (2mg/kg peso por vía intramuscular) y anestesiado con clorhidrato de metomidato (1.5 mg/kg, peso vía intravenosa). El día de la inoculación se designó como el día 0. Los lechones fueron observados diariamente y se les tomó la temperatura por vía rectal por la mañana y se observaron signos respiratorios como tos y disnea en agitación. Se sacrificaron 2 cerdos al azar cada 4 días (día 0, 4, 8, 12, 16 y 20) mediante el uso de los mismos medicamentos mencionados y exsanguinación. Se obtuvieron los pulmones asépticamente.

Como grupo control se tomaron los pulmones de 6 cerdos negativos a *Mycoplasma hyopneumoniae*, de 6 semanas de edad que no presentaron signos respiratorios y fueron normales al ser sacrificados (Cuadro 5).

Cuadro 5  
Distribución de animales en grupos  
GRUPOS EXPERIMENTALES

Grupos	I	II	III	IV	V	VI
Día de sacrificio	0	4	8	12	16	20
Infectados	2	2	2	2	2	1
control	1	1	1	1	1	1

Los cortes se sometieron a la tinción de azul de toluidina; durante 20 minutos siempre debieron estar húmedos.

El excedente de colorante se eliminó con alcohol metílico absoluto, finalmente se montaron y se aclararon con resina, de esta manera se conservan por tiempo indefinido en excelentes condiciones.

Se observaron al microscopio con el objetivo 40X para observar la presencia de las células cebadas, que se reconocieron por la metacromasia de sus gránulos, como control positivo de la tinción se tomó la metacromasia de la sustancia fundamental del cartilago debida al sulfato de condroitina.

Se cuantificó por tres observadores independientes, la cantidad de células cebadas en el parénquima pulmonar subyacente y en los bronquiólos (con un diámetro entre 160-320 $\mu$  en promedio). En el parénquima se determinó un campo (480 $\mu$ ), se contaron las células, posteriormente se avanzó la platina y en donde quedó el nuevo campo se hacía el siguiente el conteo. Se contaron las células cebadas en 10 campos de parénquima pulmonar subyacente por corte.

los bronquiolos se escogieron por medio de observación panorámica con el objetivo 10X, posteriormente ya seleccionados se observaron con el objetivo 40X y se hizo el conteo en el perímetro, contando 10 bronquiolos por corte, registrando su diámetro

### 3.3 Método estadístico

A los resultados obtenidos se les realizó:

- > Medidas de tendencia central (media mediana moda)
- > Medidas de desviación (desviación estándar y varianza)

#### 4. RESULTADOS

En total se obtuvieron 17 laminillas, 11 de cerdos infectados y 6 de cerdos testigo (Cuadro 6).

Cuadro 6

##### Relación de cerdos y laminillas con el día de sacrificio

Día	Grupo	Cerdos Testigos	No. Cerdo	Cerdos inoculados
0	I	Laminilla CC1	1	Laminilla C1
			2	Laminilla C2
4	II	Laminilla CC2	3	Laminilla C3
			4	Laminilla C4
8	III	Laminilla CC3	5	Laminilla C5
			6	Laminilla C6
12	IV	Laminilla CC4	7	Laminilla C7
			8	Laminilla C8
16	V	Laminilla CC5	9	Laminilla C9
			10	Laminilla C10
20	VI	Laminilla CC6	11	Laminilla C11

La distribución de las células en el tejido pulmonar siguió ciertos patrones.

En el árbol bronquial, las células cebadas fueron escasas a nivel de bronquios, se observaron escasas en la submucosa, en el conectivo relacionado con las glándulas mucosas (ver figuras, 2, 3, 4, y 5)

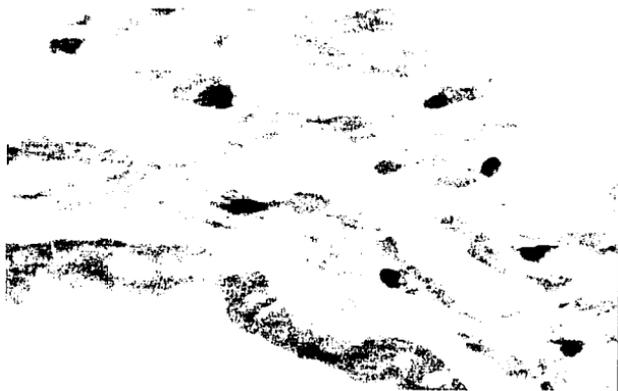
El número de células se incrementó en los bronquiolos y se observaron principalmente en el límite entre el tejido conectivo externo y la capa muscular, aunque algunas células fueron observadas en la mucosa bronquiolar. Se presentaron células en el conectivo de pleura y septos interlobulares, en algunos casos en aparente relación con vasos linfáticos.

No se observaron células asociadas al BALT, ni en vasos sanguíneos de grueso calibre como las ramificaciones de la arteria pulmonar ni las bronquiolares; sin embargo, fueron notorias en la parte externa de la capa muscular de vénulas, finalmente se observaron células en los septos alveolares.

Se observaron bronquiolos que tenían un diámetro entre 60 y 320 micras, sin embargo el promedio fue de 190 micras, con una media y una mediana de 160 micras, cabe hacer mención que en los bronquiolos de diámetro pequeños se observaron más células cebadas, además las vénulas adyacentes también presentaban hasta 3 células en su periferia.



**Fig 2.** Sección de pulmón que muestra una válvula con 2 células ciladas (células rojas ) una lesión a la capa adventicia (tinción azul de toluidina, 100X) procedente de un corazón infectado con *M. hyoscyami* y sacrificado al día 8 postinfección.



**Figura 3.** Sección de pulmón de un corazón infectado con *M. hyoscyami* , sacrificado al día 16 (tinción azul de toluidina, 40X) que muestra un irregularidad con células ciladas (Células rojas) en el pericardio adyacente.

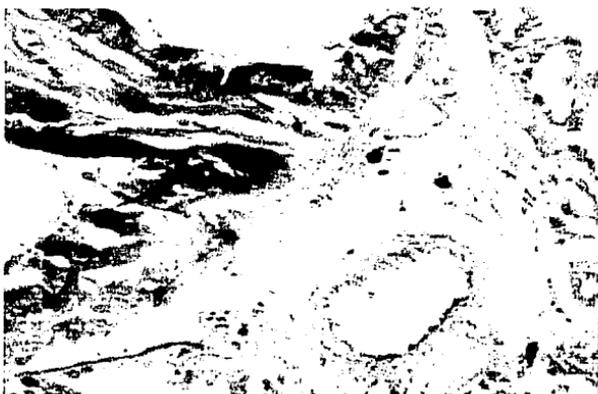


Figura 4. Sección de placenta infectada con AI. Apoyamiento al día 16 postparto mostrando una porción de 2 trofoblastos y decidua en tejido conectivo con células oscuras (Células rojas) (Tinción azul de toluidina, 200x).



Fig 5. Se muestra un trofoblasto con células oscuras (Células rojas) en la capa decidua, procedente de un embrión sacrificado al día 8 postparto con AI. Apoyamiento (Tinción azul de toluidina, 200x).

Tres observadores independientes realizaron por separado lecturas de cada una de las laminillas, dichas lecturas se promediaron con el fin de cruzar los datos obtenidos en una gráfica.

Los grupos resultantes tenían una cantidad reducida de individuos, por tanto no fue posible insertarlo en un programa estadístico, la información fue cruzada con el fin de crear una base de datos en la cual se pudieran tomar en cuenta las variables de bronquiolo, parénquima y tiempo además de obtener las gráficas en el programa Excel.

Se creó un promedio con las cuentas totales de los 2 cerdos infectados por día de sacrificio; con el fin de enfrentarlos con el cerdo control.

Quedando de la siguiente manera:

Cuadro 7  
Promedio de las tres lecturas independientes

Día	Cerdos	Parénquima	Bronquiolos
0	Infectados	1	3
	Control no infectado	3	6
4	Infectados	1	1
	Control no infectado	1	2
8	Infectados	4	8
	Control no infectado	1	1
12	Infectados	1	2
	Control no infectado	1	2
16	Infectados	2	8
	Control no infectado	1	2
20	Infectados	5	11
	Control no infectado	1	2

figura 6

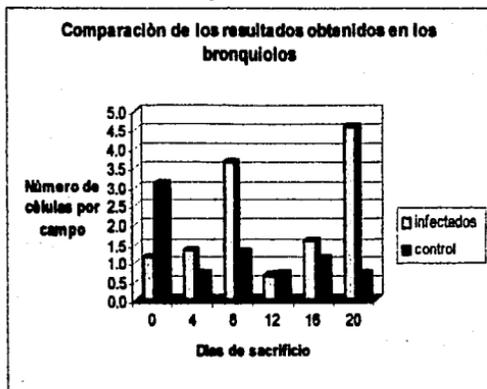


figura 8

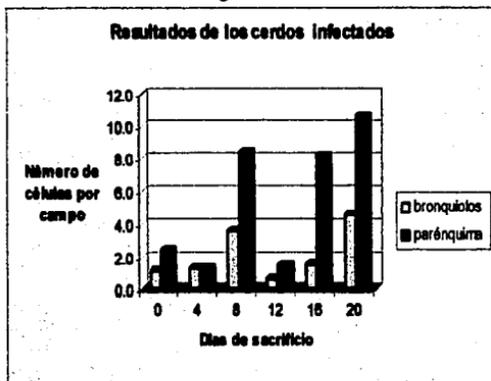


figura 7

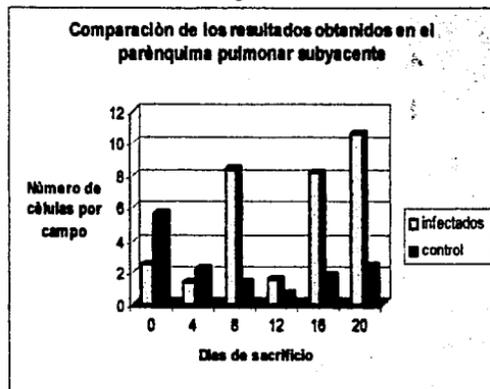
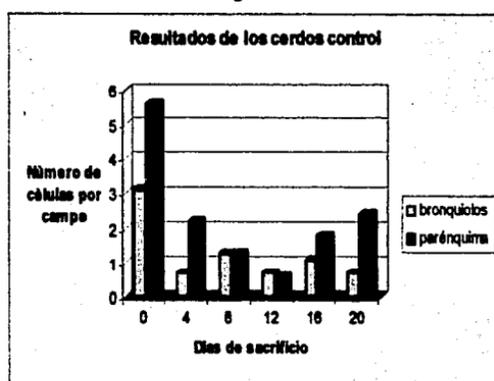


figura 9



## Estadísticas descriptivas, media con máximos y mínimos estadísticamente significativos

figura 10

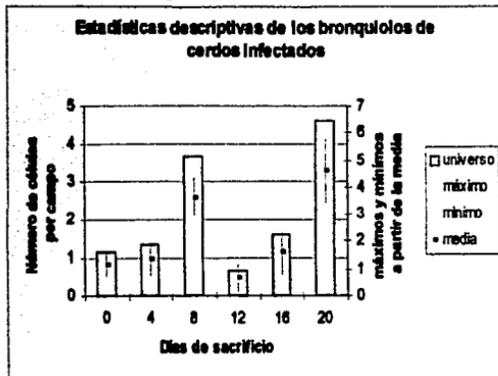


figura 12

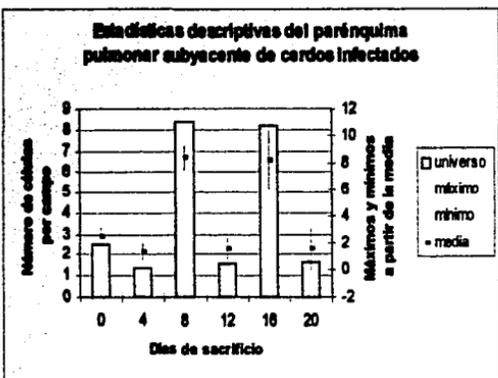


figura 11

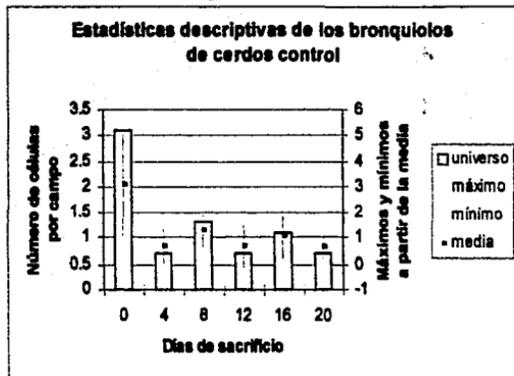
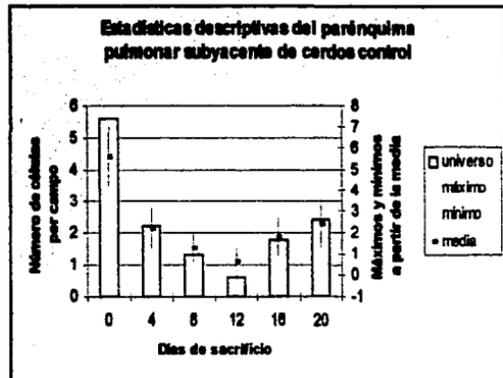


figura 13



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cuadro 8

Estadísticas descriptivas de las células cebadas cuantificadas en bronquiolos de cerdos infectados y control

Tiempo	Tratamiento	Media y Desviación estándar	Número de campos
0	Infectado	1.150+/- .474	10
4	Infectado	1.350+/- .626	10
8	Infectado	3.650+/- .709	10
12	Infectado	.650+/- .530	10
16	Infectado	1.600+/- .810	10
20	Infectado	4.600+/- 1.174	10
0	Control	3.100+/- 2.079	10
4	Control	.700+/- .675	10
8	Control	1.300+/- .675	10
12	Control	.700+/- .823	10
16	Control	1.100+/- .876	10
20	Control	.700+/- .483	10

cuadro 9

Estadísticas descriptivas de las células cebadas cuantificadas en parénquima de infectados y control

Tiempo	Tratamiento	Media y Desviación estándar	Número de campos
0	Infectado	2.500+/- .667	10
4	Infectado	1.350+/- .709	10
8	Infectado	8.400+/- .876	10
12	Infectado	1.550+/- .864	10
16	Infectado	8.200+/- 2.188	10
20	Infectado	16.600+/- 1.713	10
0	Control	5.600+/- 1.430	10
4	Control	2.200+/- .919	10
8	Control	1.300+/- .675	10
12	Control	.600+/- .699	10
16	Control	1.800+/- .919	10
20	Control	2.400+/- 1.075	10

## 5. DISCUSIÓN

Se identificaron células cebadas por la reacción metacromática de sus gránulos, técnica que se considera aún, como la más adecuada para identificar estas poblaciones celulares, aunque obviamente no distingue entre las diversas subpoblaciones ya identificadas (Castells, 2000) y con la limitante de que no permite observar las células deganuladas presumiblemente "activadas".

Este trabajo forma parte de un estudio acerca de la influencia de *M. hyopneumoniae* sobre la respuesta inmune celular, un trabajo previo demostró la dinámica de linfocitos T con marcadores  $CD4$  y  $CD8$ , en este trabajo las células  $T^{CD4}$  se encuentran en mayor número alrededor de bronquios y bronquiólos y en el día 8 post infección se observó su incremento, al mismo tiempo que ocurrió activación del tejido linfoide asociado a bronquiólos (BALT) y células  $T^{CD4}$  se encontraron en la luz de bronquios y bronquiólos (Cruz, 2000). Las células  $T^{CD8}$  se encontraron en todo el tejido, alrededor de los vasos sanguíneos y en mayor número comparadas con las células  $T^{CD4}$  (Cruz, 2000).

La célula cebada presentó un comportamiento similar al de los linfocitos  $CD4$  y  $CD8$ , observándose en los bronquiólos, alrededor de los vasos sanguíneos y cerca del BALT. El incremento de células cebadas con una dinámica semejante a la de los linfocitos  $CD4$  y  $CD8$ , sugiere que o bien los mismos mecanismos que reclutan a los linfocitos reclutan a las células cebadas o que el incremento de células T y la mayor presencia de sus mediadores (linfocinas), estimula a los precursores de las células cebadas. Se ha descrito una asociación entre las células cebadas dentro y alrededor del epitelio respiratorio, los nervios y linfocitos de  $T$  (Bienenstock, 1994), así como su capacidad de producir citocinas con patrones de comportamiento similares a las linfocinas producidas por los linfocitos  $Th^2$  (Enckso, 1995).

El patógeno (*M. hyopneumoniae*) puede inducir la presencia de células cebadas al estimular directamente su reclutamiento o al inducir mecanismos inmunes y/o inflamatorios con este efecto, estudios recientes demostraron que la célula cebada tiene la capacidad de modular la respuesta inmune innata hacia las bacterias gram negativas, por medio de la fagocitosis, procesando y presentando antígeno a los linfocitos T (Malavya, 2001).

Por influencia de un alérgeno, las células cebadas que se encuentran en el tejido conectivo migran hacia el epitelio, sin embargo, el número total de células no se incrementa, las células simplemente se posicionan en espacios adecuados a su función (Castells, 2000).

Los resultados cuantitativos indican que las células cebadas en los cerdos infectados aumentan conforme progresa la infección con *M. hyopneumoniae*, lo

que es más, es mayor el número de células en los bronquiolos, donde se multiplica el patógeno, que en el parénquima pulmonar adyacente. Por otra parte, los controles no infectados inician con un número superior al de los infectados posteriormente la respuesta baja y se mantiene en un mismo nivel hasta el final del experimento, esto se debe posiblemente a que todos los cerdos fueron inoculados el mismo día y sufrieron las mismas condiciones de estrés, por el método de inoculación con sonda intratraqueal, para afirmar esta asociación de estrés con células cebadas hubiera sido necesario evaluar esta población celular en animales no manipulados.

En cuanto a la descripción histológica las células cebadas mostraron en su mayoría morfología ahusada, algunas se identificaron solo por su metacromacia, en otras era posible ver sus gránulos. En cuanto a su distribución la mayor parte de estas células se observaron en los bronquiolos de menor tamaño ( $60\mu$ ) donde se contaron hasta cinco células cebadas, en la capa muscular de algunas arteriolas y vénulas se contaron tres CC y en el tejido conectivo de bronquiolos, algunas muy cercanas al BALT pero nunca dentro de él. Los resultados indican que hay una mayor distribución de células cebadas en los bronquiolos con respecto al parénquima. En un trabajo previo en bovinos las CC se encontraron principalmente en el tejido conectivo de la lámina propia y en la muscular de la porción peribronquiolar, así como en la muscular y adventicia de algunos vasos sanguíneos, en este caso los conteos de células cebadas, fueron hechos en bronquiolos de lóbulos craneales de cada pulmón y segmentos broncopulmonares dorsales y ventrales de los lóbulos caudales, esta cuantificación concluye que el número de células cebadas en las distintas porciones del pulmón es similar en condiciones normales<sup>(Perez, 1986)</sup>. No se encontraron trabajos semejantes en cerdos y los resultados de este trabajo no coinciden con lo observado en bovinos normales, las diferencias pueden atribuirse a particularidades de cada especie, a la presencia del patógeno o a una combinación de ambas situaciones.

## 6. CONCLUSIONES

Se analizó la respuesta de las células cebadas en la neumonía producida por la inoculación intratraqueal de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos convencionales y se encontró:

- Hubo una diferencia numérica en la respuesta de las células cebadas, la cual fue mayor en bronquiolos con respecto al tejido pulmonar adyacente.
- En el bronquiolo se encontró que los máximos niveles estadísticamente significativos fueron los días 8, 16 y 20 ( $p < 0.05$ ).
- Se observó en tejido pulmonar que los niveles estadísticamente significativos fueron los días 8 y 20 ( $p < 0.05$ ).
- De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, *Mycoplasma hyopneumoniae* tiene la capacidad de provocar la migración y reclutamiento de células cebadas en los primeros días de infección.
- Aparentemente, no existen reportes de la presencia y acción de la célula cebada en el tejido pulmonar de cerdos en condiciones de infección.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## 7. LITERATURA CITADA

- Ahlstedt, S. Smedegard, G.; immune response in rats immunized with aerolized antigen. Antibody formation, lymphoblastic response and mast cell and globet cell development related to bronchial reactivity; Int. Arch. Appl. Immunol; 72, 71-78, 1983.
- Appendini, C. M., Cornejo, M. A. Manual de Histología Veterinaria., 3ª Edición. UNAM; 2000.
- Bancroft, J. D., Stevens, A.; Theory and Practice of Histological Techniques; 3ª Edición; Churchill Livingstone; U.S.A.; 1990.
- Banks, W. J. ; Histología Veterinaria Aplicada; 1ª Edición; El Manual Moderno; México; 1986.
- Barret, J.; Textbook of Immunology; 5ª Edición; Mosby. U.S.A.; 1988.
- Befus, A. D.; Mast cell heterogeneity and functions in mucosal defenses and pathogenesis; Essentials of mucosal immunology; 1ª edición; Academic Press; Canada; 1996.
- Bochner. B. Schleimer. R; Mast cells, basophils and eosinophils; Immunological Reviews Vol. 179 5-15; USA; 2001.
- Castells. M.; Mast cells: Molecular and cell biology; The Internet Journal of Asthma, allergy and immunology 2000; Vol2 No.1; USA; 2000.
- Chu, R. M., Huang, Y. T; Changes of epithelial cells covering the intrapulmonary airway-associated lymphoid tissues after mycoplasma hyopneumoniae inoculation; Immunobiology; 4, 75; japan; 1993.
- Cormack, D. H.; Introduction to Histology; 1ª Impresión; J.B. Lippincott; U.S.A.; 1984.
- Cruz, S. T.; Efecto de la infección experimental de *Mycoplasma hyopneumoniae* sobre la inmunidad celular en el pulmón de lechones; Tesis; Fac. de Est. Sup. Cuautitlán; UNAM; México; 2000.
- Delves, P. J. Roitt, I. M.; Encyclopedia of Immunology; 2ª Edición; Academic Press; U.S.A.; 1998.

- Dyce, K. M. Sack, W. O.; *Anatomía Veterinaria*. 2ª Edición; Mc Graw-Hill. México 1999.
- Enciso, J.A.; Modulation of tumor necrosis factor alpha mRNA levels by interferons in different populations of mast cells; *Adv. in mucosal Immunology*; 293-295; Canada. 1995.
- Estrada, F. E., Peralta. Z. L.; *Manual de Técnicas Histológicas*; 1ª Edición; AGT Editor; México; 1982.
- Fawcett, D. W.; *Tratado de histología*; 1ª Edición. Interamericana; México; 1989.
- Galli, S. J.; New concepts about the mast cell; *N. Engl. J. Med.* 328: 257-256; England; 1993.
- García, T. G. *Memorias del curso de enfermedades respiratorias del cerdo; Resumen de la Anatomía Del Aparato respiratorio del Cerdo*; En prensa; 2001.
- Goldsby R. Kindt T.; *Immunology*; 3ª Edición; Freeman & Company. U.S.A.; 2000.
- Holgate, S. T.; the role of mast cells and basophils in inflammation; *Clin. Exp. Allergy*; 30 (SI) 28-32. USA; 1999.
- Holt, P. G.; The role of allergy in the development of asthma; *Nature*: 402 B12-B17 (1999)
- Leeson, T. S.; *Atlas de Histología*; 1ª Edición; Interamericana; México; 1988.
- Malaviya, R., Soman, N. A.; mast Cell modulation of immune responses to bacteria; *Immunological Reviews*. 179: 16-24; U.S.A. 2001.
- Montaraz, J. A.; *Introducción a la inmunología*; UNAM; 1ª edición; México; 1997.
- Peraray, L. O. Jiri, M.; *Mucosal Immunology*. 2ª Edición; Academic Press; U.S.A.; 1999.

- Pérez, M.; *Parámetro de distribución de los mastocitos en Pulmones Bovinos.*; Tesis de Licenciatura.; Fac. de Med. Vet. y Zoot.; UNAM; México; 1986.
- Rocha, E. A.; *Valoración de seis fórmulas fijadoras para evidenciar mastocitos en cortes de tejido de siete especies de mamíferos domésticos*; Tesis de licenciatura; Fac. de Med. Vet. Y zoot; UNAM; México; 1985.
- Straw. E; Sylvie D; *Diseases of Swine*; 8ª Edición; Iowa State University Press; U.S.A.;1999.
- Thankavel, K., M. R.; *Mast cells as modulators of host defense in the lung*;Frontiers in Bioscience. 2, d 78-87. U.S.A. 1997.
- Thomas, W. R., Holt, P. G.; *The growth of transplanted tumours in mice after chronic inhalation of fresh cigarette smoke*; Br. J. Cancer;30, 459-462; England; 1974.
- Tizard, I.; *Inmunología Veterinaria*; 5ª Edición; Interamericana; México; 1995.
- Valent, P.; *Variable expression of activation linked surface antigens on human mast cells in health and disease*; Immunological reviews 179: 74-81; Austria; 2001.