



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y SANIDAD ANIMAL

UNIDAD DE PARASITOLOGÍA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS

**RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL DEL
PORCINO IBÉRICO FRENTE A LA METASTRONGYLOSIS**

MARÍA ALCAIDE ALONSO
CÁCERES, SEPTIEMBRE de 2005



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y SANIDAD ANIMAL

UNIDAD DE PARASITOLOGÍA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS

**RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL DEL
PORCINO IBÉRICO FRENTE A LA METASTRONGYLOSIS**

Vºbº

Los Directores

Prof. Dr. Ignacio Navarrete López-Cózar.

Prof. Dr. David Reina Esojo

Dra. Eva Frontera Carrión

Memoria presentada por la licenciada en Veterinaria
MARÍA ALCAIDE ALONSO,
para optar al grado de Doctor con mención Europea.
Cáceres, septiembre de 2005.

DAVID REINA ESOJO, Catedrático de Parasitología y Enfermedades Parasitarias del Departamento de Medicina Y Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, Universidad de Extremadura.

INFORMA:

Que la Licenciada en Veterinaria **MARÍA ALCAIDE ALONSO**, he realizado en la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, bajo mi dirección y la del Dr. Ignacio Navarrete López-Cózar y la Dra. Eva Frontera Carrión, el presente trabajo de investigación titulado **“Respuesta celular y humoral del porcino ibérico frente a la metastrongylosis”**, con el que opta al título de Doctora con mención Europea en Veterinaria.

Que en todo momento ha demostrado gran rigor científico en el desarrollo de esta memoria, utilizando todos los medios puestos a su alcance para la consecución de los objetivos marcados.

Por todo ello, y para que conste en su memoria de Doctorado, firmo el presente informe en Cáceres, veinticuatro de junio de 2005.

Prof. Dr. David Reina Esojo.

A Ignacio.

A mi familia.

*No hay tiempo de sentir el desconsuelo;
sigue la vida, urgente y transitoria.
Muda la meta de tu trayectoria
y rasga del mañana el hondo velo.
Si el sentimiento, más desobediente,
se niega al natural imperativo,
álzate tú, versátil y valiente.
Tu oficio es cotidiano y decisivo;
mientras alumbre el sol serás ardiente;
mientras dure la vida estarás vivo.*

ÍNDICE



1.- INTRODUCCIÓN.....	3-4
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7-81
2.1.-El parásito: <i>Metastrongylus apri</i>	7-33
2.1.1.- Encuadre taxonómico.....	7
2.1.2.- Morfología.....	7
2.1.3.- Ciclo biológico y epidemiología.....	11
2.1.4.- Prevalencia y factores epidemiológicos.....	16
2.1.5.- Patogenia de la enfermedad.....	23
2.1.6.- Lesiones.....	25
2.1.7.- Signos clínicos.....	28
2.1.8.- Diagnóstico.....	28
2.1.9.- Tratamiento y control.....	30
2.2.-El hospedador intermediario: <i>Eisenia foetida</i>	33-40
2.2.1.- Encuadre taxonómico.....	33
2.2.2.- Morfología y Biología.....	34
2.2.3.- Métodos de cría y manejo del lombricultivo.....	37
2.2.4.- Relación de <i>Metastrongylus spp.</i> y <i>Eisenia foetida</i>	39
2.3.-El hospedador definitivo: <i>cerdo ibérico</i>	41-46
2.3.1.- Características de la raza porcina ibérica.....	41
2.3.2.- Sistemas de explotación.....	43
2.4.-Sobre la relación parásito-hospedador: Inmunobiología.....	46-67
2.4.1.- Inmunocompetencia de los porcinos.....	46
2.4.1.1.-Inmunidad innata.....	47
2.4.1.2.-Inmunidad adquirida o adaptativa.....	48
2.4.1.3.-Características diferenciales del sistema inmune de los porcinos.....	50
2.4.2.- Respuesta inmunológica de los porcinos frente a las parasitosis.....	58

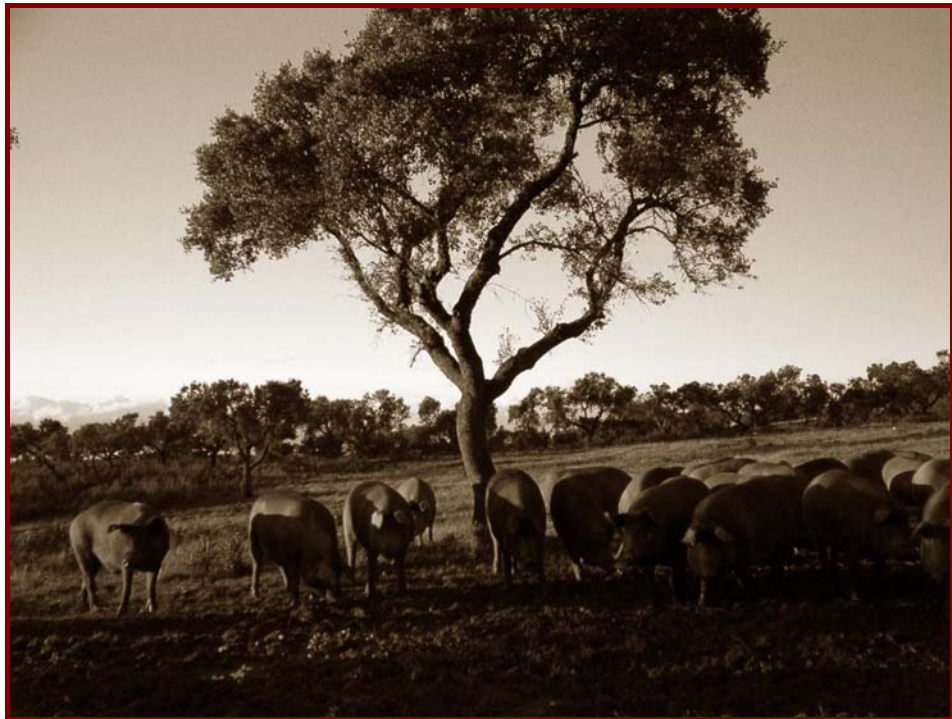
2.4.2.1.-Respuesta inmune de los porcinos frente a <i>Metastrongylus spp</i>	59
2.4.2.2.-Respuesta inmune de los porcinos frente a otras parasitosis.....	61
2.4.3.-Respuesta inmunológica de los porcinos frente a otras patologías.....	65
2.5.-Sobre la inmunobiología de otras especies frente a las parasitosis pulmonares.....	67-69
2.6.-Sobre la infección experimental por <i>Metastrongylus spp</i>	69-73
2.6.1.- Obtención de larvas 3 infectivas.....	70
2.6.2.- Ensayos de infección experimental con <i>Metastrongylus spp</i> . en los porcinos.....	71
2.7.- Sobre la inmunización frente a <i>Metastrongylus spp</i>	73-75
2.7.1.- Obtención de antígenos de <i>Metastrongylus spp</i>	73
2.7.2.- Ensayos de inmunización en cerdo y hámsteres.....	74
2.8.- La citometría de flujo en la investigación en ciencias de la salud.....	75-81
2.8.1.-Concepto y principios básicos de la citometría de flujo.....	75
2.8.2.-El citómetro y su funcionamiento.....	77
2.8.3.-Aplicaciones de la citometría de flujo.....	79
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	85-123
3.1.-Planteamiento investigador.....	85
3.2.-Diseño experimental.....	85-87
3.3.-Animales.....	87-90
3.3.1.-Lombrices de tierra.....	87
3.3.2.-Cerdos.....	88
3.4.- Material infectivo: Larvas 3.....	90-93
3.4.1.- Obtención de larvas 3 infectivas.....	90
3.4.2.- Dosificación y administración del material infectivo.....	92
3.5.-Obtención de antígenos.....	94-96
3.5.1.-Antígeno somático larvario (ASL).....	94
3.5.2.-Antígeno somático de adultos (ASA).....	95

3.6.-Obtención y administración de los inóculos para la inmunización de los cerdos.....	96-97
3.6.1.-Inóculo de antígeno somático larvario (ASL).....	96
3.6.2.-Inóculo de antígeno somático de adultos (ASA).....	96
3.6.3.-Administración del inóculo en la inmunización de los cerdos.....	97
3.7.- Determinación de la concentración proteica de los antígenos.....	97-98
3.8.- Procesado de las muestras obtenidas de los cerdos.....	98-101
3.8.1.- In vivo: Heces, sangre y suero sanguíneo.....	99
3.8.2.- Necropsias: Tejidos orgánicos.....	100
3.9.- Métodos de recuperación de larvas y adultos.....	102
3.10.-Métodos histopatológicos.....	103
3.11.-Análisis coprológicos.....	104
3.12.-Análisis hematológicos.....	105-106
3.13.-Análisis serológicos: Técnica inmunoenzimática ELISA.....	106-110
3.13.1.- Estandarización de la técnica.....	106
3.13.2. Desarrollo de la técnica.....	107
3.14.-Análisis por Citometría de flujo laminar.....	110-122
3.14.1.- Procesado de las muestras.....	111
3.14.2.-Desarrollo de la técnica.....	116
3.14.3.-Representación gráfica de las poblaciones celulares.....	119
3.15.- Análisis estadísticos.....	123
4.- RESULTADOS.....	127-226
4.1.- Resultados biopatológicos.....	127-130
4.2.- Resultados anatomopatológicos.....	130-149
4.3.- Resultados parasitológicos.....	149-156
4.3.1.-Cuantificación, longitud, ratio hembra/macho y distribución de <i>M. apri</i> en el pulmón.....	149
4.3.2.-Resultados coprológicos.....	154
4.3.3.- Recuento de las manchas de leche en hígado.....	155
4.4.- Resultados de la respuesta eosinofílica.....	156-158

4.5.-Resultados inmunológicos.....	158-223
4.5.1.- Respuesta inmune celular.....	158-201
4.5.1.1.-Estudio de la evolución de los Linfocitos T.....	158
4.5.1.2.-Estudio de la evolución de los Linfocitos B.....	172
4.5.1.3.-Estudio de la evolución de los Macrófagos y Monocitos	174
4.5.1.4.-Respuesta celular por grupos experimentales.....	176
4.5.1.5.-Correlaciones entre los resultados parasitológicos y de la respuesta celular.....	201
4.5.2.- Respuesta inmune humoral.....	201-223
4.5.2.1.-Estudio de la evolución de la Ig M.....	202
4.5.2.2.-Estudio de la evolución de la Ig G.....	204
4.5.2.3.-Estudio de la evolución de la Ig G ₁	206
4.5.2.4.-Estudio de la evolución de la Ig G ₂	209
4.5.2.5.-Respuesta inmune humoral por grupos experimentales.....	212
4.5.2.6.- Correlaciones entre los resultados parasitológicos y la respuesta humoral.....	222
4.6.- Correlaciones entre las respuestas celulares y humorales.....	223-226
5.- DISCUSIÓN.....	229-256
5.1.- Sobre la respuesta biopatológica de los cerdos frente a <i>M. apri</i>	229-230
5.2.- Sobre las lesiones anatomopatológicas.....	230-233
5.3.- Sobre los resultados parasitológicos.....	233-238
5.3.1.-Cuantificación, longitud, ratio hembra/macho y distribución de <i>M.</i> <i>apri</i> en el pulmón.....	233
5.3.2.-Resultados coprológicos.....	236
5.3.3.- Recuento de las manchas de leche en hígado.....	237
5.4.- Resultados de la respuesta eosinofílica.....	238-239
5.5.-Sobre la respuesta inmunológica de los porcinos frente a <i>M.</i> <i>apri</i>	239-254
5.5.1.- Respuesta inmune celular.....	240

5.5.2.- Respuesta inmune humoral.....	248
5.6.-Correlación entre la respuesta inmune celular y humoral frente a <i>M. apri</i>	254-255
5.7.-Direcciones futuras.....	256
6.- CONCLUSIONES.....	259-260
7.- RESUMEN.....	263-267
8.- SUMMARY.....	271-274
9.- RESUMO.....	277-281
10.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍAS.....	285-306
11.- AGRADECIMIENTOS.....	309-310

1. INTRODUCCIÓN



La metastrongylosis es una enfermedad parasitaria de las vías respiratorias profundas producida por los nematodos pertenecientes a la Superfamilia Metastrongyloidea. Afecta principalmente al cerdo y a especies afines de vida silvestre, como el jabalí (*Sus scrofa ferus*) y el pecari (*Pecari angulatus*).

Actualmente, en España es la principal causa parasitaria de los desórdenes respiratorios de los cerdos criados en extensivo, especialmente de raza Ibérica. Los vermes pulmonares de los porcinos provocan una sintomatología de carácter respiratorio, cuyo signo clínico principal es una tos seca persistente que puede ir acompañada de disnea, bronconeumonía, pérdida irreversible de peso, etc. Además, estos metastrongyloideos han sido reconocidos como agentes potenciadores o favorecedores de otras patologías de origen bacteriano y/o vírico; por ello, esta parasitosis tiene una considerable importancia económica debida a las sustanciales pérdidas que ocasiona en el sector porcino mundial.

En algunos países la metastrongylosis tiene una importancia decreciente por la masiva implantación de las explotaciones en régimen intensivo, aunque se trata de la segunda parasitosis más importante que afecta al ganado porcino, tras la ascariosis. En España, se han detectado prevalencias altas en numerosas comunidades, tratándose de una parasitosis de importancia creciente por la proliferación de las explotaciones de tipo extensivo o semi-extensivo, en las que el cerdo se halla expuesto a los hospedadores intermediarios, la lombriz de tierra. Incluso, en países con un alto nivel de industrialización de la producción porcina como puede ser Dinamarca, donde no se ha detectado la presencia de *Metastrongylus spp.* durante las últimas cinco décadas, son varios los autores que denuncian la posible reintroducción de estas especies ya erradicadas, debido a la incipiente implantación de las explotaciones orgánicas o ecológicas en la UE. Por ello, el resurgimiento de la cría tradicional del porcino Ibérico con más vigor que nunca, ha llevado a esta parasitosis a primera línea del panorama parasitológico.

Las repercusiones de la infección por *Mestastrongylus spp.* en los porcinos fue objeto de estudio principalmente en la década de los 50 y 60. Todos los ensayos de infecciones experimentales llevados a cabo, iban encaminados al establecimiento de la cronología de las lesiones producidas, tanto a nivel macroscópico como microscópico, al conocimiento de la influencia de la edad de los animales, la repercusión de diferentes

dosis infectivas en el desarrollo de la sintomatología y más recientemente, a la evaluación de la efectividad de diversos antiparasitarios.

Con el desarrollo de nuestros estudios, pretendemos conocer en profundidad la repercusión a nivel multiorgánico de la metastrongylosis en el ganado porcino. Se ha pretendido reproducir experimentalmente, diferentes situaciones de infección que pudieran darse en la naturaleza. Incluso, algunos de los animales fueron inmunizados con diferentes extractos antigénicos del parásito, con objeto de evaluar el grado de resistencia frente a los diferentes tratamientos practicados.

Así, se realizó el estudio comparativo entre los diferentes grupos del estudio de los síntomas mostrados por los animales, de las lesiones macroscópicas en los pulmones e hígados, de la histopatología en pulmones, hígados y ganglios, del número de larvas y adultos totales presentes en el pulmón, del número de huevos eliminados con las heces, del recuento diferencial de los eosinófilos y de la respuesta inmune celular y humoral desarrollada por el animal.

Con todo ello, este trabajo supone una primicia en el estudio de los mecanismos inmunológicos desencadenados, tanto a nivel sistémico como local, por los suínos frente a diversas pautas de infección con *Mestastromylylus apri*. Para tal fin, han sido empleadas las técnicas de mayor sensibilidad y especificidad en la determinación de los diversos parámetros inmunológicos analizados, como son la técnica ELISA y la citometría de flujo laminar.

Los resultados obtenidos tras el análisis de las diferentes poblaciones celulares presentes en muestras de sangre periférica, ganglio torácico-pulmonar y lavados broncoalveolares, principalmente de los linfocitos y monocitos-macrófagos, nos han permitido esbozar las posibles vías alternativas que adopta el sistema inmune porcino frente a esta parasitosis.

Para el estudio de la respuesta humoral desarrollada por los porcinos de los diferentes grupos experimentales se han analizado dos isotipos de inmunoglobulinas, IgG (T-dependientes) e IgM (T-independientes), y dentro de las IgG se analizaron las subclases IgG₁ e IgG₂. Según fue la tendencia a producir un tipo u otro, se reveló cuál fue la clase de respuesta inmunitaria desencadenada en los porcinos frente a *M. apri*, Th2 o Th1.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2.1.- El parásito: *Metastrongylus apri*.

2.1.1.- Encuadre taxonómico.

La especie *Metastrongylus apri* pertenece al género *Metastrongylus* (Molin, 1846), el cual es el único componente de la familia *Metastrongylidae*. Ésta se encuadra dentro de la superfamilia *Metastrongyloidea*, Orden *Strongylida*, Clase *Secernentea* (*Phasmidia*), Phylum *Nematoda*.

2.1.2.- Morfología.

Los parásitos adultos son vermes blanquecinos y filiformes de varios centímetros de longitud (Fig. 2.1.). La boca o extremo anterior posee dos labios trilobulados, siendo el del medio de mayor tamaño, la cápsula bucal es muy pequeña y el esófago tiene forma de huso (Fig. 2.2.).

Estudios ultraestructurales llevados a cabo sobre el intestino de *Metastrongylus spp.* han mostrado que se compone de una lámina simple de células epiteliales asentadas sobre una membrana basal. Estas células en el borde exterior presentan numerosas microvellosidades con extremos dilatados, lo que indica su relación con los procesos de absorción, secreción y excreción (Jenkins y Erasmus, 1969).



Fig. 2.1. Adultos de *Metastrongylus spp.*

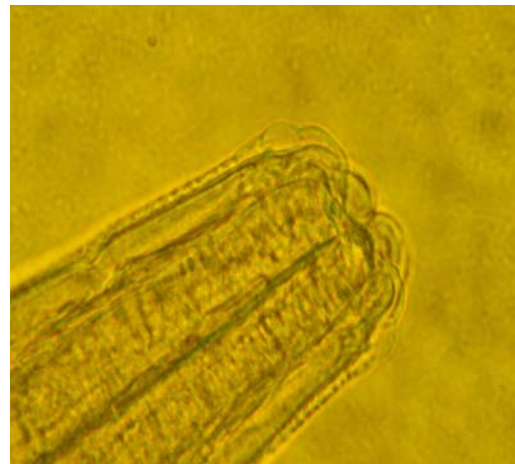


Fig. 2.2. Detalle del extremo anterior.

La bolsa copuladora de los machos tiene dos grandes lóbulos laterales, siendo el dorsal el más pequeño. Las costillas o rayos que constituyen la bolsa copuladora son gruesas y digitiformes, mientras que las espículas son largas, delgadas y estriadas,

además pueden presentar gubernáculo o no. El extremo posterior de la hembra posee un abultamiento prevulvar, dando un aspecto a su extremo caudal de digitiforme o cónico, la vulva se sitúa cerca del ano (Fig. 2.3.). Los huevos del género *Metastrongylus* están larvados al ser expulsados por la hembra (Fig. 2.4.).



Fig. 2.3. Extremos posteriores de hembras adultas de *M. apri*, *M. pudendotectus* y *M. salmi*.



Fig. 2.4. Huevo embrionado de *M. apri*.

Hasta hoy se han descrito seis especies diferentes incluidas dentro del género *Metastrongylus*:

***Metastrongylus apri* (Gmelin, 1790).**

Anteriormente denominada *Metastrongylus elongatus*, se localiza en tráquea, bronquios y bronquiolos del cerdo, jabalí y pecari, en todas las partes del mundo. También se ha encontrado en vacuno, ovino, cánidos y humanos. El macho adulto mide 1'1-1'8 cm de longitud, presenta un cono genital bien desarrollado y no posee gubernáculo. Las espículas son filiformes de 3'9-5'5 mm, que finalizan en un gancho (Fig. 2.5.). La hembra adulta mide 2'0-4'5 mm de largo, la vulva es posterior y el abultamiento prevulvar es de tamaño medio con forma de “dedo de gallina” (Fig. 2.6.) (Holló, 1965). El hecho de presentar el orificio genital al final del cuerpo, confiere al útero un excepcional tamaño en las hembras adultas. Este fenómeno se relaciona con la adaptación que ha sufrido esta especie para producir huevos que puedan resistir durante más tiempo en el medio ambiente (Kolevatova, 1976). La superficie de estos huevos es rugosa y miden aproximadamente entre 45-57 x 38-42 μm (Fig. 2.4.).



Fig. 2.5. Detalle de las espículas de un macho de *M. apri*.



Fig. 2.6. Detalle del extremo posterior de una hembra de *M. apri*.

***Metastrongylus pudendotectus* (Vostokov, 1905).**

Antiguamente, se encuadraba dentro del género *Chaerostrogylus*. Generalmente, se encuentra en tráquea, bronquios y bronquiolos de cerdo y jabalí (Holz y Tjioe Lian, 1968).

El macho mide 1'4-1'9 cm, la bolsa copuladora está flexionada ventralmente, el cono genital está poco desarrollado, las espículas tienen un doble gancho posterior y poseen gubernáculo (Fig. 2.7.).

Las hembras miden de 1'9 a 5'5 cm de largo, el abultamiento prevaginal es subsférico y posee una cutícula transparente que envuelve a la provagina (Fig. 2.8.). Los huevos miden entre 47-64 x 39-45 μm y cuando son expulsados por la hembra aparecen con una cubierta rugosa y embrionados.



Fig. 2.7. Detalle de las espículas y bolsa copuladora de un macho de *M. pudendotectus*.



Fig. 2.8. Detalle del abultamiento prevaginal de una hembra de *M. pudendotectus*.

***Metastrongylus salmi* (Geddoelst, 1923).**

Se ha hallado en tráquea, bronquios y bronquiolos de cerdo, jabalí y pécari. El macho mide entre 1'4-1'8cm de longitud, las espículas son más pequeñas que las de *M. apri* y terminan en gancho.

Las hembras miden entre 3'0 y 4'0 cm de largo, la prominencia prevulvar es de tamaño medio o reducido, y la vulva está muy cerca del extremo posterior (Fig. 2.9.). Los huevos que se encuentran embrionados al ser puestos, miden entre 43-57 μm de largo y entre 38-41 μm de ancho (Holló, 1965).



Fig. 2.9. Detalle del extremo posterior de una hembra de *M. salmi*.

***Metastrongylus confusus* (Jansen, 1964).**

Es parásito del jabalí, hasta la fecha no ha sido citado en España (Hidalgo Argüello *et al.*, 1999). Los machos adultos alcanzan una longitud de 1'6-1'8 cm, presentando unas largas espículas que miden entre 2'6 y 3'4 mm. Las hembras miden 2'2-3'0 cm aproximadamente, las cuales no presentan provagina.

***Metastrongylus madagascariensis* (Chabaud, 1956).**

Ha sido únicamente descrito en cerdos domésticos en Madagascar. Los machos de esta especie miden entre 0'9 y 1'2 cm de longitud, mientras que las hembras alcanzan los 2'2-2'6 cm.

Metastrongylus asymmetricus (Noda, 1973).

Esta especie de *Metastrongylus* fue descrita en Japón por Noda en 1973 y confirmada por Chinone *et al.* en 1984. Se trata de un parásito del jabalí, que tan sólo ha sido citado en Francia (Humbert y Henry, 1989).

Los machos adultos alcanzan una longitud de 1'4-1'8 cm y presentan unas espículas muy cortas que miden entre 0'6 y 0'9 mm. Las hembras miden 2'2-3'9 cm aproximadamente, las cuales poseen un abultamiento prevaginal de gran tamaño que envuelve a la provagina.

Las prevalencias detectadas eran inferiores al 20%, la intensidad de parasitación descrita era muy baja (2 vermes por animal infectado) y siempre se localizaban en parasitosis mixtas junto con *M. pudendotectus*. A tenor de estas observaciones, y puesto que la clasificación taxonómica de las diferentes especies de *Metastrongylus* se ha realizado basándose principalmente, en la morfología posterior de la hembra y por la longitud de las espículas de los machos, se ha dudado que *M. asymmetricus* sea tan sólo una variedad tipológica de *M. pudendotectus*. Para ello, Leignel *et al.* (1997) mediante estudios moleculares de secuenciación del ADN ribosomal y análisis RAPD, confirmaron que ambas especies pertenecen a taxones distintos.

2.1.3.- Ciclo biológico y epidemiología.

La metastrongylosis afecta principalmente, al cerdo y a especies afines de vida silvestre, especies como el jabalí (*Sus scrofa ferus*) y el pécarí (*Pecari angulatus*).

No obstante, también han sido descritos casos de bronquitis vermosas por *Metastrongylus spp.* en humanos (Chandler, 1955; Faust y Russell, 1964; Milosev, 1963), incluso en algunas ocasiones con desenlaces nefastos, como el descrito por González Castro (1951) en España de un niño de seis años muerto por asfixia. Arambulo *et al.*, llegaron a describir a la especie humana como hospedador paraténico de *Metastrongylus spp.*

Así mismo, se han descrito casos en hospedadores no específicos como ovejas y cabras (Katiyar, 1960), perros (Alicata, 1934) y gatos (Fabian, 1975). Para los estudios de investigación llevados a cabo sobre la metastrongylosis han SIDO utilizado como animales de experimentación a los hámsteres, ya que son numerosos los autores que validan su empleo para reproducir las infecciones de *Metastrongylus spp.* en

condiciones controladas (Dunn y White, 1954; Kumar y Mortelmans, 1976; Sasaki y Katsuno, 1986).

El ciclo vital de *Metastrongylus spp.* es indirecto, incluyendo a un hospedador intermediario y a otro definitivo (Fig. 2.10.). Los huevos embrionados, puestos por las hembras adultas del nematodo en sus localizaciones bronco-pulmonares, deben ser expulsados al exterior. Para ello son expectorados y deglutidos, pasando al tracto digestivo y consecuentemente eliminados con las heces.

La eliminación de los huevos aumenta con la edad de los animales, alcanzando el máximo entre la 5^a-9^a semana post-infección, para descender posteriormente (Hidalgo Argüello *et al.*, 1999). En temperaturas frías y ambientes húmedos, son muy resistentes y pueden sobrevivir hasta dos años, pero la desecación y la luz solar directa destruyen su vitalidad. La viabilidad de los huevos de *M. apri* ha sido analizada tanto en condiciones naturales como en condiciones controladas de laboratorio, los resultados obtenidos corroboran que estos resisten temperaturas frías extremas pero no la desecación (Rose, 1958). Kates (1941) denunció que los huevos embrionados pueden sobrevivir en las heces del cerdo un máximo de 25 días, en cambio si las heces son enterradas en el suelo pueden llegar a sobrevivir incluso más de un año.

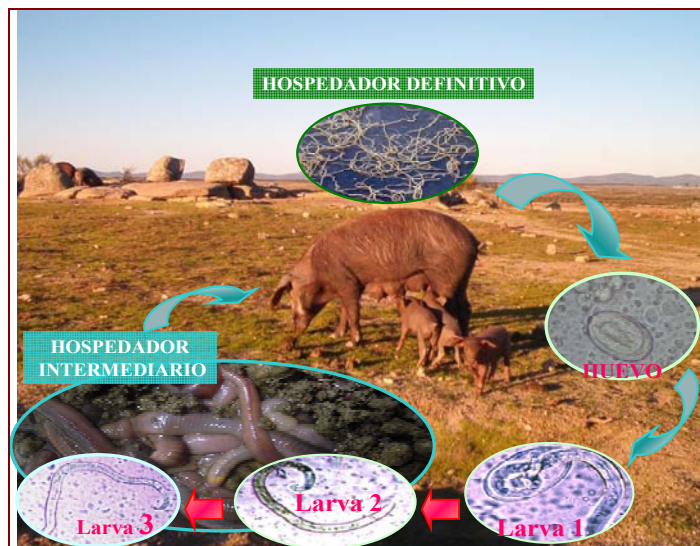


Fig. 2.10. Esquema representativo del ciclo biológico de *M. apri*.

Para su posterior desarrollo, es preciso que éstos sean ingeridos por lombrices de tierra que actúan como hospedadores intermediarios. Entre las especies más frecuentes

encontramos a *Lumbricus terrestris*, *L. rubellus*, *Eisenia foetida*, *E. lonnbergi*, *E. austriaca*, *Allolobophora caliginosa*, *A. terrestris*, *A. chloritica*, *Dendrobaena rubida*, *Bimastus tenuis* y *Diplocardia sp.* (Dunn, 1955).

El primer estado larvario del nematodo emerge del huevo en el intestino de la lombriz y se desarrolla en 24 horas tras la infección en las paredes del esófago, buche e intestino anterior. Estas larvas de primer estadio, miden entre 260 y 280 μm de longitud, presentan unas granulaciones visibles y la extremidad caudal incurvada termina en un pequeño botón característico (Fig. 2.11.). A veces ocurre que las L1 eclosionan del huevo en el medio ambiente, pudiendo perdurar hasta 20 meses en ambiente húmedo a la espera de ser ingeridas por un anélido.



Fig. 2.11. Larva 1 de *M. apri*. Detalle del extremo posterior.

Posteriormente, las larvas van invadiendo otras regiones de la anatomía de los anélidos como son las glándulas calcíferas, corazones, arteria dorsal, parte anterior del intestino y esófago (Probert, 1969). Kumar *et al.* (1978) destacaron la marcada afinidad de las larvas de *Metastrongylus spp.* por el sistema vascular y senos sanguíneos de los órganos mencionados, lugares donde el nematodo experimenta dos mudas hasta alcanzar el tercer estado larvario envainado (Fig. 2.12.).

El ritmo del desarrollo larvario en el interior de la lombriz desciende cuando las temperaturas externas son bajas. Así, la duración de las mudas se estima alrededor de los 10 días, en el caso de contar con temperaturas óptimas de entre 22 y 26°C o en 215

días si las temperaturas son más bajas, alrededor de los 10-11°C (Rose, 1958). La longevidad de las larvas descritas es similar a la de los anélidos, de hasta 7 años o más.



Fig. 2.12. Larvas 3 de *M. apri*.

Los cerdos se infectan por ingestión de lombrices de tierra infectadas, si bien el tercer estado larvario puede, al dañarse o morir el hospedador intermediario, sobrevivir en el medio ambiente hasta dos semanas (Lapage, 1956), permitiendo también el contagio directo al hozar el hospedador definitivo en el terreno. El contagio suele tener lugar en terrenos ricos en humus y húmedos, con una gran densidad de lombrices de tierra (Fig. 2.13.).



Fig. 2.13. Cerdos criados en extensivo. Paisaje típico de dehesa.

El tercer estado larvario liberado en el intestino tras la digestión, perfora la pared intestinal a la altura de colon y ciego (Mackenzie, 1959) y es transportado por los vasos linfáticos hasta los ganglios linfáticos mesentéricos. Allí, experimenta la tercera muda, surgiendo el cuarto estado larvario que llega a los pulmones a través del corazón y transportado por los sistemas circulatorio y linfático.

Los vermes, a los cinco días post-infección (*dpi*) experimentan la muda final en los bronquios, bronquiolos y tráquea, para finalmente alcanzar la madurez sexual al cabo de unos 24 días (Cheng, 1976; Quiroz, 1984).

Las infecciones masivas son raras, salvo en animales menores a seis meses, aquellos sometidos a situaciones de estrés, en casos de avitaminosis A, en asociación con otras parasitosis (ascariosis) o en infecciones bacterianas o virales (Euzéby, 1961). Por lo general, la resistencia inmunitaria adquirida por el animal a lo largo de su vida es efectiva para limitar o reducir la población de adultos en pulmón, debido a que el reiterado contacto con el parásito provoca que, en las reinfecciones no haya una nueva implantación del parásito y los existentes se eliminen (Rose, 1973).

En el caso de infecciones mixtas entre *M. apri* y *M. pudendotectus*, Ewing y Todd (1961) han demostrado un efecto sinérgico en la supervivencia de los vermes adultos, observándose mayores tasas de infección cuando se presentan de forma simultánea en un hospedador. Incluso, se ha demostrado que la maduración de los vermes pulmonares se acelera en las infecciones mixtas. Se ensayaron infecciones simples y mixtas con ambas especies, en las que se registraron parasitaciones mayores en cerdos inoculados con larvas de ambas especies, mientras que la infección provocada es mucho menor si el mismo número de larvas de cada especie se inocula por separado, como se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2.1.- Resultados parasitológicos de la experiencia llevada a cabo por Ewing y Todd (1961).

Especie	Dosis infectiva	Recuperación Adultos (%)
<i>M. apri</i>	6000 L3	3'9
<i>M. pudendotectus</i>	6000 L3	0'4
<i>M. apri</i>	3000 L3	60'6
+	+	
<i>M. pudendotectus</i>	3000 L3	10

2.1.4.- Prevalencias y factores epidemiológicos.

Las diferentes especies constituyentes del género *Metastrongylus* son parásitos cosmopolitas. Se trata de la segunda parasitosis más importante que afecta al cerdo, tras la ascariosis, a nivel mundial. Sin embargo en algunos países, la metastrongylosis tiene una importancia decreciente por la masiva implantación de explotaciones porcinas en régimen intensivo.

Los diferentes estudios epidemiológicos realizados en el continente americano revelan altas prevalencias de esta parasitosis, tanto en cerdos domésticos como en jabalíes. Incluso las intensidades medias de parasitación detectadas en algunos de los casos resultan relevantes. Por ejemplo, Forrester *et al.* (1982) denunciaron una tasa media de parasitación en jabalíes procedentes del estado de Florida (E.E.U.U.) de 155 vermes por animal.

Tabla 2.2.- Resumen de las diversas encuestas epidemiológicas sobre *Metastrongylus spp.* llevadas a cabo en el continente americano.

PAÍS	AUTORES	HOSPEDADOR	ESPECIE PARÁSITA	PREVALENCIA
EE.UU. (Sur)	Spindler, 1934	Cerdo	<i>Metastrongylus Spp.</i>	69%
E.E.U.U. (Michigan)	Morgan y Hawkins, 1949	Cerdo	<i>Metastrongylus Spp.</i>	31%
EE.UU. (Florida)	Forrester <i>et al.</i> , 1982	Jabalí	<i>M. apri</i>	94%
			<i>M. salmi</i>	76%
			<i>M. pudendotectus</i>	64%
EE.UU. (Texas)	Shender <i>et al.</i> , 2002	Jabalí	<i>M. apri</i>	72%
			<i>M. pudendotectus</i>	
			<i>M. salmi</i>	39'1%
Brasil	Serra <i>et al.</i> , 1982	Cerdo	<i>M. apri</i>	37'5%
			<i>M. pudendotectus</i>	23'4%
Brasil	Zocoller <i>et al.</i> , 1987	Cerdo	<i>M. salmi</i>	34'2%

En cambio, en líneas generales las incidencias descritas en el continente asiático son más bajas, excepto en el caso de Ghana, donde el 83'3% de los porcinos se hallaban parasitados por *M. salmi* (Permin *et al.*, 1999).

Tabla 2.3.- Resumen de las diversas encuestas epidemiológicas sobre *Metastrongylus spp.* llevadas a cabo en el continente asiático.

PAÍS	AUTORES	HOSPEDADOR	ESPECIE PARÁSITA	PREVALENCIA
Corea	Hwan Jang, 1975	Cerdo	<i>M. apri</i>	17'6%
Taiwán	Wang, 1978	Cerdo	<i>M. apri</i>	5%
Vietnam	Hung <i>et al.</i> , 1993	Cerdo	<i>Metastrongylus Spp.</i>	4'8%
Filipinas	Manuel <i>et al.</i> , 1989	Cerdo	<i>Metastrongylus Spp.</i>	15'1%
Ghana	Permin <i>et al.</i> , 1999	Cerdo	<i>M. salmi</i>	83'3%
China	Boes <i>et al.</i> , 2000	Cerdo	<i>Metastrongylus Spp.</i>	25'8%

En África se han denunciado los valores más bajos de parasitación por *M. apri*, en Mozambique tan sólo se alcanzó el 0'4% de prevalencia (Jurasek, 1986). En contraposición con estos resultados Chartier *et al.* (1990) denunciaron que *M. salmi* se hallaba presente en el 64% de los porcinos investigados y *M. pudendotectus* en el 86%.

Tabla 2.4.- Resumen de las diversas encuestas epidemiológicas sobre *Metastrongylus spp.* llevadas a cabo en África.

PAÍS	AUTORES	HOSPEDADOR	ESPECIE PARÁSITA	PREVALENCIA
Sudáfrica	Horak, 1978	Cerdo	<i>M. apri</i>	26'9%
Nigeria	Salifu <i>et al.</i> , 1990	Cerdo	<i>M. salmi</i>	3'7%
Mozambique	Jurasek, 1986	Cerdo	<i>M. apri</i>	0'4%
Zaire	Chartier <i>et al.</i> , 1990	Cerdo	<i>M. salmi</i> <i>M. pudendotectus</i>	64% 86%

En Oceanía, aunque *Metastrongylus spp.* fue descrito en cerdos domésticos de Papua Nueva Guinea por Copland en 1974, Mercy *et al.* (1989) no evidenciaron la existencia de ninguna de las diferentes especies de este nematodo en Australia, donde realizaron una encuesta epidemiológica en más de 100 explotaciones porcinas.

En el continente europeo y especialmente en España, las prevalencias de *Metastrongylus spp.* son elevadas, posiblemente debido a la peculiar forma de explotación del porcino en algunas zonas de nuestro país.

De esta forma, Poglayen *et al.* (1981) detectaron tasas de parasitación del 23% en los porcinos de la región italiana de Lombardía. En Francia, se han descrito cinco especies de *Metastrongylus* en jabalíes: *M. apri*, *M. pudendotectus*, *M. salmi*, *M. confusus* y *M. asymmetricus* (Humbert y Ferte, 1986; Humbert, 1988; Humbert y Henry, 1989). La prevalencia de estos parásitos es cercana al 92% y la intensidad de parasitación excede los 140 nematodos por animal afectado (Humbert y Drouet, 1990). Sin embargo, en países como Dinamarca donde existe un alto nivel de industrialización de la producción porcina, no se ha detectado la presencia de *Metastrongylus spp.* durante los últimos 50 años (Roepstorff y Jorsal, 1989; Nansen y Roepstorff, 1999). A pesar de ello, con la incipiente implantación de las explotaciones orgánicas o ecológicas en la UE, son varios los autores (Jolie *et al.*, 1998; Carstensen *et al.*, 2002) que denuncian la posible reintroducción de especies como *Metastrongylus spp.* en países donde estaban erradicadas.

Por lo que a España se refiere, Cordero del Campillo *et al.* (1980) indicaron que estos vermes pulmonares están muy difundidos, con valores del 24% en cerdos procedentes de Granada y Mallorca, señalando la provincia de Granada como la única en nuestro país donde se identificó la especie *M. salmi*. Por su parte, *M. apri* se evidenció en gran parte de Andalucía, Badajoz, Lugo, Mallorca, Madrid, Salamanca, Toledo, Valencia y Portugal. Tanto *M. apri* como *M. pudendotectus* fueron anteriormente evidenciados en Córdoba por Martínez *et al.* en 1972. Finalmente, Cordero del Campillo *et al.* (1994) resumieron los hallazgos de *M. pudendotectus* realizados hasta la fecha, apuntando hallazgos en Cáceres, Córdoba, Granada, Mallorca, Salamanca y Portugal.

Actualmente, se han evidenciado las tres especies mencionadas de *Metastrongylus* en jabalíes abatidos en monterías realizadas en diferentes regiones del suroeste español como Badajoz, Cáceres y Toledo (Alcaide *et al.*, 2005). Durante el desarrollo de esta encuesta epidemiológica en un total de 356 jabalíes se detectaron unas prevalencias superiores al 57%.

Extremadura es una región donde la presencia de este tipo de parasitosis ha ido en aumento con los años. Habela *et al.* (1987) detectaron una tasa de parasitación cercana al 5% en las comarcas de Trujillo y Navalmoral de la Mata (Cáceres). Rueda y Montes en 1989 clasifican a *Metastrongylus spp.* en el norte y sur de Badajoz como el quinto nematodo en importancia que afectaba al ganado porcino. En el sur de Extremadura, Pérez-Martín en 1990 denuncia unos porcentajes de parasitación por *Metastrongylus spp.* más que notables, alrededor del 35%, entre los porcinos Ibéricos investigados durante tres años consecutivos (1987-89). En este trabajo, se subrayó el altísimo porcentaje evidenciado, concretamente en el último año del estudio, puesto que de un total de 140 cerdos analizados, 64 resultaron positivos a la presencia de estos parásitos pulmonares (45'7%). En 1999 García-Vallejo durante el estudio de las endoparasitosis del porcino Ibérico en Extremadura, señaló a los nematodos como el grupo taxonómico, junto a los protozoos, de mayor importancia en la parasitación de los cerdos de montanera. Entre estos nematodos, *Metastrongylus spp.* resultó ser el segundo helminto más frecuente, puesto que el 24% de los 689 cerdos investigados presentaron adultos del parásito.

Los posibles factores predisponentes que favorecen la presencia de las parasitosis pulmonares en los porcinos se puede abordar desde diferentes puntos de vista, como se muestra en la siguiente tabla:

<p>Factores epidemiológicos intrínsecos o endógenos del parásito</p>	<p>Especie (<i>M. apri</i>, <i>M. pudendotectus</i>, <i>M. salmi</i>, etc.) Capacidad de adaptabilidad al hospedador definitivo Capacidad de adaptabilidad al hospedador indirecto Capacidad de adaptabilidad al medio ambiente</p>
<p>Factores epidemiológicos intrínsecos o endógenos del hospedador indirecto</p>	<p>Especie (<i>E. foetida</i>, <i>L. terrestris</i>, etc.) Capacidad de albergar las larvas del parásito Distribución y densidad en el medio</p>
<p>Factores epidemiológicos intrínsecos o endógenos del hospedador definitivo</p>	<p>Especie (Cerdo, Jabalí) Raza y cruces Edad Sexo Estado biopatológico e inmunológico Nutrición</p>

<p>Factores epidemiológicos extrínsecos o exógenos</p>	<p>Tipo de climatología (Humedad relativa) Época del año (Primavera, otoño) Tipo de explotación (Extensivo, Montanera) Tamaño de la piara</p>
---	---

En relación a los *factores intrínsecos o propios del animal hospedador* que influyen en el desarrollo de las parasitosis pulmonares destacamos el factor **especie**. Anteriormente, han sido enumerados los diferentes hospedadores definitivos de *Metastrongylus spp.*, los más importantes desde el punto de vista de la producción porcina son el cerdo y el jabalí, ya que ambas especies pueden cohabitar y compartir pastos en las dehesas (Fig. 2.14.).



Fig. 2.14. Cerdos ibéricos y jabalíes cohabitando la dehesa.

Como ya ha sido mencionado, se han descrito valores de prevalencia muy elevados en el suroeste español en ambas especies, principalmente en los jabalíes. Las intensidades de parasitación descritas siguen en ambas especies unos patrones muy similares, puesto que la mayoría de los animales parasitados presentan cargas parasitarias inferiores a 50 vermes. No obstante, se detecta un 5'7% de jabalíes y tan sólo un 1'3% de cerdos domésticos que presentaron niveles de parasitación superiores a los 100 vermes (Alcaide *et al.*, 2005; GarcíaVallejo, 1999).

Tabla 2.6.- Tabla comparativa de los resultados epidemiológicos obtenidos en las especies doméstica y salvaje de cerdos.

	Ningún parásito	<50 vermes	50-100 vermes	>100 vermes
Cerdos García-Vallejo, 1999	76%	21%	1'75%	1'25%
Jabalíes Alcaide <i>et al.</i> , 2005	42'7%	71'8%	22'5%	5'7%

A pesar de ello, no se han hallado evidencias claras de que la especie salvaje sea más sensible que la doméstica a este parásito. Si no que las elevadas prevalencias y tasas de parasitación descritas en los jabalíes, podrían estar causadas por factores de otra índole como la ausencia de tratamientos antiparasitarios, el contacto permanente con los hospedadores intermediarios, por factores nutricionales, reproductivos, etc. (Alcaide *et al.*, 2005).

De forma similar, la **raza** por sí misma como factor, no representa ningún riesgo o predisposición a la parasitación. Así, Alcaide *et al.* (2005) durante el desarrollo de un estudio sobre la seroprevalencia de la metastrongylosis en cerdos Ibéricos criados en las dehesas del suroeste español observaron que no existían diferencias significativas entre los diferentes **crucos** de Ibérico y Duroc analizados. Por tanto, este factor está íntimamente ligado al tipo de explotación, especialmente al hecho de que los animales tengan acceso o no al hospedador intermediario.

Respecto a la influencia de la **edad** de los animales, Dunn (1956) afirmó que los cerdos más jóvenes eran claramente los más susceptibles. Los primeros signos de la enfermedad se visualizaron a las 10 semanas de edad, por consiguiente la edad más corriente en la que los lechones se infectan es a partir de las primeras semanas de vida (Mackenzie, 1958). Quizás la constante búsqueda de proteínas animales de la que suelen estar necesitados durante esta fase del crecimiento sea una de las causas principales, adquiriendo entonces a partir de esta edad cierta resistencia a esta parasitosis. Si bien, los animales más jóvenes son realmente los menos afectados por la parasitación, así Neiland (citado por Romero Rodríguez, 1970) cita los siguientes porcentajes de parasitación en función de la edad:

Edad	Prevalencia (%)
Menos de 3 meses	10'3
3-8 meses	38'9
9-12 meses	55'3
Más de 12 meses	27'9

Se debe considerar por tanto, que la posibilidad de contacto de los cerdos jóvenes con el parásito es muy escaso, e incluso inexistente, ya que los lechones suelen ubicarse en instalaciones cementadas (naves de paridera) con las madres antes de salir a pastorear.

Con respecto a los *factores extrínsecos o medioambientales*, destacamos la **climatología**. La distribución de la metastrongylosis es mundial, aunque siempre se ha definido como una parasitosis propia de climas fríos y lluviosos. La influencia de las condiciones ecoclimáticas disgenéticas, principalmente altas temperaturas y desecación en el ciclo biológico y bionomía de *Metastrongylus spp.* ha sido ampliamente estudiadas. Son numerosos los autores que señalan la marcada estacionalidad de la metastrongylosis en zonas con una climatología atlántico-mediterránea. Sugiriéndose que el calor y la desecación limitan el desarrollo del parásito en unos determinados períodos del año. Así, lo confirmaron los resultados obtenidos por Humbert y Drouet (1993) en Francia, donde observaron un significativo aumento de los huevos eliminados al medio ambiente en las heces entre enero y febrero. En cambio, en España, Rueda y Montes (1989) describieron los picos de eliminación de los elementos de diseminación principalmente durante el otoño. García Vallejo (1999) evidenció la existencia de dos picos en la intensidad de la infección media mensual por *Metastrongylus spp.* en cerdos Ibéricos de Extremadura a lo largo de un año. Concretamente, el primero de ellos y más importante, tuvo lugar a finales del invierno y principio de la primavera (febrero, marzo y abril), mientras que el segundo se produjo en los meses otoñales de octubre y noviembre.

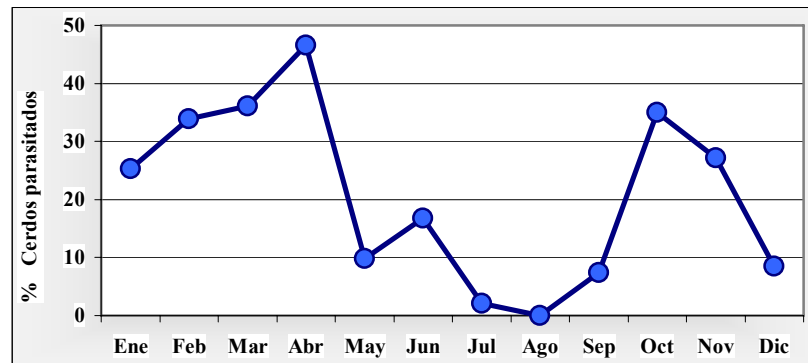


Fig. 2.15. Cronobiología de la parasitación por *Meaststrongylus spp.* en cerdos ibéricos criados en extensivo en Extremadura (García Vallejo, 1999).

Puede comprobarse que durante los meses de verano, cuando las condiciones medio-ambientales son adversas para los hospedadores intermediarios de este género, altas temperaturas y escasas lluvias, las parasitaciones son prácticamente nulas. Por consiguiente, se pone de manifiesto que la metastrongylosis porcina es eminentemente dependiente de la carga o densidad de lombrices de tierra parasitadas presentes en una zona determinada.

2.1.5.- Patogenia de la enfermedad.

La forma de entrada de *Metastrongylus spp.* en el hospedador definitivo es siempre la vía digestiva. Así, en la primera fase de invasión de las L3 del nematodo, se produce una inflamación de la mucosa intestinal, que podría provocar una fase diarreica, así como una inflamación de los ganglios linfáticos mesentéricos. Los mecanismos de acción patógena durante esta fase de prepatencia son: acción traumática durante la migración, acción mecánica-obstructiva a nivel ganglionar, acción expoliadora y antigénica durante la muda larvaria, y finalmente una acción inoculadora de bacterias y virus.

Posteriormente, al alcanzar los pulmones, las larvas ejercen nuevamente una acción traumática al romper la pared de los capilares y de los alveolos, desencadenando la aparición de hemorragias petequiales, congestión e infiltración celular en el tejido pulmonar. Si la larva muere, provocará la formación de pequeños nódulos subpleurales de no más de 8 mm de tamaño, especialmente en los lóbulos diafragmáticos, compuestos de infiltrado celular, restos celulares, etc.

Después, se sucede la acción mecánica-obstructiva, que a medida que avanza la parasitación es de mayor importancia, dado el aumento de tamaño considerable que alcanzan los nematodos, así como a la incipiente generación de mucus en los bronquios y bronquiolos como respuesta a la presencia de estos (acción irritante y antigénica).

Como consecuencia de la suma de estas acciones, se produce una bronquitis verminosa en el animal afectado, que podrá ser desde leve a muy severa. Siempre en función de la cantidad de parásitos involucrados en la primoinfección o en sucesivas reinfecciones y de acuerdo con la edad, nivel alimenticio e inmune del animal. En torno a las seis semanas, se establece una bronquitis crónica y enfisema con pequeños nódulos grisáceos en la parte posterior de los lóbulos diafragmáticos, que pueden agregarse formando áreas de difícil resolución.

Las diferentes especies de *Metastrongylus* no sólo son importantes por la patogenicidad que origina en los cerdos (trastornos respiratorios, hemorragias pulmonares, pérdida de peso, disminución del rendimiento, etc.), sino que también tienen interés desde el punto de vista biopatológico.

Han sido numerosos autores los que han denunciado la relación de *Metastrongylus spp.* con la transmisión de viremias en el ganado porcino. Como es el caso del virus de la influenza porcina (Shope, 1941 y 1943; Kammer y Hanson, 1962; Cordero del Campillo, 1966; Wallace, 1977), del virus de la peste porcina clásica (Shope, 195; Cordero del Campillo, 1966) y del virus de la neumonía porcina (Mackenzie, 1963), aunque posteriormente Preston y Switzer (1976) negaron la existencia de relación alguna entre *Micoplasma hyopneumoniae* y esta parasitosis.

En el caso del virus de la influenza porcina, Shope (1955) afirmó que las partículas virales estaban presentes en los huevos del nematodo y que eran viables durante el desarrollo larvario en el interior de la lombriz durante 32 meses. De la misma manera, Sen *et al.* (1961) confirmaron la asociación entre este virus y *Metastrongylus spp.*, pero incidieron en la existencia necesaria de un estímulo previo para que se desencadenase la infección. Como norma general, se podría afirmar que los cerdos parasitados con vermes pulmonares y portadores del virus de la influenza, no adquieren la enfermedad de forma inmediata sino que permanecen aparentemente sanos y tras la acción de un estímulo, a veces inocuo, se desencadena la enfermedad con grave mortalidad. En condiciones naturales y para animales explotados de forma extensiva, el

estímulo desencadenador más usual resultó ser el frío o una parasitosis concurrente con *Ascaris suum* (Shope, 1955). Así mismo, pueden producirse infecciones bacterianas secundarias (neumonías purulentas por estafilococos, estreptococos, salmonella, pasteurelosis, etc.) como resultado de la acción estresante más que la inoculadora del parásito, definiéndose *Metastrongylus spp.* como potenciador de estas patologías respiratorias.

2.1.6.- Lesiones.

Las lesiones macroscópicas más características (Whittlestone, 1957; Mackenzie, 1958) que se observaron durante el estudio de las infecciones por *Metastrongylus spp.* en cerdos infectados de forma natural fueron:

- ✓ Áreas enfisematosas bien definidas localizadas principalmente en los lóbulos diafragmáticos y en los casos más severos, también en los lóbulos anteriores.
- ✓ Obstrucción parcial de los bronquios por la presencia de un importante exudado mucoso y de adultos del parásito.
- ✓ Áreas de consolidación localizadas en la región ventral de los lóbulos anteriores o en la región antero-ventral de los lóbulos diafragmáticos.
- ✓ Pequeñas lesiones nodulares.

Posteriormente, Mackenzie (1959) desarrolló un estudio más exhaustivo tanto de las lesiones provocadas a nivel macroscópico como microscópico, así como de la progresión de las mismas durante la infección experimental de cerdos con una dosis de 8000 L3 de *M. apri*. Las primeras lesiones macroscópicas, se observaron al día 12 post-infección, estas consistían en unas pequeñas áreas enfisematosas acompañadas por irregulares regiones de consolidación. La evolución de estas lesiones, así como la aparición de los primeros nódulos pulmonares (35 dpi) durante los 80 días que duró la infección, se muestran de forma resumida en la figura 2.16.

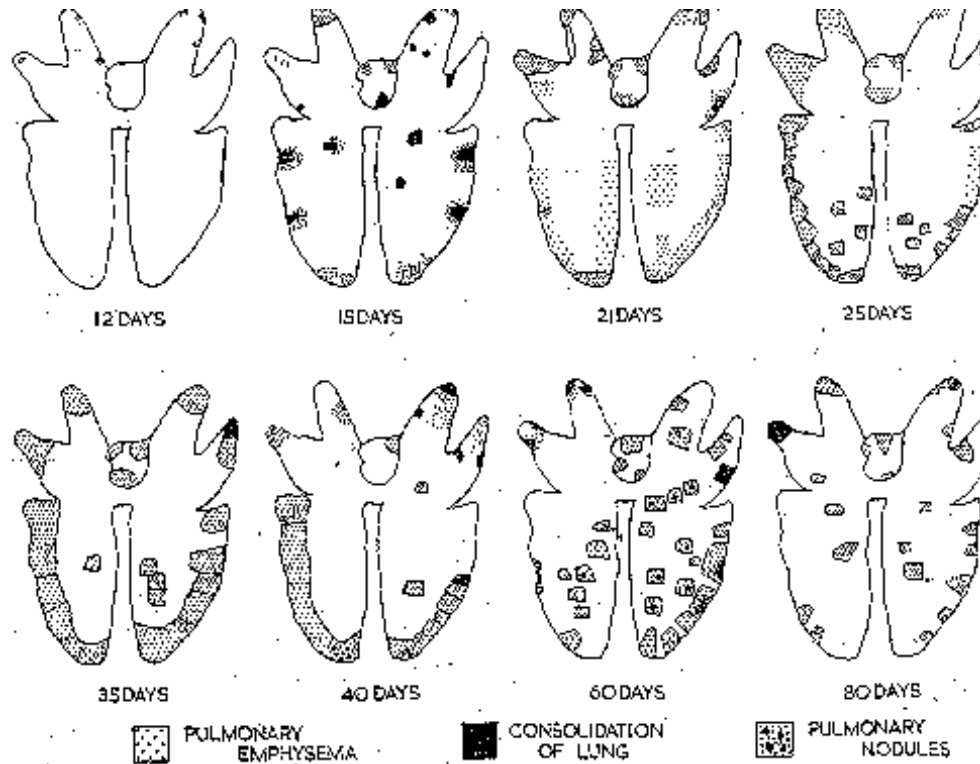


Fig. 2.16. Esquema de las lesiones macroscópicas pulmonares descritas en porcinos infectados experimentalmente con 4.000 L3 de *M. apri*. (Mackenzie, 1959).

Para una mejor comprensión de la cronología de los cambios histopatológicos producidos en el pulmón durante de la infección han sido definidas cuatro fases:

✘ Fase prepatente de migración de las larvas (1-10 dpi).

No se observan larvas en los ganglios linfáticos mesentéricos, ni tampoco inflamación de los mismos.

✘ Fase prepatente de llegada y establecimiento de las larvas en el pulmón (10-25 dpi).

En esta fase de la enfermedad, concretamente entre el día 10-12 post-infección, a nivel local en el pulmón se produce un incremento de los macrófagos alveolares, una importante reacción de células mononucleares en las paredes de los alveolos afectados, así como una incipiente migración de eosinófilos a través de la mucosa alveolar desde los vasos sanguíneos. A continuación, a partir de la segunda semana de parasitación, ya se observa una densa infiltración de eosinófilos y células intersticiales alrededor de los vermes, junto con la aparición de áreas de consolidación en el parénquima pulmonar. Así mismo, se describe una hiperplasia del tejido linfoide de los ganglios bronquiales.

✘ Fase de patencia temprana (25-40 dpi).

Posteriormente, a partir del mes post-infección se describe una importante infiltración celular en la zona dañada constituida principalmente por macrófagos alveolares, eosinófilos, linfocitos, células polimorfonucleares y células gigantes. La cronificación de las lesiones conllevan a la aparición de enfisema pulmonar, formación de granulomas y finalmente, a la estenosis bronquial por la total destrucción del epitelio broncoalveolar.

✘ Fase de patencia tardía (a partir del día 40 pi).

En esta última fase de la infección, se establece una bronquitis crónica y una epitelización alveolar. Se caracteriza por la existencia de nódulos linfoides pulmonares, presencia de importantes áreas de consolidación por coalescencia de las pequeñas, junto con áreas de enfisema.

No obstante, debemos tener en consideración que durante la fase migratoria de las larvas, vía linfática y sanguínea, éstas pueden afectar a otros órganos. Son diversos los autores que han relacionado trayectorias erráticas de la larvas hacia el hígado, con la aparición de unas lesiones granulomatosas en el tejido hepático en infecciones experimentales de cerdos o hámsteres con *M. apri* (Dunn, 1956; Yoshihara *et al.*, 1990; Yoshihara, 2004). Estas lesiones hepáticas, conocidas como manchas de leche (Fig. 2.17.), son muy características y bien definidas en otras parasitosis porcinas, como es el caso de la ascariosis (Oldham y White, 1944; Roneus, 1966).

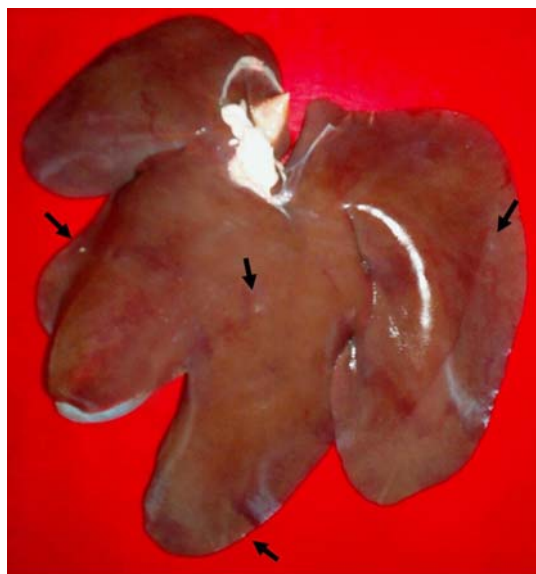


Fig. 2.17. Manchas de leche en el tejido hepático causadas por la migración de larvas erráticas de *M. apri* (Lote 3).

2.1.7.- Signos clínicos.

Las infecciones ligeras en general son asintomáticas o muy leves. Sin embargo en las intensas, los síntomas respiratorios se manifiestan tras un periodo aproximado de unos 10 días siempre en función de la cantidad de L3 que lleguen a pulmón (Mackenzie, 1958).

El más característico de ellos es la tos, que se presenta ronca, seca, paroxística y de larga duración, que se acentúa tras el ejercicio o movimiento de los animales. También se observa disnea, taquipnea, respiración abdominal, secreciones nasales de naturaleza desde mucosa a mucopurulenta, etc.

Cuando avanza la enfermedad, se observan temblores, trastornos intestinales, disminución del apetito, por lo que se produce una sustancial pérdida de peso, retraso en el crecimiento y raquitismo (Fig. 2.18.). En las fases iniciales, hay eosinofilia hemática (10-16%) que posteriormente desciende a niveles normales. Las infecciones virales y/o bacterianas secundarias, provocarían una bronconeumonía febril, que complicaría aun más el proceso parasitario.



Fig. 2.18. Mal aspecto general de de los animales parasitados por *Metastrongylus spp.*

2.1.8.- Diagnóstico.

En el animal *in vivo* podemos hacer tan sólo un diagnóstico presuntivo u orientativo, basado fundamentalmente en la observación de los signos clínicos más característicos de la parasitación, como, tos seca, secreciones nasales de consistencia variable, disnea, enflaquecimiento, etc. A todo esto, podemos añadir la valiosa información epidemiológica que se posea de la zona, así como el historial clínico de la explotación y

de las explotaciones vecinas, tipo de explotación, prácticas de manejo y por supuesto, tener siempre presente las características medioambientales (temperatura, precipitaciones, humedad relativa, etc.) de la región y época del año.

Para un veterinario experimentado, el diagnóstico clínico de la metastrongylosis puede ser factible, especialmente si se tienen en cuenta una serie de factores, como son:

- Un cierto componente estacional de la enfermedad: aparición de la sintomatología más característica durante las épocas más húmedas del año, generalmente a mediados de primavera y otoño.
- La necesaria presencia de hospedadores intermediarios infectados en la zona y la accesibilidad de la piara a ellos.
- La historia epidemiológica de la zona.
- La asociación de sintomatología respiratoria, junto con la salida a montanera o pastoreo de los animales.

A pesar de los innumerables rasgos clínicos que definen la parasitación por *Metastrongylus spp.*, sería necesario establecer un diagnóstico diferencial con otras posibles patologías que cursen con un cuadro clínico-lesional similar, como son las enfermedades bronquiales o pulmonares de origen bacteriano (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus suis*, *Salmonella cholerasuis*, *Corynebacterium spp.*, *Mycoplasma spp.*, etc.) o de origen viral (Influenza porcina, enfermedad de Aujeszky, P.R.R.S., Coronavirus respiratorios, Peste porcina clásica, etc.).

El *diagnóstico directo* de la metastrongylosis puede ser realizado mediante un análisis coprológico de las heces o post-mortem (hallazgos anatomopatológicos). Así, mediante un análisis coprológico podemos observar los huevos expulsados por los animales parasitados. Para ello debemos utilizar soluciones saturadas de gran densidad (d. 1'285), debido al elevado peso de los huevos de estos nematodos. Dunn y White (1954) compararon el uso del cloruro sódico y del sulfato de magnesio como soluciones de flotación, observando que las muestras positivas analizadas con sulfato de magnesio resultaban negativas con cloruro sódico. Posteriormente, Bello (1961) comparó la eficacia del sulfato de magnesio, cloruro sódico y una solución de sacarosa, teniendo en

consideración tres factores principales de estas soluciones: gravedad específica, viscosidad y grado de plasmólisis. Los resultados obtenidos consideraban el sulfato de magnesio con una densidad de 1'200, como la solución de flotación más eficaz. Existen otras soluciones también eficaces, como el sulfato de zinc o el yoduro de potasio.

Además, siempre debemos de tener en cuenta, a la hora de interpretar los resultados, que la expulsión de los elementos de diseminación de *Metastrongylus spp.* es estacional y varía en intensidad a lo largo de la parasitación. Por tanto, el diagnóstico asertivo se realiza durante la necropsia del animal, mediante el hallazgo de adultos en bronquios, de huevos embrionados en heces o en raspados de lesiones o en mucus, así como la visualización de las lesiones pulmonares compatibles con esta parasitosis, como por ejemplo, hepatización gris del vértice apical del lóbulo caudal de los pulmones (Fig. 2.19.).

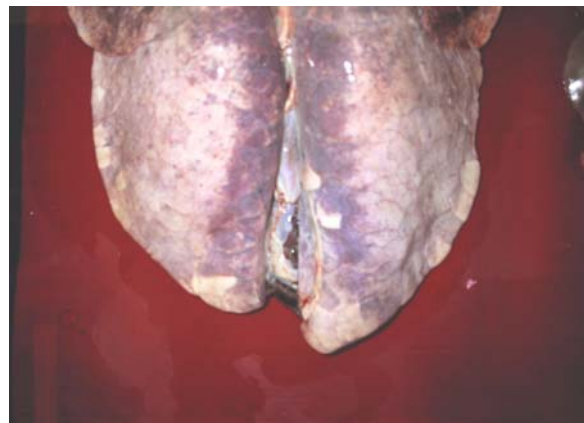


Fig.2.19. Detalle de las lesiones típicas en los vértices apicales de un pulmón afectado por *Metastrongylus spp.*

2.1.9.- Tratamiento y control.

A lo largo de las últimas décadas, se han experimentado y desarrollado infinidad de tratamientos para combatir y prevenir la metastrongylosis porcina, con muy diversos resultados. Hoy en día, los antiparasitarios más usados son el Levamisol, Fenbendazol, Flubendazol o Mebendazol y los pertenecientes al grupo de las Lactonas Macroclínicas, como la ivermectina o la moxidectina, y más recientemente, la doramectina.

Para el tratamiento de la metastrongylosis, se cuenta desde hace más de cinco décadas, con una gran cantidad de medios profilácticos y paliativos, así como un considerable arsenal de quimioterápicos, de utilidad y éxito diverso. Desde las primeras

experiencias controladas que realizó Walley en 1957, con diferentes dosis de cianacetidracina durante tres días consecutivos administradas vía subcutánea, hasta los tratamientos sistémicos actuales, con los distintos derivados de las avermectinas, hay una larga lista de principios activos y pautas de administración, que mostramos de forma resumida en los siguientes cuadros (Tablas 2.7 y 2.8.).

Tabla 2.7.- Cuadro resumen de las pautas de administración y eficacia de los derivados de los primeros antiparasitarios utilizados.

Principio Activo	Pauta de administración	Autores
<i>Cianacetidracina</i>	(Sol. 25%) 0'6 ml/10Kg pv en 2 dosis	Sen <i>et al.</i> , 1960
	115 mg/Kg pv (SC) en 2 dosis	Dick, 1958
<i>Higromicina B</i>	2 g en 45 Kg de pienso durante 2 meses	Goldsby y Todd, 1957
<i>Dietilcarbamicina</i>	100 mg/Kg pv en 7 dosis	Sasaki, 1963
<i>Clorhidrato de piperazina</i>	(Sol. 10%) 300mg/Kg de pienso	Jungmann y Splisteser, 1965
<i>Solución de Iodo</i>	0'5 ml/Kg pv Vía intratraqueal durante 5 días.	Boev <i>et al.</i> , 1958

Hoy en día, todos estos procedimientos han quedado obsoletos principalmente, por su efecto tóxico en los animales (hiperexcitabilidad, convulsiones, depresión, inapetencia, etc) y sus complicadas y prolongadas pautas de administración. Otros antiparasitarios utilizados en la lucha frente a la metastrongylosis porcina, como el *levamisol* (8mg/Kg pv, vo), muy eficaz contra las formas adultas y larvarias, incluyendo las larvas migratorias, aunque no debe ser administrado en las 72 horas previas al sacrificio. De los pertenecientes al grupo de los Benzimidazoles, señalamos el *parbendazol* (3g/Kg de alimento durante 10 días), *fenbendazol* (5mg/Kg pv en el pienso durante 5 días), *oxfendazol* al 0'5% (9mg/Kg pv en pienso), *albendazol* (30 ppm en pienso) y *flubendazol* (30 ppm durante 10 días o una única dosis de 5mg/ Kg pv) con una eficacia probada de casi el 100% en todos los casos. Actualmente, los productos de

elección son los antiparasitarios pertenecientes al grupo de los derivados de las lactonas macrocíclicas (Tabla 2.8.).

Tabla 2.8.- Cuadro resumen de las pautas de administración y eficacia de diferentes derivados de las lactonas macrocíclicas (avermectinas).

Principio Activo	Pauta de Administración	Eficacia	Autores
Ivermectina	20µg/Kg pv	99'4%	Stewart <i>et al.</i> , 1981
	500µg/Kg pv	99'9%	
	100µg/Kg pv	97'8%	Alva-Valdes <i>et al.</i> , 1989
	200µg/Kg pv	100%	
	2ppm en pienso durante 7 días	100%	Primm <i>et al.</i> , 1992
Doramectina	300 µg/Kg pv (IM)	100%	Mehlhorn <i>et al.</i> , 1993
	300 µg/Kg pv (IM)	98%	Logan <i>et al.</i> , 1996
	300 µg/Kg pv (IM)	100%	Yazwinski <i>et al.</i> , 1997
	300 µg/Kg pv (IM)	100%	Reina <i>et al.</i> , 2000
Moxidectina	0'75% (Pour-on)	100%	Stewart <i>et al.</i> , 1999

Cuando el manejo de los cerdos está basado en el pastoreo o montanera, el control de la metrastrongylosis es difícil, a causa de la extensa presencia y longevidad de las lombrices de tierra en los pastos. En explotaciones donde hayan sucedido brotes importantes de esta parasitosis, los cerdos deben mantenerse en lugares secos o en porquerizas con suelos de cemento y sus heces deben eliminarse para no propagar la infección, especialmente deben ser estabulados en épocas de lluvia. Los animales que salgan a montanera deben ser anillados para evitar el hozado y que ingieran lombrices con las raíces, así como una buena dieta complementaria, que no sólo disminuirá su interés por los hospedadores intermediarios, sino que ayudará también a que se desarrolle el sistema inmunitario del animal de forma adecuada.

Aún así, los terrenos contaminados pueden permanecer afectados durante años, por lo cual esos terrenos deberían ser destinados a otros usos como cultivo o pastoreo de otra especie animal. Para conseguir la destrucción de los hospedadores intermediarios, en caso de pastos contaminados, se pueden aplicar tratamientos al terreno basados en el

uso del pentaclorofenato de sodio y el carbathion al 3%, aunque no son muy recomendables, ya que además de tratarse de procedimientos caros no resultan prácticos.

2.2.- El hospedador indirecto: *Eisenia foetida*.

Eisenia foetida, también conocida como la lombriz roja californiana, es la lombriz más popular y empleada actualmente en la lombricultura (Fig. 2.20.).



Fig. 2.20. *Eisenia foetida*.

Las razones en que se basa esta elección son (Rivero, 1993):

- Se encuentra plenamente adaptada a diferentes condiciones de clima y altitud, pudiendo vivir en cautiverio sin fugarse de su lecho.
- Su longevidad, vive aproximadamente 16 años.
- Su prolificidad, madura sexualmente entre el segundo y tercer mes de vida, y la cópula tiene lugar cada 7 días.
- Su voracidad, cada individuo ingiere diariamente una cantidad de materia orgánica equivalente a su propio peso.

2.2.1.- Encuadre taxonómico.

Reino: *Animal*.

Subreino: *Metazoa*.

Phylum: *Protostomia*.

Grupo: *Annelida*.

Clase: *Oligochaeta*.

Orden: *Opisthoro*.

Familia: *Lombricidae*.

Género: *Eisenia*.

Especie: *E. foetida* (Savigny, 1826).

2.2.2.- Morfología y Biología.

E. foetida posee un cuerpo alargado, segmentado y con simetría bilateral, mide aproximadamente entre 8 y 10 cm de longitud (Fig. 2.21.). Presenta una porción más gruesa en el tercio anterior de 5 mm. de longitud llamada *clitellium*, lo cual indica que el individuo ha alcanzado su madurez sexual, pues su función está relacionada con la reproducción.

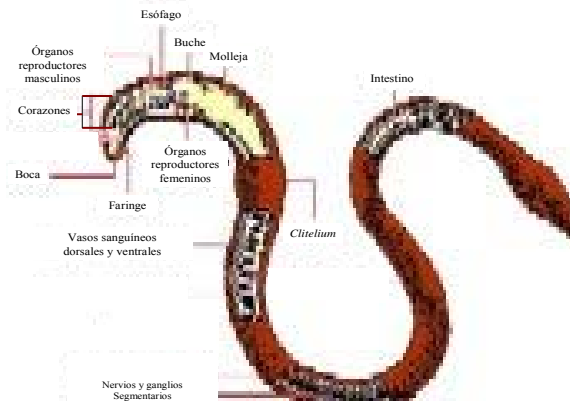


Fig. 2.21. Esquema de la anatomía de *E. foetida*.

Al nacer las lombrices son blancas, transcurridos 5 o 6 días se ponen rosadas y a partir de los 120 días, alcanzan la madurez sexual, y su apariencia es de color rojizo intenso, característica por la que reciben el nombre de lombriz roja (Kaestner, 1967).

Las lombrices de tierra necesitan vivir en suelos húmedos que contengan materia orgánica. En la naturaleza, éstas se desplazan por las capas superficiales de las praderas a través de los túneles que excavan, buscando las zonas más húmedas. Pero en invierno se entierran más para escapar de las heladas y lo mismo hacen en verano, para evitar la deshidratación. Las lombrices tienen costumbre de salir a la superficie durante la noche para alimentarse y expulsar sus detritus. Tan sólo en circunstancias especiales las encontraremos en la superficie durante el día, como por ejemplo en periodos de lluvia intensa, cuando será frecuente encontrarlas debajo de piedras, etc.

Las lombrices son fotofóbicas, los rayos ultravioletas las matan en pocos minutos. Por ello, poseen unos sensores epidérmicos o células especiales colocadas a lo largo de su cuerpo, que les avisan de la presencia de luz y les permiten huir en dirección contraria a ella.

La cutícula de la lombriz es una lámina muy delgada de color marrón brillante, quitinosa, fina y transparente. La epidermis, situada bajo la cutícula es un epitelio simple con células glandulares que producen una secreción mucosa, responsable de la formación de la cutícula y del mantenimiento de la humedad y flexibilidad de la misma. Poseen dos capas musculares, una circular externa y otra longitudinal interna, responsables de la locomoción. La lombriz avanza arrastrándose sobre el terreno, utilizando unos anillos especiales, que son capaces de clavarse en el terreno. Para comenzar el movimiento de avance, el anélido fija los anillos anteriores y encoge el resto del cuerpo hacia la parte anterior, posteriormente fija los anillos posteriores y entonces libera los anillos anteriores, empujando con la parte posterior del cuerpo la parte anterior.

El peritoneo es la capa más interna, que limita exteriormente con el celoma de la lombriz. Esta cavidad celómica está rellena por el líquido celómico, que se extiende a lo largo de la lombriz, actuando como citoesqueleto hidrostático. El sistema respiratorio, nervioso y excretor están metamerizados, es decir, repartidos en los distintos anillos o metámeros, que constituyen al individuo.

El aparato circulatorio está formado por vasos sanguíneos. Las lombrices tienen dos vasos sanguíneos principales, uno dorsal y otro ventral. Poseen también otros vasos y capilares que llevan la sangre a todo el cuerpo. La sangre circula por un sistema cerrado constituido por cinco pares de corazones. La temperatura corporal es de 19-20°C. El aparato respiratorio es muy primitivo, puesto que el intercambio de oxígeno se produce a través de la pared del cuerpo.

El sistema digestivo está formado en la parte superior por una apertura bucal, donde se sitúa el prostomio, que tiene forma de labio, y una faringe musculosa. Las células del paladar son las encargadas de seleccionar el alimento que pasa posteriormente al esófago, donde se localizan las glándulas calcíferas. Estas glándulas segregan iones de calcio (carbonato cálcico), contribuyendo a la regularización del equilibrio ácido-básico, tendiendo a neutralizar los valores de pH. A continuación,

encontramos el buche o receptáculo de comida de paredes delgadas, en el cual el alimento queda retenido para, posteriormente, dirigirse a una molleja muscular, empleada para moler la tierra digerida y finalmente, un intestino largo y recto. En la parte terminal de este intestino se encuentra en el ano, por donde son expulsados los alimentos digeridos por el anélido.

El sistema excretor se halla formado por nefridios, concretamente, dos por cada anillo. Las células internas son ciliadas y sus movimientos permiten retirar los desechos del celoma. El sistema nervioso es ganglionar. La lombriz posee un par de ganglios supraesofágicos, de los que parte una cadena ganglionar.

Las lombrices son individuos hermafroditas, cada lombriz está dotada de un aparato reproductor masculino y femenino, pero no se autofecundan, sino que es necesaria la cópula entre dos individuos. La cópula se efectúa cada 7-10 días. El aparato genital masculino, ubicado en la parte anterior de la lombriz cerca del prostomio, está integrado por los testículos que son las glándulas secretoras de esperma. Los órganos reproductores femeninos se encuentran en una posición posterior a los masculinos. Dos lombrices en fase de acoplamiento, giran en sentido opuesto la una de la otra, para que de esta forma el aparato genital femenino reciba el esperma y lo retenga hasta el momento de la fecundación. Así, en cada acoplamiento una lombriz recibe el esperma de la otra.

La fecundación tiene lugar a través del *clitellium*, cuyas glándulas producen el huevo o cápsula. Cada una de estas cápsulas, redondeadas por una parte y acuminadas por otra, cuyas dimensiones aproximadas son 2-3 mm de ancho por 3-4 mm de largo, contienen de 2 a 21 pequeñas lombrices en su interior. En el momento del nacimiento, las crías rompen la envoltura de la cápsula, precisamente por la parte acuminada de ésta, después de 14 a 21 días de incubación. Desde el mismo momento de su nacimiento, las lombrices son autosuficientes; comen solas y sólo necesitan para sobrevivir que el sustrato donde se encuentran sea lo suficiente húmedo y tierno para que sea perforado por su minúscula boca.

Fisiológicamente, el desarrollo de las lombrices está condicionado por diversos factores físicos que son fundamentalmente la humedad, la luz solar, la temperatura, la acidez o pH y la oxigenación del medio (Ferruzzi, 1985).

La humedad y la aireación del sustrato están muy relacionadas entre sí, además ambos influyen tanto en la ingesta de alimento, como en la respiración y reproducción. En un terreno empapado, las gotas de agua desplazan las burbujas de aire, y se produce falta de oxígeno y ventilación. Para la supervivencia de las lombrices, la humedad debe estar comprendida entre el 70 y 80%. Si la humedad del sustrato es superior al 85% la oxigenación es insuficiente, en cambio si la humedad es inferior al 70%, se dificulta enormemente el deslizamiento del anélido, así como la ingestión del alimento. De la misma manera, la falta de aireación, hace que el consumo de alimento se reduzca, y que las lombrices entren en un periodo de latencia, en el que no producen compost, se detienen los apareamientos y aumenta el tiempo de maduración de las cápsulas.

La temperatura considerada óptima para el desarrollo de las lombrices, oscila entre 18 y 25°C. Cuando la temperatura desciende por debajo de 15°C, las lombrices entran en fase de latencia, mientras que temperaturas inferiores a los 4°C o superiores a los 40°C resultan mortales para las lombrices. La luz solar directa mata en pocos segundos a los animales y además, aumenta la temperatura del medio, llegando a alcanzar temperaturas mortales si el animal no tiene posibilidades de huir.

Respecto al pH de los sustratos, el óptimo para el buen desarrollo de *E. foetida* es de 7, pudiendo sobrevivir sin muchas dificultades en entornos con un pH de entre 5 a 8'5.

2.2.3.- Métodos de cría y manejo del lombricultivo.

El lombricultivo arranca con una cantidad inicial de lombrices o pie de cría que se deposita en un sustrato determinado. El crecimiento y desarrollo de la población de lombrices de un lecho dependerá en gran medida de la correcta alimentación y riego, así como de la implantación de algunas medidas básicas de control de predadores y tratamiento de plagas.

- **La alimentación.**

El alimento que se les proporcione será materia orgánica parcial o totalmente descompuesta, si no es así las elevadas temperaturas generadas durante el proceso de fermentación (hasta 75°C), podrían matar a las lombrices. Además, se utilizan capas delgadas de alimento, máximo 4 cm, para evitar el calentamiento de éste cuando se usa

muy fresco, facilitar la aireación del cultivo, asegurar la transformación del material y mantener a las lombrices alimentándose en la parte superior (Fuentes, 1987).

Se ha observado que es posible estimular la reproducción de la lombriz roja, utilizando el cambio de alimentación con otros residuos que se tengan en la finca, como estiércol de diferentes especies animales (vacuno, porcino, equino, conejos) o residuos de otros cultivos (Rivero, 1993).

Se puede alimentar una o dos veces por semana, dependiendo la densidad de lombrices y el tipo de alimento utilizado. La cantidad de alimento está relacionada directamente con el consumo por parte de la lombriz. Se han observado consumos equivalentes a la mitad del peso de las lombrices presentes en el lombricultivo por día. El suministro de los alimentos, en condiciones térmicas óptimas se realiza añadiendo entre 20 y 30 Kg por lecho, en una capa de 5-10 cm, cada 10-15 días, el objetivo principal de esta práctica es mejorar la aireación (Compagnoni, 1985).

- **El riego.**

El alimento se prepara antes de llevarlo a las camas de lombrices, remojándolo si es necesario hasta que, estando totalmente humedecido, la humedad óptima está en un rango de 70 a 80%. Dependiendo de las condiciones ambientales y del espesor de la capa de sustrato con lombrices, también se deben remojar las camas para conservar esta humedad. Durante los meses de calor se regará todos los días, procurando no emplear demasiada agua en cada riego; en los días de mucho calor mejor regar dos veces al día (Fuentes, 1987). Los sistemas de riego usualmente empleados en la lombricultura son el manual y por aspersión. En ambos casos deben evitarse los encharcamientos, ya que un exceso de agua desplaza el aire del material y provoca fermentación anaeróbica.

- **Los enemigos y patologías.**

Los depredadores directos más frecuentes son los pájaros (cuervos, mirlos, tordos...) ya que excavan la tierra con sus patas y pico, siendo la medida de control más eficaz el cubrir con ramas o mallas antigranizo el lecho, además con esta medida se evita la evaporación y se mantiene la humedad. Como medida preventiva para eliminar las ratas y ratones se emplearán desratizaciones en puntos estratégicos de las instalaciones, además de medidas higiénicas. La presencia de escarabajos, moscas, ciempiés, ácaros y hormigas es indeseable, pues compiten por el consumo de alimento (Compagnoni, 1985).

Las enfermedades en los criaderos de lombrices no son muy frecuentes, aunque el hábitat de las lombrices puede verse afectado por la presencia de bacterias. La patología más importante es la intoxicación proteica, provocada por la presencia de un elevado contenido de sustancias ricas en proteínas no transformadas en alimento por las lombrices. Estas sustancias proteicas en exceso favorecen la proliferación de microorganismos, cuya actividad genera gases y provoca un aumento de la acidez del medio. Las lombrices ingieren los alimentos con una excesiva acidez que no llega a ser neutralizada por sus glándulas calcíferas. Por tanto, se produce la fermentación en el buche y en el ventrículo provocando su inflamación. Los síntomas más frecuentes suelen ser el abultamiento de la zona cliterar, coloración rosada o blanca de las lombrices y una disminución generalizada de su actividad. Como medida de control se debe remover la tierra para favorecer la oxigenación y la aplicación de elevadas dosis de carbonato cálcico (Rivero, 1993).

2.2.4.- Relación de *Metastrongylus spp.* y *Eisenia foetida*.

Desde que Hobmaier y Hobmaier (1929a, b) demostraron que la larva de *M. apri* se desarrollaba y maduraba en el esófago y corazones de la lombriz, *L. terrestris*. Han sido numerosos los trabajos destinados a conocer en profundidad la relación parásito-hospedador intermediario, cuáles son las especies de lombriz de elección para albergar las larvas de *Metastrongylus spp.*, que carga parasitaria pueden llegar a acoger las lombrices, su localización en la anatomía de la lombriz, etc.

Tras la infección experimental de diferentes especies de anélidos, Schwartz y Alicata (1934) encontraron que los estados larvarios del nematodo se localizaban preferentemente en las paredes del esófago y del buche, ocasionalmente en las paredes de la molleja y la parte anterior del intestino. Posteriormente, Schwartz y Porter (1938) denunciaron que aproximadamente el 94% del total de la carga parásita presente en *E. foetida* se localizaba en las glándulas calcíferas.

Dunn (1955) describió con todo detalle la forma de mantener un cultivo de lombrices, desde el tipo de contenedores necesarios, medios de cultivo, alimentos, hasta las especies de elección. De las seis especies de anélidos cultivadas e infectadas experimentalmente, *E. foetida* resultó ser la más fácil de criar en cautividad y la especie que mejor se infectaba con las larvas de *Metastrongylus spp.* A partir del día 12 tras la

infección, se observaban L3 en sus ubicaciones preferentes, región posterior del esófago y vasos sanguíneos dorsales, en cambio nunca fueron detectadas en la molleja o en el intestino, y únicamente se describieron en las glándulas calcíferas cuando estas se hallan totalmente desarrolladas.

Sin embargo, Probert (1969) demostró que los senos lamelares de las glándulas calcíferas eran el lugar predilecto de asentamiento de las larvas del parásito, aunque también fueron descritas en los vasos sanguíneos dorsales, corazones y senos sanguíneos perientéricos. Por su parte, Düwel y Schleich (1971) concluyeron que prácticamente todas las larvas de *M. apri* presentes en una lombriz parasitada se ubicaban en el buche.

Debido a la variabilidad existente entre las posibles localizaciones preferenciales señaladas por los distintos autores, Kumar *et al.* (1975) llevaron a cabo un estudio histológico de los diferentes segmentos de *E. foetida*. La carga parasitaria media detectada en las lombrices variaba entre 126 y 325 larvas. A las 24 horas de ser infectadas experimentalmente con huevos embrionados de *M. apri* se observan las L1 en el buche, mientras que a las 48 horas se localizan principalmente en las glándulas calcíferas y posteriormente las larvas se van asentando en los corazones, vasos dorsales, parte anterior del buche y en el esófago anterior, sin abandonar nunca las glándulas calcíferas. Parece ser que las larvas buscarían otras localizaciones, aledañas siempre a estas glándulas, cuando estas están masificadas. La explicación a esta dependencia de las glándulas calcíferas se debe a la baja tensión de CO₂ que se presenta en estos órganos y a la necesidad de oxígeno de los estados larvarios de *Metastrongylus spp.* para su supervivencia.

Humbert (1992) realizó un estudio histopatológico comparativo entre los hospedadores de los metastróngylos, es decir las lombrices y los cerdos. En cambio, en la lombriz raramente eran observadas reacciones granulomatosas frente a las larvas, en el jabalí si se describían importantes reacciones inflamatorias y de defensa frente a las presencia de las larvas en el tejido pulmonar. Por tanto, y dada su escasez estas reacciones no son un factor limitante del parasitismo en el hospedador intermediario. Las intensidades de parasitación observadas variaban de 1 a 600 larvas por lombriz infectada, la media de parasitación estimada fue de 150 L3 por individuo, aunque se han llegado a encontrar intensidades de parasitación de hasta 4000 larvas (Euzéby, 1961).

2.3.- El hospedador definitivo: Cerdo Ibérico.

2.3.1.- Características de la raza porcina Ibérica.

El análisis que los diferentes autores, desde Sansón en 1906 hasta Laguna en 1998, hacen de la aplicación del concepto raza al cerdo ibérico, pone de manifiesto la complejidad de definir con claridad a esta variedad porcina, como consecuencia de la existencia de diversos tipos o estirpes dentro de ella. De modo que vienen a proponer la consideración no ya de raza sino de una agrupación racial ibérica (Buxadé y Daza, 2000) o tronco ibérico (Sotillo y Serrano, 1985), en el que quedan incluidas todas las variantes.

El cerdo Ibérico actual es el representante de una población porcina autóctona, descendiente de un tronco ancestral prehistórico originado en la Península Ibérica, *Sus mediterraneus* o *Sus scrofa meridionales*, asentado en las zonas más meridionales y centrales de la península ibérica y con especial arraigo en el Alentejo portugués, Andalucía y Extremadura, razón por la que pasó a denominarse *Sus baeticus*.

Actualmente, aparecen como estirpes más extendidas el Retinto Extremeño, de capas que van desde la canela hasta el rojo oscuro o retinto y provistos de cerdas de igual coloración (líneas Silvela, Villalón y Valdesequera) y el Entrepelado, de coloración oscurecida y pelo ralo. Con escaso número de representantes aparece aún el Negro Lampiño, de coloración variada, desde un acentuado negro hasta los tonos cenizas y totalmente carente de cerdas. Otras variedades de presencia reducida son el Manchado de Jabugo, de capa rubia con grandes manchas oscuras, procedente de los cruces realizados con razas inglesas y el Dorado Gaditano, de capa roja viva y dorada.

Además de la capa, otras características morfoetnológicas indican que se trata de un animal de tamaño medio o ligeramente alargado y marcado dimorfismo sexual; de esqueleto óseo fino y grácil; cabeza alargada y perfil subcóncavo; hocico poderoso, alargado y de rodete vertical; orejas de tamaño medio a grande, dirigidas hacia delante y abajo; cuello corto y bien musculado; dorso recto, alargado y con suave terminación hacia la grupa, algo caída, musculosa y con nacimiento alto de la cola; extremidades de aplomos correctos, finas a la vez que fuertes que terminan en pezuñas duras, de color negro uniforme (Fig. 2.22.). Una definición más completa del prototipo racial es la establecida en el Libro Genealógico que, a su vez, se encuentra contenida en la Norma

de Calidad (Orden APA/213/2003) para los ejemplares que opten a la tipificación de ibéricos puros.



Fig. 2.22. Imágenes de diferentes variedades de cerdo Ibérico.

Desde el punto de vista zootécnico, es la rusticidad la principal características del cerdo ibérico, de modo que es capaz de soportar tanto condiciones adversas del medio como cambios bruscos en las mismas, desde la penuria de la dehesa en verano y épocas de prolongada sequía, hasta otras de abundancia de recursos y clara sobrealimentación, factor éste determinante en la especial facultad de este animal, que no es otra que la facilidad para la acumulación de grasas como material de reserva. La explotación de esta raza porcina no va encaminada a la obtención de gran cantidad de kilogramos de carne para atender la demanda masiva del mercado, sino la producción de productos de alta calidad, lo cual ha propiciado que sea uno de los escasos tipos raciales no mejorados que han sobrevivido a las modernas técnicas de producción porcina (Ruíz, 1993).

Por tanto, la raza porcina Ibérica, con índices de transformación de alimentos nada comparables a los extraordinarios niveles que reportan otras razas más precoces, puede alcanzar un peso vivo superior a los 300 kg (25 arrobas) en edades avanzadas, si bien los procesos tradicionales persiguen obtener animales con un peso de sacrificio de 150-160 kg (13 arrobas) a los 16-24 meses de edad. Los aspectos reproductivos quedan igualmente alejados de los propios de razas más seleccionadas, con tamaños de camada de 6 a 7 lechones a las tres semanas del parto y un peso medio a esa edad entorno a los 4-4'5 kilogramos, que se eleva a los 12-14 en el momento del destete, sobre el mes y medio de edad.

Con el objeto de alcanzar mejoras en algunos de estos parámetros productivos y acortar los ciclos de producción en extensivo, el cerdo ibérico se ha cruzado con razas extranjeras como la Duroc-Jersey procedente de América (Buxadé y Daza, 2000). Los cruces aportan precocidad, aumento de la prolificidad y más rendimiento magro en la canal, con el consecuente detrimento en la calidad de los productos. Actualmente, desde la entrada en vigor de la Norma de Calidad (Real Decreto 1083/01) y el Reglamento que la desarrolla (Orden APA/213/03), sólo se puede denominar ibérico a los animales procedentes de madres ibéricas puras y padre ibérico (Ibérico puro) o Duroc (Ibérico x Duroc al 50%) o cruzado (75% Ibérico x 25% Duroc).

Bromatológicamente, la importancia del porcino ibérico reside en la extraordinaria calidad de sus carnes, cuya característica fundamental es la infiltración grasa, principalmente constituida por ácido oléico, que les proporciona jugosidad y ternura, haciéndolas muy adecuadas para la elaboración de productos transformados de altísima calidad.

Ecológicamente, el cerdo ibérico es el responsable del mantenimiento del ecosistema de la dehesa, gracias a su sistema productivo en régimen extensivo. La explotación por métodos tradicionales del cerdo ibérico se basa en el aprovechamiento de todos los recursos de la dehesa. Es el animal que mejor utiliza los frutos de las quercíneas, aprovechando también otros aportes alimenticios de procedencia natural, como hierbas y rastrojeras.

2.3.2.- Sistemas de explotación.

Desde el comienzo de su historia, el desenvolvimiento del cerdo ibérico se ha distinguido por su manejo mediante un sistema extensivo, la dehesa; dicho sistema se caracteriza por la dependencia del aprovechamiento de los recursos naturales disponibles y por la larga duración de las fases componentes de su ciclo productivo (Laguna, 1998). En general, y para todos los sistemas de explotación, en el ciclo productivo completo del cerdo ibérico se diferencian las fases siguientes:

- ✓ Cubrición de madres y parideras correspondientes, se planifican para hacerlas coincidir con las épocas en las que los lechones aprovechen mejor los pastos naturales.

- ✓ Las parideras se efectúan en modalidades distintas según cual sea el sistema empleado: cabañas o camping en los más extensivos (entre 10 y 15 cabañas/Ha), hasta sistemas con naves y pequeños corrales de ambiente controlado o el totalmente intensivo.
- ✓ Lactancia y cría, comprende el periodo que va desde el nacimiento del lechón hasta el destete y desde el destete hasta los 23-25 kilos de peso vivo, aproximadamente dos arrobas.
- ✓ Recría, es el periodo comprendido desde los 25 kilos hasta los 100-105, aproximadamente hasta las nueve arrobas. La alimentación básica es pienso concentrado, aprovechando los recursos naturales como pastos, sembrados, espigaderos, rastrojeras, barbechos, etc.
- ✓ Cebo, se trata de la fase final de la vida del animal destinado al sacrificio, la de mayor trascendencia para la calidad final y categoría del producto. Su duración, alimentación y características varían mucho de unos sistemas a otros, de modo que las modalidades van desde el cebo en naves cerradas a base de pienso concentrado y cereales, cebo en cercados con la misma base alimenticia hasta la terminación en montanera, los animales deben alcanzar alrededor de 14 arrobas (161 Kg). Del sistema que se siga se obtendrán ibéricos de pienso, recebo, campo o bellota.

Atendiendo a todos estos parámetros, se distinguen los sistemas extensivos, semiextensivo e intensivos en la producción del cerdo ibérico. Dentro de cada tipo, además, existen muchos gradientes en cuanto a la extensificación o la intensificación por lo que los límites entre unos y otros resultan en ocasiones difusos (Rueda, 2004).

1. Extensivo.

El cerdo ibérico en extensivo va haciéndose con el paso del tiempo y en libertad. Se alimenta en pastoreo y ejercitando su musculatura. Es el sistema tradicional, hasta hace muy poco el único sistema de producción del ibérico, ligado al desarrollo y conservación de la dehesa, donde se obtienen los productos de ibérico de mayor calidad.

Generalmente, los animales engordados bajo este sistema de producción son ibéricos puros. Los alojamientos y construcciones suelen ser rudimentarios, a base de

charcas y naves para las épocas de alimentación en cebadero o el recebo con zona de reposo y ejercicio. Algunas explotaciones poseen también naves de parideras sencillas con parques para los lechones.

El éxito de la montanera o periodo de cebo en extensivo, comprendido entre los meses de noviembre y febrero, depende en gran medida de la producción de bellota, que oscila entre 8 y 20 kilos de bellota por árbol medio, oscilación que unida a la de pies por hectárea, da una tremenda variabilidad, entre 200 y 800 kilos bellota/Ha. La carga ganadera de cerdos ibéricos de bellota que puede soportar una explotación es función tanto de la densidad como del desarrollo de la copa de las encinas y alcornoques.

La dieta de estos animales se complementa con la ingestión de hierba, normalmente disponible desde el otoño hasta finales de la siguiente primavera. Además, consume otros productos presentes en la dehesa como lombrices, escarabajos, lagartijas o caracoles.

2. Semiextensivo.

El sistema semiextensivo acelera la producción en niveles variables respecto al sistema tradicional, utilizando para ello alimentación con concentrados y un mayor grado de confinamiento de los animales, aunque siempre cuenta con una base territorial y superficie de dehesa muy aceptable para la obtención de cerdos de recebo de calidad.

En este caso, se introduce con mayor frecuencia padres cruzados con Duroc-Jersey al 50%, para aumentar la prolificidad y precocidad pero pudiendo acoger los productos al la Norma de Calidad y en las denominaciones de origen existentes. En general, las parideras pueden hacerse en boxes, en camping o en corrales. Siempre cuentan con más posibilidades de naves y corrales que los sistema meramente extensivos.

El cebo de los porcinos nacidos en septiembre y diciembre se destinan a la montanera del año siguiente con 16 y 13 meses, respectivamente. Dependiendo de la base territorial, pueden terminarse en montanera sin suplementación o añadir pienso y concentrados para obtener animales de recebo, siempre que hayan puesto un mínimo de 2'5 arrobas en montanera. En cambio los nacidos en marzo y junio pueden seguir un sistema similar al extensivo o alimentarse en corrales con algo de ejercicio para producir “jamones de campo”.

3. Intensivo.

Este modelo cada vez más utiliza instalaciones y procesos similares a los empleados en las producciones de cerdo blanco, si bien, en algunas regiones tradicionales como Extremadura, Andalucía o Castilla y León, aún se establecen este tipo de explotaciones con base territorial, de modo que, en alguna de sus fases, los lechones, marranos, primales o reproductores hacen ejercicio en parques o incluso en territorios mayores aunque se alimenten a base de concentrados.

Para producir porcinos de cebo, la Norma de Calidad pone como requisito mínimo que se sacrifiquen a edades superiores a los diez meses y que los piensos estén constituidos fundamentalmente con cereales y leguminosas. Generalmente, los cerdos destinados a este tipo de procesos son cruces de madres Ibéricas y padres Duroc-Jersey.

2.4.- Sobre la relación parásito-hospedador: Inmunobiología.

La penetración y el establecimiento de un parásito son dependientes de numerosos factores que difieren según la localización de éste en el hospedador. Al penetrar el parásito es reconocido como un agente extraño, lo cual desencadenará la activación de una serie de mecanismos inmunológicos que varían considerablemente en función del patógeno, vía de entrada, estado inmunitario, sanitario y nutricional del animal, entre otros.

2.4.1.- Inmunocompetencia de los porcinos.

Las principales características del sistema inmune son: la capacidad de diferenciar lo propio de lo ajeno, la especificidad de la respuesta y la capacidad de memorizarla.

Los mecanismos de respuesta inmune, natural o adquirida, se producen por una serie de mecanismos que de forma coordinada, activan diferentes poblaciones celulares y la secreción de diferentes moléculas, con la finalidad de eliminar el agente extraño (Fig. 2.23.).

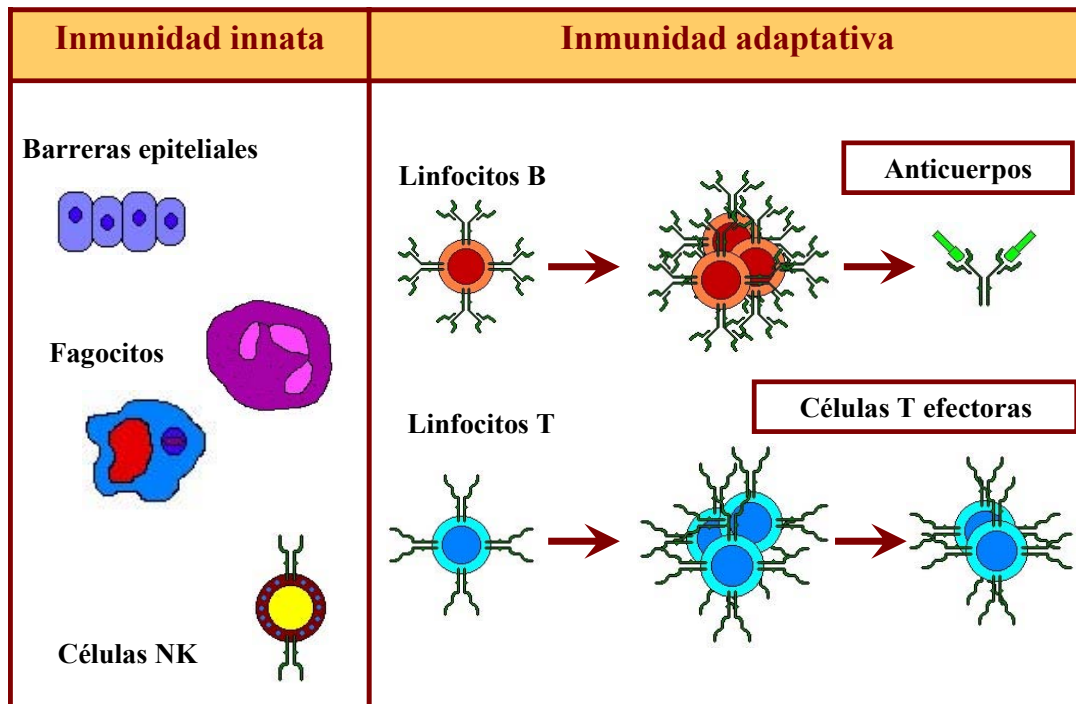


Fig. 2.23. Principales mecanismos efectores que interviene en la respuesta inmune innata y adaptativa.

2.4.1.1.- Inmunidad Innata.

Las principales barreras entre los huéspedes y su entorno son los epitelios de la piel y de los tractos digestivo y respiratorio (secreciones de las mucosas, enzimas proteolíticas, etc). Los epitelios actúan al mismo tiempo, como barreras físicas y funcionales inespecíficas frente a la infección, impidiendo la entrada de los microorganismos e interfiriendo en su crecimiento. Si éstos logran atravesar los epitelios, se encuentran con los mecanismos de defensa de la inmunidad innata, que están específicamente diseñados para reaccionar frente a los invasores y sus productos.

Se induce la activación de factores humorales como el complemento, o celulares como los fagocitos, incluidos los neutrófilos y los macrófagos, así como las células citocidas naturales. A su vez, estas células producen citoquinas pro-inflamatorias, que activan las respuestas mediadas por linfocitos.

Por ello, los mecanismos propios de la inmunidad innata estimulan a la inmunidad adaptativa subsiguiente, al proporcionar señales que son esenciales para la iniciación de las respuestas de linfocitos B y linfocitos T específicos de antígeno (Abbas *et al.*, 2000).

2.4.1.2.- Inmunidad adquirida o adaptativa.

La respuesta inmune adquirida es una respuesta específica inducida por un antígeno concreto que se genera cuando fracasa la inmunidad innata. Ésta se inicia por la interacción del antígeno extraño con los linfocitos T y B maduros, que expresan diversos receptores para los antígenos de distribución clonal.

El resultado neto de la activación de los linfocitos es la generación de células efectoras y de memoria. Según la naturaleza de estas células podemos diferenciar dos tipos de respuesta inmune adquirida (Fig. 2.24.):

- ✓ **Inmunidad Celular**, definida como el principal mecanismo de defensa frente a los microorganismos intracelulares, que son ingeridos por fagocitos y sobreviven en ellos, o que infectan células no fagocíticas. Esta forma de inmunidad está mediada por los linfocitos T de las subpoblaciones CD4 y CD8, que reconocen los antígenos peptídicos de los invasores ingeridos por los macrófagos. Una de las primeras respuestas detectables de las células T al reconocimiento antigénico es la secreción de las proteínas denominadas citoquinas. La principal citoquina producida por los linfocitos T no estimulados es la interleuquina-2 (IL-2), que actúa como factor de crecimiento y diferenciación de las células T.

- ✓ **Inmunidad Humoral**, se trata del mecanismo de defensa frente a los microorganismos extracelulares y sus toxinas. Está mediada por anticuerpos producidos por linfocitos B, aunque requieren la participación de los linfocitos T colaboradores. No obstante, en el caso de antígenos no proteicos, como los polisacáridos y los lípidos, estos mecanismos se desarrollan en ausencia de las células T CD4⁺.

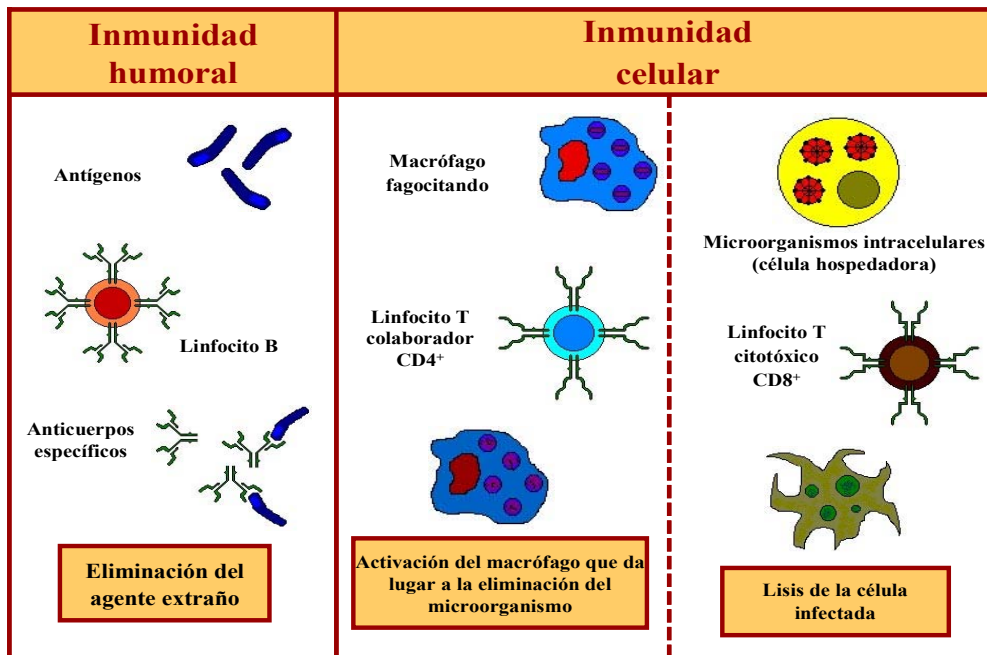


Fig. 2.24. Esquema de los mecanismos efectores de la inmunología humoral y celular.

Las respuestas de inmunidad humoral dependiente de los linfocitos T son sumamente especializadas, y generan anticuerpos de diferentes isotipos, como diversos subtipos de inmunoglobulinas (Ig) G, E y A, cada una de las cuales media funciones efectoras específicas. En cambio, las respuestas de los anticuerpos frente a antígenos T-independientes son relativamente sencillas y dependen principalmente de la IgM de escasa afinidad.

Tabla 2.9. Cuadro resumen de los diferentes tipos de mecanismos de defensa.

BARRERAS FÍSICAS Y QUÍMICAS
Piel
Secreciones mucosas
pH del estomago
Enzimas proteolíticas
INMUNIDAD INNATA (Factores humorales y celulares)
Complemento (vía alternativa)
Fagocitosis (Macrófagos, neutrófilos, etc.)
Activación de las células NK
Citoquinas: INF- γ

INMUNIDAD ADQUIRIDA (Factores humorales y celulares)

Activación de linfocitos de **T** (colaboradores y citotóxicos)

Activación de linfocitos de **B** ----Anticuerpos.

Citoquinas de perfil Th1 o Th2: IL-2, INF- γ , IL-4, IL-10,...

2.4.1.3.- Características diferenciales del sistema inmune de los porcinos.

El estudio del sistema inmunológico de los porcinos, se ha llevado a cabo para poder identificar los tipos de respuestas desarrolladas frente a diferentes agentes infecciosos y frente a antígenos endógenos. Además, el cerdo es un excelente modelo para emular las enfermedades humanas para su estudio *in vivo* (Tumbleson *et al.*, 1996), aunque es evidente que ambas especies no son similares. Existen diversos aspectos que reflejan algunas diferencias del sistema inmunológico de los porcinos:

▪ **Diferencias anatómicas.**

En los cerdos, como en otras especies, el tamaño de los órganos linfoides y sus diferentes compartimentos dependen en gran medida de la edad y del status inmunológico del animal (Rothkötter *et al.*, 1991; Joling *et al.*, 1994). Por ejemplo, los ganglios linfáticos de los lechones recién nacidos se presentan sin los centros germinativos y son de menor tamaño que los observados en los cerdos convencionales. Por tanto, la alimentación, la edad y la estimulación antigénica deben ser tenidas muy en cuenta en los animales de experimentación.

Es de resaltar la inusual disposición celular y circulación linfática en las cadenas ganglionares en el cerdo. Esta estructura y su funcionalidad anatómica, así como el número de células linfoides presentes en los órganos no-linfoides del cerdo han sido ampliamente estudiadas (Binns *et al.*, 1985; Binns y Pabst, 1994, 1996).

Histológica y funcionalmente se observan dos zonas bien diferenciadas en el parénquima ganglionar: la corteza y la médula. Su distribución diferencial con otras especies se presenta en que el tejido cortical, constituido principalmente por poblaciones de linfocitos B y linfocitos T CD4⁺, se ubica en la región central del ganglio. Por su

parte el tejido medular, pobre en linfocitos pero con importantes poblaciones de macrófagos y células dendríticas, se localiza en la periferia de las unidades medulares.

Además, puesto que en la mayoría de las especies, los linfocitos acceden a los órganos linfoides secundarios a través de la circulación sanguínea, permanecen en ellos durante un tiempo, y si no encuentran ninguna estimulación antigénica apropiada, abandonan dicho órgano linfoide a través de los conductos linfáticos. Sin embargo, este patrón circulatorio en el cerdo se produce de manera inversa. Los linfocitos entran en los ganglios a través de los vasos linfáticos y salen directamente al torrente circulatorio (Binns y Pabst, 1996).

El tejido linfoide asociado a las mucosas forma parte del sistema inmune aunque con cierta independencia, es el encargado de proteger las mucosas del cerdo del ataque de los agentes patógenos, tanto en una respuesta primaria como secundaria. Éste está formado por nódulos de tejido linfoide que según su localización, se denominan: GALT (del inglés *Gut Associated Lymphoid Tissues*) en el intestino y BALT (del inglés *Bronchus Associated Lymphoid Tissues*) en el tracto respiratorio (Saif, 1996; Stokes *et al.*, 1996).

Por tanto, el pulmón es considerado parte integrante del sistema inmune asociado a mucosas (Pabst y Binns, 1994). Aunque el pulmón no es un órgano propiamente linfoide, contiene una gran cantidad de células linfoides, aproximadamente el 0'2% del total de linfocitos cuantificados en cerdos jóvenes (Pabst y Trepel, 1975). Los linfocitos presentes en los espacios broncoalveolares no son células efectoras, pero sí retornan a los ganglios linfáticos bronquiales vía linfática (Pabst y Binns, 1995). Estos se ubican principalmente en los compartimentos intravasculares e intersticiales del pulmón y en BALT, además de encontrarse linfocitos intraepiteliales y en la lámina propia de los bronquios, así como en el espacio broncoalveolar, los cuales pueden ser analizados mediante la realización de lavados broncoalveolares (BAL).

Tabla 2.10. Cuadro resumen de los principales órganos linfoides de la especie porcina.

ORGANOS LINFOIDES		
ÓRGANOS PRIMARIOS Producción y diferenciación de linfocitos.	MÉDULA ÓSEA: Maduración de Linfocitos B	
	TIMO: Maduración de Linfocitos T	
ÓRGANOS SECUNDARIOS Captación y procesamiento de antígenos.	SISTÉMICOS	Ganglios linfáticos Bazo
	AGRUPADOS EN LAS MUCOSAS	Tonsilas Placas de Peyer
	AISLADOS EN LAS MUCOSAS	Folículos intestinales (GALT) Folículos bronco-pulmonares (BALT)

Actualmente, existen numerosos datos sobre las poblaciones celulares broncoalveolares, si bien éstos son aparentemente bastante dispares. Esta gran variabilidad puede ser debida al uso de diferentes técnicas de BAL, a las diferentes razas de animales empleados en su estudio e incluso debido a las diferentes edades de los animales. El consenso general al que se ha llegado en animales sanos o SPF (del inglés, *Swine Pathogen Free*) convencionalmente criados, es que el contenido celular del BAL está constituido por un 93-96% de macrófagos, entre un 3-5% de linfocitos, entre un 2-4% de neutrófilos y el resto de células minoritarias abarcan aproximadamente un 0'1%, éstas son principalmente los eosinófilos y basófilos (Ganter y Hensel, 1997). Estos resultados fueron corroborados posteriormente por Hennig-Pauka *et al.* (2001), quienes identificaron y cuantificaron las poblaciones celulares en los fluidos de los lavados broncoalveolares (BALF) de cerdos sanos, donde los macrófagos alveolares resultaron ser la población más abundante ($2'02 \times 10^9$ - $49'91 \times 10^9$ células por litro de BALF), en menor cantidad se identificaron los linfocitos ($0'1 \times 10^9$ - $4'74 \times 10^9$ células por litro de BALF) y neutrófilos polimorfonucleares ($0'01 \times 10^9$ - $3'48 \times 10^9$ células por litro de BALF).

Una particularidad del BALT en la especie porcina, a diferencia de los roedores o de los humanos, es la presencia en los pulmones de macrófagos intravasculares que presentan una gran actividad citocida. Estos macrófagos intravasculares son capaces de fagocitar, producir citoquinas como IL-1 y TNF- α y realizar eficazmente la lisis intracelular. En cambio, los macrófagos alveolares pueden fagocitar bacterias, ya que presentan una importante capacidad fagocítica y endocítica, además de su rapidez acidificadora de los endosomas (Basta *et al.*, 1999). También pueden producir citoquinas como la IL-1, si bien su función citocida es relativamente escasa (Chitko-McKwon *et al.*, 1991; Bailey *et al.*, 2000). Son numerosos los autores que han pretendido conocer los diferentes roles que desarrollan los macrófagos alveolares en las respuestas inmunes locales, y es que su funcionalidad como célula fagocítica y la capacidad de limitar los procesos inflamatorios en el pulmón (Herscowitz *et al.*, 1979; Etensohn *et al.*, 1988), no son las únicas que desempeña en la defensa inmunológica. Además, son consideradas células inmuno-moduladoras de la respuesta inmune en el pulmón, ya que se ha comprobado que pueden estimular la actividad de los linfocitos durante la fase inicial de una infección (Basta *et al.*, 2000).

▪ **Diferencias genéticas.**

A diferencia de lo que ocurre en roedores y primates, el repertorio de anticuerpos en los porcinos se desarrolla a partir de un número relativamente pequeño de genes V_H (del inglés, *Variable Heavy*) o de dominio variable de las cadenas pesadas. En el cerdo tan sólo se ha encontrado un segmento de los genes J que codifican la región variable, mientras que en el ratón y en el hombre se han definido cuatro y nueve, respectivamente (Butler *et al.*, 1996 a, b).

No se conoce con certeza si la linfogénesis de células B es un proceso continuo a lo largo del ciclo vital, como ocurre en roedores y primates, o si dichas células descienden en su mayoría del linaje B1 y se desarrollan sólo durante las etapas fetal y neonatal de la vida del animal. El hecho de que los porcinos carezcan por completo de IgD podría ser significativo, dado que estos anticuerpos se expresan débilmente en las células B1 de los roedores (Butler, 1998).

En el cerdo se han caracterizado cuatro isotipos de inmunoglobulinas denominadas IgM, IgA, IgG e IgE. Quizás lo más sorprendente de esta especie animal es la heterogeneidad de las subclases de inmunoglobulinas, ya que son numerosos los

estudios serológicos que han reconocido cuatro subclases diferentes de IgG (Bokhout *et al.*, 1986; Olsovská, *et al.*, 1982; Van Zaane y Hulst, 1987) y numerosos alotipos (Rapacz y Hasler-Rapacz, 1982). Posteriores análisis con ADN complementario y genómico, han revelado un patrón de cinco subclases, incluidas al menos, ocho variantes alotípicas en la especie porcina de la IgG. Estas son clasificadas de acuerdo a la similitud que presenta las secuencias de aminoácidos en dos grupos; uno formado por IgG₁ e IgG₃ y el otro constituido por IgG_{2α}, IgG_{2β} e IgG₄ (Kacsokovics *et al.*, 1994).

En la membrana de los linfocitos T, además del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*), se pueden diferenciar dos tipos de receptores específicos para los complejos péptido-molécula del MHC, denominados TCR, del inglés *T Cell Receptor*.

La especie porcina se ha distinguido, frente al resto de especies, por presentar una enorme diversidad en los complejos genéticos que constituyen los receptores de estas células T. La caracterización de las regiones constantes de los TCR en la especie porcina ha revelado la existencia de una cadena α , dos β , al menos tres γ y una δ , las cuales muestran una gran similitud en el nivel de aminoácidos con las cadenas de los receptores de otras especies (Thome *et al.*, 1994).

Yang y Parkhouse (1996) realizaron una clasificación fenotípica de las poblaciones linfocitarias en sangre y tejido linfático de porcinos a diferentes edades, donde se distinguieron tres subpoblaciones celulares: α - β TCR, γ - δ TCR y células NK (del inglés, *Natural Killer*).

Dentro de las células T α - β , se identificaron cuatro subpoblaciones; CD4⁺CD8⁻ y CD4⁺CD8^{lo} (“lo” del inglés *low*, expresión con baja intensidad), ambas incluidas dentro de los linfocitos T colaboradores y las subpoblaciones CD4⁻CD8^{lo} y CD4⁻CD8^{hi} (“hi” del inglés *high*, expresión con alta intensidad), incluidas dentro de los linfocitos T citotóxicos. Además, en este estudio se demuestra que los linfocitos CD4⁺CD8⁺ son células con receptores α - β , aunque expresan el CD8 siempre con baja intensidad (CD8^{lo}). Esto puede ser debido a que la molécula del CD8 presente en esta población consta de homodímeros de la cadena α (Yang y Parkhouse, 1996). Además, estas expresan los antígenos CD3 y MHC de clase II, pero no expresan CD1 (Saalmüller *et al.*, 1989 y 1991). Esta subpoblación de células T, con expresión dual de los marcadores CD4 y CD8, es única por su elevada presentación en los linfocitos periféricos de los porcinos

en comparación con la especie humana (Saalmüller *et al.*, 1987; Pescovitz *et al.*, 1994; Zuckermann y Husmann, 1996).

Dentro de los linfocitos T γ - δ , se encuadran un tipo de células que carecen de la mayoría de los receptores clásicos o característicos de las células T, por ello anteriormente fueron denominadas células nulas. Yang y Parkhouse (1996) han identificado estos linfocitos T en sangre periférica, bazo, ganglios y tonsilas de cerdos sanos como CD3⁺CD4⁻, diferenciándolos en tres grupos fenotípicos diferentes, el más frecuente de todos CD2⁻CD8⁻, así como CD2⁺CD8^{lo} y CD2⁺CD8⁺.

Trinchieri (1989) observó mediante el análisis de los parámetros citométricos, que el tamaño y la granularidad de las células NK en la especie humana son superiores al de los porcinos. No obstante, la población de células NK en cerdos se identificó molecularmente como CD2⁺CD3⁻CD4⁻CD8^{lo}, fenotipo muy similar al descrito para las células NK en los humanos (Yang y Parkhouse, 1996). Posteriormente, a las células de actividad NK se le asignaron expresiones negativas de CD5 (Saalmüller *et al.*, 1994; Appleyard *et al.*, 1998) y CD6 (Pauly *et al.*, 1996), la ausencia de estos antígenos dotaban a las células de actividad citolítica.

▪ **Diferencias fisiológicas.**

Los diferentes isotipos de las inmunoglobulinas G porcinas han sido relacionados con la resistencia y susceptibilidad frente a las infecciones, aunque aún no han sido descritas las relaciones funcionales concretas de cada isotipo.

Así Furesz *et al.* (1998) observaron que el ratio de IgG₁/IgG₂ aumentaba correlativamente en casos de resistencia a la toxicidad extracelular causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Según Crawley *et al.* (2003) la expresión del isotipo IgG₂ o IgG₁ en la especie porcina, está controlada por la producción de citoquinas derivadas de los linfocitos T colaboradores (CD4⁺) del tipo 1 (respuesta Th1) como son IFN- γ e IL-12 o del tipo 2 (respuesta Th2) como son IL-4 e IL-10. Hecho que define la polarización de la respuesta inmune hacia una inmunidad mediada por células (Inmunidad Celular) o por anticuerpos (Inmunidad Humoral). En la especie porcina, el descenso de la expresión de la IL-4 se ha relacionado con la disminución en el grado de especificidad humoral, por ello se ha especulado con la posibilidad de que IL-4, considerada como un mediador

típico de la respuesta Th2 en humanos y roedores, ceda ese papel a otras interleuquinas como la IL-6, IL-13 y TNF- α (Reddy *et al.*, 2000).

La mayor producción de IgG₁ respecto a IgG₂ por parte de linfocitos B cultivados *in vitro*, se incrementaba significativamente en presencia de la IL-10, mientras que la respuesta inversa tenía lugar cuando se cultivaban en presencia de IFN- γ o IL-12 (Crawley *et al.*, 2003; Crawley y Wilkie, 2003). Se ha demostrado que la expresión del isotipo IgG₁ está controlada por citoquinas del tipo Th2, mientras que la regulación de la producción de IgG₂ es llevada a cabo por citoquinas del tipo Th1. Originalmente, a la IL-10 que actúa a nivel de linfocitos T, macrófagos y células presentadoras de antígeno, se le ha considerado como una inhibidora de las citoquinas propias de una respuesta Th1 (Fiorentino *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1993). Actualmente, la IL-10 resulta ser un agente anti-inflamatorio que media de forma negativa el “feedback” entre Th1 y Th2 (Murraille y Leo, 1998), de tal manera que es capaz de estimular la quimiotaxis de los CD8⁺ (Jinquan *et al.*, 1993), la diferenciación y actividad de los CD8⁺ y NK (Carson *et al.*, 1995), así como la expresión de MHC de clase II en los linfocitos B para la producción de anticuerpos específicos (Levy y Brouet, 1994).

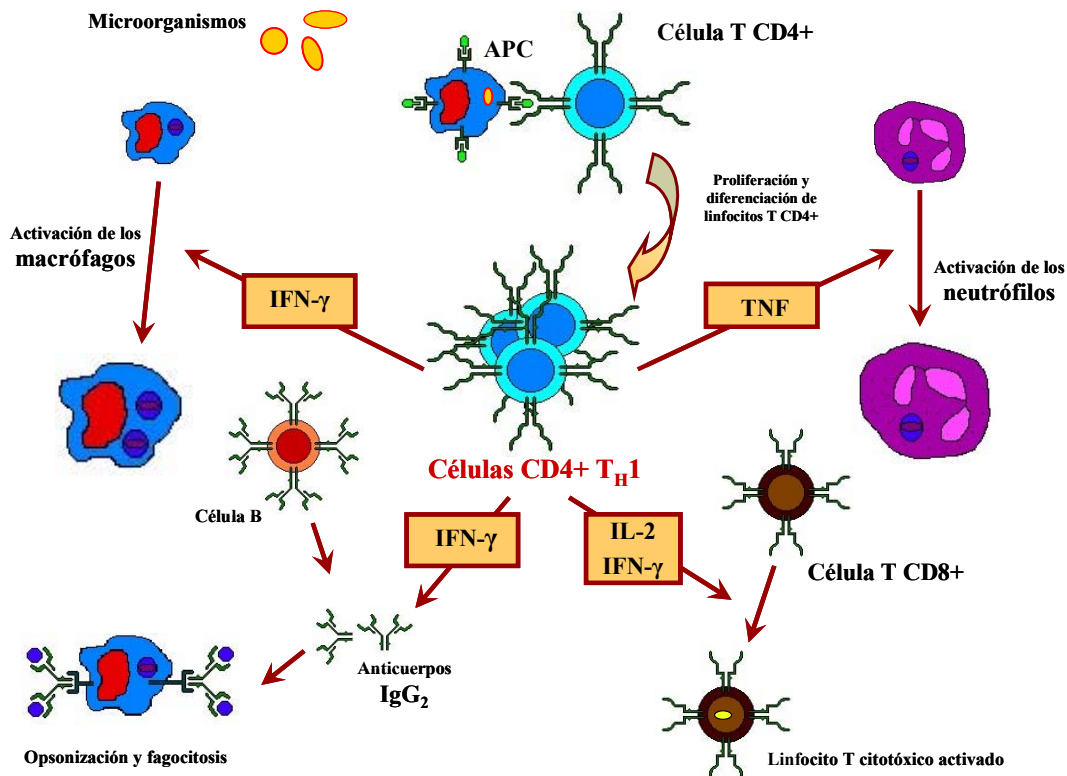


Fig. 2.25. Esquema de la inducción a la respuesta inmune del tipo Th1.

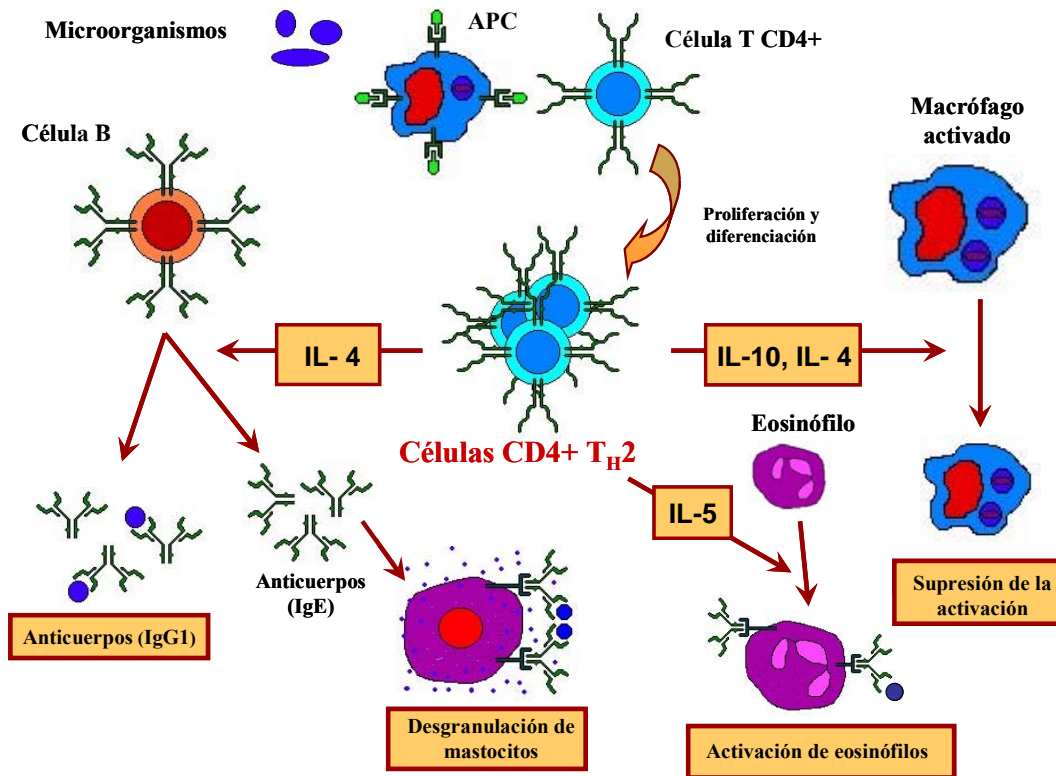


Fig. 2.26. Esquema de la inducción a la respuesta inmune del tipo Th2.

Una de las principales diferencias que presenta el sistema inmunológico de la especie porcina, al igual que los rumiantes y los pollos, es el gran número de células nulas o linfocitos T γ - δ presentes en sangre periférica, minoritarias en otras especies como en los humanos y roedores (Thome *et al.*, 1994; Boeker *et al.*, 1999). Puesto que estos linfocitos difieren de los convencionales en su caracterización molecular, distribución tisular y comportamiento migratorio, la elucidación del papel que desempeñan estas enigmáticas células en la iniciación y regulación de las funciones inmunes es aún desconocida (Binns, 1994). Joling *et al.* (1994) detectaron que la mayoría de las células nulas, entre un 5 y 13%, se localizaban en la región medular del timo, lo cual probablemente represente a un tipo de célula de recirculación. Además, denunciaron que en cerdos de una semana de edad, la mitad de los linfocitos presentes en bazo y sangre eran γ - δ , los cuales disminuían a lo largo de la vida del animal a favor de los $CD8^+$, aunque en cerdos de 40 semanas de edad aún se observaron linfocitos T γ - δ localizados en la pulpa roja del bazo.

Otra de las diferencias fisiológicas del sistema inmune porcino frente a otras especies, es la existencia de una importante población periférica de linfocitos T dobles

positivos (CD4⁺CD8⁺). Se ha observado que esta subpoblación T α - β en los cerdos aumenta con la edad del animal, ya que en animales de un mes esta población representa un 1% del total de las células linfocitarias presentes en sangre periférica, mientras que en cerdos de 3 años aumentan hasta alcanzar un 60% (Peskovitz *et al.*, 1985; Saalmüller *et al.*, 1989; Yang y Parkhouse, 1996). También se ha observado un significativo incremento de los dobles positivos mediante la activación *in vitro* con diversos antígenos, como por ejemplo el virus de la enfermedad de Aujeszky (Pescovitz *et al.*, 1994). La función de estos linfocitos se cree ligada a la de células de memoria (Summerfield *et al.*, 1996; Zuckermann y Gaskins, 1996). Sin embargo, últimamente se ha relacionado con la actividad cooperadora de los linfocitos T en las infecciones primarias. Licence *et al.* (1995) sugirieron que algunos linfocitos CD4⁺ podían proceder de la población de células T CD4⁺CD8⁺ derivados de la pérdida del CD8. Por tanto, se definen como poblaciones cooperadoras en las respuestas primarias a las células T CD4⁺CD8⁻ y CD4⁺CD8⁺, puesto que ambas actúan en conjunto frente a agentes virales, mientras que en la respuesta secundaria actúan únicamente las CD4⁺CD8⁺ (Saalmüller *et al.*, 1999). Otros autores han contemplado la posibilidad de que las células T dobles positivas cooperen con los linfocitos B en la producción de inmunoglobulinas específicas durante el desarrollo de una respuesta inmune humoral (Ober *et al.*, 1998).

2.4.2.- Respuesta inmune de los porcinos frente a las parasitosis.

El conocimiento de la inmunología, como el de las demás ciencias, se encuentra en constante avance en paralelo con el desarrollo tecnológico. A pesar de los avances conseguidos en el campo de la inmunología porcina en los últimos años (desarrollo de numerosos anticuerpos monoclonales, animales singénicos para el sistema de histocompatibilidad, etc.), todavía son muchos los retos que quedan por conocer.

Sin ir más lejos, la lucha inmunológica contra las enfermedades parasitarias todavía presenta grandes limitaciones, es aún una ciencia muy poco cultivada. Las principales características de la respuesta inmunológica de los porcinos frente a los parásitos, que las diferencian de la respuesta frente a bacterias y virus, se pueden resumir en los siguientes puntos (Sher y Colley, 1989; Mitchell, 1991; Finkelmann *et al.*, 1991):

- ✓ Los parásitos están formados por una mayor cantidad de antígenos debido a su mayor tamaño y complejidad estructural. A pesar de la gran capacidad antigénica que presentan los parásitos, no todas las respuestas inmunes que inducen son efectivas. Esto es debido, fundamentalmente, a los cambios morfológicos que sufren a lo largo de sus ciclos biológicos.
- ✓ Las infecciones, tanto en el cerdo como en otras especies, suelen de carácter subclínico, con gran tendencia a la cronicidad. El parásito suele vivir durante largos periodos de tiempo en su huésped, induciendo una estimulación antigénica prolongada, con activación de un gran número de mecanismos inmunitarios, tanto de tipo humoral como celular. Dentro de ellos, los anticuerpos y los mecanismos citotóxicos juegan el papel más importante.
- ✓ Los parásitos son capaces de desarrollar diferentes mecanismos de evasión de la respuesta inmune o al menos que ésta no sea muy eficaz. Entre ellos, cambio de la estructura antigénica en las diferentes fases del ciclo parasitario, modificación de los antígenos de superficie o infecciones intracelulares sin cambios en la membrana de la célula parasitada.

2.4.2.1.- Respuesta inmune de los porcinos frente a *Metastrongylus spp.*

En general, la infección por vermes pulmonares en los porcinos desencadena diversas manifestaciones de inmunidad. Así, la presencia de anticuerpos frente a *M. apri* ha sido verificada mediante las técnicas de fijación del complemento, precipitación, hemaglutinación o inmunofluorescencia (Barriga *et al.*, 1981). No obstante, existe un gran desconocimiento en cuanto a la patogenia del parásito y los mecanismos de inmunidad humoral o celular que se desarrollan en los hospedadores frente a la invasión de estos, para evitar su implantación a nivel pulmonar.

Los primeros estudios sobre los mecanismos efectores en la resistencia de los porcinos frente a las re-infecciones por *Metastrongylus spp.*, apuntaron la importancia de los eosinófilos y de las gammaglobulinas, los cuales sufrían un incremento mayor y más rápido en las segundas infecciones, junto con una caída simultánea de la seroalbúmina (Jaggers y Herbert, 1968). Este incremento de las gammaglobulinas en el suero, también ha sido relacionado con la resistencia mostrada frente a *M. apri* por los

hámsteres, después de la administración de 800 L3 tras una previa infección con 160 L3 (Kumar y Mortelmans, 1976). Posteriormente, Barratt (1972) demostró mediante inmunodifusión radial, que la reacción de hipersensibilidad desencadenada en los cerdos inmunizados y reinfectados estaba mediada por anticuerpos específicos del tipo IgA e IgE.

Así mismo, Barratt y Herbert (1972) mediante el uso del test de hemaglutinación pasiva, detectaron la presencia de los primeros anticuerpos específicos circulantes al día 7 y 14 post-infección en las infecciones simples con dosis de 1000L3 y 5000L3, respectivamente, alcanzando los niveles máximos entre los días 14 y 21 tras la infección (titulación de 1:81). En los casos ensayados de infecciones repetidas, los primeros anticuerpos eran observados a los 7 días, mientras que los niveles máximos se detectaban a los 14 días tras el reto (titulación de 1:128). Resultados similares fueron manifestados durante la estandarización de un método de diagnóstico serológico (IFI) en porcino frente a la infección por *M. apri*, puesto que los niveles de fluorescencia más elevados se detectaban entre los días 14 y 33 tras la infección, aunque la presencia de fluorescencia persistía hasta el día 85 post-infección (Kumar *et al.*, 1978).

En los diversos estudios llevados a cabo sobre infecciones experimentales de *Metastrongylus spp.* en cerdos, se han descrito los importantes infiltrados celulares a nivel del parénquima pulmonar, principalmente de eosinófilos, neutrófilos y macrófagos (Mackenzie, 1958 y 1959). Incluso, se ha descrito una densa infiltración de eosinófilos en el pulmón y eosinofilia en sangre periférica, en el momento de la llegada de las primeras larvas de *M. apri* al pulmón proporcional a la carga parásita (Sasaki y Hyogo, 1977). Mediante ensayos *in vitro*, Sasaki y Katsuno (1982) confirmaron que los extractos solubles de adultos de *M. apri*, usados como estimuladores celulares, poseían actividad quimiotáctica para los eosinófilos y neutrófilos. En ulteriores estudios (Sasaki y Katsuno, 1983 y 1984), identificaron que los antígenos elaborados a partir de L3 de *M. apri*, son estimuladores de los eosinófilos, mientras que los obtenidos a partir de huevos embrionados y de adultos del nematodo presentan actividad quimiotáctica por los neutrófilos y macrófagos.

El grado de importancia que poseen los linfocitos T en la respuesta inmune celular desencadenada frente a infecciones por *M. apri*, ha sido puesta en evidencia mediante el análisis comparativo de la respuesta celular desencadenada en animales

sanos y timentomizados, tras la infección experimental siguiendo diferentes patrones de dosificación (Koga *et al.*, 1976). Con la finalidad de alcanzar un mayor conocimiento de los mecanismos de inmunidad celular protectora desarrollados en animales vacunados con L3 atenuadas, sus células esplénicas fueron cultivadas *in vitro* en presencia de L3 de *M. apri*. A tenor de los resultados obtenidos en estos ensayos Sakamoto (1978) apuntó la importancia tanto de los linfocitos T como de los linfocitos B, ambos presentes en los folículos esplénicos, en la respuesta inmune celular frente a las L3 de *M. apri*.

Como ocurre en la mayoría de las infecciones tanto parasitarias como víricas o bacterianas, los mecanismos efectores humorales y celulares del sistema inmunológico interactúan entre sí para estimularse o inhibirse. Así mismo, se ha observado que el suero de hámsteres infectados por *M. apri*, promueven un mayor grado de adherencia de los eosinófilos peritoneales, obtenidos de animales normales e infectados, a las L3 cultivadas *in vitro* (Sasaki y Katsuno, 1986). Ésto indica la dependencia existente entre los eosinófilos y la presencia de inmunoglobulinas específicas en las respuestas protectoras frente a *M. apri*.

2.4.2.2.-Respuesta inmune de los porcinos frente a otras parasitosis.

Según Urban *et al.* (1996), en general, los parásitos intracelulares estimulan una respuesta de tipo Th1, donde el INF- γ es el activador inmune predominante. Esta citoquina inhibe la actividad de la IL-4 en las células B y además promueve el desarrollo de células plasmáticas para que sintetice anticuerpos del tipo IgG₂, que es considerada de mayor importancia en infecciones virales y microbianas porque establece con mayor eficacia la fijación de las proteínas del complemento (Paul, 1987).

Los parásitos extracelulares estimulan una respuesta tipo Th2, que sintetiza un patrón de citoquinas que incluyen a IL-4, IL-5, IL-9 e IL-10 (Mosmann y Coffman, 1989). En estudios con ratones, la IL-4 producida por las células Th2 inducen una población de células B, para diferenciarse preferentemente en células plasmáticas que segreguen anticuerpos de los isotipos IgG₁ o del tipo IgE (Finkelman *et al.*, 1997), mientras que la IL-5 estimula la diferenciación de las células B a células plasmáticas que producirán anticuerpos del tipo IgA (Murray *et al.*, 1987).

Muchos autores han establecido que la defensa contra la mayoría de infecciones por helmintos se define por una elevada respuesta de los anticuerpos del tipo IgE, así como por una eosinofilia, y en algunos casos determinados por una mastocitosis (Urban, 1986; Finkelman *et al.*, 1991). No menos importante es el papel que desempeñan las citoquinas en la estimulación de esta respuesta celular y humoral, por ejemplo IL-4 estimula la presencia de IgE (Finkelman *et al.*, 1988), IL-5 provoca eosinofilia (Coffman *et al.*, 1989) e IL-3, IL-4 e IL-10 producen mastocitosis (Madden *et al.*, 1991; Thompson-Snipes *et al.*, 1991).

Este tipo de respuesta T-dependiente, observada en infecciones causadas por diferentes helmintos, se atribuyen a la tendencia que presentan estos parásitos a estimular la subpoblación Th2 de las células T efectoras CD4⁺, que secretan IL-4 y son capaces de estimular la producción de IgE e IL-5, la cual estimula el desarrollo y activación de los eosinófilos. Por tanto, las respuestas inmunológicas desencadenadas por los helmintos, son tanto de naturaleza celular como humoral. Puesto que la citotoxicidad celular de los eosinófilos depende de la unión de los anticuerpos IgE a la superficie de los helmintos, quienes una vez activados se acoplan a través de sus receptores, secretando las enzimas de sus gránulos citoplasmáticos que destruyen a los parásitos. Los eosinófilos juega un papel decisivo en las parasitosis, ya que pueden matar más eficazmente a los helmintos que otros leucocitos, porque la proteína básica principal de sus gránulos es más tóxica para éstos que las enzimas proteolíticas y que los reactivos derivados de la oxidación-reducción producidos por los neutrófilos y macrófagos.

Murrell (1985) observó que los adultos de *Trichinella spiralis* eran eliminados del tracto intestinal con mayor rapidez en animales inoculados por segunda vez con L1 del nematodo. Además, la intensidad de este evento resultó ser dependiente de la dosis inicial aplicada de L1 de *T. spiralis*. Posteriormente, mediante el estudio del perfil de inmunoglobulinas presentes en la infección experimental de cerdos con *T. spiralis*, se observaron que la IgG e IgG₁ eran responsables de la respuesta protectora, mientras que la IgM sólo aumentó durante las primeras semanas de la infección e IgG₂ apenas se registró, aunque el patrón que seguía fue similar al de IgG e IgG₁ (Serrano *et al.*, 2001). A su vez, en infecciones experimentales llevadas a cabo en roedores con *T. spiralis*, se mostró que los procesos de resistencia a esta parasitosis estaban correlacionados con un

patrón de citoquinas de tipo Th2, aumento de IL-5 y disminución de INF- γ , mientras que la susceptibilidad venía definida por el patrón inverso, IL-5 reducida e INF- γ elevado (Pond *et al.*, 1989).

La ascariosis es una de la parasitosis más estudiadas en el porcino. Son muchos investigadores que han encontrado serias dificultades para crear infecciones patentes de *Ascaris suum* en cerdos experimentalmente infectados. Así, Andersen *et al.* (1973) demostraron una relación inversa entre la dosificación de huevos y el número de formas adultas desarrolladas en el intestino. Los cerdos inoculados con *A. suum* exhiben un perfil de anticuerpos del tipo IgG₁ e IgM, mientras que los cerdos inmunizados con diferentes fracciones antigénicas de *A. suum* desarrollaron principalmente los isotipos IgG₁ e IgG₂, y en menor medida IgM. Estos resultados sugieren que la resistencia adquirida frente a las larvas migratorias de *A. suum* está correlacionada con la producción de anticuerpos específicos del tipo IgG₁ e IgM, por lo que los futuros protocolos de inmunización investigados deberían centrarse en la estimulación de una respuesta del tipo Th2 (Frontera *et al.*, 2003). A nivel local, principalmente en los bronquios y áreas peribronquiales, se ha detectado una importante presencia de la IgA en animales infectados con *A. suum*, sugiriendo un papel preponderante de esta inmunoglobulina en la protección frente a las larvas migratorias a nivel pulmonar (Frontera *et al.*, 2004).

Sobre la respuesta inmune celular desarrollada en los porcinos frente a *A. suum*, Lunney *et al.* (1986) detectaron, mediante el análisis citométrico de las células mononucleares procedentes de sangre periférica en animales infectados e inmunizados, que la exposición natural de este parásito provocaba una importante activación celular, principalmente de los macrófagos y de las células que presentan antígenos MHC de tipo II. Por su parte, las poblaciones de linfocitos T colaboradores y citotóxicos se mantenían invariables tras la exposición del mencionado parásito. La respuesta inmune celular a nivel local frente a *A. suum*, presenta un significativo aumento de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y de linfocitos B, acompañado por un disminución de las células T CD8⁺ presentes en los ganglios linfáticos hepáticos y pulmonares después de la inoculación con el parásito (Jungersen *et al.*, 2001). Sin embargo, este incremento detectado en los linfocitos B entre un 10% y un 20%, resulta modesto si se compara con otras infecciones que afectan a los pulmones, puesto que se han registrado en casos de

neumonía por *Mycoplasma hyopneumoniae*, aumentos de hasta el 40% de las células B en los ganglios linfáticos bronquiales (Walker *et al.*, 1996).

La importancia de la regulación por parte de las citoquinas en la expresión de la respuesta inmune de tipo Th1 o Th2, ha sido ampliamente estudiada en las nematodosis gastrointestinales (Urban *et al.*, 1991; Else *et al.*, 1994). La respuesta inmune de los porcinos frente a otros nematodos como *Trichuris suis* parece seguir el mismo patrón que en los casos anteriores, ya que Mansfield *et al.* (2003) describieron la estimulación de un patrón de citoquinas de tipo Th2.

En cambio, en cerdos vacunados contra *Taenia solium* se ha registrado una producción de citoquinas del tipo Th1, principalmente un significativo aumento de IL-2 e INF- γ , acompañado de una inhibición de IL-4 e IL-10, tras la estimulación específica de los mononucleares periféricos con péptidos individuales procedentes de *T. solium* (Díaz *et al.*, 2003). Este perfil de citoquinas produce una respuesta inflamatoria local exacerbada durante las fases iniciales del establecimiento del cisticerco, lo cual probablemente interfiere en el establecimiento de una respuesta humoral específica frente al parásito.

Los estudios llevados a cabo por Zarlenga *et al.* (2004) y Dawson *et al.* (2004a, b) son los primeros análisis desarrollados sobre los niveles de expresión de los receptores específicos de IL-4 e IL-13 en las poblaciones de linfocitos y macrófagos de porcinos parasitados, concretamente con *Toxoplasma gondii*, *A. suum* y *T. suis*. En estos estudios, se demostró que los animales parasitados con *T. gondii* exhibían una respuesta de tipo Th1, puesto que se producía un significativo incremento del INF- γ y del TNF- α . Por lo contrario, el patrón de citoquinas mostrado por los animales parasitados por *A. suum* y *T. suis*, aumento de la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 se corresponde a un tipo de respuesta inmune Th2.

2.4.3.- Respuesta inmune de los porcinos frente a otras patologías.

En las infecciones víricas se desarrollan diferentes mecanismos de la respuesta natural y adquirida, tanto frente al virus libre como contra la célula infectada o contra ambas. En la mayoría de las infecciones virales, el sistema inmune tiene la oportunidad de enfrentarse a la partícula viral en algún momento de la infección, antes de penetrar en la célula o al salir de ella tras la replicación, así como de reconocer las células infectadas,

ya que en ellas aparecen antígenos de infección en la membrana, que activan los primeros mecanismos efectores del sistema inmunológico (Abbas *et al.*, 2000). Sin embargo, en algunas infecciones como las causadas por el virus de la enfermedad de Aujeszky (Rooij *et al.*, 2004) o el virus del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) (López *et al.*, 1999; Drew, 2000) la infección puede cursar durante largos periodos de tiempo sin que aparezca la partícula viral, ni las células infectadas expresen estos antígenos de membrana.

Estudios llevados a cabo en ratones, mostraron que tanto el INF- γ como los linfocitos T colaboradores juegan un papel muy importante en la protección frente a dosis letales del virus de Aujeszky (Bianchi *et al.*, 1998; Grob *et al.*, 1999). En la especie porcina, su hospedador natural, estudios inmunológicos similares están limitados por la carencia de “herramientas” que identifiquen los diferentes componentes del sistema inmune en los cerdos.

Aún así, se conoce que las inmunoglobulinas tienen una gran importancia en la protección frente a las viremias. En el caso del virus de Aujeszky, en las fases más avanzadas de la enfermedad, se observa una importante presencia de anticuerpos. En cambio los niveles detectados en las fases iniciales de la infección se correlacionan débilmente con la reducción de la replicación del virus (Martin y Wardley, 1987; Marchioli *et al.*, 1988; Kimman *et al.*, 1992). Incluso, durante la evaluación de la eficacia de una vacuna comercial frente al virus de la influenza A en cerdos, se mostró la importancia en la respuesta protectora de la IgG frente al virus, aunque se observó que esta vacuna inducía una respuesta celular y humoral local (IgA) muy débiles, por ello los animales inmunizados con esta vacuna no resultaron debidamente protegidos (Heinen *et al.*, 2001).

En cambio, durante el estudio de la respuesta inmune protectora de un aislado no-hemoadsorbente del virus de la peste porcina africana se observó que los animales que desarrollaron lesiones y fiebre, incluso en las fases tardías de la infección, presentaban una hipergammaglobulinemia que afectaba a los isotipos IgG₁, IgG₂, IgGM e IgA y una actividad de las células NK similar a la de los animales controles, mientras que los animales asintomáticos presentaban una elevada actividad citocida (nivel elevado de células NK) y bajos niveles de inmunoglobulinas en el plasma (Leitao *et al.*, 2001).

Parece clara la interactividad existente entre las respuestas inmunes de tipo humoral y celular durante las infecciones virales y bacterianas. Tanto es así, que durante la evaluación de los mecanismos inmunológicos desencadenados, tanto a nivel local como sistémico, por una inyección intramuscular de *Mycoplasma hyopneumoniae* en lechones sanos, se observó que en los animales inmunizados respecto a los únicamente retados, presentaban una importante reducción de la severidad de la patología a nivel pulmonar. Sugiriendo una patente participación a nivel de la mucosa broncoalveolar de la IgA y del TNF- α , acompañados simultáneamente de un significativo incremento del IFN- γ segregado por los linfocitos periféricos (Thacker *et al.*, 2000).

En apartados anteriores, ya se ha señalado la relevancia del tejido linfoide broncoalveolar (BALT) en las respuestas inmunológicas a nivel local, Sarradell *et al.* (2003) han estudiado los cambios morfológicos e inmunohistoquímicos desarrollados en el BALT de cerdos infectados naturalmente con *M. hyopneumoniae*. Los resultados muestran una importante población de macrófagos y linfocitos B en los centros germinales, así como de linfocitos T en las áreas perifoliculares, donde la población CD4⁺ es predominante a la de CD8⁺. Además, alrededor de estos folículos linfoides, concretamente en el epitelio alveolar, lámina propia de los bronquios y bronquiolos y en los septos alveolares, se ha descrito una importante población de células plasmáticas IgG⁺ e IgA⁺.

Son muchos los autores que asocian la susceptibilidad a las patologías víricas y bacterianas con la presencia preponderante de las células CD4⁺ respecto a las CD8⁺, puesto que las células CD8⁺ resultan cruciales en el control de las infecciones. Estos linfocitos T citotóxicos poseen la habilidad de activarse específicamente, tras el reconocimiento y posterior, unión a los antígenos presentados por el MHC de clase I (Harty *et al.*, 2000). Además de la actividad citotóxica específica que desarrollan, las células CD8⁺ activadas son capaces de segregar IFN- γ y TNF- α , los cuales reducen o inactivan la replicación viral directamente (Guidotti y Chisari, 1999), esta producción de citoquinas es estrictamente antígeno-dependiente. La correlación entre la expresión del IFN- γ y la actividad citolítica ha sido establecida en diversos modelos, los cuales indican que los perfiles de la actividad de los linfocitos T citotóxicos son INF- γ ⁺ y CD8⁺ (Murali-Krishna *et al.*, 1998). Por tanto, se señala la trascendental actividad de estas células en el desarrollo de nuevas y más eficaces vacunas (Seder y Hill, 2000).

Gracias a los numerosos estudios llevados a cabo para evaluar la respuesta inmunológica de los porcinos frente a diferentes virus (PRRS, Aujeszky, rubulavirus porcino o peste porcina clásica), se ha descrito que los animales inmunizados o resistentes a la virosis expresaban una respuesta inmune de tipo Th1 (López *et al.*, 1999; Samson *et al.*, 2000; Borghetti *et al.*, 2003; Rooij *et al.*, 2004). A nivel sistémico esta respuesta se caracteriza, principalmente por un aumento de la población periférica de las células CD8⁺ respecto a las CD4⁺, por un incremento de los linfocitos T CD4⁺CD8⁺ y de las células γ - δ y NK, por una mayor producción de citoquinas del perfil Th1 como son, la IL-2 e INF- γ , así como por una mayor producción de IgG₂. A nivel local en el pulmón se observa una importante disminución de la población de macrófagos alveolares en las fases iniciales de la viremia, acompañada de un incremento de los linfocitos CD8⁺ y de las células NK.

2.5.- Sobre la inmunobiología de otras especies frente a las parasitosis pulmonares.

Las nematodosis pulmonares son especialmente frecuentes en los rumiantes, especialmente *Dictyocaulus viviparus* que parasita al ganado vacuno, y los géneros *Muellerius*, *Protostrongylus* o *Cystocaulus* que afectan a ovinos y caprinos.

Por tanto, para completar nuestra visión de cómo actúa el sistema inmune de un hospedador frente a una parasitación localizada en los pulmones vamos a contemplar la relación inmunológica entre los rumiantes y los nematodos pulmonares, principalmente entre *D. viviparus* (Superfamilia Trichostrongyloidea) y los bóvidos y entre *Muellerius capillaris* (Superfamilia Metastrongyloidea) y las cabras.

Johnson *et al.* (2005) afirmaron que el grado de inmunidad inducido por *D. viviparus* es muy elevado, concibiéndolo como un modelo ideal para el estudio de los mecanismos de protección desarrollados por un hospedador frente a los nematodos pulmonares.

Varios tipos de técnicas inmunológicas han sido ensayadas para la cuantificación de la respuesta inmune humoral en las bronquitis parasitarias (Weber, 1958; Bokhout *et al.*, 1979; Bos y Beekman, 1985). De forma generalizada, estos inmunoensayos demostraron el aumento de anticuerpos específicos frente a *D. viviparus* durante la primoinfección y subsecuentes parasitaciones.

En bovinos infectados experimentalmente con L3 de *D. viviparus*, se ha mostrado un papel primordial de la IgM durante las primeras semanas de la parasitación, mientras que a partir de los dos meses, la inmunoglobulina más significativa fue la IgG₁. En cambio, en animales previamente inmunizados y posteriormente infectados, se observó, desde el comienzo, un evidente incremento del isotipo IgG₁ (McKeand *et al.*, 1996).

Scott *et al.* (1996) analizaron la presencia de las inmunoglobulinas: IgA, IgM, IgG₁ e IgG₂ en BALF (respuesta inmune humoral a nivel local) y suero sanguíneo (respuesta inmune humoral a nivel sistémico) de bóvidos seriadamente infectados con L3 de *D. viviparus*. En los animales inmunizados tras cada una de las tres infecciones llevadas a cabo, se observó un incremento muy significativo de IgG₁ e IgA en el BALF. Éstos resultados sugieren la importancia de los mecanismos de respuesta humoral a nivel local en la protección frente a esta parasitosis. El incremento selectivo de los títulos de anticuerpos en el BALF, se podría explicar de dos formas, por la producción de las mismas *in situ* o por el transporte selectivo de las mismas hacia el pulmón. Los niveles de IgG e IgG₁ en el suero sanguíneo, siguieron un patrón similar a lo largo del experimento, alcanzando los niveles máximos a partir del día 21 tras la primera infección, y de igual manera tras la segunda, pero no se elevaron sus niveles tras la tercera dosis de L3. Respecto a la IgG₂, en suero y BAL, se observó que los niveles más elevados se correlacionaron positivamente con una mayor expulsión de larvas.

De la misma manera, se ha corroborado la decisiva contribución que desempeña la rápida y fuerte respuesta de la IgE a nivel local y sistémico, en la protección del ganado vacuno frente a *D. viviparus* (Kooyman *et al.*, 2002). El desencadenamiento de la respuesta de la IgE en la especie bovina está controlada por células T del tipo Th2 y por la IL-4 (Estes *et al.*, 2002). Por todo ello, la inmunología protectora frente a *D. viviparus* parece estar asociada a una respuesta de tipo Th2.

Tras el análisis de las respuestas locales de las citoquinas durante la infección experimental con *D. viviparus*, Johson *et al.* (2005) denunciaron que el paradigma de las respuestas inmunes Th1/Th2 en las nematodosis de los rumiantes era ambiguo. Primeramente, los niveles detectados de IgG₁ se correlacionaron negativamente con los niveles de expresión de todas las citoquinas analizadas en el parenquima pulmonar, anillos traqueales y ganglios bronquiales y mediastínicos (IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-

13). Y en segundo lugar, se observó un incremento en la expresión de todas ellas, principalmente en las primeras etapas de migración de las larvas por el parénquima pulmonar, hasta el día 42 tras la infección que disminuyeron hasta alcanzar sus niveles basales o incluso por debajo de ellos. Puede ser que este perfil de citoquinas Th1 (IL-12 e IFN- γ) sean necesarias para el desarrollo de la inmunidad frente a esta parasitosis o que sean producidas para contrarrestar el excesivo daño de la respuesta Th2 inducida por el parásito.

El establecimiento de *M. capillaris* en los pulmones de los pequeños rumiantes provoca una inflamación crónica caracterizada por la acumulación de células inflamatorias en el parénquima pulmonar, células hiperplásicas de tipo II y formación de granulomas. Para conocer mejor las poblaciones celulares que participan en la respuesta inmunológica local frente a este nematodo, Berrag *et al.* (1997) analizaron los BALF de cabras infectadas experimentalmente con dos dosis de *M. capillaris*. Durante la primoinfección, se observó un importante aumento de los macrófagos alveolares, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos, que mostraron un patrón bifásico. El primer pico se produjo en la segunda semana tras la infección, mientras que el segundo pico tenía lugar entre la séptima y novena semana. La magnitud de la respuesta celular en la siguiente infección, resultó considerablemente superior a la primera, excepto los neutrófilos que respondieron de igual forma. Los cambios citológicos y morfológicos mostrados por las células presentes en el BAL, evidencian la importancia del rol que desarrollan estas células inflamatorias a nivel pulmonar frente a la parasitación por *M. capillaris*.

2.6.- Sobre la infección experimental con *Metastrongylus spp.*

Los diversos trabajos publicados sobre infecciones experimentales de cerdos con *Metastrongylus spp.*, han sido encaminados principalmente al conocimiento del ciclo biológico de dicho nematodo en su hospedador definitivo. Desde que Hobmaier y Hobmaier en 1929, descubrieron a las lombrices de tierra como los hospedadores intermediarios y necesarios para la consecución del ciclo vital de *Metastrongylus spp.*, hasta las últimas infecciones experimentales realizadas por Ferguson en 1981, para la evaluación del albendazol como antihelmíntico de elección, son varios los autores que han descrito los signos clínicos, las lesiones macroscópicas e histopatología en los

pulmones, la excreción de huevos en heces, eosinofilia, etc., en función de las diferentes dosis y patrones de administración empleados.

2.6.1.- Obtención de larvas 3 infectivas.

Para la obtención de L3 infectivas de *Metastrongylus spp.*, Dunn (1995) ensayó diferentes métodos de infección de las lombrices con heces de animales infectados y mediante huevos larvados y L1 procedente de hembras adultas del parásito. Estas hembras adultas se obtenían directamente de los pulmones de cerdos parasitados naturalmente, posteriormente eran lavadas en suero salino y trituradas, y el contenido se recogía y se mezclaba con agua. La suspensión resultante era administrada a las lombrices mediante una fina cánula a través de la boca o mediante la dispersión de la misma sobre las lombrices colocadas en un pequeño recipiente, método similar a los anteriormente descritos por Hobmaier y Hobmaier (1929) y Schwartz y Alicata (1934). De las diferentes especies de lombriz ensayadas, *Eisenia foetida* resultó la especie más fácil de criar y donde mejor se desarrollaban las diferentes fases larvarias del nematodo, puesto que a los 9 días tras la infección, mediante de la dispersión de los huevos embrionados y L1 del parásito, ya se podían observar L2 y tras 12 días L3 en la anatomía de la lombriz.

Métodos muy similares de cultivo de L3 de *Metastrongylus spp.*, han sido utilizados por otros autores para la consecución de infecciones experimentales (Mackenzie, 1955; Ferguson, 1981; Sasaki y Katsuno, 1983). La mayor diferencia entre estos métodos de obtención de dosis infectivas de *Metastrongylus spp.*, radica en la cuantificación del número de larvas por inóculo. Así, la media del número de L3 por lombriz estimada por Dunn (1955) se calculaba contabilizando las L3 presentes en la parte anterior y posterior de las lombrices tomadas de forma aleatoria del cultivo. Para ello, estas eran presionadas entre dos portas y observadas al microscopio. Los animales eran infectados con un número aproximado de lombrices en función de la media de L3 estimada por lombriz y de la dosis deseada.

En cambio autores como, Ferguson (1981), Hata *et al.* (1980) y Sasaki y Katsuno (1983) describieron métodos de digestión artificial de las lombrices para liberar a las L3 de *Metastrongylus spp.* Estas digestiones consistían en imitar los jugos gástricos producidos por los cerdos durante la digestión. Para ello, previamente se

trituran a las lombrices con tijeras, a las que se les añadía un 1% de pepsina (pH 1'0), un 2% de HCl concentrado y agua destilada, y se mantenían a 37°C entre 1-4 horas. Para la recogida de las larvas del contenido digestivo, Sasaki y Katsuno (1983) han descrito el método del gel flotante, donde se filtra el resultado a través de 100 µm y posteriormente se incuban durante 24 horas a 37°C con agarosa al 0'37% y PBS. Las larvas migrarán desde el gel hacia el PBS. Sin embargo, Ferguson (1981 y 1982) centrifuga el resultado de la digestión y recoge el pellet donde se encontrarán las L3 liberadas. Posteriormente, realiza varios lavados con suero fisiológico estéril para eliminar los residuos más groseros de la digestión de las lombrices. El número de larvas infectivas fueron determinadas mediante el conteo del número de L3 presentes en nueve alícuotas del homogeneizado, tomadas al azar.

2.6.2.- Ensayos de infección experimental con *Metastrongylus spp.* en los porcinos.

Respecto a la forma de administración del inóculo se han descrito diferentes métodos. Para la infección de cerdos jóvenes, Dunn (1956) administra la parte anterior y posterior de las lombrices trituradas en una cápsula de gelatina que coloca como un bolo en la parte final de la lengua. En el caso de animales de más edad se añadía el triturado de lombrices junto con el alimento húmedo o con leche antes de la comida de la mañana. Jagers y Herbert (1964) utilizaban bolos de gelatina donde se incluían las larvas infectivas de *Metastrongylus spp.* que habían sido obtenidas mediante disección de las lombrices. Finalmente, Ferguson (1981 y 1982) describió un método de administración del inóculo mediante el empleo de un tubo gástrico, por el que dosificaba las L3 y añadía agua a través del mismo para asegurar la entrada de la dosis completa en el estómago del animal.

Los patrones de infección empleados por los diversos autores durante el desarrollo de las experiencias han sido muy variados, bajas y altas cargas parasitarias administradas en monodosis, diversas dosis aplicadas sucesivamente con diferentes tiempos de intervalos (patrones multidosis), distintas dosis de reto, diferentes edades de los animales, etc. De forma general, podemos afirmar que las infecciones experimentales con *Metastrongylus spp.* han sido exitosas, ya que la eficacia de

implantación de los parásitos en los cerdos varía desde un 50% (Ferguson, 1982) hasta un 1% (Jaggers y Herbert, 1964).

Los síntomas observados en los animales infectados se correlacionan con el desarrollo de los parásitos y los cambios anatomopatológicos producidos durante la parasitación. Aún así, se observó que los animales que recibían sucesivas dosis de L3 infectivas eran significativamente más resistentes al reto que aquellos animales que recibían una sola dosis infectiva (Rose, 1973). Así mismo, se sugirió que los individuos adultos presentaban una resistencia natural frente a la parasitación por *Metastrongylus spp.* respecto a los cerdos más jóvenes (Dunn, 1956).

Los primeros signos clínicos de la enfermedad fueron observados a los 10 días tras la infección. El síntoma más característico es la tos, que aparece de forma esporádica y en procesos breves. A medida que avanza la parasitosis aumenta la frecuencia de presentación, especialmente acentuada tras el ejercicio de los animales. En cambio, a partir de las cuatro o cinco semanas tras la infección, los signos respiratorios como, disnea, respiración abdominal, tos, etc., comienzan a remitir. Además, no se observó pérdida de apetito ni disminuyó la ganancia de peso respecto a los animales controles (Dunn, 1956; Mackenzie, 1959). También se observó una fuerte eosinofilia a partir del día 10 post-infección que se mantuvo aproximadamente durante un mes, alcanzando su nivel máximo al día 25 tras la infección (Mackenzie, 1959).

Respecto a la eliminación de los huevos de *Metastrongylus spp.* en las heces, Dunn (1956) observó que la aparición de las primeras cargas eliminadas en las heces tenían lugar a partir de la tercera o cuarta semana. Mackenzie (1959) y Jaggers y Herbert (1968) precisaron que la primera observación de los huevos embrionados del nematodo en animales infectados tenía lugar al día 30 y 28 post-infección, respectivamente. La expulsión de los huevos en las heces se observó durante los 80 días que duró la experiencia, mientras que el máximo se observó entre los días 50 y 75 tras la infección (Mackenzie, 1959).

A las 24 horas tras la infección, se observaron L4 en las paredes del ciego y partes anteriores del colon. A los 3 y 5 dpi, se describen un mayor número de L4 y algunas L5 en los ganglios ileo-cecales, mientras que al día 7 tras la infección un importante número de L5 fueron recopiladas de los pulmones, desde el día 9 y hasta el día 18 post-infección se observan individuos inmaduros en los pulmones. Los adultos de

Metastrongylus spp., que suelen localizarse en los bronquios menores cerca de la superficie de los pulmones, no fueron observados hasta el día 25 post-infección, aunque no alcanzaron su longitud máxima hasta el día 40 post-infección.

Durante el desarrollo de un estudio de campo en 100 cerdos, Ewing y Todd (1961) observaron que la proporción entre hembras y machos de *Metastrongylus spp.* era de 3:2. Así mismo, se definieron las localizaciones predilectas de este nematodo en el aparato respiratorio, que por orden de preferencia corresponden al: lóbulo diafragmático derecho, lóbulo diafragmático izquierdo, lóbulo apical derecho, lóbulo intermedio y lóbulo apical izquierdo.

Las lesiones pulmonares observadas durante las necropsias de los animales en diferentes tiempos tras la infección, muestran una neumonía verminosa con infiltración de células gigantes, asociada con la liberación de un gran número de huevos dentro del parénquima pulmonar (Fig. 2.16.). Posteriormente, se describen lesiones crónicas de bronquitis, enfisema, hiperplasia linfoide peribronquial e hipertrofia de la capa muscular de los bronquios. A partir del 40 *dpi*, es muy característica la aparición de unos nódulos subpleurales de un tamaño aproximado de 2 a 8 mm, de color grisáceo, localizados preferentemente en el borde inferior y extremo caudal del lóbulo diafragmático (Dunn, 1956; Mackenzie, 1959).

2.7.- Sobre la inmunización frente a *Metastrongylus spp.*

Los diversos estudios llevados a cabo sobre inmunizaciones experimentales en cerdos con antígenos de *Metastrongylus spp.* son muy escasos. Fundamentalmente, para su consecución se han utilizado como animales de experimentación a los hámsteres, ya que son numerosos los ensayos que avalan su utilización como hospedadores de elección en el estudio de los mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria desarrollados frente a *Metastrongylus spp.* (Dunn y White, 1954; Onishi, 1973).

2.7.1.- Obtención de antígenos de *Metastrongylus spp.*

La mayoría de los estudios inmunológicos, se han llevado a cabo utilizando antígenos elaborados a partir de adultos y L3 de *Metastrongylus spp.*

Barrat (1972) denominó AWA-M, a un extracto crudo soluble de machos y hembras adultos del parásito, los cuales eran lavados en varias ocasiones con una solución salina al 0'85% y homogeneizados durante 2-4 horas a 4°C. A continuación, esta suspensión se centrifugaba a 5.700 g durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante resultante era recogido. Posteriormente, Sasaki (1982) también utilizó un antígeno bruto soluble de adultos de *Metastrongylus spp.* en ensayos de inmunización realizados en hámsteres, en este caso los parásitos eran homogeneizados en un macerador de teflón en VBS (Veronal Buffer Salino) frío a un pH de 7'2 durante 10 minutos. Seguidamente la suspensión era sonicada y centrifugada a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y finalmente el sobrenadante era recogido y congelado a -80°C hasta su utilización.

Los primeros antígenos elaborados a partir de las fases larvarias de *Metastrongylus spp.*, se deben al ensayo de inmunizados que confieran cierta resistencia al hospedador frente al parásito. Así, Onishi (1975) y Koga *et al.* (1976) utilizaron L3 irradiadas a una intensidad de $5 \times 10^4 R$, estas larvas son capaces de desarrollarse en los hospedadores hasta alcanzar el estado de L4, pero no evolucionan ni a L5 ni a estado adulto. De forma similar actuaban las L3 atenuadas, mediante la exposición con una solución acuosa al 1 o 2% de TEM (Trietileno melanina) durante 1 hora a 27°C, descritas por Sakamoto (1978). Por su parte, Kumar *et al.* (1978), describieron la utilización de un liofilizado de L1 como antígeno, en la estandarización de un test de inmunofluorescencia indirecta como método diagnóstico de *M. apri* en cerdos.

Posteriormente, Sasaki (1983) detalló la realización de un antígeno soluble de huevos embrionados y L1, obtenidos de las hembras adultas mediante disección del útero, así como de L3, obtenidas a partir de lombrices infectadas. Los huevos y estados larvarios eran lavados y homogeneizados por separado en PBS, se sonicaban a 20KC, 60W, durante 10 minutos y para obtener el extracto soluble se centrifugaban a 12.000 g durante 30 minutos a 4°C.

2.7.2.- Ensayos de inmunización en cerdo y hámsteres.

En los primeros ensayos de inmunización descritos en porcinos frente a *Metastrongylus spp.*, se demostró la capacidad de los extractos salinos de adultos del parásito de desarrollar reacciones anafilácticas homólogas registradas mediante la técnica PCA (del inglés, *Passive Cutaneous Anaphylactic*) en animales previamente sensibilizados (Barratt,

1969; Barratt y Herbert, 1970). Posteriormente, Barratt (1972) describió que los componentes especialmente alergénicos de los extractos solubles de adultos de *Metastrongylus spp.* tenían unos pesos moleculares de entre 5 y 50 KDa.

Como ya mencionamos con anterioridad, los estudios inmunológicos llevados a cabo, para describir los mecanismos efectores que proporcionan protección frente a la infección por *M. apri* han sido desarrollados en hámsteres, ampliamente utilizados como animales de experimentación en el estudio de las bronquitis verminosas.

Onishi (1973), durante el estudio de la actividad inmunizante de las L3 irradiadas con $5 \times 10^4 R$ utilizadas como vacunas frente a animales retados posteriormente, con 500 L3 normales de *M. apri*, testó diferentes dosis y vías de administración. Los resultados obtenidos de estos ensayos, revelaron que incluso la dosis más baja probada, 100 L3 irradiadas, era capaz de desarrollar una fuerte respuesta protectora, puesto que se detectaron diferencias significativas en el número de adultos desarrollados en el tracto respiratorio y el ratio de hembras/machos, entre los animales vacunados y los controles. Así mismo, Onishi (1973) concluyó que la vacuna era altamente inmunizante tanto si se administraba por vía oral como subcutánea.

Estas L3 irradiadas de *M. apri* han sido probadas en hámsteres timentomizados y normales (Koga *et al.*, 1976). En los animales normales vacunados, se observaron signos clínicos, lesiones macroscópicas y número de adultos recopilados al día 21 tras el reto, significativamente menores que en los no vacunados. En cambio, en los animales timentomizados vacunados, esta respuesta protectora no resultó tan eficaz, por ello se consideró la importancia de la población de linfocitos T en el desarrollo de la inmunidad protectora frente a *M. apri*.

2.8.- La citometría de flujo en la investigación en ciencias de la salud.

2.8.1.- Concepto y principios básicos de la citometría de flujo.

La técnica de la citometría de flujo fue desarrollada en la década de los años sesenta, en los Estados Unidos y Alemania, como un avance importante en la investigación de la biología celular. Pero es desde hace aproximadamente quince años, en que los avances en inmunología, oncología y hemopatología, han permitido la aplicación de la citometría en la investigación biomédica y en la práctica clínica.

La citometría de flujo consiste en la medición de las propiedades físico-químicas de células o partículas en suspensión a través de un flujo laminar y una fuente de luz. Se trata de una técnica de análisis celular multiparamétrico, cuyo fundamento se basa en hacer incidir un haz de láser focalizado sobre un flujo laminar de partículas.

La suspensión celular, convenientemente procesada y teñida, se inyecta en la cámara de flujo del citómetro, que está hidrodinámicamente enfocada para que las células pasen individualmente, una detrás de otra, a través de un punto en que éstas interaccionan físicamente con un haz de luz monocromática, dispersando la luz en todas las direcciones. La luz dispersada hacia delante (ángulo de 0°), llamada *Forward Scatter*, (FS) está relacionada con el tamaño de la célula. En cambio la luz dispersada a 90° del eje del haz lumínico, llamada *Side Scatter* (SC), está relacionada con la estructura interna de la partícula y complejidad citoplasmática. Las señales de fluorescencia recogidas por el citómetro, se deben al empleo de fluorocromos en el procesado de las partículas. Éstos son unas moléculas químicas que absorben la luz a una determinada longitud de onda (espectro de absorción o excitación) y son capaces de emitir a una longitud de onda superior (espectro de emisión). La excitación de estos fluorocromos ocurre en el punto de interacción de la célula y el haz de luz, dando como resultado la emisión de una nueva luz que es recogida a 90° de la dirección del láser. Posteriormente, estas son adecuadamente dirigidas mediante espejos dicroicos hacia los detectores fotomultiplicadores, mientras que las longitudes de onda no deseadas son bloqueadas por filtros ópticos. Estos detectores convierten las señales energéticas en señales eléctricas analógicas que, seguidamente, serán digitalizadas para permitir la medida simultánea tanto de las señales de dispersión como de fluorescencia emitidas por una misma célula.

Gracias a los diferentes parámetros que podemos analizar mediante el empleo de la citometría de flujo, las características intrínsecas de la célula, como su tamaño y complejidad citoplasmática y las características antigénicas o su inmunofenotipo, es posible identificar un tipo celular dentro de una población variada de células.

Pero la principal característica de esta técnica, es que puede ofrecer información simultánea de varios parámetros de cada una de las células analizadas y la relación entre los parámetros de una población celular respecto a los de otra también analizada. Es posible, gracias al sistema informático del citómetro, establecer criterios de selección

para estudiar las distintas inmunofluorescencias. Así por ejemplo, en una muestra de leucocitos, podemos seleccionar por separado los datos (características de tamaño y complejidad) de los linfocitos, de los monocitos y de los polimorfonucleados. Pero también podemos seleccionar poblaciones celulares dentro de estas por criterios de fluorescencia, por ejemplo se podrían analizar las células $CD4^+$ que a su vez sean exclusivamente $CD3^+$. Estos criterios de selección se denominan *gates* y se pueden realizar tanto a la hora de adquirir como a la de analizar los resultados obtenidos. La informática nos permite estudiar y presentar los datos como histogramas, *plots* de puntos, *plots* de densidad, *plots* de contorno, en representaciones en dos o tres dimensiones.

La citometría es una técnica sencilla que se aplica en la rutina diaria de muchos laboratorios clínicos médicos y de investigación, capaz de proporcionar resultados de forma rápida, con objetividad, sensibilidad, precisión, reproducibilidad de un gran número de células en poco tiempo, que pueden ser aplicables al diagnóstico y conocimiento del desarrollo de innumerables patologías, tanto en medicina humana como veterinaria.

2.8.2.- El citómetro y su funcionamiento.

Como anteriormente ha sido comentado, el citómetro es un aparato capaz de medir varios parámetros celulares a partir de una suspensión celular por medio de la interacción de las células con un haz de luz láser, guiadas mediante un flujo continuo. Básicamente en todo citómetro existen los siguientes elementos (Fig. 2.27.):

- **Sistema óptico.** El sistema óptico está constituido por una fuente de iluminación, los filtros necesarios para discriminar la señal lumínica y llevarla al detector adecuado, y los fotodetectores que se encargan de recoger la luz. Como fuentes de iluminación, se pueden usar lámparas de arco voltaico o láseres, siendo estos últimos los más utilizados. Los más utilizados son los de argón de baja intensidad (488 nm, 15mW) refrigerados por aire. La luz dispersada, tras el choque de la partícula con el haz de luz, es recogida por la lente colectora y mediante los filtros ópticos son los que seleccionan la longitud de onda que llega a cada fotodetector y le confieren la especificidad de lectura de una u otra

fluorescencia. Existen filtros coloreados o de absorción, que absorben la luz de una determinada longitud de onda y filtros de interferencia o dicroicos que reflejan la luz que tiene una longitud de onda superior o inferior a la que dejan pasar. Los fotodetectores pueden ser de dos tipos; los fotomultiplicadores, que detectan la señal de fluorescencia y la luz dispersada a 90° y los fotodetectores diodos, que detectan la dispersión frontal de la luz (0° de ángulo).

- **Sistema hidráulico.** Está compuesto por la cámara de flujo y el sistema de presión y de inyección de la muestra. Las cámaras pueden ser cerradas o abiertas, teniendo estas últimas, velocidades superiores y fácil limpieza, aunque la cámara cerrada ofrece una mejor discriminación de la señal-ruido. El sistema de presión y de inyección de la muestra se encarga de adquirir la muestra e inyectarla junto con el fluido de arrastre en la cámara de flujo. Es fundamental que la velocidad de inyección de la suspensión celular sea constante y que las presiones se mantengan estables durante toda la lectura. Existen dos sistemas principales por presión y por inyección isovolumétrica por jeringa.
- **Componente electrónico.** Cuando la luz incide en los fotodetectores, se produce una respuesta de los mismos en forma de señal eléctrica. Los pulsos detectados por los fotodetectores pasan a un amplificador, para posteriormente ser convertidos de señal analógica a digital. Es posible efectuar amplificaciones de la señal, así como seleccionar un umbral de señal o incluso crear regiones selectivas de adquisición. Después del procesamiento informático de la señal, se obtienen los histogramas o representaciones gráficas de los resultados de la adquisición.

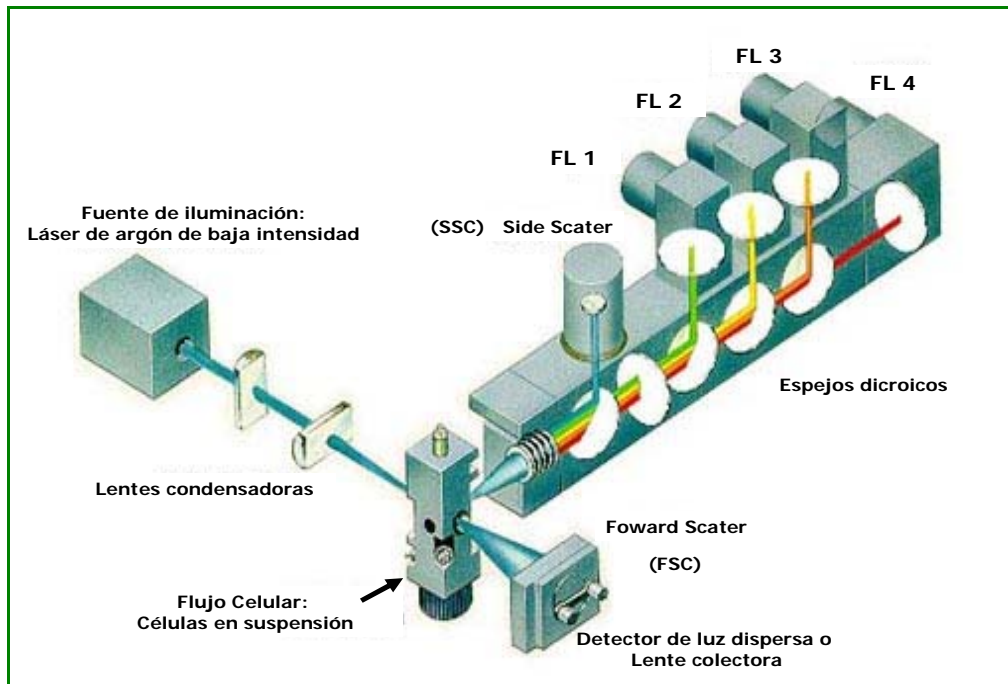


Fig. 2.27. Esquema de los componentes de un citómetro de flujo.

2.8.3.- Aplicaciones de la citometría de flujo.

La citometría de flujo presenta múltiples ventajas frente a otras técnicas de detección de inmunofluorescencia, como la inmunofluorescencia al microscopio o las técnicas citoquímicas, puesto que:

- Permite el análisis, tanto funcional como cinético, de la célula en tiempo real.
- Posibilidad de analizar un elevado número de partículas en un corto período de tiempo (5000 partículas/segundo).
- Posibilidad de cuantificar la intensidad antigénica por medio de los canales medios de fluorescencia.
- Mayor sensibilidad y objetividad, que le permiten detectar enfermedad mínima residual y caracterizar poblaciones celulares poco abundantes en condiciones normales, como los basófilos.
- Posibilidad de analizar poblaciones celulares y epítomos celulares.
- Permite almacenar informáticamente la información del análisis para poderla utilizar en cualquier momento y reanalizar análisis hechos con anterioridad.
- Posibilidad de cuantificar las moléculas antigénicas presentes en un grupo celular.

Entre las distintas partículas que se pueden pasar a través del citómetro se encuentran las señaladas en el siguiente cuadro resumen:

ESCALA MOLECULAR	Proteínas extracelulares Secuencias de ADN o ARN libres Complejos inmunes circulantes
ESCALA SUBCELULAR	Viriones individuales Liposomas Cromosomas aislados Orgánulos aislados Núcleos aislados
ESCALA CELULAR	Bacterias Hongos unicelulares Células humanas y animales Protoplastos vegetales
ESCALA SUPRACELULAR	Hibridomas y fusiones celulares Esferoides Organismos pluricelulares

De acuerdo con esta variedad de partículas, las muestras que podríamos analizar por citometría pueden proceder de:

- ✘ Médula ósea.
- ✘ Sangre periférica.
- ✘ Exudados y trasudados (ascíticos, pleurales, pericárdicos).
- ✘ Líquido cefalorraquídeo (LCR).
- ✘ Lavados broncoalveolares (BAL).
- ✘ Punción aspiración con aguja fina (PAAF).
- ✘ Tejidos sólidos como ganglios o MALT (tejidos linfáticos asociados a mucosas).
- ✘ Líquido seminal.
- ✘ Células procedentes de cultivos celulares.

✘ Productos de aféresis.

La citometría de flujo, puede ser utilizada con los siguientes objetivos:

- En **hematología**: conteo celular, fórmula leucocitaria, conteo reticulocitario, análisis de médula ósea, diagnóstico de trombocitopatías.
- En **farmacología**: estudios de cinética celular.
- En **inmunología**: subpoblaciones linfocitarias, tipificación tisular, detección de inmunoglobulinas, detección de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, estimulación linfocitaria.
- En **oncología**: diagnóstico-pronóstico, monitorización del tratamiento, cuantificación de los receptores de la progesterona.
- En **microbiología**: diagnóstico bacteriano y vírico, sensibilidad a antibióticos.
- En **genética**: cuantificación de ADN y ARN, determinación del cariotipo, diagnóstico de portador, diagnóstico prenatal.

En las ciencias veterinarias, y en concreto en el ámbito de la especie porcina, la citometría de flujo se está utilizando desde hace años, principalmente en el estudio de los mecanismos efectores del sistema inmune relacionado con la susceptibilidad o resistencia frente a diversas patologías. También, se ha probado su validez en la investigación en el campo de la reproducción. Abeydeera *et al.* (1998), utilizan la técnica citométrica de alta velocidad para comprobar el potencial de fertilidad de los verracos, midiendo determinados parámetros de la estructura del ADN presente en los espermatozoides. De hecho, se ha observado una elevada correlación entre la estructura anormal de la cromatina y la susceptibilidad al incremento de la acidez que induce desnaturalización de dicho ADN.

3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1.- Planteamiento investigador.

Actualmente, la metastrongylosis es una de las parasitosis que en mayor medida afecta al ganado porcino criado en extensivo, principalmente de raza Ibérica. Esta nematodosis pulmonar durante muchos años ha sido dejada de lado por las connotaciones de su ciclo biológico, y es que la necesidad de la presencia de lombrices de tierra para su transmisión, no concordaban con las tecnificadas instalaciones requeridas para la explotación del cerdo blanco, tan abundantes hasta la fecha. Pero el resurgimiento, con más vigor que nunca, de la cría tradicional del porcino Ibérico ha llevado a esta parasitosis a primera línea del panorama parasitológico.

Con el desarrollo de esta experiencia pretendemos conocer en profundidad la repercusión a nivel multiorgánico de la metastrongylosis en el ganado porcino.

Para tal fin, tratamos de reproducir experimentalmente diferentes situaciones de infección que pudieran darse en la naturaleza. Incluso algunos de los animales fueron inmunizados con diferentes extractos antigénicos del parásito, con objeto de evaluar el grado de resistencia frente a los diferentes tratamientos seguidos en el curso del experimento.

Así, se realizó el estudio comparativo entre los diferentes grupos del estudio de los síntomas mostrados por los animales, de las lesiones macroscópicas en los pulmones e hígados, de la histopatológica en pulmones, hígados y ganglios, del número de larvas y adultos presentes en el pulmón, del número de huevos eliminados con las heces y del recuento diferencial de los eosinófilos, a lo largo de los tres meses que duró el ensayo.

Para completar este análisis, han sido utilizadas técnicas como el ELISA o la citometría de flujo, para poder evaluar la respuesta inmunológica humoral a nivel sistémico y la respuesta inmune celular, tanto a nivel sistémico como local, a lo largo de toda la experiencia.

3.2.- Diseño experimental.

Para la consecución de este estudio, se utilizaron 48 cerdos divididos en cinco grupos según el protocolo experimental (Fig. 3.1.):

- ✘ **Lote 1 (n=9):** los cerdos pertenecientes a este grupo fueron infectados con 3000 L3 de *M. apri*.
- ✘ **Lote 2 (n=9):** los animales integrantes de este lote experimental fueron inoculados con 1000 L3 de *M. apri*.
- ✘ **Lote 3 (n=12):** constituido por los cerdos que recibieron múltiples infecciones crecientes, de 200 L3, 400 L3 y 800 L3 con un intervalo de 10 días entre las dosis. Los animales, 10 días después de la última infección fueron desparasitados con una solución inyectable de doramectina (Dectomax®, Pfizer). Finalmente, 30 días después, recibieron un reto de 1000 L3 de *M. apri*.
- ✘ **Lote 4 (n=12):** los animales pertenecientes a este grupo fueron inmunizados con 3 dosis, con un intervalo de 10 días, de inóculos elaborados a partir de los antígenos somáticos larvarios y de adultos de *M. apri*. Tras 15 días de la última inmunización los cerdos fueron infectados con 1000 L3 de *M. apri*.
- ✘ **Lote Control (n=6):** este último grupo experimental esta constituido por los cerdos no recibieron ningún tipo de tratamiento.

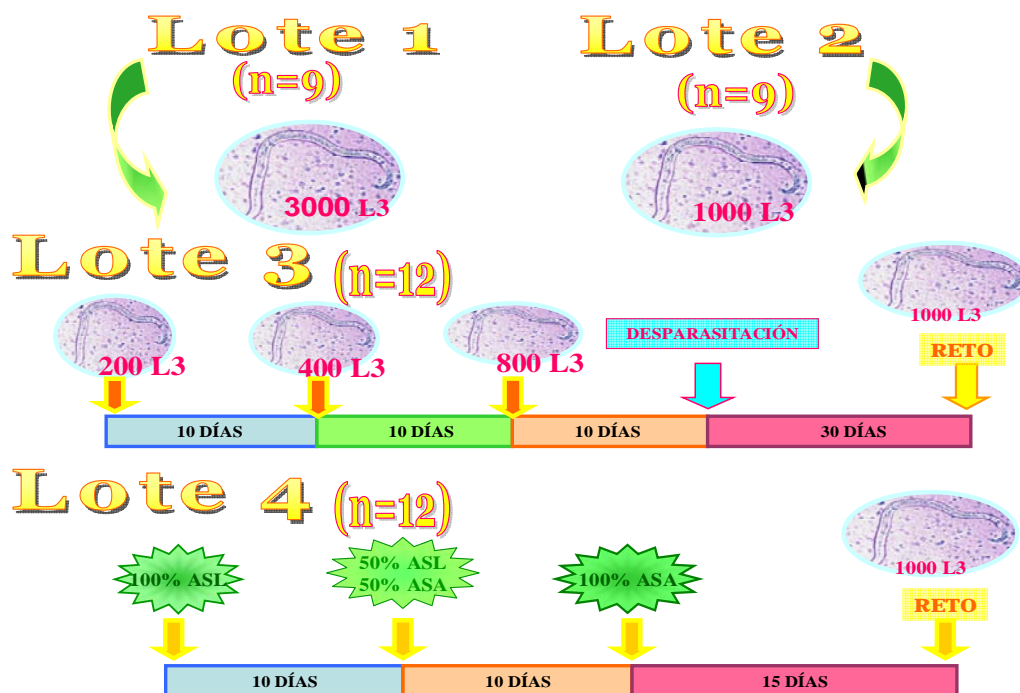


Fig. 3.1. Esquema del diseño experimental.

Los animales pertenecientes a un mismo lote se mantuvieron juntos en corrales debidamente preparados con bebederos y comederos durante el desarrollo de la experiencia (Fig. 3.2.). En cambio, los animales procedentes de diferentes lotes no tuvieron contacto alguno entre sí para evitar cualquier tipo de interacción entre ellos (Fig. 3.3.).



Fig. 3.2. Instalaciones de los parques.



Fig. 3.3. Distribución de los lotes experimentales en parques independientes.

3.3.- Animales.

3.3.1.- Lombrices de tierra.

La especie de lombriz elegida para criar e infectar los cerdos fue *E. foetida* o lombriz roja californiana, puesto que son muy numerosos los trabajos que avalan la especialización de esta especie para su cría en cautividad y la facilidad para infectarse del nematodo objeto de estudio (Dunn, 1955; Mackenzie, 1958).

El pie de cría, es decir, las lombrices generadoras del cultivo fueron adquiridas a una empresa destinada al lombricultivo profesional del anélido en cuestión (Peralbillo S.C.P. de Torrecampo, Córdoba). El sustrato del cultivo se preparó previamente con estiércol de caballo, paja y posos de café empapados en agua y fermentados durante 2-3 días.

La cría doméstica de esta especie es muy sencilla, no requiere de ningún acondicionamiento previo. Se basa en el empleo de cajones de madera a los que se les hicieron unos orificios en el fondo, para facilitar el drenaje del exceso de agua tras los riegos (Fig. 3.4.). Primero se colocaron las lombrices en un extremo del cajón junto con el sustrato y se empieza a suministrar diariamente alimento nuevo. Una vez saturado el

primer cajón, se toma otro empleando para la nueva siembra de lombrices algunos ejemplares del primer cajón.



Fig. 3.4. Cajones de madera para la cría de las lombrices.



Fig. 3.5. Lugar donde se ubicaron los cajones de cría.

Los cajones de cultivo se dispusieron en las dependencias del Hospital Clínico de la Facultad de Veterinaria destinadas a la experimentación con animales, en una sala sin ventanas, bien ventilada por extractores de aire, donde no se registraban grandes variaciones de temperaturas (Fig. 3.5.). Las lombrices estuvieron expuestas constantemente a la luz artificial, para que no abandonasen los cultivos, puesto que estos anélidos son fotofóbicos. El alimento se iba agregando gradualmente en el núcleo de las lombrices, pero sin cubrirlas y los cajones se regaron gradualmente un par de veces por semana, excepto en el verano que se aumentaba la frecuencia de riego a cuatro veces por semana. La aireación del sustrato es muy importante para el lombricultivo, para ello, y con la ayuda de un rastillo, se volteaba la tierra desde el fondo de los cajones hacia el exterior, con la finalidad de favorecer la oxigenación.

3.3.2.- Cerdos.

Para la consecución de esta experiencia, se han utilizado un total de 48 cerdos de raza ibérica cruzados al 50% con Duroc-Jersey, de ambos sexos y de peso medio al comienzo del ensayo de $17'2 \pm 3'6$ Kg.

Los progenitores de éstos fueron adquiridos en el Centro de Selección y Reproducción Animal (CENSYRA) de Badajoz, fueron un total de 12 hembras primíparas ibéricas puras y un macho reproductor de raza Duroc. Una vez trasladados

los animales a las instalaciones del Hospital Clínico de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, fueron debidamente identificados y desparasitados.

Durante todo el tiempo que duró la cubrición y la preñez, estas hembras fueron convenientemente desparasitadas con oxibendazol (Loditac®, Pfizer) a fin de evitar cualquier interacción en el posterior ensayo. Los lechones nacidos, se mantuvieron con las madres hasta los 1'5 y 2 meses de edad, aproximadamente. A la semana de vida se les administró hierro (Ferropen®, Laboratorios Ovejero) y un complejo vitamínico (Vitamina AD₃E parenteral®, Laboratorios Ovejero), una vez que los lechones fueron adecuadamente destetados, se les trasladó a las instalaciones del Hospital Clínico de la Facultad de Veterinaria de Cáceres donde se desarrolló la experiencia (Fig 3.6.). Se trataba de una nave independiente, compuesta por 8 parques grandes independientes entre sí, donde se dispusieron los animales pertenecientes a los diferentes lotes. Cada uno de estos parques estaba habilitado con bebederos y comederos adecuados para la especie porcina (Fig.3.2.).



Fig. 3.6. Nave de porcino del Hospital Clínico de la Facultad de Veterinaria de Cáceres.

Los animales se mantuvieron durante 20 días con un pienso completo de alta densidad nutritiva y elevada digestibilidad, indicado especialmente para el destete de lechones ibéricos (Iberdestete®, Purina). Posteriormente, este pienso de inicio se cambió gradualmente a una dieta de mantenimiento basada en el uso de un pienso de crecimiento (P-2, Coop. Ntra. Sra. del Prado). La edad media de los animales al comienzo del experimento fue de 2'5 meses. Previamente los animales fueron pesados y crotalizados para distribuirlos uniformemente en función del peso y sexo, en los

diferentes lotes que constituirían la experiencia. Así mismo, durante el periodo de adaptación de los lechones, antes de comenzar la fase experimental, se realizaron diversos controles para determinar su estado sanitario desde el punto de vista parasitológico.

3.4.- Material infeccioso: Larvas 3.

3.4.1.- Obtención de larvas 3 infectivas.

● Recogida e identificación de hembras adultas de *M. apri*.

La obtención de los parásitos adultos, se realizó a partir de pulmones de cerdos domésticos y jabalíes infectados naturalmente, obtenidos en matadero y monterías, respectivamente. Estos pulmones fueron colocados sobre bandejas, procediendo a la apertura del tracto respiratorio mediante el uso de unas tijeras de puntas curvadas para no deteriorar los vermes (Fig. 3.7.). Tratando de evidenciar los nematodos broncopulmonares, la apertura de los conductos respiratorios comenzó por tráquea, bronquios superiores, medianos y bronquiólos, hasta llegar finalmente a la región más apical del lóbulo diafragmático del pulmón, ubicación predilecta de *Metastrongylus spp.* Los vermes hallados se recogieron con la ayuda de unas pinzas, para finalmente introducirlos en placas de Petri con suero fisiológico.



Fig. 3.7. Procedimiento de apertura de los conductos pulmonares en busca de *M. apri*.

Posteriormente, se separaron los machos de las hembras, estas fueron identificadas en un estéreomicroscopio (Nikon, Mod.XN), en función de sus características morfológicas, especialmente de la parte posterior.

● Infección de lombrices.

Para proceder a la infección de las lombrices, introdujimos un gran número de lombrices en un pequeño terrario de infección, este consiste en una caja de madera de pequeñas dimensiones, 15x30 cm, con sustrato generosamente regado.

Previamente, y una vez conseguidas las hembras adultas de *M. apri*, tal y como se ha sido descrito en el apartado anterior, se introdujeron en una placa de Petri con suero fisiológico, donde se procedió al triturado de las mismas mediante el uso de un bistorí, favoreciéndose así la salida de los huevos embrionados de *M. apri* al medio salino.

Por último, las lombrices fueron rociadas con el homogeneizado resultante, y mantenidas en este terrario de infección durante siete días aproximadamente, para lograr la completa ingestión de los huevos de *M. apri*. Esta misma operación se realizó en varias ocasiones, para asegurarnos una importante carga parasitaria por lombriz. No obstante, las lombrices no desarrollaron el estadio larvario infectivo (L3) en su interior hasta 3 semanas después de las primeras infecciones, por ello se volvían a ubicar en el terrario original hasta su uso.

● Digestión de lombrices.

Medios instrumentales	Lombrices infectadas. Coladores. Filtro de 0'125 mm de diámetro de poro. Filtro de 0'065 mm de diámetro de poro. Bote de cristal con tapón de rosca. Trituradora eléctrica, Moulinex© tipo 320. Pepsina 1:10.000 NF (Panreac, Ref. 175208). Ácido Clorhídrico 37% (Panreac, Ref. 141020). Incubador y agitador orbital, Certomat® HK (B.Braun-Biotech S.A.) Balanza, Precisa 600 C© (P.A.C.I.S.A). Matraz Erlenmeyer de cristal.
-----------------------	--

Las lombrices se recogieron del terrario y se lavaron, ayudándonos con un colador, para evitar el exceso de tierra. Se mantuvieron durante unas 12 horas en una caja pequeña con papel de filtro en su interior, para que las lombrices expulsaran la tierra que aun tenían en su interior. Posteriormente, fueron trituradas con una trituradora eléctrica, el homogeneizado resultante se pesó para calcular las proporciones adecuadas de los diferentes componentes del líquido de digestión. La proporción estandarizada fue la siguiente:

Por cada 15 g del triturado de lombrices se emplea

{	25 ml de agua a 37°C
	0´6 ml de HCl al 37%
	0´3 g de pepsina

Tras la mezcla de todos los componentes de la digestión artificial en un bote de cristal con tapón de rosca, se incubaron en el digestor artificial a 40°C, manteniendo una agitación de 175 rpm, durante 35-40 min.

Pasado el tiempo estimado de digestión, se procedió a filtrar la mezcla a través de un doble filtro; uno superior de 0´125 mm de diámetro de poro y otro inferior de 0´063 mm. De modo que en el primer filtro se retenían los trozos de lombrices sin digerir y la suciedad, y en el segundo las L3 de *M. apri*. Consecutivamente, se realizaba un lavado de este último filtro, utilizando agua templada para facilitar la recogida de las larvas, que fueron depositadas en un matraz Erlenmeyer.

3.4.2.- Dosificación y administración del material infectivo.

Medios instrumentales	<p>Cámara McMaster.</p> <p>Pipetas Pasteur de plástico (Scharlab, 027-200000).</p> <p>Microscopio Nikon Mod. Labophot.</p> <p>Sondas de plástico.</p> <p>Tubo de plástico duro.</p> <p>Jeringas de 50ml (BD Discardit™ II).</p>
------------------------------	---

Para la preparación de la dosis infectiva, se procedió a la cuantificación de las L3 de *M. apri* en la solución resultante de la digestión artificial de las lombrices. Para

ello, se homogeneizó meticulosamente la solución y se realizó el conteo en cámaras McMaster. Se llevaron a cabo 6 recuentos de una misma muestra, calculando la media resultante. De esta manera ajustamos las dosis de infección de cada lote en función del número de larvas resultantes por mililitro, de la siguiente manera:

$$\begin{array}{r} \text{N}^\circ \text{ de larvas contadas} \text{ ----- } 300 \mu\text{l (Volumen de la cámara McMaster)} \\ \text{X} \qquad \qquad \qquad \text{----- } 1000 \mu\text{l} \end{array}$$

El procedimiento de administración de los inóculos se realizó mediante el sondaje gástrico de los animales (Ferguson, 1981). Para ello, se inmovilizaron convenientemente a los animales, y se le introdujo en la boca un tubo cónico de plástico duro con sendos agujeros en la boca y en el fondo, que permite mantener fija y abierta la boca del cerdo, para así facilitar la introducción de la sonda, sin que el animal la muerda ni la mueva con la lengua. A continuación, se localizó la entrada al esófago y se introdujo el tubo de plástico hasta una longitud que nos asegurase su entrada en el estómago.

Una vez sondado el animal, se le administró el inóculo ayudándonos de una jeringa. Para asegurarnos de la completa administración de la dosis, seguidamente con esta misma jeringa, se le aplicaron 100 ml de agua, así como varios volúmenes de aire, con lo que se facilitó el arrastre de todo el líquido de la sonda hacia el estómago. Tras cerciorarnos de la adecuada ingestión del contenido, la sonda esofágica fue retirada poco a poco. Todo este laborioso proceso, se realizó con los animales en ayunas durante las 12 horas previas a la infección, con largas pausas y tranquilidad para evitar la regurgitación de la dosis infectiva. Así mismo tras la infección, los animales fueron observados durante unas horas para comprobar que no hubiesen vomitado el inóculo.

3.5.-Obtención de antígenos.

Medios instrumentales	Medio de cultivo de lavado	RPMI-1640 (Sigma, 8758) Enrofloxacin (Syvaquinol 100®, Syva Laboratorios). Anfotericina B (PAA Laboratories GmbH, P11-001). 5% de Suero Fetal Bovino (Linus, S01805H).
		PBS 1x estéril. Coladores. Copas de sedimentación. Pipetas Pasteur de plástico (Scharlab, 027-200000). Filtros celulares de diámetro 0'22 µm (Millex®, SLGP033RS). Tubos Falcon 50 ml estériles (BD, 35-2070). Macerador estéril. Centrífuga, KUBOTA Mod. 5800. Centrífuga, Costar mini-centrifuge. Sonicador, Sonic & Materials, INC. Mod. VC 300.

3.5.1.- Antígeno somático larvario (ASL).

Tras la digestión de las lombrices, descrita anteriormente en el apartado 3.4.1., procedimos a la recuperación larvaria mediante el método Baermann. Para ello, en una copa de sedimentación se añadieron, 500 ml de PBS 1x y medio de cultivo de lavado estériles en una proporción 1:2, a una temperatura aproximada de 38-39°C.

A continuación, sobre la copa de sedimentación se coloca un colador con una gasa doble, de tal modo que el colador contacte con el medio de migración preparado en la copa de sedimentación. Sobre la superficie de la gasa fuimos añadiendo poco a poco el resultado de la digestión de las lombrices, usando para ello una pipeta Pasteur. Para favorecer la migración de las larvas, el Baermann se mantiene durante 5 horas a 38-39°C, tiempo suficiente para que las larvas alcancen por gravedad el fondo de la copa. Si el medio de migración se va evaporando, debemos rellenar con PBS 1x estéril templado, de modo que siempre el colador este en contacto con el medio líquido.

Tras las 5 horas de migración, el sobrenadante fue retirado y el sedimento recogido mediante una pipeta Pasteur. Éste se deposita en un tubo Falcon de 50 ml y se

centrifuga a 175 g durante 5 minutos a 30 °C. Posteriormente se retira el sobrenadante y se añadieron 30 ml de PBS 1x estéril, centrifugándolo en las mismas condiciones, nuevamente. Se realizaron dos lavados más, siguiendo este mismo procedimiento.

A continuación, se procede a la sonicación en frío de las larvas durante 16 min a 175 W de salida, con paradas cada 2 min y con pulsos al 50%. Por último, el resultado se ultracentrifugó a 1500 g a 4°C durante 20 min, el sobrenadante obtenido fue filtrado (0,22 µm diámetro de poro) y conservado en alícuotas a -80°C hasta su uso.

3.5.2.- Antígeno somático de adultos (ASA).

Las hembras y machos adultos identificados de *M. apri*, fueron introducidos en un tubo Falcon con 40 ml de PBS 1x estéril y centrifugados a 2 g durante 1 min a 4°C. Posteriormente, retiramos el sobrenadante y volvemos a realizar la misma operación en cuatro ocasiones más.

A continuación, para proceder al triturado de los vermes, éstos fueron introducidos en el macerador esterilizado junto con 3 ml de PBS 1x estéril (Fig. 3.8.). Para un mejor aprovechamiento del antígeno, se añadieron 3 ml más de PBS 1x estéril para arrastrar los restos que quedaron adheridos a las paredes del macerador. El homogeneizado resultante se vierte en un tubo de propileno de 15 ml, el cual fue rellenado con PBS 1x hasta alcanzar un volumen final de 10 ml.



Fig. 3.8. Detalle del homogeneizado obtenido a partir de la maceración de los adultos de *M. apri*.



Fig. 3.9. Sonicador empleado en la obtención de los antígenos.

Esta solución se sonica durante 8 min a 175 W de salida, con paradas cada minuto y con pulsos al 50% (Fig. 3.9). La sonicación se realizó en hielo picado, para evitar el sobrecalentamiento de la muestra y, consecuentemente, la desnaturalización proteica. El resultado se centrifugó a 1500 g durante 20 min a 4°C, fue filtrado (0,22 µm de poro) y conservado en alícuotas a -80°C hasta su uso.

3.6.- Obtención y administración de los inóculos para la inmunización de los cerdos.

Medios instrumentales	Antígeno somático larvario (ASL). Antígeno somático de adultos (ASA). Agua destilada estéril (Millipore®). Adyuvante incompleto de Freund (Sigma, F-5506). Sonicador, Sonic & Materials, INC. Mod. VC 300. Ependorffs. Jeringas de 1ml (BD Plastipak™, 300014).
-----------------------	---

3.6.1.- Inóculo de antígeno somático larvario (ASL).

La elaboración del inóculo con ASL, se realizó de manera individualizada para cada animal del lote 4 en función de su peso, puesto que la concentración empleada fue de 10 µg/ml por Kg de peso vivo de animal. Una vez conocida la concentración proteica del antígeno y el peso del animal, se calculó la cantidad de ASL a utilizar en cada una de las administraciones. Seguidamente, se completaba esa cantidad hasta los 500 µl con agua destilada estéril, a los que se les añadían otros 500 µl de adyuvante de Freund. Todo ello se realizó en campana de flujo laminar para preservar la esterilidad del preparado. Finalmente, se sonicó la muestra durante 2 min a 175 W de salida y un pulso del 50%, para obtener un inóculo completamente homogeneizado.

3.6.2.- Inóculo de antígeno somático de adultos (ASA).

La elaboración del inóculo con ASA, al igual que en el caso anterior, se realizó de manera individualizada para cada cerdo del lote 4 en función de su peso. La concentración empleada también, fue de 10 µg/ml por Kg de peso vivo de animal. De

tal forma, se siguió el proceso de preparación igual que en el caso de ASL, descrito anteriormente, para la consecución de un inóculo completamente homogeneizado.

3.6.3.-Administración del inóculo en la inmunización de los cerdos.

Una vez preparados los inóculos en el laboratorio, éstos eran inmediatamente transportados en jeringas de insulina selladas, hasta la granja para su administración. Los animales pertenecientes al lote 4 recibieron, tres dosis de inóculos, durante el desarrollo experimental. La primera dosis estuvo constituida por el 100% de ASL, la segunda dosis consistió en un 50% de ASL y un 50% de ASA y la última estuvo integrada por el 100% de ASA. En la tabla 3.1. se esquematiza el protocolo de inmunización llevado a cabo en los animales del lote 4.

Tabla 3.1. Protocolo de inmunización llevado a cabo en el lote 4.

	Día pre-infección	Contenido del inóculo
1ª Inoculación	35	100% ASL
2ª Inoculación	25	50% ASL + 50% ASA
3ª Inoculación	15	100% ASA

Los animales fueron convenientemente inmovilizados, procediendo a la administración subcutánea del inóculo en la parte trasera de la base de la oreja.

3.7.- Determinación de la concentración proteica de los antígenos.

Medios instrumentales	PBS 1x. Coomassie® Plus Protein Assay Reagent (Pierce, 1856210). Seroalbúmina bovina estándar, fracción V (Pierce, 23209). Micropipetas dispensadoras de diversos volúmenes. Lector de ELISA, MRX Microplate Reader, (DYNEX TECHNOLOGIES). Placas microtiter ELISA de fondo plano (Costar, 3590). Incubador y agitador orbital, CERTOMAT® HK (B.Braun-Biotech S.A.).
------------------------------	--

La concentración proteica de los antígenos se determinó mediante una modificación del método Bradford. Mencionado método se basa en la elaboración de una curva patrón, mediante diluciones progresivas de la seroalbúmina bovina de concentraciones proteicas conocidas. Los rangos de las concentraciones usadas, variaron según el tipo antígeno a estudiar, dependiendo de que la cantidad de proteína presente en el extracto antigénico sea elevada o reducida, estas abarcan desde los 2000 µg/ml hasta los 50 µg/ml (curva de alto rango) o desde 25 µg/ml a 1 µg/ml (curva de bajo rango) de BSA.

Tras la elaboración de la curva patrón, en una placa microtiter ELISA, se procedió a la colocación por duplicado, de 10 µl de cada una de las diferentes diluciones de BSA conocidas, junto con 10 µl de otras tantas diluciones de los antígenos. Posteriormente, se añadieron 290 µl del reactivo colorimétrico de Coomasie, de forma que el volumen final de cada pocillo fue de 300 µl.

Finalmente, se procedió a la lectura de la placa en el equipo lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm. Gracias a la curva patrón de concentraciones proteicas conocidas, podemos extrapolar y calcular la concentración proteica de los extractos antigénicos a partir de ella.

3.8.- Procesado de las muestras obtenidas de los cerdos.

Medios instrumentales	Tubos estériles 10 ml (Venoject silicone, VT-100SP). Tubos con EDTA 10 ml (Venoject EDTA, VT-05TK). Bolsas de plástico. Micropipetas dispensadoras de diversos volúmenes. Cajas de Racks (Costar®, 4410). Centrífuga, KUBOTA Mod. 5800. Portaobjetos (Knittel Gläser®) Botes de muestra. Formol tamponado al 10%. Tubos Falcon 50 ml (BD, 35-2070). Bisturí estéril. Pinzas metálicas estériles. Tijeras.
------------------------------	---

Medio de cultivo de lavado	RPMI-1640 (Sigma, 8758) Enrofloxacin (Syvaquinol 100®, Syva Laboratorios). Anfotericina B (PAA Laboratories GmbH, P11-001). 5% de Suero Fetal Bovino (Linus, S01805H).
Medio de cultivo definitivo	RPMI-1640 (Sigma, 8758) Enrofloxacin (Syvaquinol 100, Syva Laboratorios). Anfotericina B (PAA Laboratories GmbH, P11-001). 10% de Suero Fetal Bovino (Linus, S01805H)

3.8.1.- In vivo: Heces, sangre y suero sanguíneo.

Los días que se realizaron tomas de heces y sangre en cada lote experimental se resumen en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Distribución cronológica la de toma de las muestras de heces y sangre en los lotes experimentales.

	Nº Crotal	Días post-infección
LOTE 1	11, 12, 13	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84
	14, 15, 16	0, 7, 14, 21, 28, 35
	17, 18, 19	0, 7, 14
LOTE 2	21, 22, 23	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84
	24, 25, 26	0, 7, 14, 21, 28, 35
	27, 28, 29	0, 7, 14
LOTE 3	31, 32, 33	- 50, -50, -40, 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84
	34, 35, 36	- 60, -50, -40, 0, 7, 14, 21, 28, 35
	37, 38, 39	- 60, -50, -40, 0, 7, 14
	1, 2, 3	- 60, -50, -40, 0
LOTE 4	41, 42, 43	- 35, -25, -15, 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84
	44, 45, 46	- 35, -25, -15, 0, 7, 14, 21, 28, 35
	47,48, 49	- 35, -25, -15, 0, 7, 14
	4, 5, 6	- 35, -25, -15, 0
LOTE	51, 52, 53	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84
CONTROL	54, 55, 56	0

Las muestras de heces fueron tomadas directamente del recto del animal, debidamente selladas e identificadas con el número de crotal. Así mismo, de cada cerdo se obtuvieron 20 ml de sangre en cada extracción, mediante venipunción de la yugular. Se utilizaron tubos estériles sin anticoagulante para la obtención de suero sanguíneo y tubos con anticoagulante EDTA para el análisis celular.

Una vez en el laboratorio las muestras fueron procesadas, de tal forma que los tubos sin anticoagulante fueron centrifugados a 250 g durante 10 min a 4°C, para la obtención del suero, el cual fue almacenado a -20°C en cajas de racks debidamente identificadas.

3.8.2.- Necropsias: Tejidos orgánicos.

La cronología de los sacrificios se estipuló en base a las diferentes etapas descritas en la patogenia de *Metastrongylus spp.* De este modo, los días de necropsia fueron marcados los días 0, 14, 35 y 84 tras la última infección (*dpi*, días post-infección) (Tabla 3.3.).

Tabla 3.3. Distribución cronológica de los sacrificios.

LOTE 1			LOTE 2			LOTE 3				LOTE 4				LOTE CONTROL		N° del animal
11	14	17	21	24	27	31	34	37	1	41	44	47	4	51	54	
12	15	18	22	25	28	32	35	38	2	42	45	48	5	52	55	
13	16	19	23	26	29	33	36	39	3	43	46	49	6	53	56	
84	35	14	84	35	14	84	35	14	0	84	35	14	0	84	0	Día del sacrificio (<i>dpi</i>)

Todos los cerdos utilizados en el desarrollo de la experiencia fueron sacrificados, previa insensibilización, por el método de desangrado. Para la realización de la necropsia, se siguió el método descrito por Gázquez (1987). En primer lugar se observaron macroscópicamente, las lesiones que aparecieron en el exterior e interior de cada animal, anotando cualquier incidencia o anomalía anatomopatológica.

Posteriormente, se procedió a la recogida y tratamiento de las vísceras objeto de estudio en la experiencia. Primeramente se extrajo con mucho cuidado el tracto respiratorio completo, desde tráquea hasta pulmones. La tráquea es rápidamente sellada

para evitar cualquier tipo de contaminación externa. A su vez, los ganglios torácico-pulmonares son identificados y separados, y por último el hígado es extraído.

Se tomaron fotografías de los pulmones e hígados, en el momento de la necropsia, para su posterior análisis anatomopatológico.

Para el posterior estudio celular, los ganglios torácico-pulmonares fueron obtenidos e introducidos en medio de cultivo *definitivo* estéril, hasta su procesamiento en el laboratorio (Fig. 3.10.). La zona de trabajo se mantuvo lo más estéril posible trabajando siempre en torno a un mechero Bunsen. De igual modo, parte de estos ganglios fueron conservados en una solución de formol tamponado al 10% con el fin de estudiar posteriormente sus características histopatológicas.



Fig. 3.10. Obtención de los ganglios torácico-pulmonares durante la necropsia.

En el hígado se efectuó la cuantificación de las manchas de leche, lesión que evidencia el paso de larvas erráticas de *M. apri* a través del parénquima hepático. Este conteo se realiza mediante la observación macroscópica de la superficie tanto dorsal como ventral de los diferentes lóbulos hepáticos. Tras esta operación, se toma una muestra hepática de 1 cm³, para su posterior análisis anatomopatológico, introduciéndolo en formol tamponado al 10%.

Por último el tracto respiratorio, junto con el resto de muestras recopiladas fueron trasladados a los laboratorios del Área de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, para proseguir con su procesado.

3.9.- Métodos de recuperación de larvas y adultos.

Con el fin de obtener el mayor número de larvas del pulmón, las técnicas seguidas para su cuantificación total han sido en total tres.

En primer lugar, se recogieron las larvas filtradas durante la realización de los lavados broncoalveolares (BAL) en el pulmón derecho (capítulo 3.14.1.).

En segundo lugar, se procedió a la apertura de los conductos respiratorios comenzando por tráquea, bronquios superiores, medianos y bronquiólos, hasta llegar finalmente a la región más apical del lóbulo diafragmático de los pulmones. Una vez abiertos, se lavan bien los pulmones en una bandeja con agua tibia, haciendo pasar la solución de lavado a través de un doble filtro de 0'125 mm y de 0'063 mm de diámetro de poro, de modo que en el primer filtro quedan los restos más groseros (coágulos de sangre, fragmentos del pulmón, etc.), y en el segundo se retienen las L4 de *M. apri*, que podemos recoger tras el lavado de este último filtro.

Por último, para capturar las larvas que aún quedan en el tejido pulmonar, se realizó un Baermann (capítulo 3.5.1), para ello trituramos el pulmón con ayuda de tijeras y bisturís, de tal modo que quedaron trozos de un tamaño de unos 2-3 mm, los cuales se dispusieron sobre una gasa doble de algodón en un colador. El líquido de migración utilizado fue una mezcla al 50% de PBS 1x estéril y medio de cultivo de lavado y se mantuvo a 37°C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, recogimos el sedimento con las L4 separadas de los tejidos y procedimos al cómputo total de las mismas.

Por su parte, las formas adultas de *M. apri* se obtuvieron mediante la cuidadosa apertura de los bronquios y bronquiólos, ya que por su gran tamaño se visualizaban con relativa facilidad. Tan sólo una pequeña proporción de ellos se recuperaron durante el desarrollo de los BAL en el pulmón derecho (capítulo 3.14.1.), al quedar retenidos en los filtros.

3.10.- Métodos histopatológicos.

El material obtenido de las necropsias, fue fijado en formol tamponado al 10%, tallado en pequeños bloques, tras 3 días de fijación, e incluido en parafina en un procesador automático (Leica, TP1020), siendo almacenados hasta su utilización.

Se realizaron cortes de entre 4 y 8 μm de espesor, se depositaron en portaobjetos y se sometieron a calentamiento suave para provocar su adherencia. A continuación, se desparafinan sometiendo el corte primero a 50°C durante un mínimo de una hora. Posteriormente, se someten a dos baños de xilol, más tarde se rehidratan mediante sucesivos baños de alcohol etílico de concentración decreciente (100°C, 96°C y 70°C) y luego en agua destilada. Por último, se realiza la tinción con hematoxilina-eosina. De forma resumida, la técnica seguida fue la siguiente:

Hemalumbre de Hematoxilina de Mayer	6 min
Lavado con agua destilada		
Tampón ácido para diferenciación	1 min
Lavado con agua destilada		
Tampón básico de viraje	2 min
Lavado con agua destilada		
Eosina G	5min
Lavado con agua destilada		
Tampón neutro de diferenciación	5 min

Por último, se realiza este mismo proceso pero en sentido contrario, para lograr la deshidratación absoluta del tejido, y tras el último baño de xilol, se cubre la preparación con medio de montaje permanente. Una vez teñido, podemos observar los núcleos celulares en color azul oscuro, mientras que el citoplasma aparece en distintas tonalidades de rosa.

Todas las preparaciones y tinciones fueron realizadas en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

3.11.- Análisis coprológicos.

Medios instrumentales	<p>Vasos de plástico.</p> <p>Balanza Precisa 600 C[©] (P.A.C.I.S.A).</p> <p>Gasas de algodón.</p> <p>Pinzas metálicas.</p> <p>Probeta graduada de 100 ml.</p> <p>Tubo de cristal de fondo curvo.</p> <p>Centrifuga KUBOTA Mod. 5800.</p> <p>Líquido de flotación: Sulfato de Zinc (d= 1'310).</p> <p>Pipetas Pasteur de plástico (Scharlab, 027-200000).</p> <p>Cámara McMaster.</p> <p>Microscopio Nikon Mod. Labophot.</p>
-----------------------	---

La técnica empleada para la cuantificación de los huevos embrionados de *M. apri*, se trata de un método McMaster modificado, descrito por Roepstorff y Nansen (1999).

Para su consecución, pesamos 4 g de heces en un vaso de precipitado debidamente identificado con el número de crotal del animal. Posteriormente añadimos 56 ml de agua, mezclándolo bien, hasta conseguir homogeneizarlas. A continuación, filtramos la mezcla a través de una gasa de algodón colocada en doble capa, vertiendo el filtrado en un segundo vaso. Inmediatamente, se añaden 10 ml de esta mezcla en un tubo de cristal (15 ml de esta suspensión suponen un gramo de heces, luego 10 ml representan 2/3 de gramo). Posteriormente, la mezcla fue centrifugada durante 10 min a 250 g, seguidamente se eliminó el sobrenadante con cuidado de no remover el sedimento. Y se añadieron 4 ml de una solución de flotación de Sulfato de Zinc para resuspender el sedimento.

Finalmente, se rellena una cámara McMaster y esperamos unos 4-5 min para que los huevos asciendan a la parte superior, pero en ningún caso más de 10 min, ya que algunos huevos se pueden destruir en el líquido de flotación. Una vez realizada la cuantificación, se calcula el *nº de huevos por g de heces*, multiplicando el número de huevos por 20.

3.12.- Análisis hematológicos.

Medios instrumentales	Portaobjetos (Knittel Gläser®).
	Contador automático.
	Microscopio Nikon Mod. Labophot.
	Fijador para tinción (Panreac, 254101).
	Kit de tinción rápida en hematología Azul (Panreac, 253998). Eosina (Panreac, 253999).

Se realiza previamente una extensión fina de la muestra de sangre con anticoagulante (EDTA) en un portaobjetos, y dejamos secar, identificando debidamente cada muestra con el nº lote, nº animal, fecha de la toma y día post-infección (Fig. 3.11.).



Fig. 3.11. Procesado y almacenamiento de las muestras de sangre y suero sanguíneo en el laboratorio.

A continuación, teñimos la muestra mediante la tinción de Panóptico rápido, técnica utilizada para el diagnóstico y caracterización de los leucocitos en sangre.

Para la realización del recuento diferencial de los eosinófilos, procedemos al conteo de un total de 100 leucocitos en un campo del frotis, con la ayuda de un contador automático, de entre los que diferenciaremos el total de eosinófilos observados (Fig. 3.12.). Esta operación se repite en tres ocasiones por cada muestra, obteniendo la media del porcentaje de eosinófilos en una muestra.

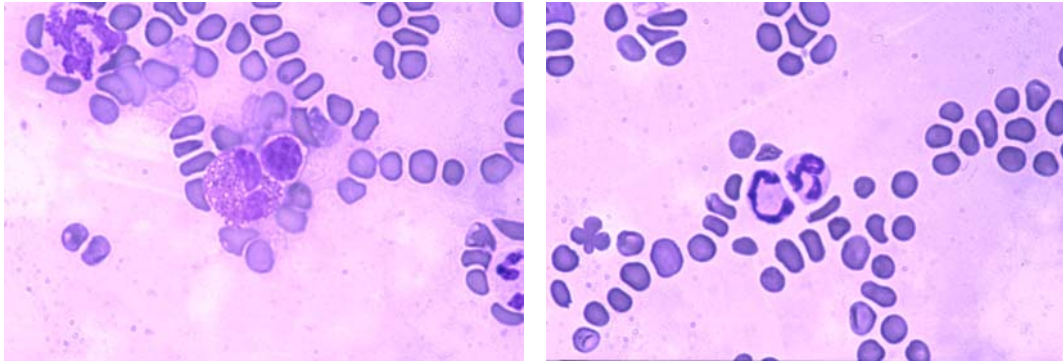


Fig.3.12. Eosinófilo y monocito en frotis sanguíneo. Fig.3.13. Polimorfonucleares en frotis sanguíneo.

3.13.- Análisis serológicos: Técnica inmunoenzimática ELISA.

Medios instrumentales	<p>Anti-pig Ig G (whole molecule) peroxidase conjugated (Sigma, P-8290).</p> <p>Mouse anti-porcine IgM (Serotec, MCA637).</p> <p>Mouse anti-porcine IgG1 (Serotec, MCA635).</p> <p>Mouse anti-porcine IgG2 (Serotec, MCA636).</p> <p>Goat anti-mouse IgG (H&L) (Multi species adsorbed) (Serotec, STAR117P)</p> <p>TMB (3, 3', 5, 5'- tetrametilbencidina) (Sigma, T-3405).</p> <p>Tampón citrato 0'05 M.</p> <p>Peróxido de hidrógeno.</p> <p>Ácido sulfúrico 3N.</p> <p>PBS 1x.</p> <p>Tween-20 (Merck, 822184)</p> <p>Micropipetas dispensadoras de diversos volúmenes.</p> <p>Placas microtiter ELISA de fondo plano (Costar, 3590).</p> <p>Lector de placas ELISA MRX Microplate Reader, DYNEX TECHNOLOGIES.</p> <p>Dispensador y lavador de placas Merck System MIOS.</p> <p>Incubadora CERTOMAT® R.</p>
------------------------------	--

3.13.1.- Estandarización de la técnica.

Con el objeto de obtener una óptima relación entre la concentración del antígeno y la densidad óptica, se llevaron a cabo una serie de ensayos encaminados a determinar los parámetros que mayor influencia tienen en la fiabilidad de la técnica, utilizando para

ello diferentes diluciones de los sueros y de los conjugados anti-especie, así como determinando el tiempo de reacción enzimática adecuado, tras la aplicación del sustrato.

Para ello, diferentes concentraciones de cada uno de los antígenos testados, ASA y ASL (1, 3, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$) fueron enfrentados a sueros negativos y positivos, a las siguientes diluciones: 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/500, 1/800, 1/1000, 1/1200 y por último a 1/2400.

A su vez, cada una de estas diluciones séricas fueron ensayadas frente a las diferentes diluciones de los conjugados empleados. En el caso del conjugado IgG anti-porcino obtenido en conejo: 1/500, 1/5000, 1/10000 y 1/50000. Las diluciones de IgM anti-porcino desarrollada en ratón, fueron: 1/200, 1/400 y 1/800. De IgG₁ anti-porcino desarrollada en ratón, se testaron las diluciones 1/200, 1/400 y 1/800. Mientras que en el caso de IgG₂ se probaron las diluciones 1/50, 1/100 y 1/200.

Por último, también se probaron dos diluciones del anticuerpo secundario que fue una IgG anti-ratón desarrollada en cabra, 1/5000 y 1/10000. Para todos los casos se empleó la misma concentración del sustrato, descrita en el siguiente apartado (3.13.2).

En una segunda fase de los ensayos, partiendo de las concentraciones antigénicas y diluciones, tanto de los sueros como de los conjugados que ofrecían las mayores diferencias entre los sueros de referencia positivos y negativos empleados, se probaron diferentes tiempos de incubación y de lectura a 450 nm cada 5 minutos hasta un cómputo total de 60 minutos, determinando así los tiempos óptimos de incubación de los sueros y conjugado, así como de parada de la reacción.

3.13.2. Desarrollo de la técnica.

● Para el tapizado de las placas con el antígeno.

Se procede a la descongelación del antígeno obtenido según se describió en los capítulos 3.6.1. y 3.6.2. Se diluye en PBS 1x, pH 7.2 hasta la concentración deseada y se distribuye en las placas de ELISA, a razón de 100 μl por pocillo.

A continuación, las placas se incuban durante 2 horas a 37°C, con ambiente húmedo, para permitir la adsorción del antígeno a las paredes del pocillo. Tras la incubación, se procede a lavar tres veces las placas con solución de PBS 1x con Tween-

20 al 0'1%, usando para ello un lavador automático de placas y arrastrar así el exceso de antígeno.

Seguidamente, las placas son sacudidas enérgicamente sobre un papel de filtro para eliminar las gotas de líquido de lavado que pudieran permanecer aún en los pocillos. Tras el tapizado de las placas, adicionamos a razón de 200 µl por pocillo BSA al 3% en PBS 1x Tween-20 0'1%, manteniéndolas a 4°C durante toda la noche. El objetivo de este último paso, es cubrir perfectamente las zonas de los pocillos que no han sido recubiertos por el antígeno, para así poder evitar las posibles reacciones inespecíficas de las inmunoglobulinas.

Después de esta incubación, las placas se someten a un nuevo proceso de lavado triple. Las placas con el antígeno adsorbido, se mantienen a -80°C en bolsas de plástico selladas herméticamente hasta el momento de su utilización.

● **Desarrollo de la técnica ELISA.**

La técnica inmunoenzimática desarrollada en la determinación de los niveles de la IgG es un ELISA de dobles anticuerpos, por su parte, en el caso de las IgG₁, IgG₂ e IgM, se trata de un ELISA de triples anticuerpos.

Para la consecución de la técnica, las placas tapizadas son descongeladas. Tras alcanzar la temperatura ambiente, se procede a la adición de 100 µl de los sueros a chequear diluidos con PBS 1x Tween-20 0'1% por duplicado. Junto con los sueros problema, se depositan por cuadruplicado los controles, positivo y negativo, procediendo a su vez a rellenar una columna de blancos, como pocillos control del conjugado. Las placas se incuban durante 40 min a 37°C, en ambiente húmedo.

A continuación, tras lavar la placa en tres ocasiones (Fig. 3.14.), procedemos a la adición del conjugado según la inmunoglobulina a determinar, a la concentración previamente establecida, a razón de 100 µl por pocillo, sometiendo la placa a una nueva incubación en la estufa durante 45 min a 37 °C en ambiente húmedo.

Por último, realizamos un nuevo proceso de lavado para eliminar las inmunoglobulinas que no hayan reaccionado con los anticuerpos del suero testado. A partir de aquí, y solamente en el caso de los isotipos IgG₁, IgG₂ e IgM, se realiza una nueva incubación de 45 min a 37°C con un tercer anticuerpo (conjugado secundario),

que es una IgG anti-ratón unido a la peroxidasa, a razón de 100 μ l por pocillo. A continuación se procede a un nuevo proceso de lavado de las placas.

Para finalizar, y en todos los casos adicionamos 100 μ l por pocillo del sustrato, constituido por 10 ml de tampón citrato 0'05 M pH 5'0, 30 μ l de peróxido de hidrógeno y 1 mg de TMB por placa, que fue preparado como máximo media hora antes de su utilización debido a la inestabilidad del preparado. El sustrato toma una coloración azul-verdosa, con una intensidad proporcional a la cantidad de anticuerpos fijados al antígeno.

La parada de la reacción se lleva a cabo a los 20-30 min de la adición del sustrato, tiempo óptimo determinado para la lectura de la placa, utilizando ácido sulfúrico 3 N a razón de 50 μ l por pocillo.

La lectura se realiza con espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda (Fig. 3.14.), después de haber observado a simple vista la existencia de errores o coloraciones anormales en los diferentes pocillos que constituyen la placa.



Fig. 3. 14. Equipo necesario para el desarrollo de la técnica ELISA: dispensador y lavador de placas (Merck System MIOS) y lector de placas (ELISA MRX Microplate Reader).

Para comprobar que todos los pasos de la técnica han sido realizados correctamente, es necesario reservar unos pocillos en cada placa para realizar el *control del conjugado*, para ello se reserva la última columna de pocillos.

A cuatro de ellos no se les añade suero, siendo este sustituido por PBS 1x con Tween continuando con el desarrollo de la técnica como describe el protocolo. Estos

pocillos no indican la posibilidad de reacciones cruzadas entre el antígeno y el conjugado primario anti-porcino.

A los cuatro restantes, añadimos el suero control positivo, pero no el segundo anticuerpo, continuando con el protocolo de forma habitual. Estos 4 pocillos nos indican la existencia de posibles reacciones entre el suero positivo de cerdo con el conjugado secundario anti-ratón.

Además, estos controles nos pueden aportar información muy valiosa sobre los posibles errores en la consecución del procedimiento como pueden ser procesos de lavados inadecuados, reactivos en mal estado, etc.

Como *control positivo* se utiliza un suero positivo conocido, que situaremos en cuatro pocillos de la placa microtiter que nos garantiza que la técnica está bien realizada. Igualmente, para *control negativo* se utiliza un pool de los sueros de los cerdos pertenecientes al lote control.

3.14.- Análisis por Citometría de flujo laminar.

La técnica de la citometría de flujo nos permite el estudio, cualitativo y cuantitativo de las poblaciones celulares presentes en las muestras analizadas.

Así, para la determinación del tipo de inmunidad celular desarrollada a nivel sistémico se realizó mediante el estudio de las diferentes poblaciones linfocitarias y de los monocitos a lo largo de la experiencia procedentes de muestras de sangre periférica.

Por su parte, el estudio de la respuesta inmune a nivel local se realizó a partir de muestras de ganglio torácico-pulmonar y BAL, determinando las poblaciones linfocitarias y de macrófagos.

La toma de las muestras (sangre periférica, ganglio torácico y BAL) se realizaron los días 0, 14, 35 y 84 post-infección. Tras el sangrado o en su caso, el sacrificio y necropsia reglada de los animales, se llevó a cabo el procesado de dichas muestras con la finalidad de obtener las células en suspensión, para su posterior marcaje con los anticuerpos monoclonales (Ac-Mo) de elección.

3.14.1.- Procesado de las muestras.

Medios instrumentales	<p>PBS 1x estéril.</p> <p>Embudos de cristal estériles.</p> <p>Coladores estériles.</p> <p>Gasas de algodón estériles.</p> <p>Bisturí estéril.</p> <p>Pinzas metálicas estériles.</p> <p>Botes estériles de 250 ml.</p> <p>Mechero de alcohol.</p> <p>Placas de Petri estériles (Falcon, 35-1008).</p> <p>Tubos de poliestireno de fondo curvo de 14 ml (BD, 35-2057)</p> <p>Tubos de polipropileno estériles de 15 ml (Corning, 430052).</p> <p>Tubos Falcon de 50 ml estériles (BD, 35-2070).</p> <p>Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences™, 17-1440-02).</p> <p>Reactivo lisante de cloruro amónico, PharM Lyse™ (BD, 555899).</p> <p>Pipetas Pasteur de punta fina estériles (Sigma, Z350923-400E).</p> <p>Pipetas estériles de 10 ml (Falcon, 35-7551).</p> <p>Micropipetas dispensadoras de diversos volúmenes.</p> <p>Filtros celulares de nylon de 100 µm de poro (Falcon, 35-2360).</p> <p>Azul Tripán sol. 0'5% (Biological Industries, 03-103-1B).</p> <p>Hemocitómetro (Cámara de Neubauer).</p> <p>Centrífuga, KUBOTA Mod. 5800.</p> <p>Estufa de CO₂ (Hucha-Erlöss, Mod. Forma Scientific).</p> <p>Cámara flujo laminar (Telstar AV-100).</p> <p>Autoclave (Penta).</p> <p>Microscopio invertido (Olympus CK2).</p>
-----------------------	--

Medios de cultivo	Medio de cultivo <i>de lavado</i>	RPMI-1640 (Sigma, 8758). Enrofloxacin (Syvaquinol 100, Syva Laboratorios). Anfotericina B (PAA Laboratories GmbH, P11-001). 5% de Suero Fetal Bovino (Linus, S01805H).
	Medio de cultivo <i>definitivo</i>	RPMI-1640 (Sigma, 8758). Enrofloxacin (Syvaquinol 100, Syva Laboratorios). Anfotericina B (PAA Laboratories GmbH, P11-001). 10% de Suero Fetal Bovino (Linus, S01805H).

● **Sangre periférica.**

Para la separación de las células mononucleares sanguíneas se utilizó un gradiente de Ficoll. Así, para su elaboración se tomaron 2 ml de Ficoll-Paque Plus, cuya densidad es de 1'081 g/ml depositándolo en el fondo de un tubo de polipropileno de 15 ml. Por otro lado, se tomaron 2 ml de sangre, que se diluyó con 2 ml de PBS 1x estéril en un tubo de poliestireno de 14 ml, debido a la alta densidad de la sangre de porcino.

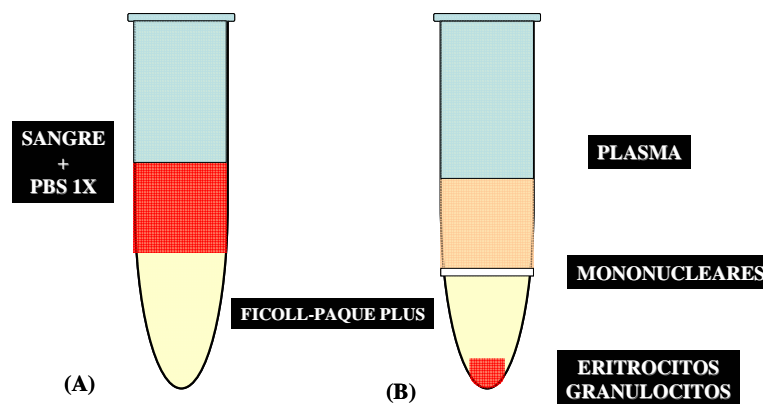


Fig. 3.15. Esquema representativo de las fases de separación de los mononucleares de la sangre mediante un gradiente de Ficoll. (A) Antes de centrifugar y (B) después de centrifugar.

A continuación, se tomaron 3 ml de esta última mezcla y se depositaron suavemente sobre los 2 ml de Ficoll, evitando que ambos medios se mezclasen (Fig. 3.15.). Sin agitar los tubos, se centrifugan a 450 g durante 20 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se establece una banda blanquecina entre el plasma y el medio de separación que contiene a los mononucleares sanguíneos, que se recogen con la ayuda de una pipeta Pasteur de punta fina estéril, depositándose en tubos de 15 ml estériles

(Fig.3.16.). Después se adicionaron 10 ml de medio de cultivo de lavado y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos a 4°C, seguidamente se realizaron 3 lavados más, siendo el último de ellos con medio de cultivo definitivo.

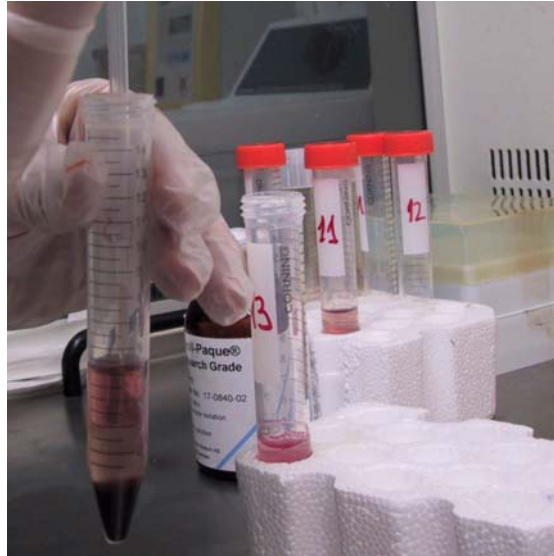


Fig. 3.16. Proceso de recogida de la banda celular que contiene los mononucleares sanguíneos.

Finalmente, se resuspende el pellet en 5 ml de medio de cultivo definitivo y se mantienen en frío durante la cuantificación de la concentración celular. Para dicha operación, se tomaron 10 μ l de esta suspensión y se mezclaron con 45 μ l de azul Tripán y 45 μ l de PBS 1x (dilución 1:10). Tras dejar actuar al colorante durante unos minutos, se procedió al recuento de las células viables (aquellas no teñidas de azul Tripán) en una cámara de Neubauer.

● **Ganglio torácico-pulmonar.**

Tras la necropsia del animal, las muestras ganglionares son trasladadas al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres (capítulo 3.8.1) Para lograr una suspensión celular, empleamos la técnica, originalmente descrita por Meeusen y Brandon (1994), que consistió en colocar los ganglios torácico-pulmonares extraídos sobre una placa de Petri estéril, en la que previamente se había añadido, aproximadamente 2 ml de medio de cultivo de lavado. Con la ayuda de 2 pinzas estériles se disgrega mecánicamente el ganglio, liberando las células de las cápsulas y tejidos conectivos que las rodean (Fig. 3.17.).



Fig. 3.17. Disgregación mecánica de los ganglios. Fig. 3.18. Filtrado del homogeneizado resultante.

Seguidamente, la solución se hizo pasar a través de un filtro de nylon de 100 μm de poro, depositando el contenido en un tubo Falcon de 50 ml estéril, al cual se le añade el volumen necesario de medio de cultivo de lavado hasta alcanzar 25 ml (Fig. 3.18.). La mezcla se centrifuga a 250 g durante 5 minutos a 4 °C. De la misma forma, se realizan dos lavados más. En el último lavado, se toma un volumen de 1000 μl del sedimento y se pasan a otro tubo Falcon, al que se le añadieron entre 5 y 8 ml de cloruro amónico (PharmLyse®), según tenga más o menos cantidad de glóbulos rojos. Se agita y se incuba durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo oportuno de lisado eritrocitario, se realizaron 3 lavados más con medio de cultivo de lavado. Finalmente, se tomaron 10 μl de la suspensión y se lleva a cabo la cuantificación celular, junto a 50 μl de Tripán azul y 340 μl de PBS 1x (dilución 1:40).

● Lavados broncoalveolares (BAL).

Para la obtención del BALF se realizaron sucesivos lavados de la mitad derecha del pulmón con una solución isotónica estéril a baja temperatura para el mejor desprendimiento de las células.

Para ello, introducimos un embudo de cristal de 20 cm de diámetro sobre el bronquio superior derecho y añadimos poco a poco PBS 1x estéril a 4°C en el interior del embudo para que el pulmón se vaya llenando lentamente. Al mismo tiempo, vamos masajeando el órgano con el fin de que el líquido llegue hasta las partes más distales de

los conductos respiratorios (Fig. 3.19.). Una vez se haya administrado un volumen aproximado de 100 ml de PBS 1x, sacamos el embudo y volcamos cuidadosamente el fluido de lavado sobre un filtro. Este consiste en una gasa de algodón doble dispuesta sobre un colador estéril para retener a los parásitos y posibles coágulos sanguíneos. Repetimos este proceso de llenado y vaciado en tres ocasiones más hasta que fueron utilizados un total de 300 ml de PBS 1x. Así, el contenido recuperado, fue de 200 ml aproximadamente, alojándolo en tubos Falcon estériles de 50 ml. Posteriormente, estos tubos fueron centrifugados a 175 g durante 20 minutos, obteniendo el sedimento celular.



(A)

(B)



(C)

Fig. 3.19. Proceso paso a paso de un BAL. (A) Llenado del pulmón con PBS 1X. (B) Masajeado del pulmón. (C) Recogida y filtrado del BAL.

Una vez reunido el sedimento de los diferentes tubos, se realizaron dos lavados a 250 g durante 5 minutos a 4°C. En el último lavado, se tomaron 2000 µl del sedimento y

se pasaron a otro tubo Falcon, para añadirse entre 7-10 ml de PharmLyse®, según tenga más o menos glóbulos rojos. La mezcla se incubó durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizan 3 lavados más y finalmente, se toman 10 µl de la suspensión celular, junto a 50 µl de Tripán azul y 340 µl de PBS (dilución 1:40), para cuantificar las células viables.

Tanto en el procesado de las muestras celulares procedentes de sangre periférica, ganglio o BAL se realizaron en condiciones de esterilidad trabajando en campana de flujo laminar. Así, durante los procesos de lavado y recuento celular, las células son mantenidas siempre en frío en un tanque con hielo picado o en la nevera.

Tras realizar el recuento de las células viables en la cámara de Neubauer, se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Céls/ml} = n^{\circ} \text{ céls contadas} \times \text{factor dilución} \times 10.000$$

De acuerdo con el recuento, se toman las cantidades necesarias para ajustar la suspensión a la concentración deseada de 1×10^6 de células/ml.

3.14.2.- Desarrollo de la técnica.

Medios instrumentales	<p>Tubos polipropileno 5 ml.</p> <p>Micropipetas de diferentes volúmenes.</p> <p>Mouse Anti pig-CD3ε-Biotin conjugate (BD PharMingen, 559599).</p> <p>Streptavidin-PE-Cy5 (SAv-PE-Cy5) conjugate (BD PharMingen, 554062).</p> <p>Mouse Anti pig-CD4a-PE (BD PharMingen, 559586).</p> <p>Mouse Anti pig-CD8a-FITC (BD PharMingen, 551303).</p> <p>Mouse Anti human-CD21-PE (BD PharMingen, 555422).</p> <p>Mouse Anti human-macrophages-FITC (Serotec, MCA874F).</p> <p>Tampón de lavado FACS: PBS 1x, 0´1% SFB y 0´01% azida sódica.</p> <p>Citómetro de flujo laminar Mod. Cytomics® FC-500 (Beckman-Coulter).</p>
------------------------------	---

Como ya ha sido indicado, la determinación de la tipología celular se realizó sobre muestras de sangre periférica, ganglio torácico-pulmonar y BAL. Una vez que han sido transformadas en una suspensión celular, se procedió al marcaje de las células con los

Ac-Mo conjugados con diferentes fluorocromos, como estreptavidina, ficoeritrina (PE) o isocianato de fluoresceína (FITC). (Tabla 3.4.).

Para ello, se prepararon dos tubos de polipropileno de 5 ml con 100 µl de células a una concentración de 1×10^6 células por ml de cada muestra, con la relación de Ac-Mo indicados en la tabla 3.5., previamente titulados, para usar una concentración óptima de los mismos en el marcaje celular.

Tabla 3.4. Anticuerpos monoclonales y fluorocromos utilizados en cada tubo de muestra.

TUBO 1	CD3 biotinado , Anti-pig CD3-BIOT	CD4 , Anti-pig CD4a- PE	CD8 , Anti-pig CD8a- FITC
	Estreptavidina-cianina 5 , Streptavidin Cy-chrome™ conjugate		
	Se excita a 480 nm y emite a 488 nm (Luz Azul)	Se excita a 480 nm y emite a 578 nm (Luz Naranja)	Se excita a 490 nm y emite a 514 nm (Luz Verde)
TUBO 2	CD21 , B-ly4	Macrófagos , MCA874F	
	Anti-human CD21- PE	Mouse Anti-human Macrophages- FITC	
	Se excita a 480 nm y emite a 578 nm (Luz Naranja)	Se excita a 490 nm y emite a 514 nm (Luz Verde)	

La cantidad de anticuerpo que añadimos es de 0'5 µg, excepto para el CD8-FITC que añadimos 0'7 µg. De esta forma, y teniendo en cuenta la concentración de los Ac-Mo disponibles, las cantidades necesarias fueron las siguientes:

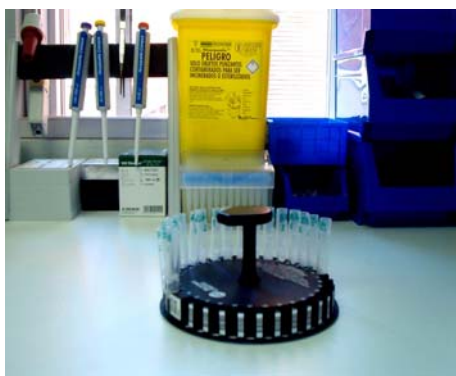
Tabla 3.5. Cantidades empleadas de cada anticuerpo monoclonal para el marcaje celular.

	TUBO 1				TUBO 2	
	CD3 Biotinado	Streptavidin Cy5	CD4 PE	CD8 FITC	CD21 PE	MCA874F FITC
Concentración	0'5 mg/ml	0'2 mg/ml	0'2 mg/ml	0'5 mg/ml	1 mg/ml	0'1 mg/ml
Volumen	1 µl	2'5 µl	2'5 µl	1'4 µl	10 µl	5 µl

Una vez, fueron añadidas en el Tubo 1 las cantidades necesarias de CD3-Biot, CD4-PE y CD8-FITC y en el Tubo 2, de CD21-PE y MCA874F-FITC, se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Tras la incubación de los Ac-Mo, se centrifugó a 300g durante 5 minutos, el sobrenadante resultante se desechó y seguidamente, se

realizaron 2 lavados a 250 g durante 5 minutos a 4°C con la solución de lavado o FACS de los Tubos 1. Las muestras del Tubos 2 se lavaron veces. Posteriormente, añadimos la estreptavidina en el Tubo 1 y fue incubado durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Tras este proceso, se hacen otros 3 lavados. Finalmente, el botón celular de los tubos 1 y 2, se resuspende en 600 µl de PBS 1x.

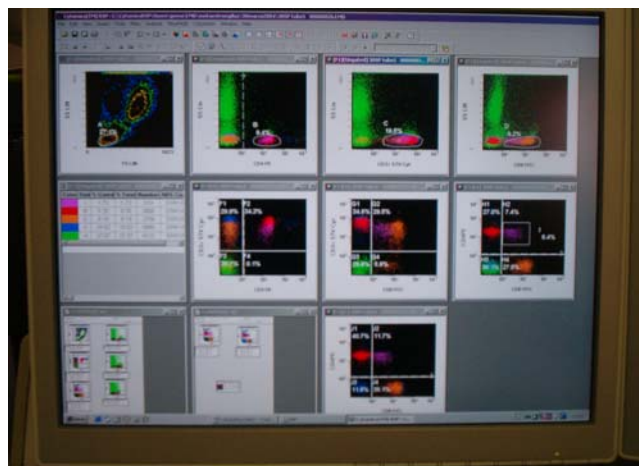
Tras el proceso de marcaje, las células, debidamente embaladas en un tanque de frío, fueron trasladadas al laboratorio de Inmunología del Hospital San Pedro de Alcántara de Cáceres, lugar donde se procedió a su lectura en el citómetro (Fig. 3.20.).



(A)



(B)



(C)

Fig. 3.20. Proceso de lectura en el citómetro. (A) Muestras marcadas preparadas en el carro. (B) Adquisición celular en el citómetro. (C) Imágenes digitalizadas ofrecidas durante la adquisición.

3.14.3.- Representación gráfica de las poblaciones celulares.

Los histogramas o citogramas de dispersión usados habitualmente, tanto en la adquisición celular como en su análisis, se presentan sobre unos ejes de coordenadas. Las poblaciones celulares, representadas por agrupaciones homogéneas de puntos, se situarán en los histogramas dependiendo de sus características físicas de dispersión: tamaño de la célula (Forward Scater o FSC) y la complejidad de la estructura interna de la célula (Side Scater o SSC).

Los resultados obtenidos tras el análisis citométrico, son expresados en porcentajes en función del total de células adquiridas, un total de 30.000 eventos, o de las regiones celulares preseleccionadas.

Para la interpretación de los resultados, nos hemos valido de los diferentes tipos de histogramas existentes, a continuación se muestran las imágenes citométricas de los valores obtenidos de las muestras analizadas de sangre periférica (Fig. 3.21.), ganglio (Fig. 3.22.) y BAL (Fig. 3.23.), de uno de los animales del lote control (51) al día 84 post-infección.

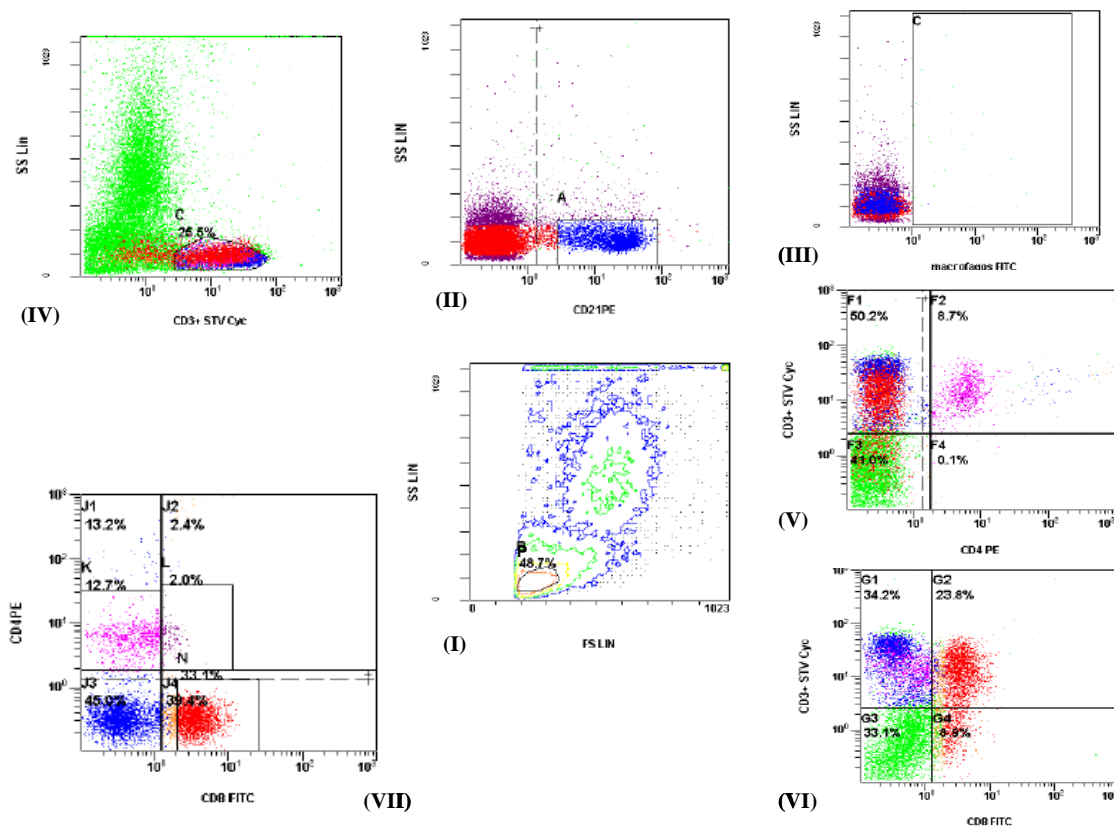


Fig. 3.21. Representaciones gráficas de las diferentes poblaciones celulares en sangre periférica.

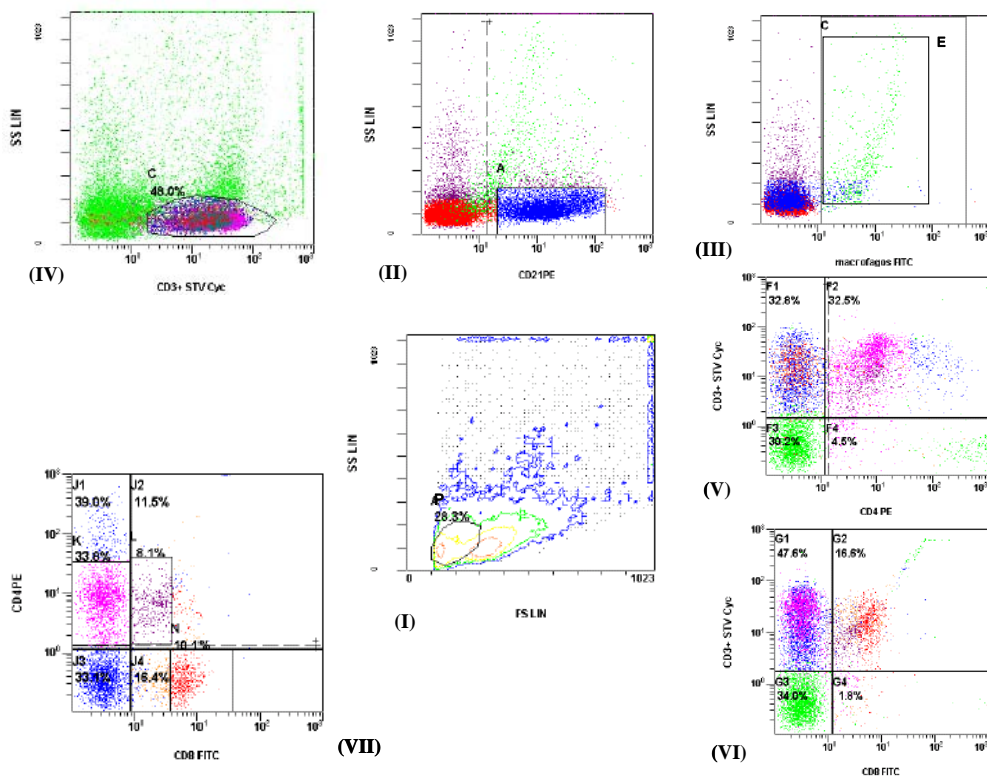


Fig. 3.22. Representaciones gráficas de las diferentes poblaciones celulares en Ganglio.

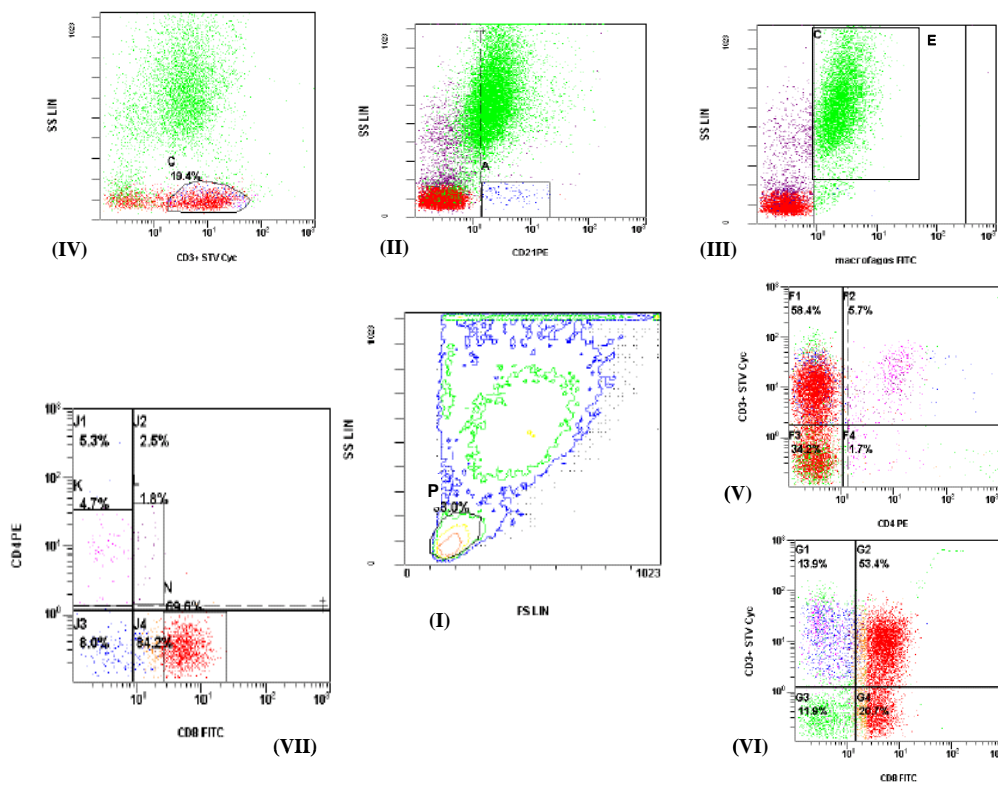


Fig. 3.23. Representaciones gráficas de las diferentes poblaciones celulares en BAL.

Así, en las gráficas (I) de las figuras 3.21., 3.22. y 3.23., se muestran los citogramas de densidad característicos de las diferentes muestras analizadas durante la experiencia. En estos histogramas, las células más grandes y de mayor complejidad estructural se situarán en la parte superior derecha de los ejes. En las muestras sanguíneas, esta población se corresponde con los polimorfonucleares (PMNs), mientras que en las muestras procedentes de ganglio y BAL se corresponde con la población de macrófagos existente en las muestras. En cambio, las células de menor tamaño y menor complejidad, se sitúan en la región inferior izquierda de los ejes, las cuales se corresponden con las poblaciones linfocitarias presentes en las muestras (*región P*). En los citogramas de densidad para las células blancas de la sangre periférica, se observa otra población intermedia, de mayor tamaño que los linfocitos y de menor complejidad estructural que los eosinófilos y neutrófilos, se trata de la población de monocitos.

También han sido utilizados los citogramas mixtos, en este tipo de representaciones se utiliza una característica de dispersión (SSC o FSC) enfrentada con un Ac-Mo marcado con un fluorocromo. Con ello, seleccionamos las células que expresan un antígeno dependiendo de una de las características de dispersión elegida. En el ejemplo mostrado en la grafica (II) de la figura 3.23., en el caso concreto de las muestras procedentes de BAL, utilizamos el Ac-Mo anti-macrófagos marcado con FITC y la característica de dispersión SSC o complejidad interna de la célula, para poder diferenciar los macrófagos alveolares, de mayor tamaño y complejidad que el resto de las células presentes en los BAL (*región E*). De la misma forma, gracias a los histogramas mixtos que representan el Ac-Mo anti-CD3⁺ unido a la estreptavidina (gráficas IV) o aquellos que representan el anti-CD21⁺ unido a la PE (gráficas III) frente a la complejidad celular (SS), se obtienen la *región C*, la cual marca el porcentaje total de linfocitos T y la *región A*, que determina el porcentaje total de linfocitos B presentes en la muestra.

Por su parte, las figuras V y VI, representan los histogramas de fluorescencia, utilizados para diferenciar el porcentaje de las poblaciones de linfocitos T colaboradores (CD4⁺) y citotóxicos (CD8⁺) respecto del total de la población linfocitaria, es decir las células representadas en estos citogramas, pertenecen únicamente a la *región P*

preseleccionada, es decir están gateadas desde *P*. En estas representaciones se dibujan cuatro cuadrantes:

- **Región F1/G1:** Se definen las células $CD3^+$ que no son $CD4^+/CD8^+$.
- **Región F2/G2:** Son las células que expresan ambos antígenos, es decir $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$, los llamados linfocitos T colaboradores o citotóxicos.
- **Región F3/G3:** Son las células que no expresan ninguno de los dos antígenos, se trata de aquellos linfocitos que no expresan el dominio $CD3^+$.
- **Región F4/G4:** Son células que sin expresar el antígeno CD3, sí expresan el $CD4^+/CD8^+$.

Otro de los citogramas de fluorescencias utilizados en el análisis de los resultados citométricos, se basan en el enfrentamiento de los anticuerpos, anti- $CD4^+$ unido a la ficoeritrina y anti- $CD8^+$ unido al isocianato de fluoresceína (Figuras VII). Las células representadas en estas coordenadas, pertenecen a las *regiones P* y *C*, preseleccionadas anteriormente. Por tanto, los porcentajes obtenidos mediante el uso de este tipo de representaciones, para cada muestra analizada, son respecto a la población de los linfocitos T $CD3^+$. En éstos se describen las siguientes regiones:

- **Región J3:** Células que no expresan ninguno de los antígenos analizados ($CD4^-CD8^-$).
- **Región J4:** Células que expresan el antígeno CD8, correspondientes a los linfocitos T citotóxicos ($CD4^-CD8^+$).
- **Región N:** Células que expresan el antígeno CD8 con alta intensidad, correspondiente a la población de linfocitos T citotóxicos con expresión alta de CD8 ($CD4^-CD8^{+high}$).
- **Región K:** Células que expresan el antígeno CD4 con una intensidad media, en este caso se corresponde con los linfocitos T colaboradores ($CD4^+$).
- **Región J4-N:** Células que expresan el antígeno CD8 con baja intensidad, correspondiente a la población de linfocitos T citotóxicos con expresión baja de CD8 ($CD4^-CD8^{+low}$).

- **Región L:** Células que coexpresan ambos antígenos, se trata de la población de los linfocitos T doble positivos (CD4⁺CD8⁺).

3.15.- Análisis estadísticos.

Las diferencias estimadas entre los diferentes grupos de datos se han analizado por el test de análisis de la varianza y por comparación *post-hoc* para diferencias específicas entre pares de datos, usando los test de F de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch, el test de Newman-Keuls y de Duncan. Por su parte, la relación entre las distintas variables ha sido estimada por el coeficiente de correlación lineal de Pearson.

El nivel de significación ha sido establecido como $p < 0,05$.

Todos los cálculos se llevaron a cabo mediante el programa estadístico SPSS 12.0[®] Microsoft.

4. RESULTADOS



El principal objetivo del presente trabajo ha sido el análisis de la respuesta multiorgánica desencadenada por los porcinos ibéricos frente a la infección experimental con *Metastrongylus apri* en diferentes situaciones. Tratando de evaluar, fundamentalmente el efecto que tienen diferentes dosis infectivas, la exposición previa progresiva del parásito o la inmunización con inóculos procedentes de antígenos larvarios y de adultos de *M. apri*, sobre la respuesta inmunitaria de tipo celular y humoral.

Dentro de los parámetros parasitológicos analizados, se describieron los signos clínicos manifestados por los animales a lo largo de la experiencia y se contabilizaron los nematodos presentes en los pulmones. Así mismo, se realizó el recuento de los huevos por gramo de heces y se describió la evolución de la respuesta eosinofílica periférica. Todo ello, se complementó con el estudio de las lesiones macroscópicas descritas en los pulmones e hígados, junto al análisis histopatológico de los pulmones, hígados y ganglios linfáticos torácico-pulmonares.

Respecto al estudio de las inmunorespuestas, se ha realizado el estudio del perfil serológico que adoptan diferentes tipos de inmunoglobulinas específicas, como son: IgM, IgG, IgG₁ e IgG₂ a lo largo de toda la experiencia frente a dos antígenos diferentes, el antígeno somático larvario (ASL) y de adultos (ASA). Finalmente, el análisis inmunológico se completó con el examen de muestras procedentes de sangre periférica, ganglio y fluidos broncoalveolares (BAL) para la determinación de las variaciones sufridas por las diversas poblaciones linfocitarias, monocitos y macrófagos, mediante citometría de flujo laminar a lo largo de la experiencia en las diferentes situaciones de infección investigadas.

4.1.- Resultados biopatológicos.

Los cuadros sintomáticos definidos en los porcinos infectados con *M. apri* han sido descritos por diversos autores (Dunn, 1956; Whittlestone, 1957; MacKenzie, 1958; Ferguson, 1981). Durante el desarrollo de nuestra experiencia, los animales fueron observados diariamente por la mañana y por la tarde al menos durante media hora, anotando todas las incidencias acontecidas.

El primer signo de la enfermedad y el más evidente en todos los lotes infectados fue la tos. También se evidenció en algunos animales disnea, respiración abdominal y estertores, generalmente después de recibir el alimento y tras el ejercicio físico.

En la figura 4.1., se expone de forma resumida la distribución e intensidad de los brotes de tos descritos en los porcinos integrantes de los diferentes lotes.

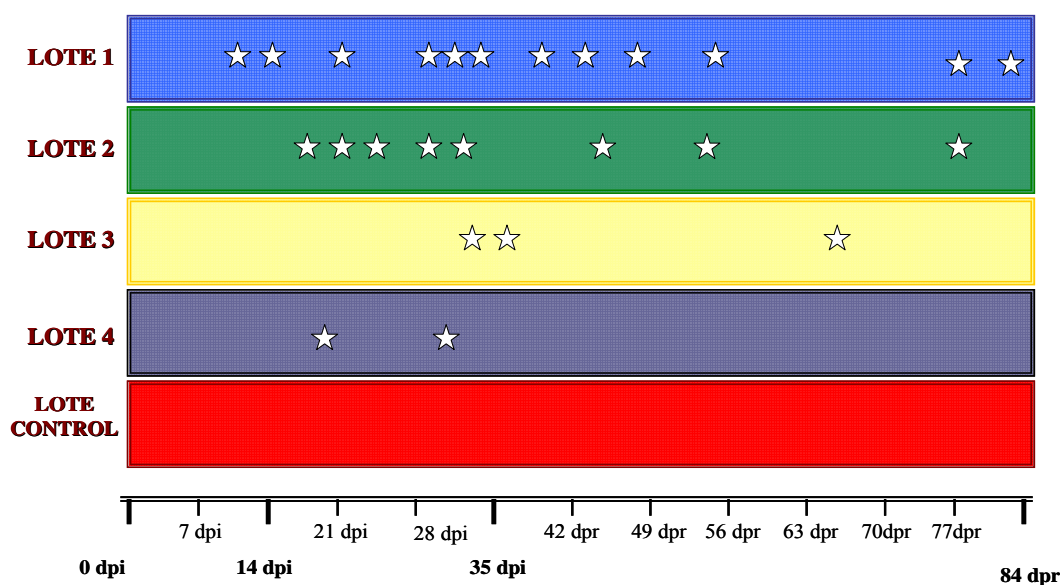


Fig. 4.1. Cuadro resumen de la distribución de los brotes de tos observados a lo largo de la infección en los diferentes grupos experimentales.

Los cerdos infectados con una monodosis de 3000 L3 de *M. apri* (Lote 1) fueron los que manifestaron una sintomatología más evidente. Los primeros brotes de tos se registraron en la mayoría de los animales entre el día 9 y 10, aunque se fueron haciendo cada vez más frecuentes y severos a partir del día 28 hasta el 42 post-infección, fecha en la que los signos parecen comenzar a remitir paulatinamente.

En líneas generales, los síntomas registrados en los animales infectados con una única dosis de 1000 L3 (Lote 2) siguen un patrón similar a los del lote anterior, aunque en este caso las primeras toses se evidencian más tarde, aproximadamente entre el día 16 y 19, recrudesciéndose la sintomatología hasta el día 35 post-infección.

En cambio, tan sólo en ciertos cerdos pertenecientes al lote 3 se describieron algunos brotes de tos entre los días 32 y 35 post-infección, siendo sin duda los brotes más leves de todos los registrados en los animales infectados. Sin embargo, durante el periodo previo al reto en estos porcinos fue descrita la dinámica habitual de

presentación de los signos. Así, en el momento de las reinfecciones los primeros brotes de tos se registraron a los 13 días de la 1ª dosis o a los 6 días de la 2ª dosis, aumentando paulatinamente la frecuencia e intensidad de presentación hasta la administración del antiparasitario al día 35 post-1ª infección.

Respecto a la sintomatología descrita en los cerdos previamente inmunizados con antígenos del parásito y posteriormente retados con una dosis de 1000 L3 (Lote 4), lo más importante de resaltar fue su escasa y breve manifestación, registrándose las primeras toses en tres animales únicamente, desde el día 20 hasta el día 30 post-infección.

Además, debemos señalar que en algunos cerdos pertenecientes a los lotes 1, 2 y 3 se registraron de nuevo leves signos respiratorios, principalmente, tos y respiración abdominal, a partir del segundo mes post-infección y hasta el final de la experiencia (Fig. 4.1.).

Por último, señalamos que en ninguno de los animales integrantes del lote control, aquellos que no recibieron ningún tipo de tratamiento, fue evidenciada sintomatología respiratoria alguna. De hecho, su estado fue muy saludable durante el desarrollo de la investigación.

Respecto al estudio de los parámetros productivos, no podemos mostrar ningún resultado cuantificable de la ganancia de peso, ya que los animales fueron pesados al inicio del proyecto pero no al final del mismo. Aún así, no se observó pérdida del apetito por parte de ningún animal a lo largo de la experiencia. El estado nutricional y la conformación de los mismos fueron aceptables, según el tipo alimentación administrada y de la edad al sacrificio (Fig. 4.2.).



Fig. 4.2. Conformación de los animales al día 0 y 84 de la experiencia.

4.2.- Resultados anatomopatológicos.

El estudio anatomopatológico de las lesiones producidas en los animales infectados, se realizó a nivel macroscópico y microscópico. A nivel macroscópico, se analizaron las lesiones provocadas por los parásitos en los pulmones, hígados y ganglios linfáticos torácico-pulmonares a lo largo de la experiencia.

Así mismo, con el fin de corroborar y completar las lesiones descritas macroscópicamente, fue llevado a cabo un estudio histopatológico de estos mismos órganos. Los resultados obtenidos se muestran detallados por lotes experimentales, describiendo las principales lesiones encontradas en los diferentes tejidos examinados (Tablas 4.1. y 4.2.).

Tabla 4.1. Tabla resumen de los cambios histopatológicos sufridos en el parénquima hepático a lo largo de la infección en los diferentes grupos experimentales.

Lesiones	Lote 1				Lote 2				Lote 3				Lote 4			
	0	14	35	84	0	14	35	84	0	14	35	84	0	14	35	84
Parénquima aparentemente normal	+++	++	++	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	+++	+++	++	++	+++
Tumefacción turbia	-	++	±	+	-	+	++	±	-	-	±	±	-	+	±	±
Presencia de eosinófilos	-	-	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-
Infiltrado focal células inflamatorias	-	-	+	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+
Hiperplasia de células metabólicas	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Infiltración en sistema porta	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hiperplasia de células mononucleares-fagocíticas	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-
Infiltrado perilobulillar	-	-	-	-	-	++	++	-	++	-	++	-	-	-	++	-

- Ausente ± Observado ocasionalmente +, ++ o +++ Leve, patente o muy patente.

Tabla 4.2. Tabla resumen de los cambios histopatológicos sufridos en el parénquima pulmonar a lo largo de la infección en los diferentes grupos experimentales.

Lesiones	Lote 1				Lote 2				Lote 3				Lote 4			
	0	14	35	84	0	14	35	84	0	14	35	84	0	14	35	84
Enfisema	-	++	+++	+++	-	+	++	++	±	+	+	±	-	+	++	++
Neumonía intersticial	-	-	++	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Neumonitis	-	-	-	+++	-	+	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-
Exudado bronquial	-	-	-	-	-	-	+	++	+	-	+	+	-	++	+	-
Inflamación peribronquial	-	-	+++	+++	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++
Hiperplasia linfoide peribronquial	-	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pleuritis	-	-	++	-	-	+	±	-	+	++	+	-	-	++	-	-
Edema alveolar	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	+	+	-	++	-	-
Presencia de parásitos	-	+	+++	+++	-	-	++	++	-	+	±	±	-	-	++	+
Áreas de granulación	-	-	++	+++	-	-	-	++	++	+	++	++	-	-	+	++

- Ausente ± Observado ocasionalmente +, ++ o +++ Leve, patente o muy patente.

● Lote 1.

Los animales correspondientes al lote 1 mostraron una estructura orgánica afectada principalmente a nivel del pulmón, no obstante se han detectado lesiones leves en hígado y en el ganglio torácico pulmonar.

En primer lugar, el hígado muestra a los 14 días post-infección, escasos o nulos cambios macroscópicos, sin embargo al 35 *dpi* aparecen unas manchas lechosas en la superficie hepática denominadas manchas de leche. Así mismo, el parénquima hepático se muestra con un aumento de volumen y brillantez junto con los bordes ligeramente romos (Fig. 4.3.).

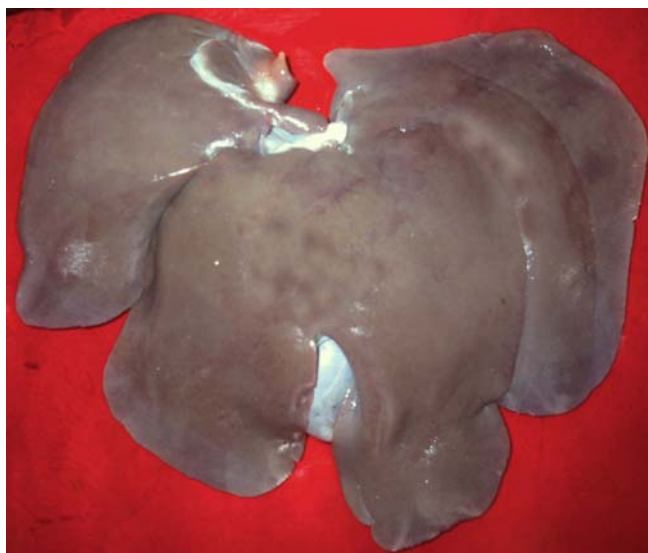


Fig. 4.3. Hígado al día 35 post-infección en uno de los animales del lote 1.

En cuanto al parénquima ganglionar, durante el transcurso de la infección no se encontraron externamente signos algunos de cambios, posiblemente un ligero aumento del volumen no muy significativo.

Todo lo contrario, sucedió en el parénquima pulmonar que desde el primer momento fueron halladas modificaciones referenciables. Así, al día 14 post-infección apareció en los pulmones una falta de colapsamiento en los lóbulos principales, en cuyos bordes pudimos evidenciar ciertas imágenes de enfisema pulmonar, imágenes que por otro lado se hicieron más evidentes entre los días 35 y 84 tras la infección (Fig. 4.4. y 4.5.). En la fases medias y finales de la experiencia, en el lote 1 se observó un pulmón muy aumentado de tamaño con la superficie abigarrada y signos claros de enfisema

pulmonar, dibujándose nítidamente los lobulillos respiratorios, mas hacia la periferia que en el centro. También fue observada una congestión pasiva en los lóbulos accesorios.

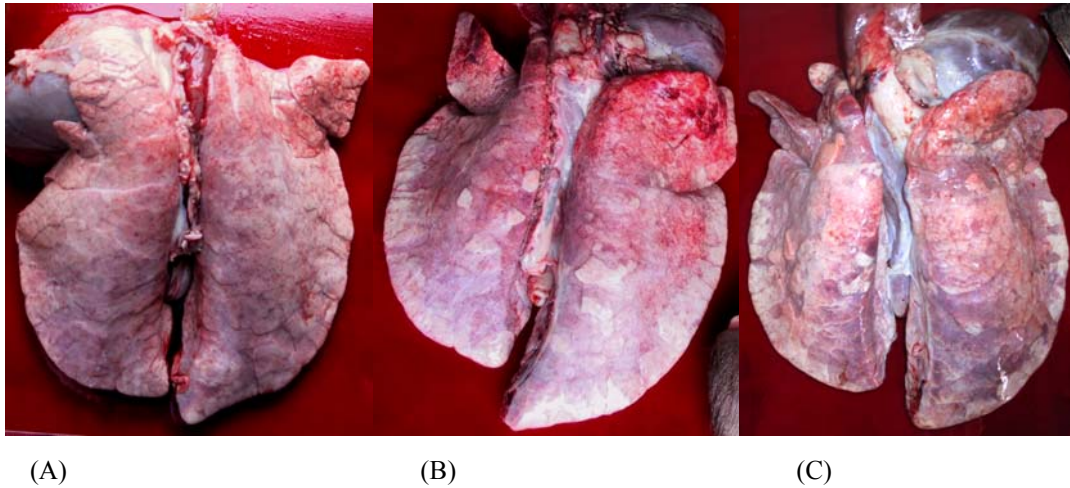


Fig. 4.4. Lesiones macroscópicas en los pulmones de los animales del lote 1 al día 14 (A), 35 (B) y 84 (C) post-infección.

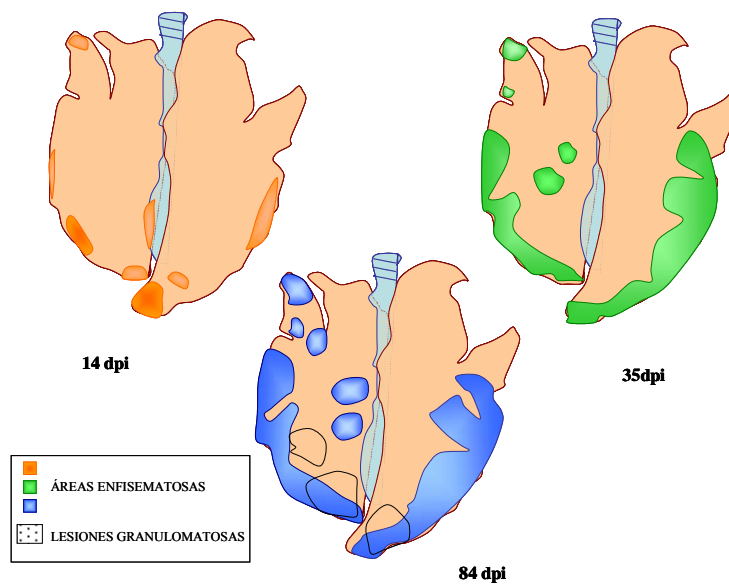


Fig. 4.5. Evolución de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los animales del lote 1 a lo largo de la experiencia.

En cuanto a los hallazgos microscópicos, el parénquima hepático muestra en todos los días post-infección, una ligera-moderada tumefacción turbia. La aparición de focos inflamatorios provocados por los trayectos parasitarios, principalmente localizados en el área del espacio de Kiernnan, fueron observados a partir del día 14 post-infección. Los focos inflamatorios estaban representados por células de tipología inflamatoria, esencialmente eosinófilos, con la presencia también de fibroblastos y células inmunocompetentes (Fig. 4.6.).

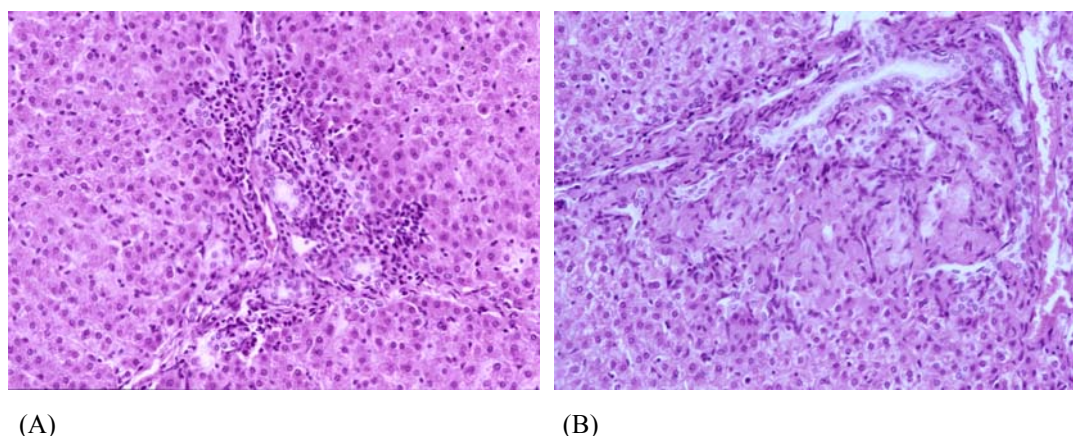


Fig. 4.6. Lesiones inflamatorias provocadas por el paso de larvas al día 14 (A) y 84 (B) post-infección en el parénquima hepático en el lote 1.

En el caso del parénquima ganglionar, se observó un proceso caracterizado por la hiperplasia e hipertrofia de los folículos linfoides, los cuales presentaron un centro germinativo muy desarrollado y una escasa corona folicular, propios de folículos muy activos. Los folículos linfoides se hallaban repletos de células inmunocompetentes (Fig. 4.7.).

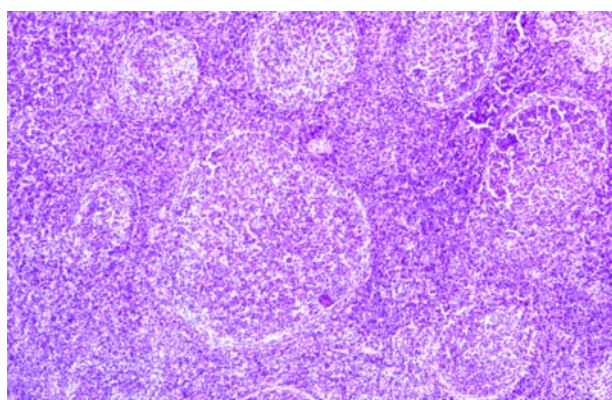


Fig. 4.7. Folículos linfoides del parénquima pulmonar reactivos, al día 14 post-infección en un animal del lote 1.

En el parénquima pulmonar fue donde se encontraron más cambios histopatológicos. Ya desde el día 14 post-infección, apareció un proceso enfisematoso compensatorio, áreas compactas y rellenas de células fagocíticas (Fig. 4.8.). Al día 35 post-infección, se hallaron granulomas parasitarios típicos con la presencia de restos de parásitos en su centro (Fig. 4.9.). Junto a estos granulomas existían áreas atelectásicas, incluso en algunos casos con restos parasitarios en las luces alveolares, más abundantes en las luces de bronquios secundarios y terciarios. En dichos casos los folículos peribronquiales se hallaron hipertrofiados y los centros germinativos se presentaron muy patentes. Estas lesiones granulomatosas descritas se hicieron más evidentes al día 84 post-infección (Fig. 4.10.). De cualquier forma, la lesión histopatológica pulmonar se puede definir como un proceso neumónico típico parasitario con todos sus componentes inflamatorios.

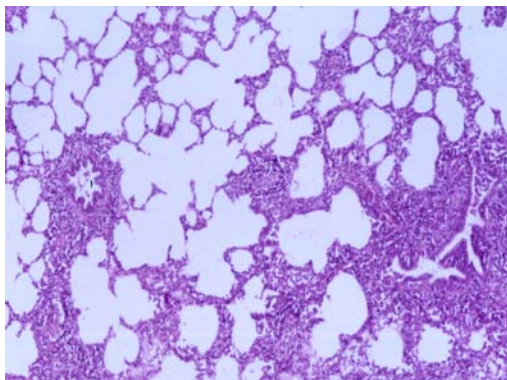


Fig. 4.8. Detalle de las áreas enfisematosas y del infiltrado celular al 14 *dpi*.

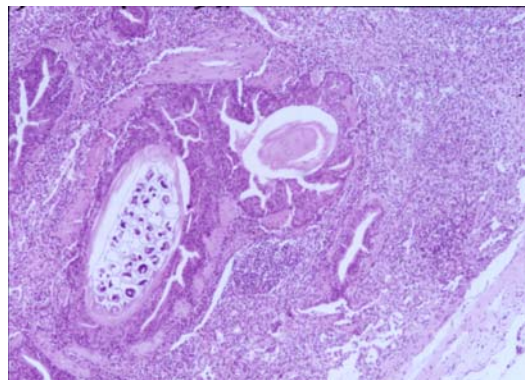


Fig. 4.9. Presencia de parásitos y material granular en los espacios broncoalveolares al 35 *dpi*

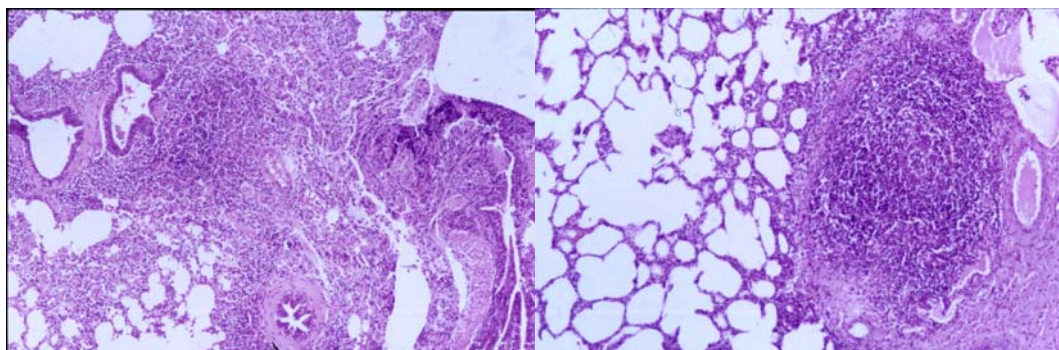


Fig. 4.10. Lesiones granulomatosas en el parénquima pulmonar al día 84 post-infección en el lote 1.

● **Lote 2.**

En los animales del lote 2, al igual que en el lote anterior, los cambios anatomopatológicos se presentaron a tres niveles: hígado, ganglio torácico-pulmonar y pulmón. En líneas generales, se puede afirmar que las lesiones, tanto macroscópicas como microscópicas, no fueron tan pronunciadas como las descritas para los cerdos constituyentes del lote 1.

En cuanto al hígado, en este caso no se mostraron cambios interesantes en su anatomía macroscópica, tan sólo un pequeño debilitamiento de su tonalidad que se vuelve de aspecto cocido y brillante. Los bordes solieron ser agudos y no se evidenciaron reacciones de volumen (Fig. 4.11.).



Fig. 4.11. Hígado al día 35 post-infección de un animal del lote 2.

Lo que respecta al parénquima ganglionar, solo hubo unos ligeros cambios al día 84 post-infección, con un aumento de volumen y de consistencia. El color tendió a ser algo mas apagado que el natural y en el cuerpo aparecieron signos de una cierta congestión.

En la anatomía pulmonar fue donde encontramos los cambios más llamativos desde el punto de vista macroscópico. Desde el día 14 al 84 post-infección (Fig. 4.12.), se observó una superficie abigarrada con signos de congestión pasiva y zonas enfisematosas mas claras, principalmente en los lóbulos principales, aunque los accesorios se hallaban ligeramente con cambios congestivos. Todos los pulmones mostraron un aumento de tamaño y no se encontraron colapsados (Fig. 4.13.).

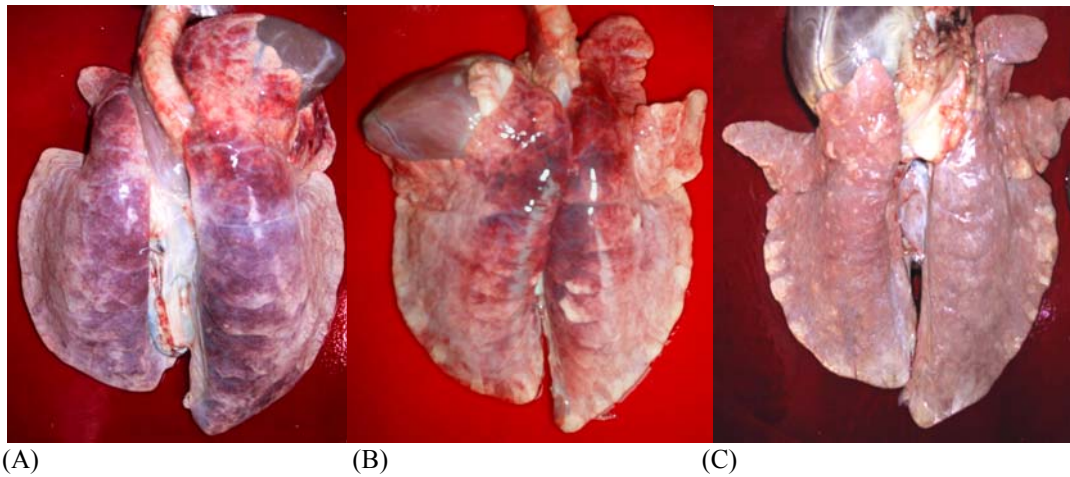


Fig. 4.12. Lesiones macroscópicas en los pulmones de los animales del lote 2 al día 14 (A), 35 (B) y 84 (C) post-infección.

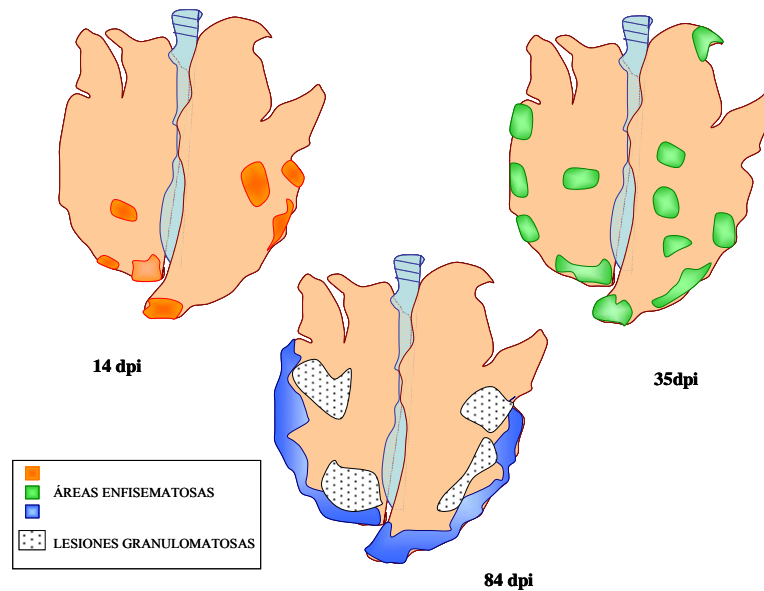


Fig. 4.13. Evolución de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los animales del lote 2 a lo largo de la experiencia.

En el estudio histopatológico se pudo apreciar que el parénquima hepático no presentó lesiones focales inflamatorias. Pero sí un proceso de tumefacción turbia en los hepatocitos, así como un ligero edema en el espacio de Disse (Fig. 4.14.). Todos estos cambios se sucedieron a lo largo del periodo de infección, aunque se mostraron mas significativos en el último tercio.

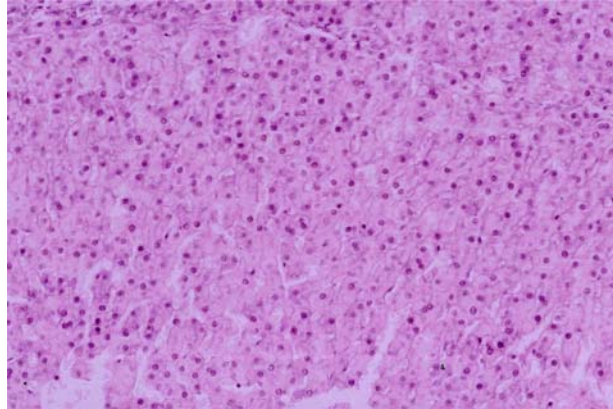


Fig. 4.14. Tumefacción turbia del parénquima hepático al día 35 post-infección en el lote 2.

En el caso del parénquima ganglionar, se evidenció una histopatología idéntica a la definida para el lote 1, apareciendo una hipertrofia e hiperplasia folicular y unos nítidos folículos linfoides (Fig. 4.15.).

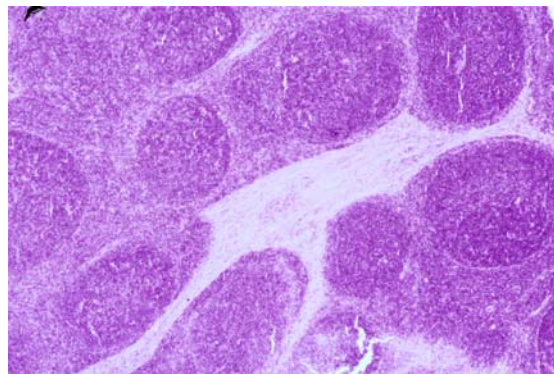


Fig. 4.15. Detalle de los folículos linfoides reactivos al día 84 post-infección.

En el caso de las lesiones histológicas en el pulmón, se observó una clara neumonía y neumonitis parasitaria con presencia de granulomas parasitarios. Ya desde el día 14 post-infección, se encontraron zonas atelectásicas junto a zonas enfisematosas, describiéndose casos en los que los alvéolos llegaron a romper su estructura parenteral (Fig. 4.16.). Así mismo, a partir del día 35 se detallaron zonas peribronquiales muy afectadas, con presencia de granulomas y áreas de células inmunocompetentes, del tipo de células plasmáticas e inmunoblastos. En algunos casos, también se observaron células gigantes de cuerpos extraños, propias de estos procesos parasitarios y que se reconocieron nítidamente como células fagocíticas (Fig. 4.17.). En las áreas interseptales encontramos células del tipo fibroblastos, monocitos, células plasmáticas y

linfocitos de varios tamaños. Igualmente pudimos apreciar áreas congestivas en bronquios y bronquiolos de tipo secundario, terciario e incluso en los bronquiolos terminales, especialmente al día 84 post-infección (Fig. 4.18.).

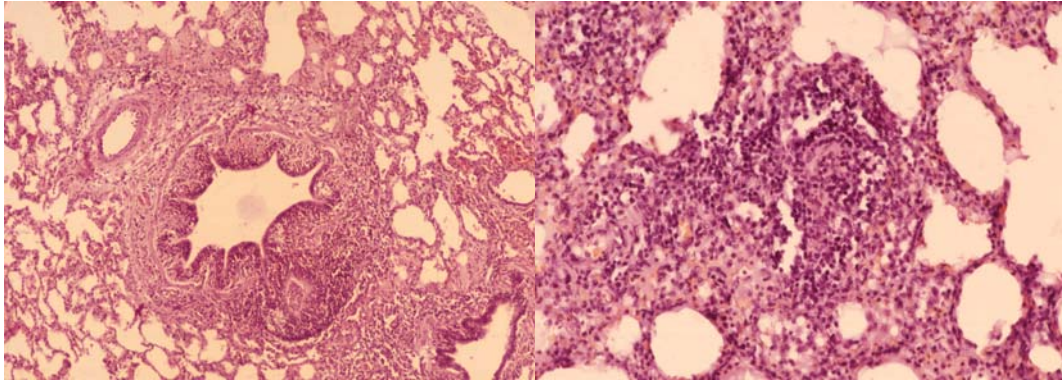


Fig. 4.16. Detalle de las áreas enfisematosas y de las reacciones celulares peribronquiales al día 14 post-infección en el lote 2.

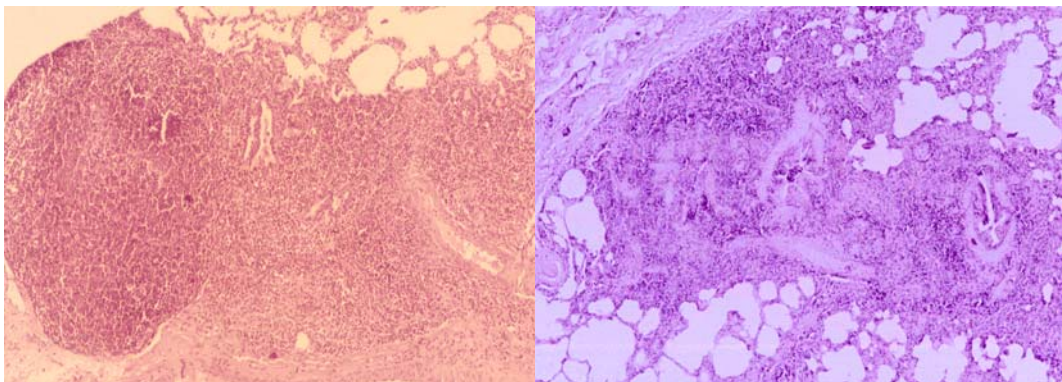


Fig. 4.17. Detalle de las lesiones granulomatosas y del infiltrado celular peribronquial al día 35 post-infección en el lote 2.

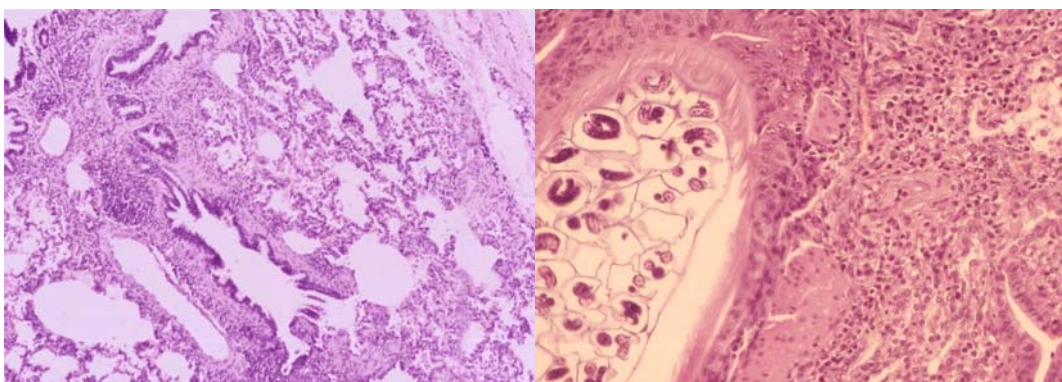


Fig. 4.18. Detalle del infiltrado celular peribronquial y presencia de adultos en los espacios broncoalveolares al día 84 post-infección en el lote 2.

● **Lote 3.**

En los animales del lote 3, como consecuencia de las reinfecciones previas realizadas, debemos analizar las muestras desde el día 0 de la experiencia.

Así en el caso de las características anatomopatológicas del hígado, se observaron bordes algo romos con evidencia de aumento de volumen, brillo de tipo untuoso y superficie tersa. (Fig. 4.19.).



Fig. 4.19. Hígado al día 14 post-infección de un animal del lote 3.

Respecto al ganglio, no encontramos cambios significativos de su anatomía. Posiblemente, un ligero aumento de volumen pero sin ser digno de tener en cuenta como cuadro lesional característico.

Es en el tejido pulmonar donde volvemos a apreciar los cambios anatomopatológicos más característicos de esta parasitosis. La superficie del pulmón se evidenció subida de color rojizo, no colapsada y con algunas áreas de enfisema, aunque mucho menos patente que en los lotes anteriores, fueron mas reducidas y evidenciaron poco los lobulillos respiratorios (Fig. 4.20. y Fig. 4.21.).

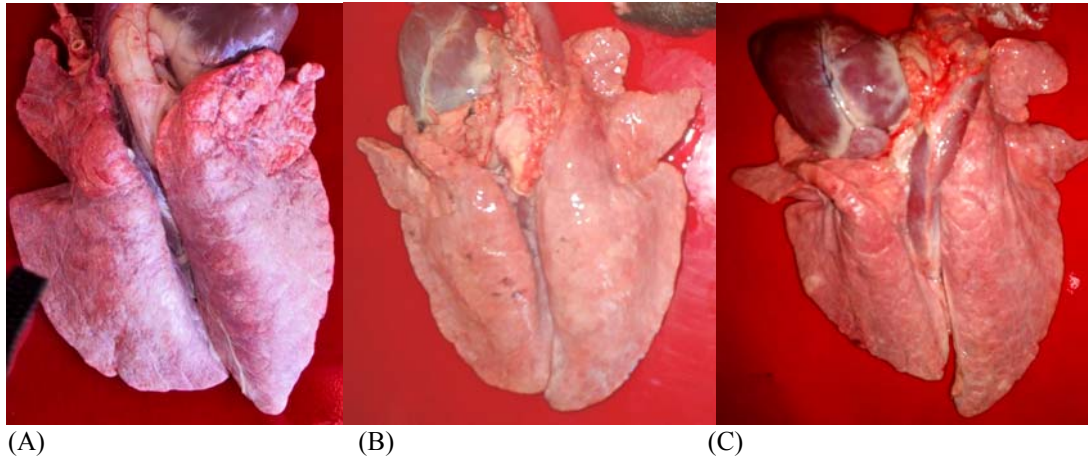


Fig. 4.20. Lesiones macroscópicas en los pulmones de los animales del lote 3 al día 14 (A), 35 (B) y 84 (C) post-infección.

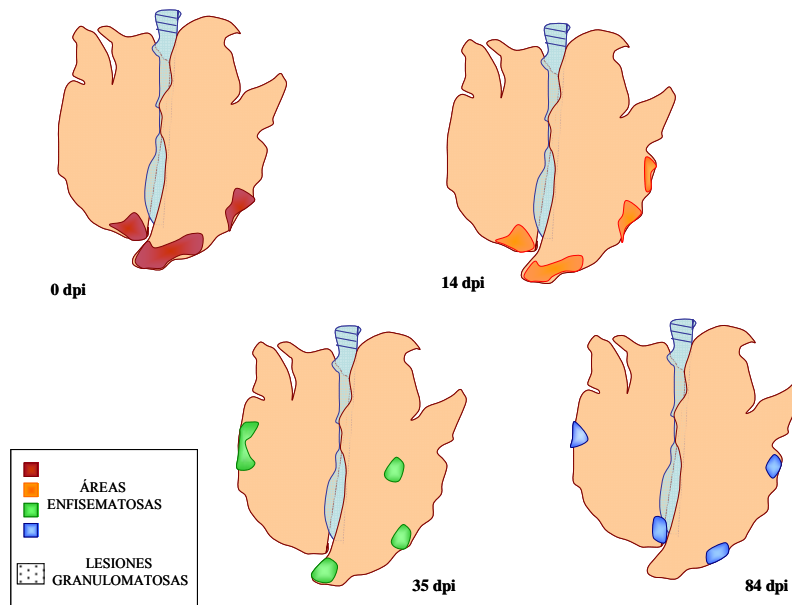


Fig. 4.21. Lesiones macroscópicas en los pulmones de los animales del lote 3 a lo largo de la experiencia.

En la histopatología fue donde apreciamos los cambios importantes sucedidos en el parénquima hepático. Éste mostró signos de tumefacción turbia, edema en los espacios de Disse y en algunas áreas del espacio de Kiernnan, además aparecieron signos evidentes de trayectos parasitarios, con hiperplasia de canalículos biliares y algunas áreas de cicatrización reciente (Fig. 4.22.). Así mismo, se encontraron áreas con tejido de granulación, restos de hepatocitos y áreas de necrosis causadas por el paso de los estados larvarios del parásito (Fig. 4.23.).

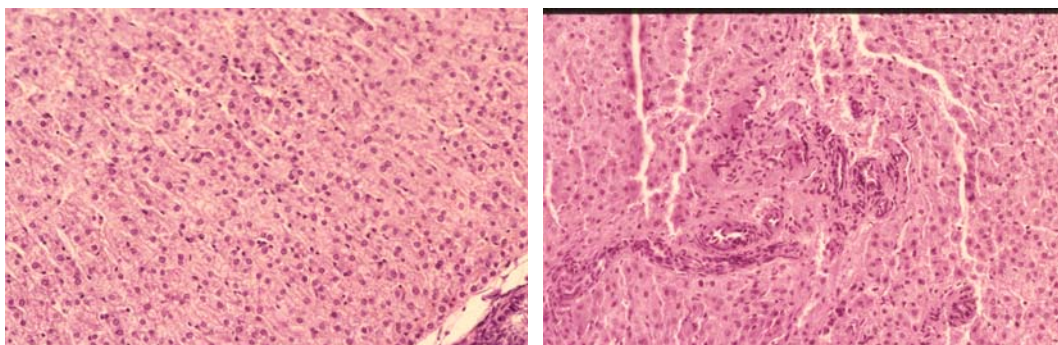
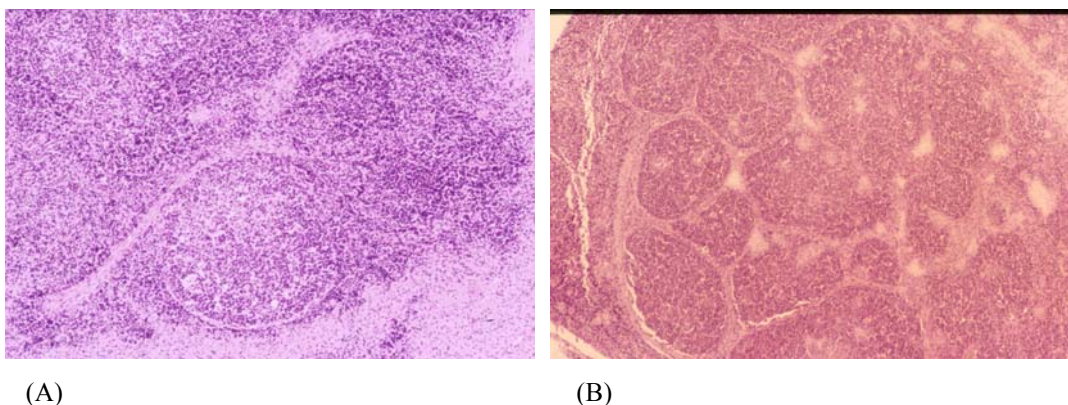


Fig. 4.22. Detalle de la tumefacción turbia existente en el parénquima hepático al 14 *dpi*.

Fig. 4.23. Reacciones inflamatorias focales y áreas necróticas al día 84 post-infección.

En el parénquima ganglionar se describió una fuerte hipertrofia e hiperplasia folicular con centros germinativos muy desarrollados. A su vez, se hallaron áreas de conjunción folicular a modo de estructuras polifoliculares que tendieron a formar una unión de folículos (Fig.4.24.).



(A)

(B)

Fig. 4.24. Detalle del parénquima ganglionar al día 0 (A) y 35 (B) post-infección.

En el parénquima pulmonar de los animales pertenecientes al lote 3, no fue observado un cuadro lesional tan evidenciado como en el resto de grupos experimentales. Puesto que, al día 0 de la experiencia tan sólo se observó un ligero enfisema no muy desarrollado, junto a áreas atelectásicas compensatorias, pero que aún presentaban las luces bronquiolares activas (Fig. 4.25.).

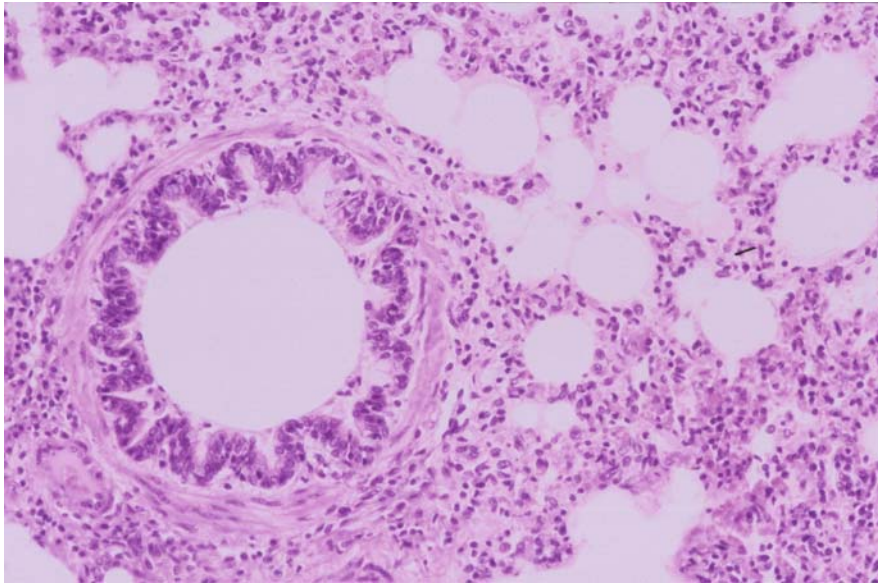


Fig. 4.25. Detalle de las áreas atelectásicas compensatorias y luces bronquiolares activas al día 0 post-infección.

Focalmente, se pudo detectar granulomas relativamente pequeños, aunque en ningún caso se detectaron parásitos ni restos parasitarios alguno (Fig. 4.26.). De un modo generalizado, se puede decir que en el parénquima pulmonar encontramos una neumonía parasitaria moderada y una neumonitis presencial concomitante, con la presencia de granulomas parasitarios esporádicos (Fig. 4.27. y Fig. 4.28.).

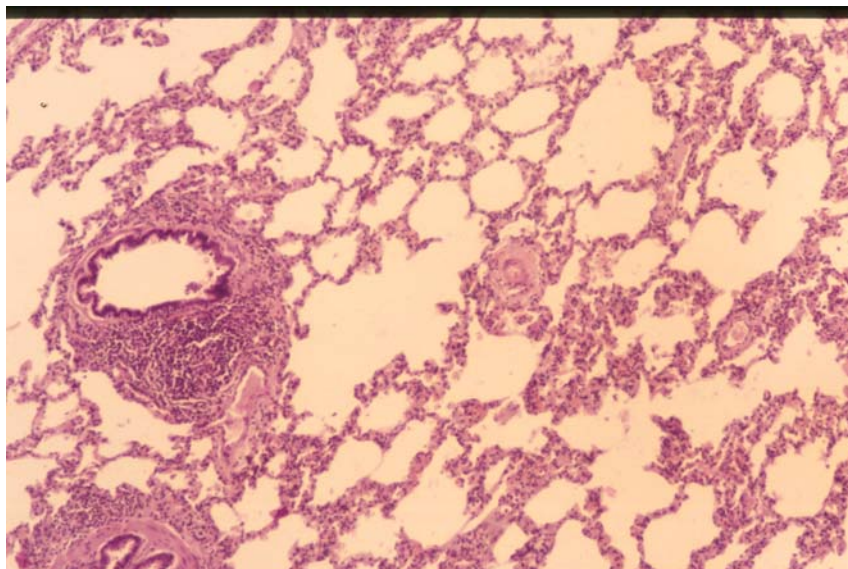


Fig. 4.26. Detalle de los pequeños granulomas presentes en el parénquima pulmonar al día 35 post-infección.

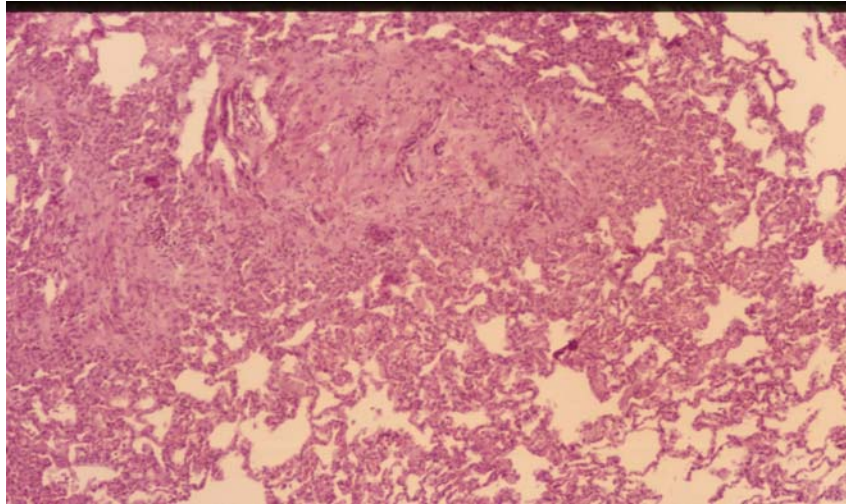


Fig. 4.27. Lesiones neumónicas al 35 *dpi*.

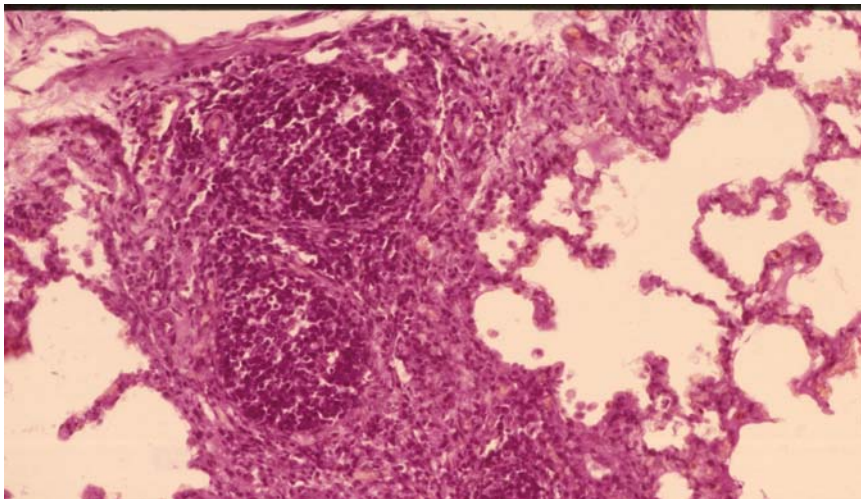


Fig. 4.28. Lesiones granulomatosas (84 *dpi*).

● **Lote 4.**

En el lote 4 se evidenció una anatomía patológica que se corresponde con todo el proceso lesional desarrollado en el resto de animales.

En el caso del hígado fue muy similar su anatomía patológica macroscópica a la del resto de los lotes. Aunque, en este caso los hígados que sufrieron mayores cambios están representados en el día 35 post-infección, en que se observaron aumentados de volumen con los bordes romos y aumento de brillo (Fig. 4.29.).



Fig. 4.29. Hígado al día 35 post-infección de un animal del lote 4.

Por el contrario, los pulmones evidenciaron signos de enfisema y de una superficie abigarrada que tendió a ser marmórea. Principalmente, en los lóbulos diafragmáticos desde el día 14, no obstante fue al día 84 tras la infección, cuando se mostró un evidente aumento de volumen y un fuerte color rojizo, algo mas apagado al día 35 post-infección (Fig. 4. 30.). La evolución de las lesiones enfisematosas a lo largo de la infección fue en aumento desde el día 14 hasta el 35 post-infección. Sin embargo, se observó un claro retroceso de las mismas, en la etapa final de la experiencia (Fig. 4. 31.).

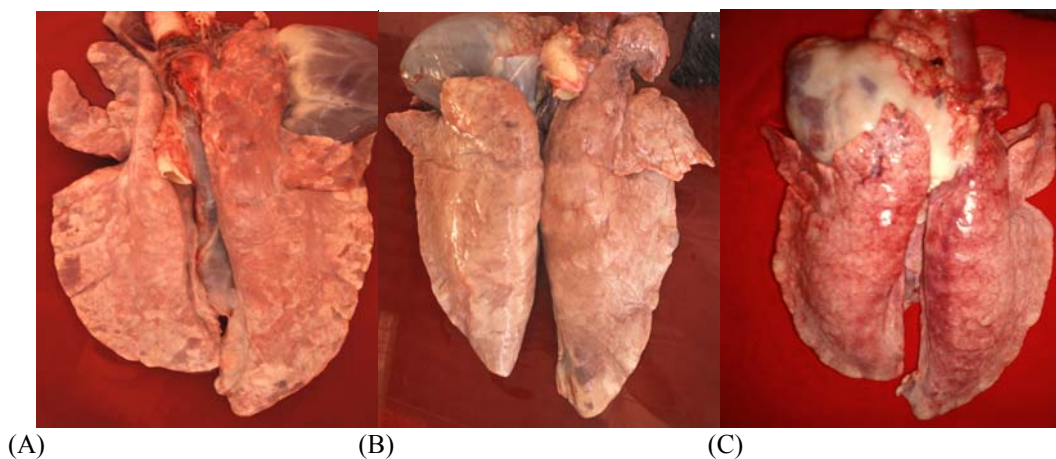


Fig. 4.30. Lesiones macroscópicas en los pulmones de los animales del lote 4 al día 14 (A), 35 (B) y 84 (C) post-infección.

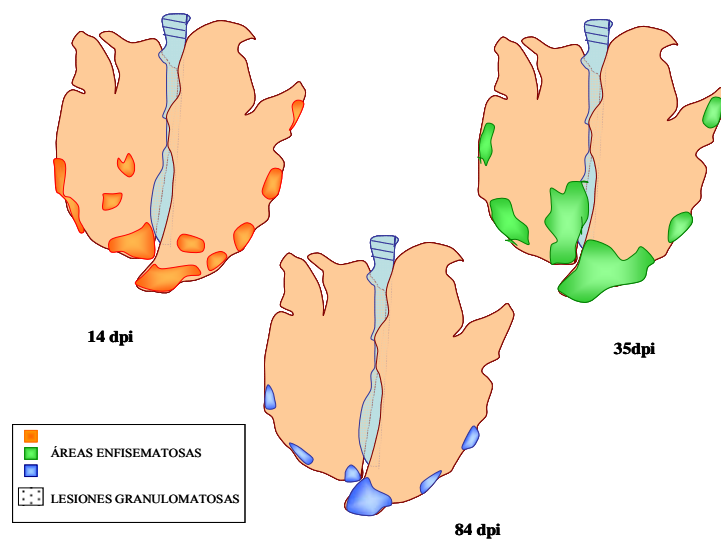


Fig. 4.31. Lesiones macroscópicas en los pulmones de los animales del lote 4 a lo largo de la experiencia.

La histopatología de este lote viene significada por una tumefacción turbia focal del parénquima hepático, una degeneración lipídica, posiblemente de tipo alimentario en la zona sensible de Noel. Si bien, la lesión parasitaria más característica fuese el infiltrado inflamatorio de las áreas portales y también del interior de lobulillo hepático (Fig. 4.32.).

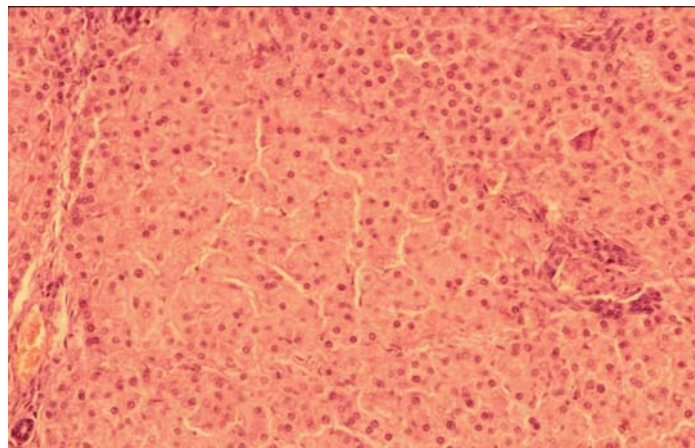


Fig. 4.32. Detalle de la degeneración lipídica y lesión inflamatoria con infiltrado celular por el paso de larvas (35 dpi).

Los animales de este lote 3, como en los casos anteriores sufrieron una hipertrofia e hiperplasia folicular a nivel de los ganglios torácico-pulmonares, típica de este proceso parasitario (Fig. 4.33.). Aunque, realmente se puede catalogar como una reacción inespecífica ante los procesos parasitarios.

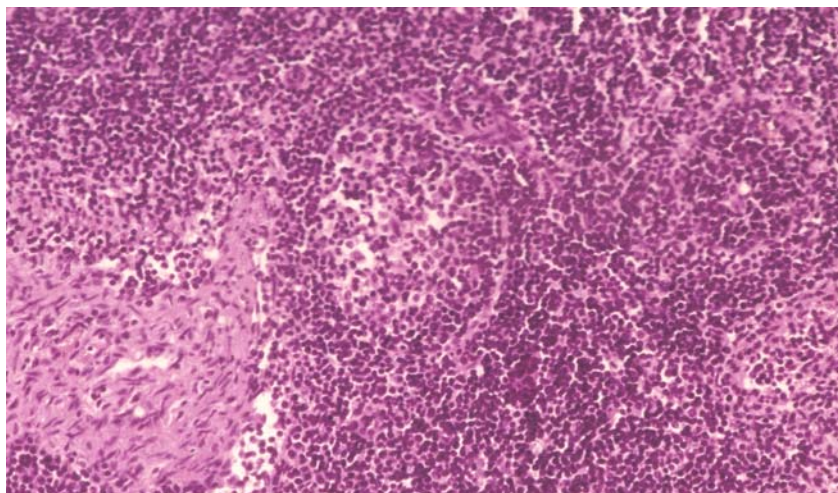


Fig. 4.33. Hiperplasia e hipertrofia de los folículos linfoides del ganglio torácico-pulmonar (0 *dpi*).

El parénquima pulmonar fue el que sufrió los mayores cambios desde los primeros días tras la infección y se mantuvieron hasta el día 84 post-infección. En los animales del lote 4 se aparecieron procesos de atelectasia y enfisema, aunque no tan evidentes como en los lotes que recibieron una única dosis (Lotes 1 y 2) (Fig. 4.34.). Sin embargo, se describió un fuerte infiltrado inflamatorio bronquial, con pequeños granulomas parasitarios e hipertrofia de nódulos linfáticos (Fig. 4.35.). Así mismo, se observó la presencia de parásitos en luces alveolares y bronquiales. Estos bronquios afectados mostraron sus paredes totalmente infiltradas de células inflamatorias crónicas (Fig. 4.36.).

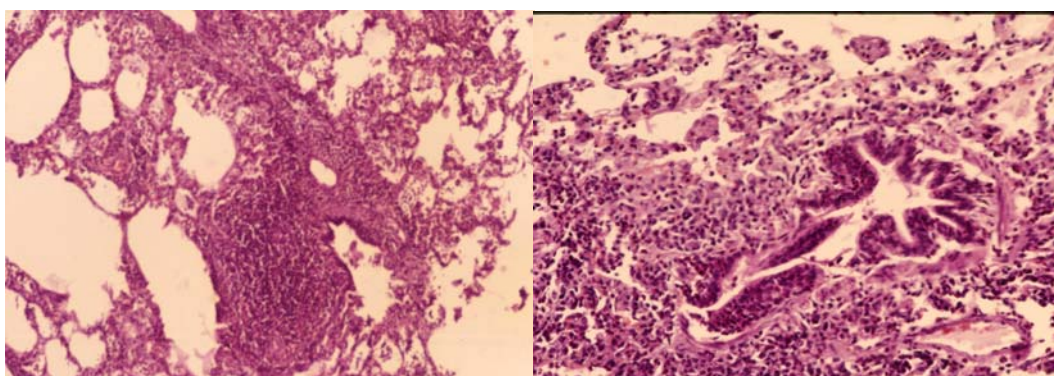


Fig. 4.34. Atelectasia y enfisema (14 *dpi*).

Fig. 4.35. Granulomas parasitarios (35 *dpi*).

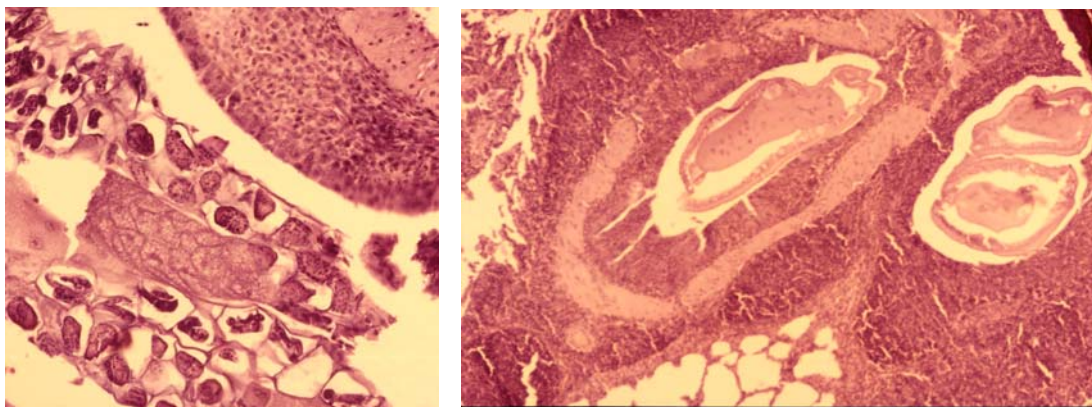


Fig. 4.36. Detalle de la presencia de adultos en los espacios broncoalveolares (84 dpi).

4.3.- Resultados parasitológicos.

4.3.1.-Cuantificación, longitud, ratio hembra/macho y distribución de *M. apri* en el pulmón.

Con el objeto de evaluar el estado parasitológico mostrado por los distintos lotes experimentales, tras recibir los tratamientos e infecciones correspondientes, fueron analizados diferentes parámetros, tales como el número de larvas 4 al día 14 post-infección, el número de adultos tanto al día 35 como 84 post-infección, la longitud media de las hembras adultas, la proporción hembra/macho y determinación de la ubicación de los nematodos en el órgano respiratorio.

Los resultados obtenidos nos muestran que el lote re infectado (Lote 3) presentó una tasa de recuperación larvaria significativamente inferior al resto de lotes. En cuanto a la tasa de recuperación de adultos en el lote 3, esta continuó siendo la más baja de las detectadas respecto a los demás grupos. En cambio, los lotes infectados con una única dosis (Lotes 1 y 2), aumentaron el número de parásitos recolectados según avanzaba la experiencia. Además, el porcentaje de recuperación de adultos hallado en los lotes monoinfectados fue muy similar, entre un 18-20%. Respecto al grupo de porcinos previamente inmunizados (Lote 4), se observó un descenso de casi el 50%, en el número de adultos recogidos al día 84 respecto al día 35 post-infección. El porcentaje de recuperación de adultos hallado para el lote 4 mostró un valor intermedio, inferior al lote 1 y 2 pero superior al lote 3 (Tabla 4.3. y Fig. 4.37.).

Tabla 4.3. Resultados por lotes del número de parásitos y el porcentaje de recuperación.

	DOSIS INFECTIVA	RECuento DE PARÁSITOS	TASA DE RECUPERACIÓN	
			Larvas	Adultos
LOTE 1	3000 L3	L4 (14dpi): $149'3 \pm 25'3$ Adultos (35dpi): $417 \pm 75'4$ Adultos (84dpi): 479 ± 158	5%	20 %
LOTE 2	1000 L3	L4 (14dpi): $45'5 \pm 49'2$ Adultos (35dpi): $118'7 \pm 25'5$ Adultos (84dpi): $151'7 \pm 31$	4'6%	18%
LOTE 3	200 L3+400 L3+800 L3 1000 L3	L4 (14dpi): $9'5 \pm 3'5$ Adultos (35dpi): 13 ± 5 Adultos (84dpi): $9'3 \pm 0'1$	1%	1%
LOTE 4	(Previa inmunización) 1000 L3	L4 (14dpi): $45 \pm 22'6$ Adultos (35dpi): $105 \pm 11'8$ Adultos (84dpi): $64 \pm 15'1$	4'5%	10%

El número máximo de parásitos registrados en cerdos del lote 1 fue de 639 al día 84; en el lote 2 fue de 182 al día 84; en el lote 3 fue de 19 al día 84; y por último, en el lote 4 fue de 115 adultos de *M. apri* al día 35 post-infección. Concretamente, entre el lote 1 y el resto de los lotes existía una diferencia significativa tanto en el recuento total de larvas 4, como de adultos al día 35 y 84 post-infección.

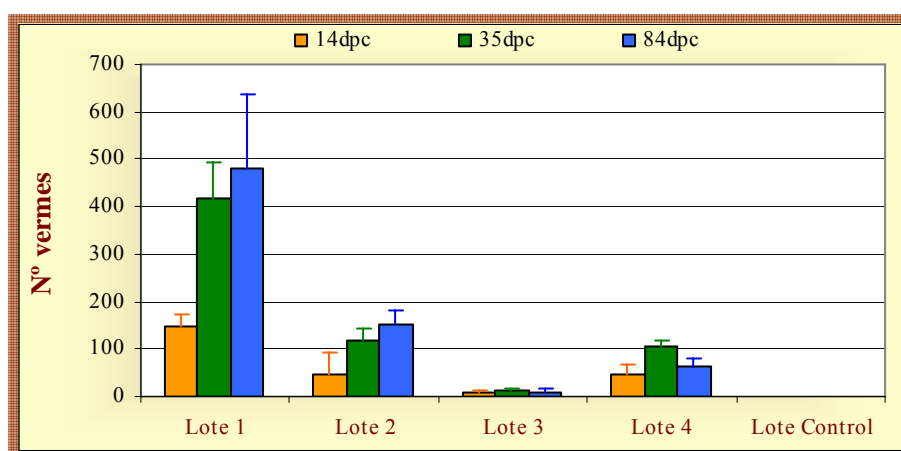


Fig. 4.37. Recuento del número de parásitos hallados en los animales de los diferentes lotes ensayados a lo largo de la experiencia.

La longitud de las hembras adultas de *M. apri* está estrechamente relacionada con la capacidad de estas para albergar una cierta cantidad de huevos. Efectivamente, según nuestros resultados se ha registrado una correlación positiva entre la longitud media de las hembras y la concentración de los huevos en las heces ($R=0'576$; $p<0'00$).

El tamaño medio de las hembras de *M. apri* alcanzado fue de $3'1 \pm 0'33$ cm. La longitud media en el lote 1 fue de $3'5$ cm; en el lote 2 de $3'0$ cm; en el lote 3 de $2'7$ cm; y por último, en el lote 4 de $3'2$ cm.

Los resultados de las longitudes medias de las hembras de *M. apri* calculadas para cada uno de los lotes experimentales a lo largo de la infección muestran una evolución heterogénea (Fig. 4.38.). Así, en las hembras recopiladas en animales del lote 1 se observó un aumento de la longitud media al día 84 respecto a los del día 35 post-infección. Además, se observó una correlación positiva estadísticamente significativa entre la longitud media y los huevos por gramo de heces ($R= 0'82$; $p<0'05$). Por el contrario, en el resto de los lotes analizados se observó la situación opuesta, según avanzaba el tiempo, disminuía el tamaño medio alcanzado por las hembras. Sin embargo, debemos señalar que las diferencias detectadas entre los diferentes lotes y entre los días de toma de muestra no fueron estadísticamente significativas.

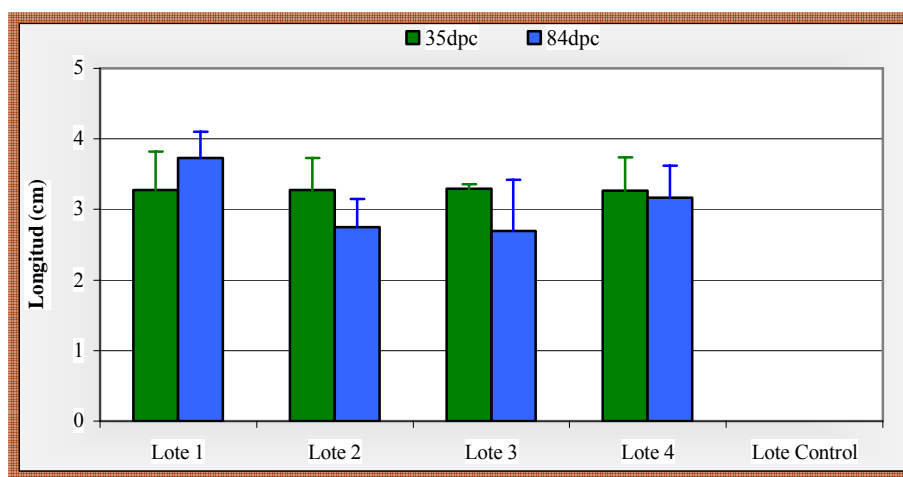


Fig. 4.38. Tamaño de las hembras en los diferentes lotes investigados a lo largo de la experiencia.

El ratio hembra/macho (H/M) medio calculado para el lote 1 fue de $1'56 \pm 0'49$, en el lote 2 fue de $1'86 \pm 0'38$, en el lote 3 de $4'30 \pm 2'88$ y para el lote 4, fue de $2'75 \pm 1'75$. Según estos resultados, observamos que la proporción de hembras frente a los machos adultos de *M. apri* aumentó en los grupos donde se registró una menor

población parásita. Es decir, en los procesos parasitarios con escaso número de individuos el sexo predominante fue el femenino.

En la figura 4.39. se muestra la evolución de este parámetro en los diferentes grupos estudiados, donde se registró un ligero aumento de la proporción de las hembras respecto a los machos de *M. apri* en los animales pertenecientes al lote 1 y 4. En el lote 3, el ratio H/M experimentó un incremento muy significativo entre los días 35 y 84 post-infección ($p < 0'005$). Así mismo, se registró una alta correlación positiva entre la población total de adultos respecto a la de hembras ($R = 0'977$; $p < 0'005$). Por el contrario, el ratio H/M calculado para los animales del lote 2, se mantuvo constante durante la infección.

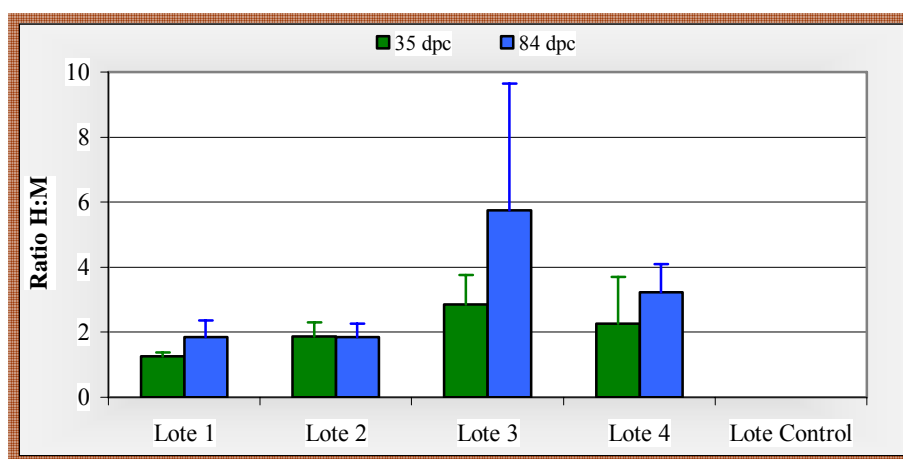


Fig. 4. 39. Ratio entre el número de hembras y machos de *M. apri* en los diferentes lotes investigados.

Respecto a la ubicación de los nematodos en el pulmón, se ha realizado una distinción entre los lóbulos pulmonares derecho e izquierdo (Fig. 4.40.).

Según nuestros resultados, los parásitos se alojaban principalmente en los lóbulos diafragmáticos. Aunque en algunos animales especialmente, del lote 1 y 2, se localizaron adultos de *M. apri* en los lóbulos craneales e intermedios, en cualquier caso fue en número muy inferior a los hallados en los lóbulos diafragmáticos. De forma generalizada, en los cuatro grupos infectados con *M. apri* fue registrada una diferencia muy significativa ($p < 0'000$) entre el número de parásitos hallados en los lóbulos pulmonares derecho e izquierdo, siendo estos últimos los menos poblados. Esta diferencia se muestra especialmente evidente al día 14 y 35 post-infección.

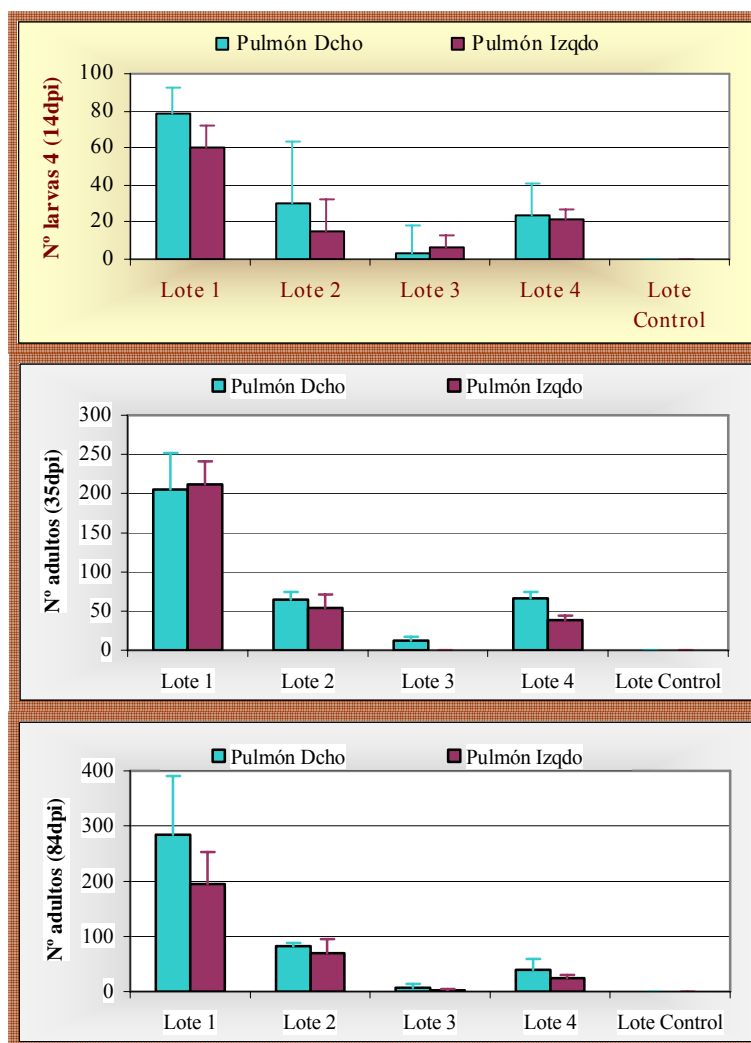


Fig. 4.40. Evolución del número de parásitos según su ubicación en los lóbulos pulmonares derechos e izquierdos, en los diferentes grupos experimentales.

En la figura 4.40. se expone la evolución que siguieron los nematodos respecto a las ubicaciones en los lóbulos caudales derecho e izquierdo del pulmón en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la experiencia. Las diferencias más acusadas entre el lado derecho ($284'3 \pm 106'4$) e izquierdo ($194 \pm 58'2$) del pulmón se observaron en los animales pertenecientes al grupo 1 al día 84 post-infección.

Las correlaciones halladas entre el número total de larvas cuantificadas y la población de adultos en cada una de las ubicaciones consideradas del pulmón fueron significativamente positivas. Sin embargo, en el lote 3 se detectó una correlación negativa entre el número total de larvas recopiladas al día 14 y la población de adultos presentes en el pulmón derecho ($p < 0'000$).

4.3.2.- Resultados coprológicos.

Tal y como se describió, en el capítulo de material y métodos (3.8.1 y 3.11), los recuentos fecales de los huevos embrionados de *M. apri* se determinaron por el método McMaster modificado, con una sensibilidad de 20 huevos/g de heces. Para ello, siempre el mismo día de la semana y aproximadamente a la misma hora, se recogían las muestras directamente del recto de los animales para posteriormente, proceder a la estimación de la concentración de huevos de éstos nematodos en las heces.

El número medio de huevos por gramo de heces calculado para el lote 1 fue de $1.337'27 \pm 766'32$; para el lote 2 fue $397'58 \pm 264'94$; para el lote 3, $18'06 \pm 31'56$; y finalmente, para el lote 4 fue, $173'33 \pm 98'83$. Tras el análisis estadístico de los resultados medios del recuento fecal de los huevos en los diferentes lotes analizados, se observó una diferencia significativa entre el lote 1 respecto al resto de los grupos a partir del día 28 y hasta el día 84 post-infección. Además, en el lote 1 se ha registrado una correlación positiva estadísticamente significativa entre el número total de adultos y los huevos/g de heces ($R= 0'85$; $p<0'05$).

Así, el número máximo de huevos de *M. apri* por gramo de heces registrado durante el análisis de las muestras fue de 3.120, detectados en un animal del lote 1 al día 49 post-infección. En el resto de grupos, los niveles máximos detectados fueron de 1.180 huevos/g de heces al día 70 en un animal del lote 2; de 100 huevos/g de heces al día 56 en un animal del lote 3; y por último, de 360 huevos/g de heces en un cerdo perteneciente al lote 4 al día 70 post-infección.

La evolución de los resultados coprológicos a lo largo de la experiencia se expone en la figura 4.39. No se detectaron huevos embrionados de *M. apri* hasta el día 28 post-infección. Fue a partir de esta fecha, cuando los valores de los recuentos fecales comenzaron a aumentar progresivamente en todos los lotes experimentales, significativamente en el lote 1. Concretamente, al día 35 post-infección se distinguieron tres grupos significativamente diferentes; el primero de ellos, constituido por el lote 1, el segundo por el lote 2 y el tercero por los lotes 3 y 4. En tomas consecutivas, los lotes 2, 3 y 4 formaron un único grupo estadístico que difirieron exclusivamente respecto del lote 1.

Para el lote 1, los recuentos fecales máximos se produjeron entre los días 49 y 63 post-infección (2060-2347 huevos/g de heces), momento a partir del cual se observó un

descenso significativo en la expulsión de los huevos, manteniéndose en un rango de 1000-1500 huevos/g de heces hasta el final de la experiencia (Fig. 4.39.).

En el resto de los lotes se observó un primer pico de eliminación de huevos en las heces entre el día 35 y 42 post-infección. Los valores medios más elevados en este primer pico detectado en el lote 2 fueron de 560 huevos/g heces; en el lote 3 de 27 huevos/g heces y en el lote 4 de 173 huevos/g heces. A partir de este momento, los niveles de expulsión de huevos en estos lotes se mantuvieron más o menos constantes hasta el final de la infección.

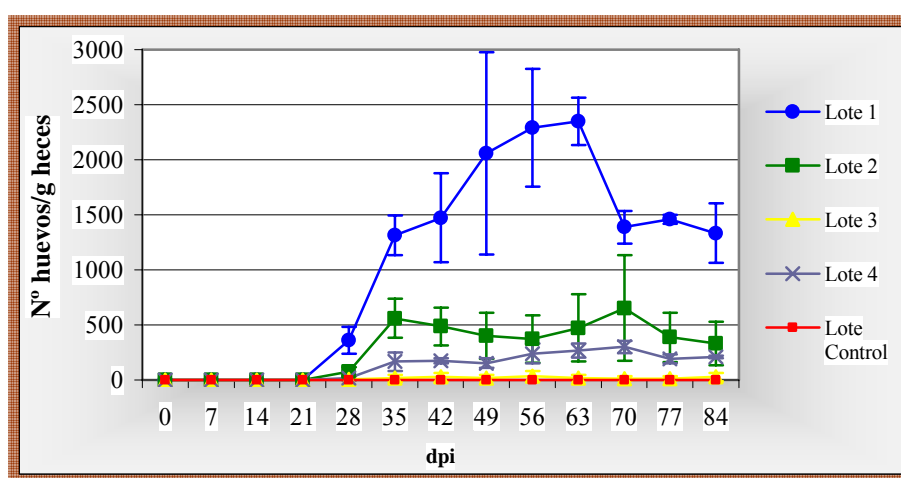


Fig. 4. 41. Resultados por lotes del número de huevos de *M. apri* por gramo de heces detectados a lo largo de la infección.

4.3.3.- Recuento de las manchas de leche en hígado.

Las lesiones hepáticas conocidas como manchas de leche son muy características y bien definidas en otras parasitosis porcinas, como es el caso de la ascariosis. Sin embargo, también se ha relacionado la aparición de estas lesiones inflamatorias en el hígado como resultado de la migración de las larvas erráticas de *Metastrongylus spp.* Así, en infecciones experimentales llevadas a cabo en cerdos o en hámsteres con *M. apri* (Dunn, 1956; Yoshihara *et al.*, 1990; Yoshihara, 2004) se ha observado la aparición de unas lesiones granulomatosas en el tejido hepático, muy similares a las características manchas de leche producidas por *A. suum* durante su migración por el hígado.

En los días de sacrificio, se cuantificaron las manchas de leche presentes en los hígados de los cerdos de los diferentes lotes experimentales. Así, la media del número de manchas de leche registradas en los hígados de los cerdos pertenecientes al lote 1 fue

de $2'77 \pm 1'59$; en el lote 2 fue de $3'00 \pm 2'45$; en el lote 3 fue de $8'33 \pm 7'38$; en el lote 4 fue de $2'00 \pm 1'27$; y por último, en los hígados de los animales utilizados como controles no se registraron estas lesiones hepáticas. El número máximo de lesiones hepáticas descritas en los animales infectados ha sido de 24, concretamente en el animal nº 35 del lote 3 sacrificado al día 35 post-infección.

Según los resultados obtenidos en el recuento de las lesiones hepáticas a lo largo del estudio (Fig. 4.42.), el lote 3 presenta un número significativamente más elevado de manchas de leche en los días 0, 14 y 35 post-infección que el resto de los grupos. Por el contrario, al día 84 post-infección no se detectan diferencias significativas en el número de lesiones hepáticas registradas entre los diferentes lotes. Además, en el lote 3 fue registrada una elevada correlación positiva entre el número total de larvas y el número de manchas de leche registradas en el hígado ($p < 0'005$).

De forma generalizada, aunque no se describan diferencias significativas, el número más elevado de manchas de leche se registró al día 35 post-infección en todos los grupos de animales infectados.

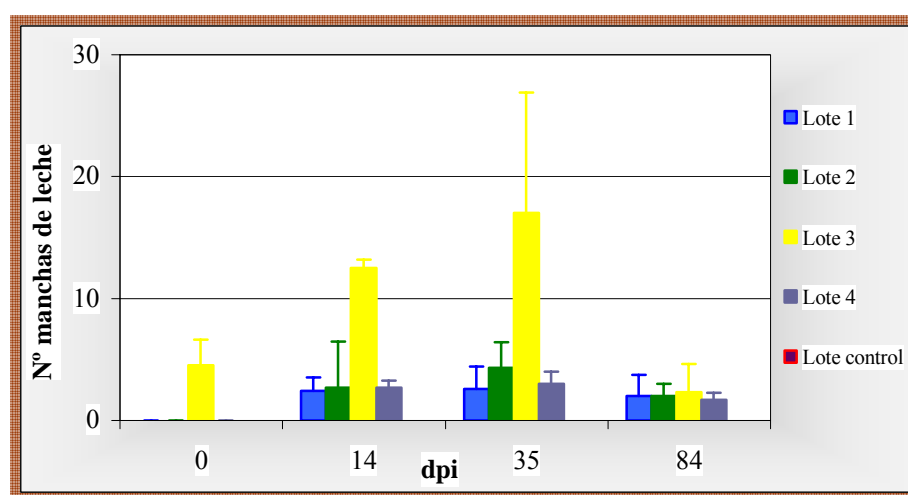


Fig. 4.42. Resultados por lotes del número de manchas de leches en el hígado a lo largo de la experiencia.

4.4.-Resultados de la respuesta eosinofílica.

La media del porcentaje de eosinófilos calculados para los diferentes grupos experimentales fue de $2'85 \pm 2'14$ para el lote 1; de $2'15 \pm 1'71$ para el lote 2; de $2'52 \pm 1'92$ para el lote 3; $1'68 \pm 1'62$ para el lote 4; y finalmente, de $2'00 \pm 1'10$ para el

lote control. Estos resultados nos definen tres grupos significativamente diferentes ($p < 0.05$); el primero de ellos está formado por las medias de los lotes 1 y 3, el grupo intermedio está constituido por los porcentajes del lote 2 y el tercero está integrado por los resultados medios del lote 4 y control.

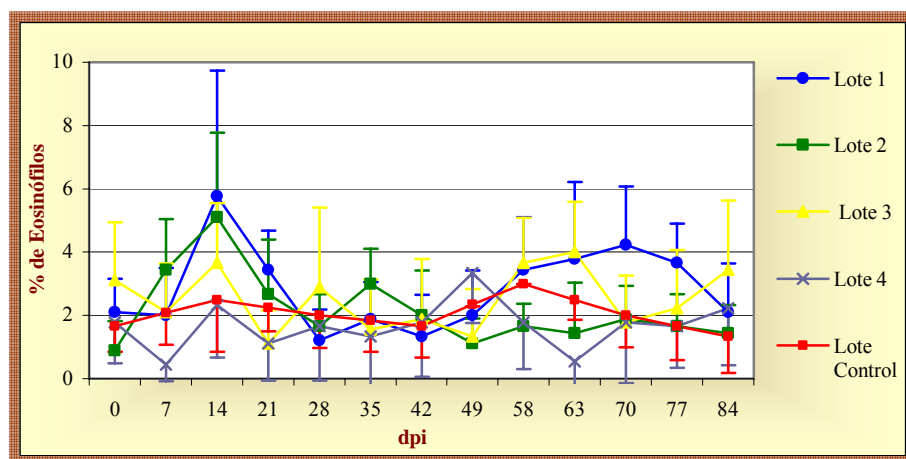


Fig. 4.43. Evolución media del porcentaje de eosinófilos en los lotes durante la infección.

El primer incremento significativo del porcentaje de eosinófilos se produjo al día 14 post-infección en los diferentes lotes de animales infectados (Fig. 4.43.). Así, excepto el lote 4, el resto de grupos mostraron valores de eosinófilos circulantes más elevados que el lote control. En animales del lote 1 y del lote 2 los porcentajes máximos registrados se produjeron al día 14 tras la infección (10% y 9%, respectivamente).

Aun así, a lo largo de la experiencia no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes grupos, incluido el lote control. Excepto al día 70 post-infección, cuando los valores medios alcanzados por el lote 1 resultaron significativamente superiores a los mostrados por el resto de lotes.

La distribución de los valores medios del porcentaje de eosinófilos en los animales pertenecientes al lote 1 siguió un patrón con dos picos característicos. El primero y más elevado se produjo al día 14 post-infección. Por su parte, el segundo se evidenció a partir del día 49 y hasta el día 77 post-infección, en el que no se alcanzaron valores tan elevados como en el primero, pero se prolongó más en el tiempo. Además, en este lote 1 se registró una correlación positiva significativa entre el porcentaje de eosinófilos periféricos y el número de manchas de leche en hígado ($R=0.997$; $p < 0.05$).

Los resultados de los porcentajes de eosinófilos obtenidos en el lote 2 experimentaron una evolución similar al lote 1. En este caso, el segundo pico de eosinófilos circulantes se produjo entre el día 28 y 42, para finalmente descender y mantenerse en valores similares al grupo control.

Igualmente, la tendencia mostrada por los valores del lote 3 fue semejante a la descrita para el lote 1. En cambio, el segundo pico descrito en este caso, se produjo a partir del día 58 hasta el 63 post-infección, tras el cual se detectaron unos valores constantes hasta el fin de la experiencia. Respecto al lote 4, cabe señalar su escasa respuesta eosinofílica periférica frente a la infección por *M. apri*, incluso se han detectado en numerosas ocasiones valores inferiores a los valores del grupo control.

4.5.- Resultados inmunológicos.

4.5.1.- Respuesta inmune celular.

Para un mejor conocimiento de los mecanismos inmunológicos celulares implicados en la respuesta orgánica del cerdo ibérico frente a *M. apri*, tanto en las fases iniciales de la enfermedad como en la fase crónica, se llevó a cabo el estudio de las poblaciones celulares de las muestras mediante su análisis citométrico.

Se ha ilustrado el tipo de respuesta celular desarrollada a nivel sistémico, mediante el análisis de las diferentes poblaciones linfocitarias y de los monocitos procedentes de muestras de sangre periférica a lo largo de la experiencia. Por otro lado, el estudio de la respuesta inmune a nivel local se realizó a partir de muestras de ganglio torácico-pulmonar y BAL, determinando las poblaciones linfocitarias y de macrófagos.

4.5.1.1.- Estudio de la evolución de los Linfocitos T.

● Linfocitos T totales (CD3⁺).

Los valores medios registrados de los porcentajes de CD3⁺ son expresados respecto al total de células adquiridas durante el análisis citométrico de las diferentes muestras. La evolución a lo largo de la infección de los porcentajes de linfocitos T en los diferentes grupos experimentales se muestra en las figuras 4.44., 4.45. y 4.46.

Los valores medios de CD3⁺ en las muestras de sangre periférica de los lotes 3 y 4 al día 0 post-infección fueron significativamente menores a los del resto de grupos. Además, el lote 3 presenta durante los días 35 y 84 post-infección los valores medios más bajos. En cambio, durante los días 14 y 35 post-infección son los animales del lote 1 los que presentan las proporciones más elevadas de linfocitos T en sangre (Fig. 4.44.). En líneas generales, los porcentajes medios de los CD3⁺ periféricos tienden a disminuir a lo largo de la experiencia en todos los grupos experimentales, excepto los grupos 2 y 4 que sufren el efecto contrario.

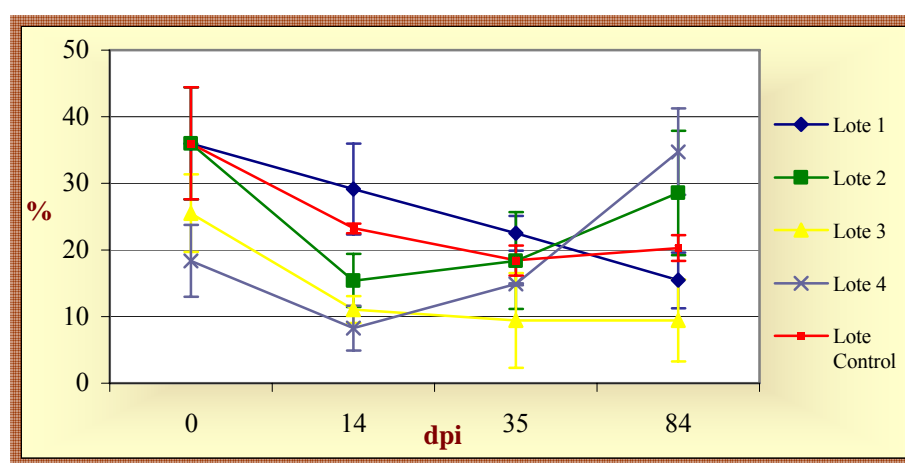


Fig. 4.44. Evolución de los porcentajes de linfocitos T en muestras de sangre periférica en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

Según los resultados obtenidos, tanto al inicio (0 *dpi*) como al final (84 *dpi*) de la experiencia, no se han observado diferencias significativas de los porcentajes medios de linfocitos T presentes en las muestras de ganglio y BAL entre los diferentes lotes experimentales.

Respecto a los porcentajes de los linfocitos T ganglionares, pudimos observar un ligero aumento de los mismos en todos los lotes al final de la infección. Al día 35 post-infección los porcentajes medios de CD3⁺ en los lotes 3 y 4 sufrieron una significativa bajada del 39% y del 23%, respectivamente (Fig. 4.45.).

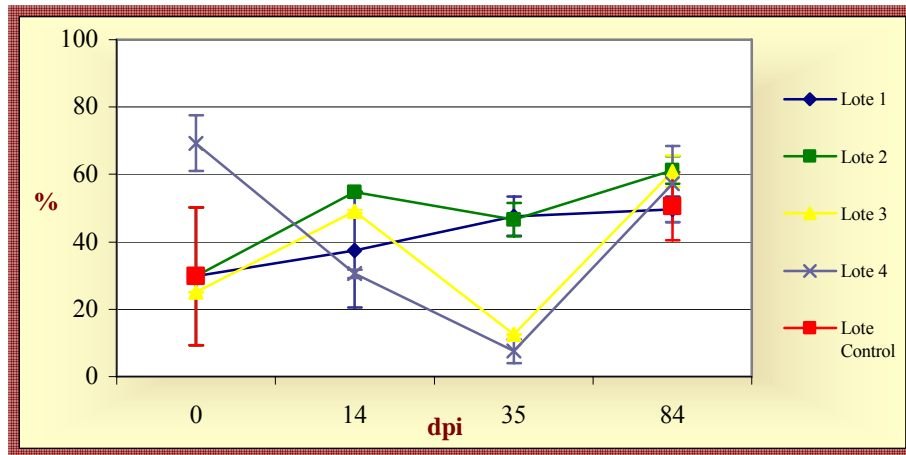


Fig. 4.45. Evolución de los porcentajes de linfocitos T en muestras de ganglio en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

En las muestras de BAL las variaciones registradas para la subpoblación linfocitaria $CD3^+$ fueron prácticamente nulas. Solamente destacó, el significativo incremento del porcentaje medio de linfocitos T, de más del 20%, detectado al día 14 post-infección en el lote 2 (Fig. 4.46.).

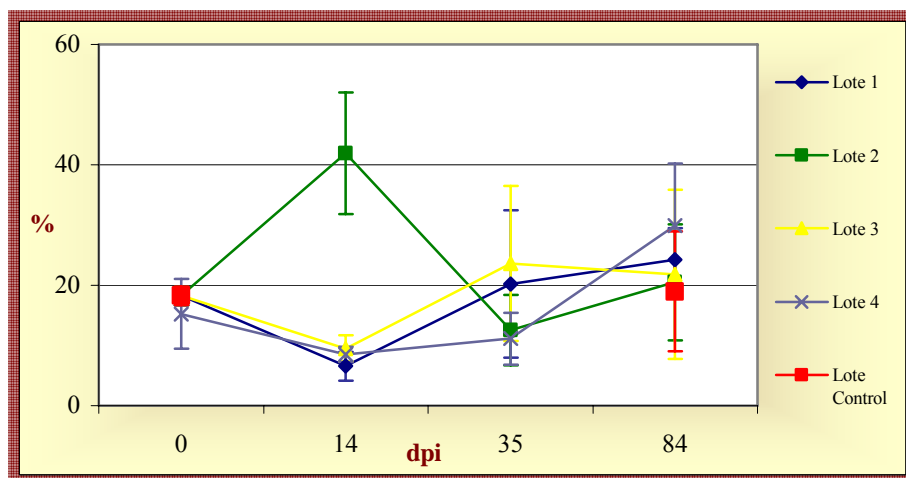


Fig. 4.46. Evolución de los porcentajes de linfocitos T en muestras de BAL en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

● Linfocitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$).

El porcentaje medio de los linfocitos T $CD8^+$ registrado en los diferentes lotes de la experiencia en muestras de sangre periférica, ganglio y BAL son expresados respecto a la población total de los linfocitos T ($CD3^+$) en cada una de ellas (Fig. 4.47., 4.48. y 4.49.).

En todos los grupos experimentales, la tendencia general mostrada a lo largo del tiempo por los linfocitos T citotóxicos sanguíneos fue a disminuir o mantenerse en los niveles iniciales (Fig. 4.47.). Concretamente, al día 0 post-infección se observaron porcentajes de células CD8⁺ significativamente más bajos en los grupos previamente tratados (Lotes 3 y 4) que en el resto. Posteriormente, los porcentajes detectados en los lotes 2, 3, 4 y control se igualaron, mientras que el lote 1 mantuvo sus niveles iniciales. Finalmente, durante el resto de la infección no se registraron diferencias significativas entre los diferentes lotes experimentales.

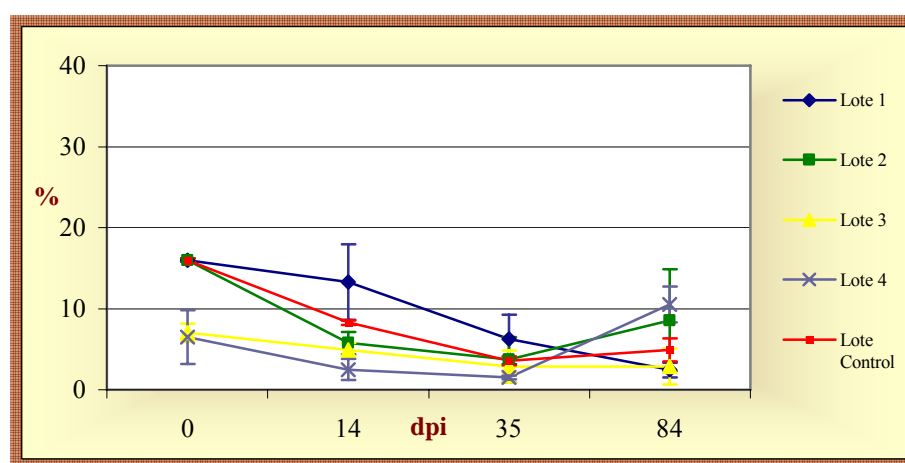


Fig. 4.47. Evolución de los porcentajes de linfocitos T citotóxicos en muestras de sangre periférica en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

La supoblación linfocitaria CD3⁺CD8⁺ presente en las muestras de ganglio torácico-pulmonar al día 0 post-infección fue similar en todos los grupos analizados (Fig. 4.48.). Según los resultados obtenidos el mismo día de la infección (0 dpi), podemos observar que en el lote 4 se registraron unos porcentajes de linfocitos T CD8⁺ más elevados que en el resto de grupos.

Las primeras variaciones significativas se produjeron a partir del día 14 post-infección, donde los lotes 2 y 3 experimentaron un incremento del porcentaje de linfocitos T. Por el contrario, el lote 4 disminuyó significativamente sus niveles, más de un 10% respecto al día 0 post-infección. Al día 35 post-infección, mientras que el lote 1 mantenía sus niveles de CD8⁺ constantes, los lotes 2, 3 y 4 experimentaron un descenso significativo. En la etapa final de la experiencia, los lotes infectados se alcanzaron los niveles de los porcentajes de linfocitos T citotóxicos controles ($9.2 \pm 2.5\%$).

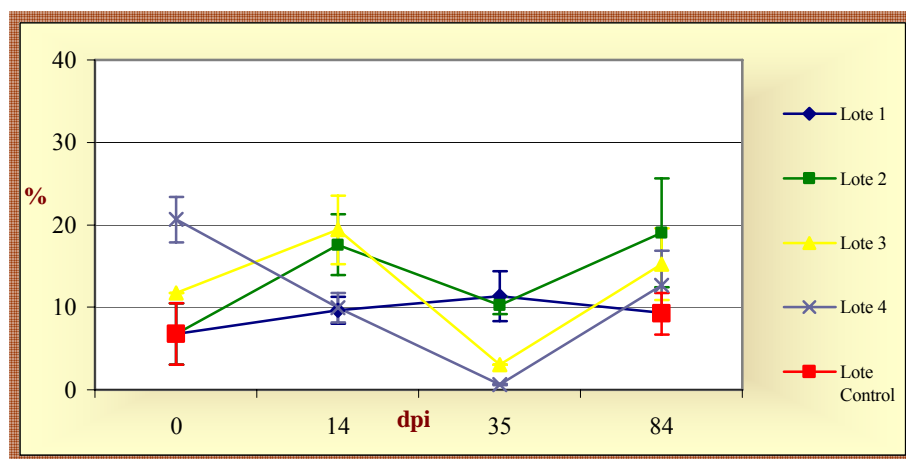


Fig. 4.48. Evolución de los porcentajes de linfocitos T citotóxicos en muestras de ganglio en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

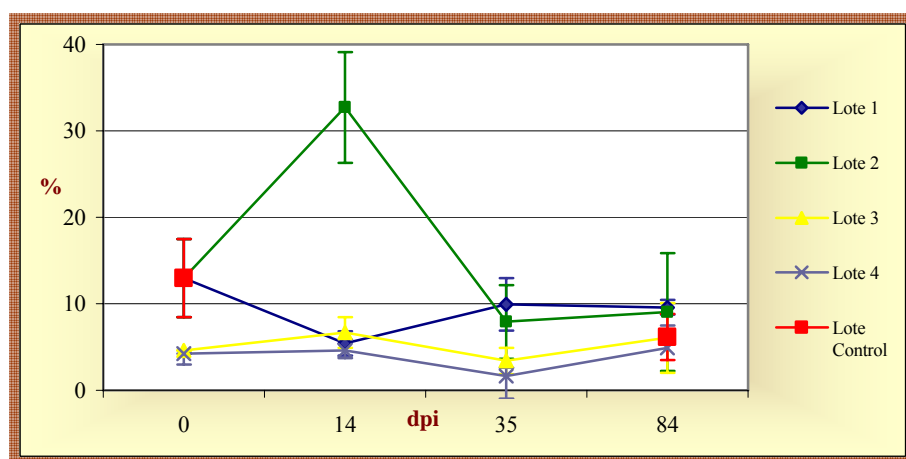


Fig. 4.49. Evolución de los porcentajes de linfocitos T citotóxicos en muestras de BAL en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

Al comienzo de la infección (0 *dpi*), no se registraron diferencias significativas entre los porcentajes de la subpoblación linfocitaria $CD8^+$ presente en las muestras de BAL de los diferentes grupos experimentales (Fig. 4.49.). Sin embargo, en los lotes 3 y 4 estos valores se apreciaron más bajos que en el resto.

En la mayoría de los casos, a lo largo de la experiencia se mantuvieron los porcentajes más o menos constantes. A excepción de los niveles registrados para el lote 2, pues se observó un pico muy significativo, del $33 \pm 6.4\%$ al día 14 post-infección.

Dentro de la población de linfocitos T citotóxicos han sido diferenciadas dos subpoblaciones; los linfocitos T que expresan el antígeno CD8 con fuerte intensidad ($CD8^{+hi}$, "high") o baja intensidad ($CD8^{+lo}$, "low"), como ya ha sido expuesto en el capítulo 3.14.3.

Los porcentajes registrados de linfocitos T CD8^{hi} respecto del total de la población de CD3⁺ en muestras de sangre periférica, no mostraron ninguna variación significativa. Aunque, como ya ha sido comentado para la población total de CD8⁺, los lotes previamente tratados (Lotes 3 y 4) mostraron valores inferiores a los detectados para el resto de grupos.

La tendencia de los porcentajes de CD8^{hi} circulantes a lo largo de los dos primeros tercios de la infección fue a disminuir (Fig.4.50.). En ese momento de la experiencia (14-35 *dpi*) fue el lote 1, el que presentó los niveles periféricos de CD8^{hi} más elevados, ya que en el resto de los lotes disminuyeron drásticamente.

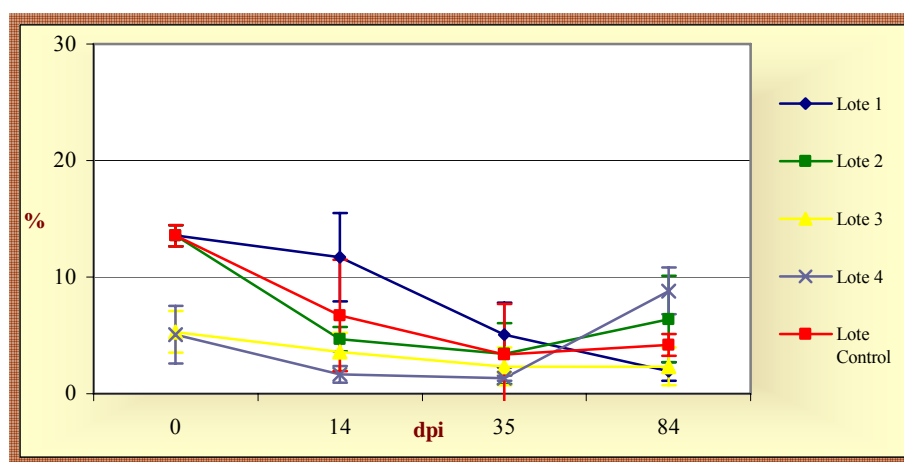


Fig. 4.50. Evolución de los porcentajes de linfocitos T CD8^{hi} en muestras de sangre periférica en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

La evolución de los CD8^{hi} en las muestras de ganglio torácico-pulmonar en los diferentes lotes se expone en la figura 4.51. A pesar de que no han sido descritas diferencias significativas al inicio de la experiencia (0 *dpi*) entre los diferentes grupos experimentales, fueron los animales del lote 4 los que presentaron los valores más elevados ($18 \pm 2.8\%$) respecto al resto de grupos.

Al día 14 tras la infección se detectó un importante descenso de los porcentajes en el lote 4, así los niveles más altos fueron registrados en los lotes 2 y 3. Al día 35 post-infección, se produjo un descenso significativo de los porcentajes medios de de CD8^{hi} en los lotes 3 y 4, mientras que los lotes 1 y 2 mantuvieron los valores registrados anteriormente. A final del estudio (84 *dpi*), no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los infectados.

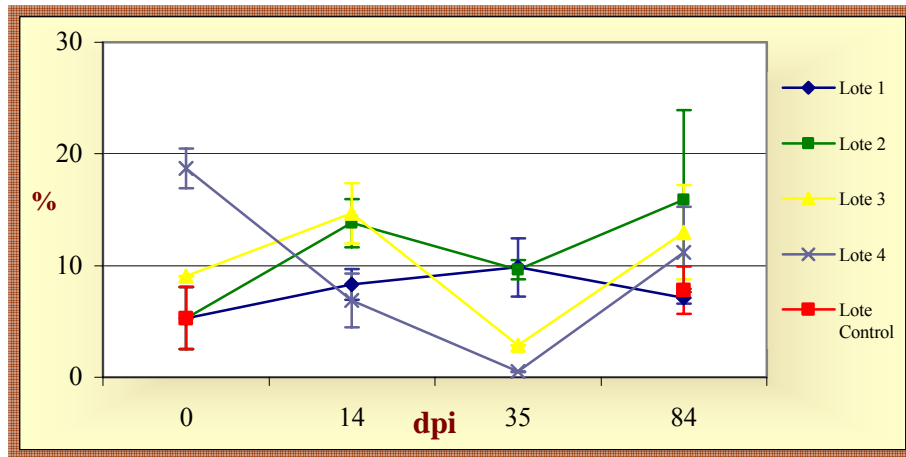


Fig. 4.51. Evolución de los porcentajes de linfocitos T CD8^{hi} en muestras de ganglio en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

De forma generalizada, los porcentajes de CD3⁺CD8^{hi} registrados en los BAL de los lotes 1, 3, 4 y control se mantuvieron constantes a lo largo de la experiencia. En cambio, en el lote 2 se describe un incremento muy significativo de los niveles de ésta subpoblación, la cual alcanzó unos valores medios de 26±3'8% al día 14 post-infección.

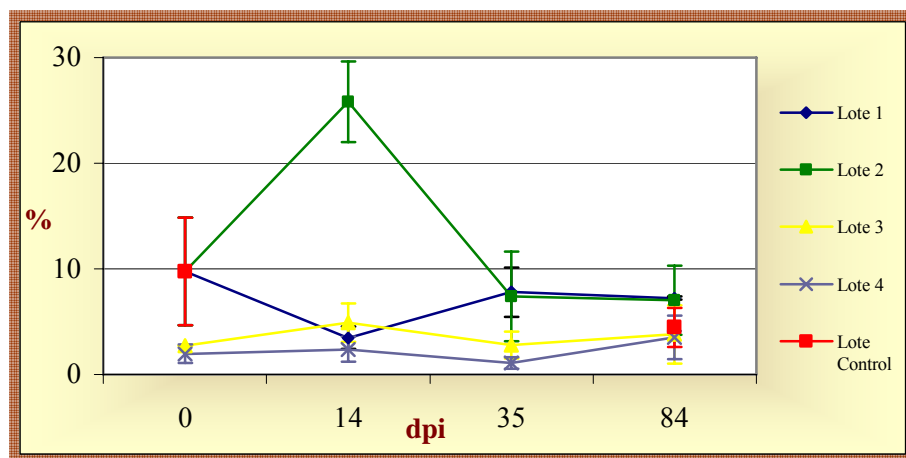


Fig. 4.52. Evolución de los porcentajes de linfocitos T CD8^{hi} en muestras de BAL en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

La evolución seguida por los linfocitos T CD8^{lo} periféricos en los diferentes lotes se muestra en la figura 4.53. Los resultados obtenidos, evidenciaron una ligera tendencia al descenso de los valores sanguíneos de esta subpoblación a medida que se desarrollaba la infección. Tan sólo, se observó un ligero incremento de los porcentajes de CD3⁺CD8^{lo} en el lote 1 al día 35 y en el lote 2 y 4 al día 84 post-infección.

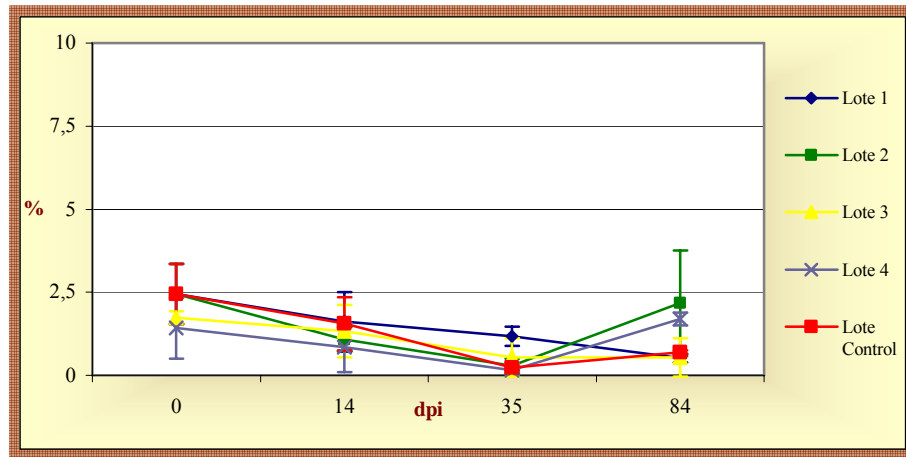


Fig. 4.53. Evolución de los porcentajes de linfocitos T CD8^{+lo} en muestras de sangre periférica en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

En el caso de los porcentajes registrados de los linfocitos T CD8^{+lo} en ganglio torácico-pulmonar (Fig. 4.54.), no se ha observado ninguna variación en los lotes 1 y control a lo largo de la experiencia. Sin embargo, en el resto de grupos fue registrado un incremento significativo de los valores de esta subpoblación al día 14 post-infección. Por el contrario, al día 35 se detectó un importante descenso en los lotes 2, 3 y 4, los cuales se recuperaron al final de la experiencia.

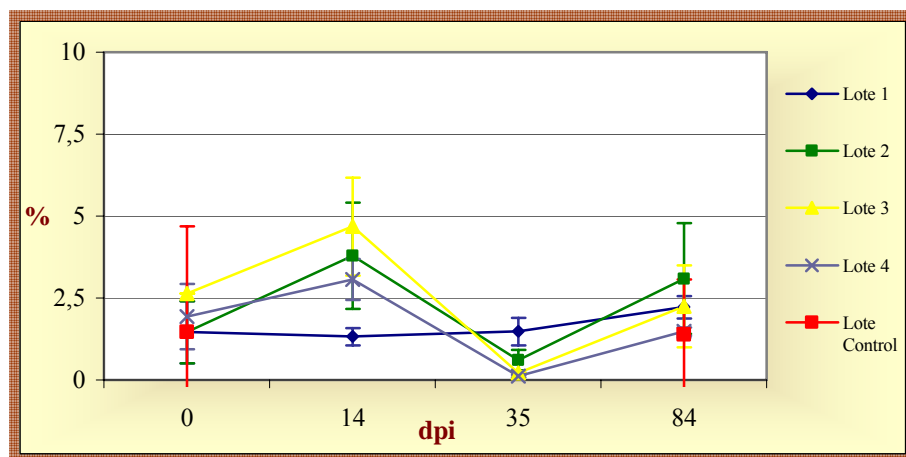


Fig. 4.54. Evolución de los porcentajes de linfocitos T CD8^{+lo} en muestras de ganglio de los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

En las muestras de BAL no se detectaron variaciones significativas de los porcentajes de linfocitos CD8^{+lo} registrados para los lotes 1, 3, 4 y control a lo largo de la experiencia. Únicamente, al igual que en el caso de las muestras ganglionares, fue el

lote 2, el que experimentó un incremento significativo de sus porcentajes medios al día 14 post-infección (Fig. 4.55.).

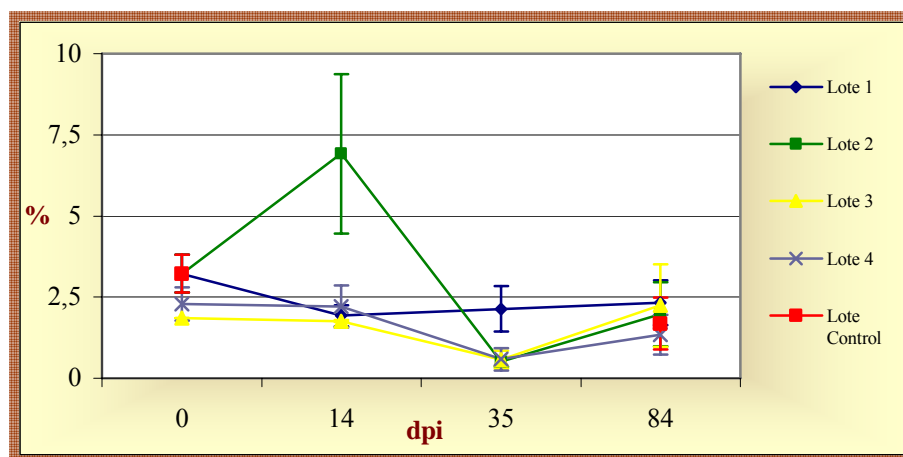


Fig. 4.55. Evolución de los porcentajes de linfocitos T $CD8^{+lo}$ en muestras de BAL en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

● Linfocitos T colaboradores ($CD3^{+}CD4^{+}$).

Los resultados obtenidos del porcentaje medio de los linfocitos T colaboradores, son expresados respecto a la población total linfocitaria $CD3^{+}$ presente en las diferentes muestras analizadas.

Los niveles medios de $CD4^{+}$ periféricos detectados en las muestras sanguíneas de los animales de los diferentes lotes experimentales, sufren un descenso progresivo desde el inicio de la experiencia. No obstante, al día 35 post-infección en el lote 1 fue registrado un ligero incremento estadísticamente significativo de los porcentajes de los $CD4^{+}$. Al día 84 post-infección, especialmente los lotes 2 y 4, experimentaron un aumento significativo de los niveles periféricos de linfocitos T colaboradores respecto al registrado en el resto de los lotes.

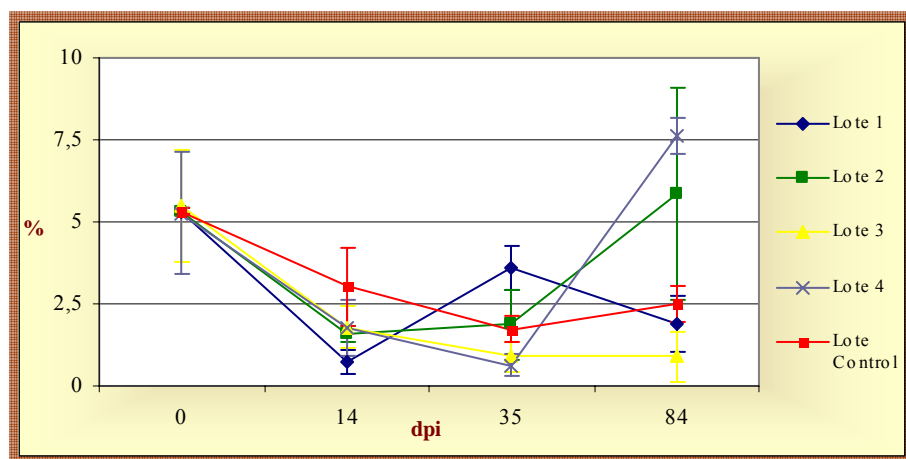


Fig. 4.56. Evolución de los porcentajes de linfocitos T colaboradores en muestras de sangre periférica en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

En líneas generales, y para todos los grupos experimentales, se describió un incremento de los porcentajes de los linfocitos $CD4^+$ ganglionares desde el inicio y hasta el final de la investigación.

Al comienzo de la experiencia (0 *dpi*) no se detectaron diferencias significativas entre los valores medios de los linfocitos T colaboradores en ganglio torácico-pulmonar de los diferentes lotes experimentales. Al día 14 post-infección se produjo por un lado, el aumento de los valores del lote 1, 2 y 3 y por otro, el descenso de los porcentajes del lote 4. Si bien, fue al día 35 post-infección cuando se distinguieron dos grupos significativamente diferentes entre sí; los lotes 1 y 2 que mostraban los valores más elevados y los lotes 3 y 4 que descendieron notablemente. Al final de la infección (84 *dpi*) no se registraron diferencias evidentes entre los lotes infectados y el control.

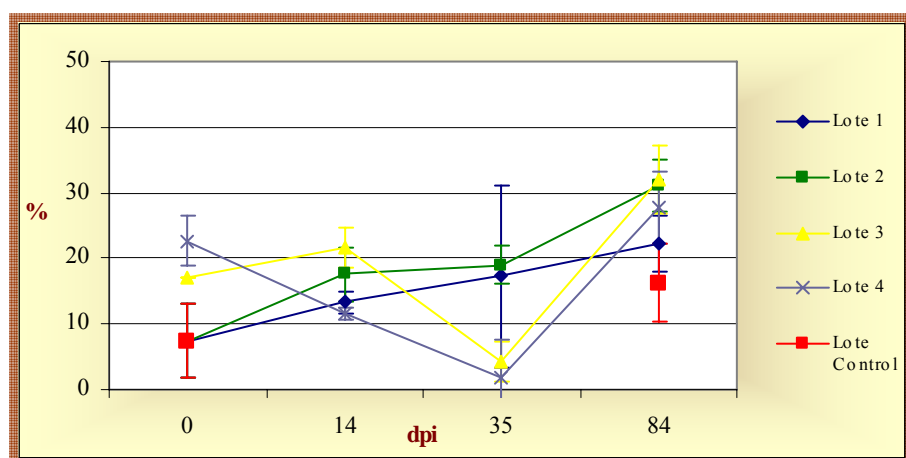


Fig. 4.57. Evolución de los porcentajes de linfocitos T colaboradores en muestras de ganglio en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

El análisis de los porcentajes de linfocitos T colaboradores presentes en los BAL detectados para los diferentes lotes ensayados, pusieron de manifiesto la escasa presencia de esta subpoblación linfocitaria en los espacios broncoalveolares durante la infección (Fig. 4.58.). Además, no se registraron variaciones significativas entre los diferentes grupos experimentales, aunque se apreció una tendencia general a aumentar los niveles de células $CD4^+$ en BAL según avanzaba el tiempo.

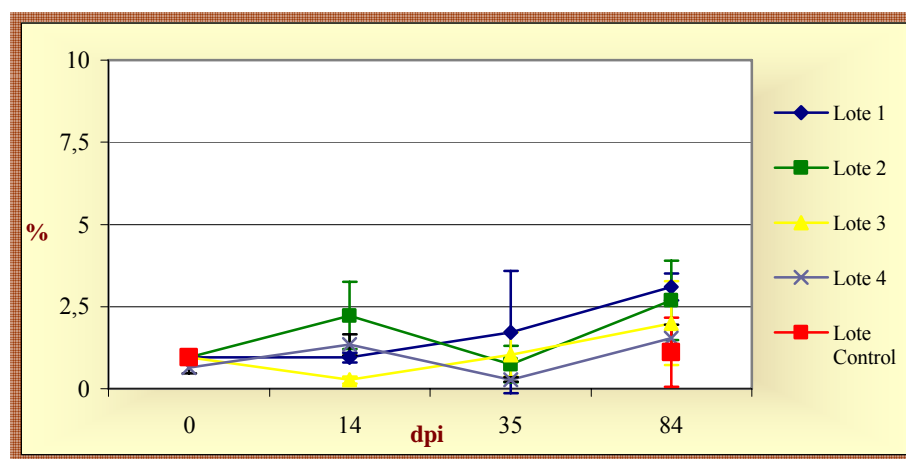


Fig. 4.58. Evolución de los porcentajes de linfocitos T colaboradores en muestras de BAL en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

● Linfocitos T dobles positivos ($CD3^+CD8^+CD4^+$).

La población de linfocitos T que coexpresan los antígenos CD8 y CD4 son especialmente abundantes en la especie porcina, como ya se ha apuntado anteriormente. Los porcentajes expresados de esta subpoblación han sido calculados a partir de la población de linfocitos T totales ($CD3^+$).

La evolución al alza de los valores medios de las células T $CD8^+CD4^+$ ha sido registrada en todos los lotes, menos en el lote 1 y 3. El lote control presentó los mayores niveles de estos linfocitos entre los días 14 y 35 post-infección, aunque nunca sobrepasó el 5% del total de $CD3^+$. Finalmente, al día 84 post-infección el lote 4 alcanzó los niveles máximos registrados de linfocitos T dobles positivos periféricos ($4,0 \pm 1,4\%$), seguido de cerca por los valores del lote control. Tan sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los lotes 1 y 3, respecto a los lotes 2, 4 y control.

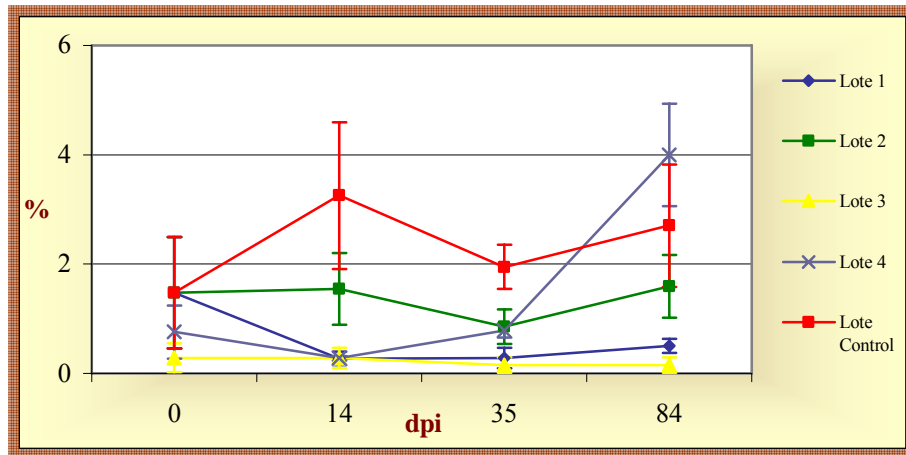


Fig. 4.59. Evolución de los porcentajes de linfocitos T dobles positivos en muestras de sangre periférica en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

En la figura 4.60. se exponen los resultados descritos para los porcentajes de los linfocitos T dobles positivos presentes en las muestras de ganglio linfático. La tendencia general mostrada por los diferentes grupos experimentales fue el aumento evidenciado en los porcentajes de esta subpoblación de linfocitos T desde el inicio hasta el final de la experiencia.

Aunque, no se trató de una diferencia estadísticamente significativa, el lote 3 tanto al día 0 como al día 84 tras el reto, presentó unos niveles más elevados que el resto de lotes. Pero, hasta el día 35 post-infección no fueron detectadas las primeras diferencias significativas entre lotes, concretamente se produjo un pico de los porcentajes de las células T $CD8^+CD4^+$ en el lote 2.

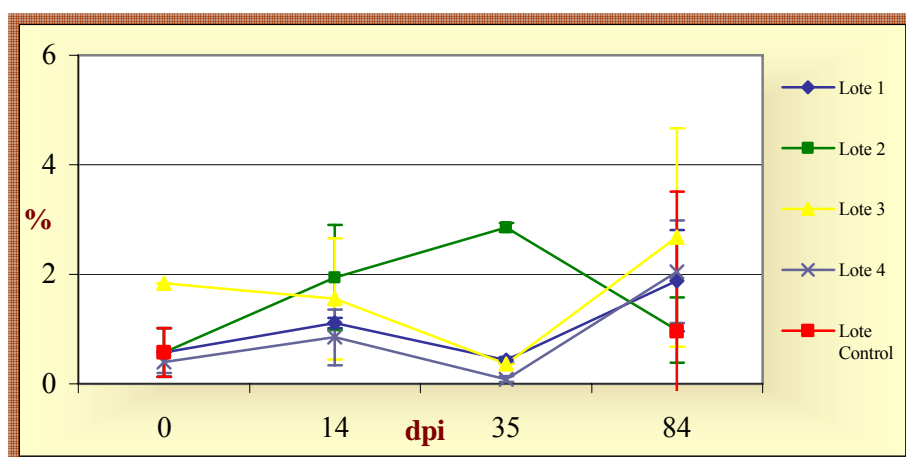


Fig. 4.60. Evolución de los porcentajes de linfocitos T dobles positivos en muestras de ganglio en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

Los porcentajes de dobles positivos en las muestras de BAL son algo menores que en los casos anteriormente descritos. En ninguno de los grupos experimentales se registraron variaciones significativas a lo largo de la infección. Tan sólo, se produjo un incremento estadísticamente significativo en los porcentajes registrados para el lote 2 ($2'0 \pm 1'3\%$) al día 14 post-infección (Fig. 4.61.).

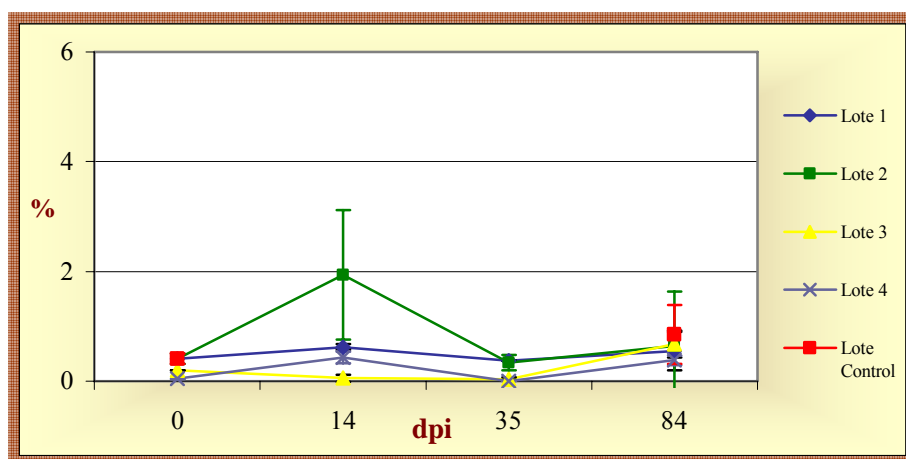


Fig. 4.61. Evolución de los porcentajes de linfocitos T dobles positivos en muestras de BAL en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

● Linfocitos T dobles negativos ($CD3^+CD8^-CD4^-$).

Esta subpoblación linfocitaria anteriormente era conocida como células nulas. En la actualidad, se reconocen como linfocitos T $\gamma\delta$, ya que estos presentan un tipo de receptores antigénicos diferentes a los descritos en el resto de células T ($\alpha\beta$).

De la misma manera, que el resto de las subpoblaciones de células T anteriormente analizadas, los porcentajes registrados de estas células T que no expresan los antígenos CD8 y CD4, los valores son expresados en función de la población total de linfocitos $CD3^+$.

La evolución de los linfocitos $\gamma\delta$ presentes en sangre periférica de los animales pertenecientes a los diferentes grupos ensayados se muestra en la figura 4.62. Según estos resultados, a medida que avanza la experiencia los valores tienden a disminuir. Al inicio del experimento (0 dpi) se describieron unos niveles significativamente más bajos en los lotes previamente tratados (lote 3 y 4) respecto al resto de los grupos. Durante los días 14 y 35 post-infección, los valores medios más elevados de $CD8^-CD4^-$ fueron los registrados en el lote 1.

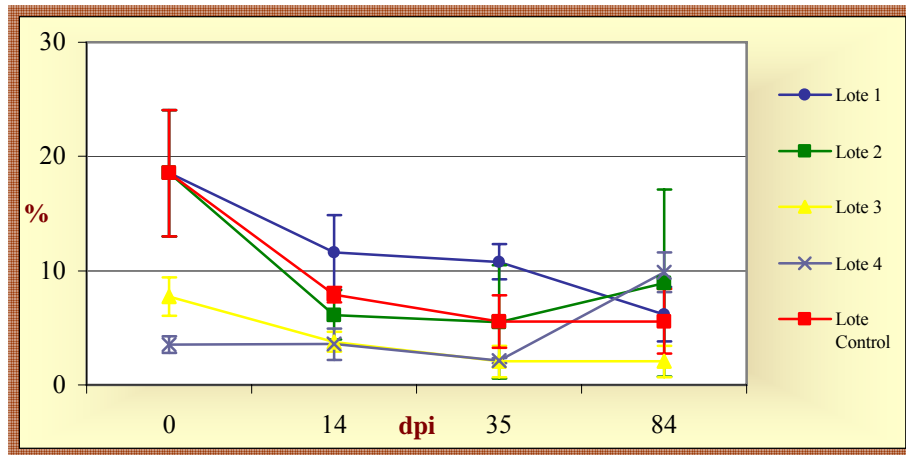


Fig. 4.62. Evolución de los porcentajes de linfocitos T dobles negativos en muestras de sangre periférica en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

Prácticamente, no se ha descrito ningún tipo de evolución de los porcentajes de los linfocitos T dobles negativos procedentes de muestras ganglionares en los diferentes grupos experimentales (Fig. 4.63.).

Al comienzo de la experiencia (0 *dpi*) se evidenciaron valores más elevados en los lotes pre-tratados (Lotes 3 y 4) que en el resto. Sin embargo, hasta el día 14 post-infección no se registraron diferencias significativas cuando el lote 2 experimentó un incremento de los porcentajes de CD8⁺CD4⁻. Posteriormente, los lotes 1 y 3 mostraron un incremento significativo al día 35 post-infección.

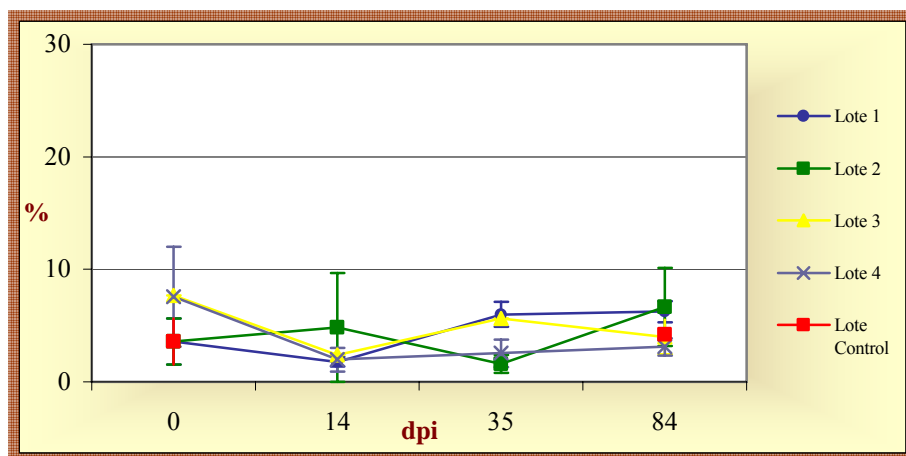


Fig. 4.63. Evolución de los porcentajes de linfocitos T dobles negativos en muestras de ganglio en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

Los porcentajes de los linfocitos T dobles negativos procedentes de muestras de BAL de los diferentes grupos experimentales se muestran en la figura 4.64. Se observaron comportamientos muy diferentes a lo largo de la infección entre los grupos experimentales. Los lotes pre-tratados (Lotes 3 y 4) no mostraron ninguna variación de los niveles de los linfocitos T dobles negativos durante la experiencia.

Por el contrario, en el lote 2 se observó un aumento significativo de los porcentajes de CD8⁺CD4⁻ al día 14 post-infección. Posteriormente, al día 35 post-infección el lote 1 experimentó una importante subida de los mismos. Al final del ensayo no se registraron diferencias significativas entre los grupos infectados y el control.

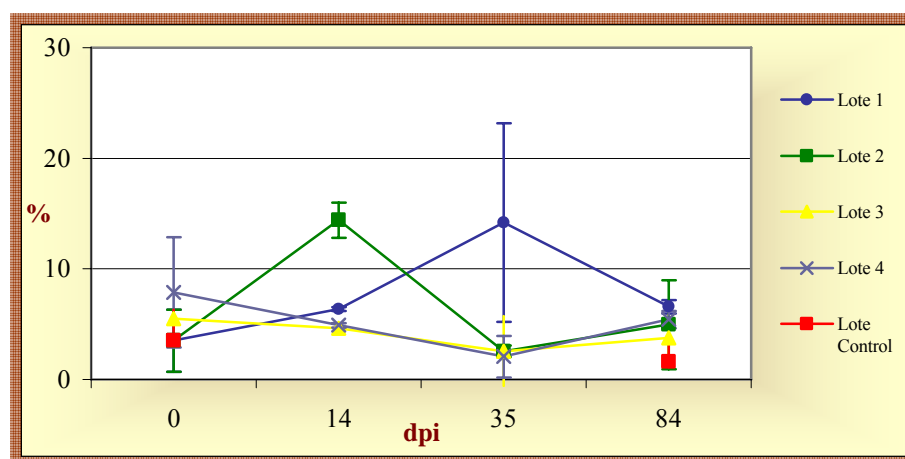


Fig. 4.64. Evolución de los porcentajes de linfocitos T dobles negativos en muestras de BAL en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

4.5.1.2.- Estudio de la evolución de los Linfocitos B (CD21⁺).

Los porcentajes registrados de los linfocitos B presentes en las diferentes muestras analizadas durante la investigación son expresados en función del total de células adquiridas durante el análisis citométrico de las mismas. En líneas generales, las proporciones de células B presentes en BAL son menores que las registradas en sangre y ganglio.

El estudio de los porcentajes de las células B presentes en sangre periférica en los diferentes lotes experimentales mostró escasas variaciones significativas. Las únicas diferencias significativas detectadas fueron debidas a los elevados niveles de linfocitos B mostrados por el lote 1 al día 14 y 35 post-infección.

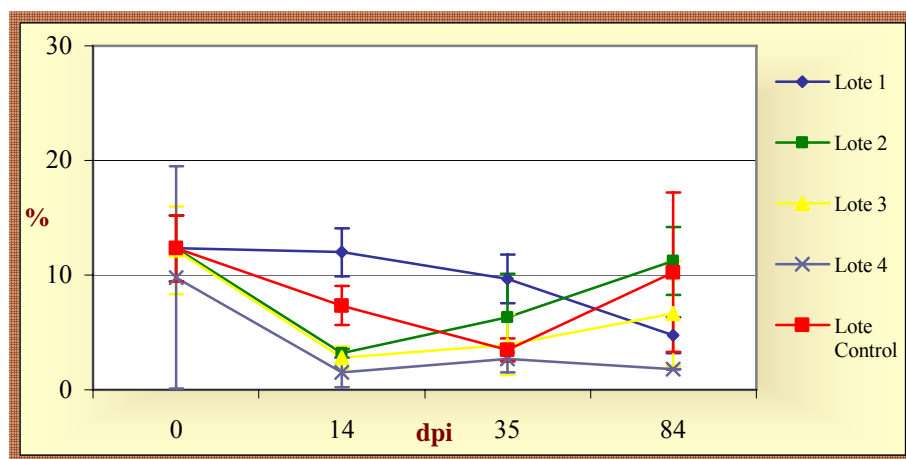


Fig. 4.65. Evolución de los porcentajes de linfocitos B en muestras de sangre periférica en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

Los resultados obtenidos de los porcentajes de linfocitos B respecto al resto de las poblaciones celulares presentes en ganglio son mostrados en la figura 4.66. Al inicio de la experiencia (0 *dpi*), aunque el lote 3 presenta los valores más elevados no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales. Al día 14 post-infección, se describe un incremento significativo de los porcentajes de células B en el lote 1 que se mantiene en estos niveles hasta el final de la infección. En el resto de grupos, lote 2, 3 y 4 se produjo un incremento significativo de la población linfocitaria CD21⁺ al día 35 respecto al día 14 post-infección.

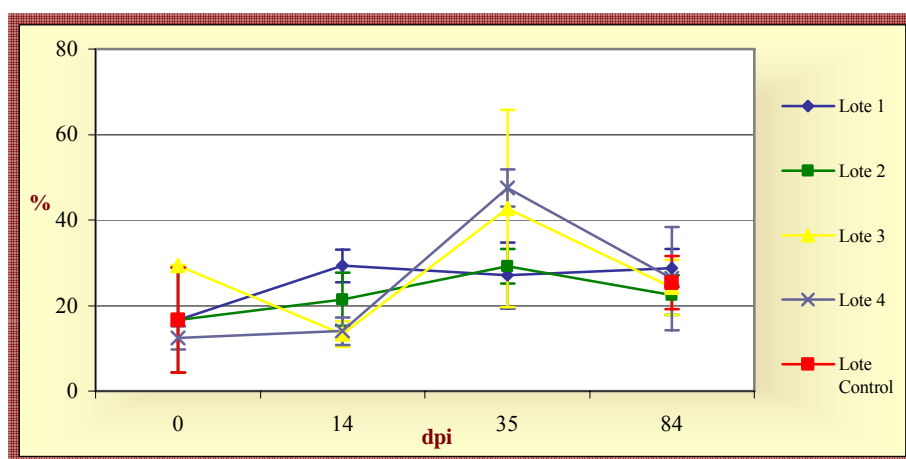


Fig. 4.66. Evolución de los porcentajes de linfocitos B en muestras de ganglio en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

El análisis de los porcentajes de las células B presentes en las muestras de BAL de los animales procedentes de los lotes 1, 2 y control no mostraron prácticamente

ninguna variación significativa a lo largo de la infección. Si bien, la tendencia fue a aumentar su presencia en los fluidos pulmonares. Por su parte, los lotes 3 y 4 desde el día 14 y hasta el día 35 post-infección mostraron unos niveles de linfocitos B a nivel pulmonar significativamente más elevados que el resto de lotes, alcanzando unos porcentajes medios de hasta el 4'5%.

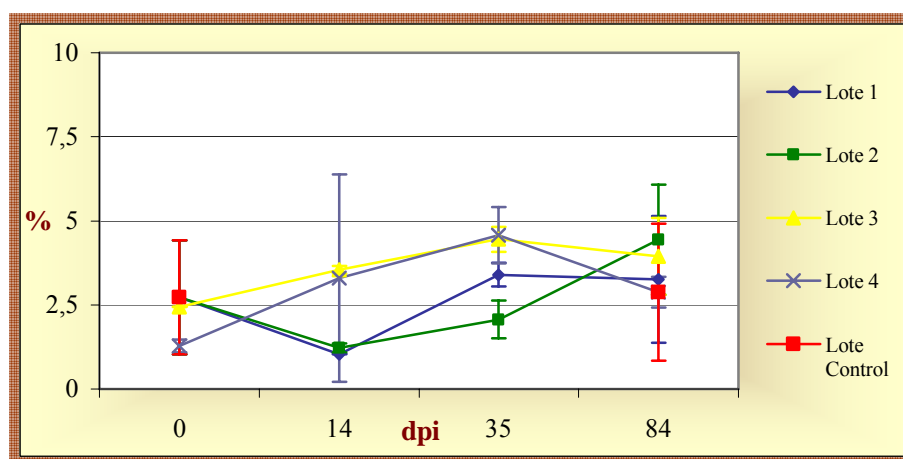


Fig. 4.67. Evolución de los porcentajes de linfocitos B en muestras de BAL en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

4.5.1.3.- Estudio de la evolución de los Macrófagos y Monocitos.

Gracias a la utilización de los histogramas mixtos, podemos seleccionar las poblaciones celulares no sólo por la intensidad de fluorescencia emitida por los fluorocromos unidos a los Ac-Mo específicos, sino también por su tamaño y complejidad estructural. Así, se han diferenciado las poblaciones de los monocitos sanguíneos, los macrófagos presentes en los ganglios y los macrófagos alveolares existentes en BAL.

La evolución de los monocitos sanguíneos en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección se muestra en la figura 4.68. Los porcentajes detectados al comienzo de la experiencia (0 dpi) fueron superiores en los lotes previamente tratados (Lotes 3 y 4) respecto al control. En cambio, al día 14 post-infección, al aumentar los valores registrados en los lotes 1, 2 y control y mantenerse constantes los porcentajes detectados en los lotes 3 y 4, no se reconocieron diferencias significativas entre los distintos grupos del ensayo. A partir de este momento, los porcentajes de monocitos periféricos mostrados en los diferentes lotes disminuyeron progresivamente hasta el final del experimento. Salvo en el caso del lote 1 que alcanzó los niveles máximos de monocitos sanguíneos al día 35 post-infección.

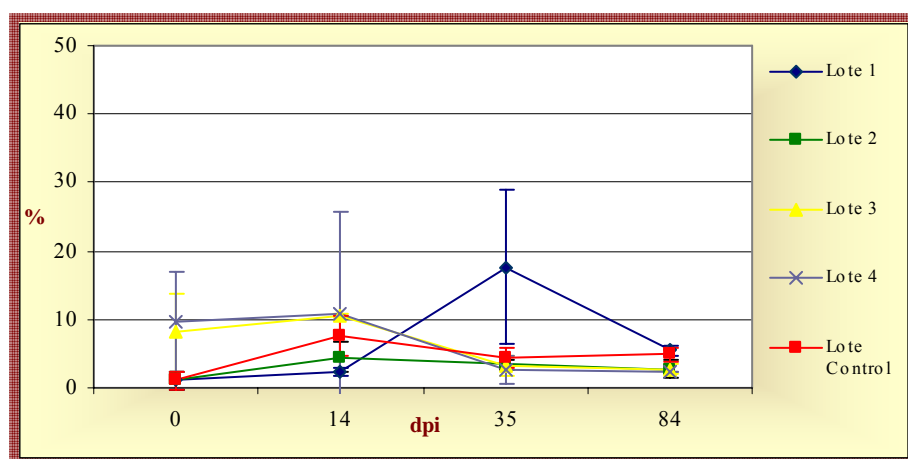


Fig. 4.68. Evolución de los porcentajes de monocitos en muestras de sangre periférica en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

Al comienzo del ensayo (0 *dpi*) no se mostraron diferencias significativas entre los porcentajes de macrófagos presentes en los ganglios torácico-pulmonares analizados en los animales de los diferentes grupos experimentales. En cambio, en líneas generales, al día 14 post-infección se observó un incremento de esta población celular en los lotes, aunque de forma significativa, tan sólo en los lotes 2, 3 y 4. Al día 35 post-infección los lotes 3 y 4 mantuvieron niveles elevados de macrófagos, sin embargo en el lote 2 estos valores fueron descendiendo hasta alcanzar los valores iniciales. Finalmente, al día 84 post-infección todos los lotes registraron unos porcentajes de macrófagos similares a los valores detectados al comienzo de la experiencia.

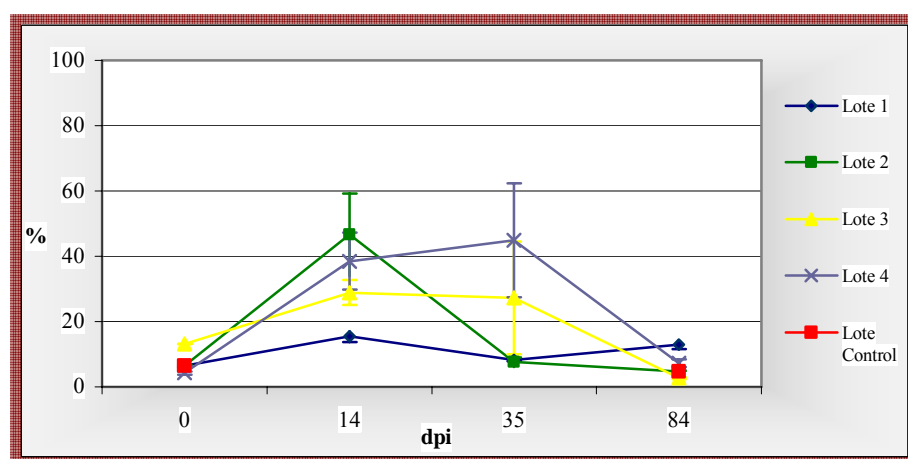


Fig. 4.69. Evolución de los porcentajes de macrófagos en muestras de ganglio en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

Como se puede observar en la figura 4.70., la población de los macrófagos alveolares es muy abundante en las muestras de BAL en la especie porcina. Los valores más elevados ($p < 0.05$) de estas células durante la infección se presentaron en el lote 3. En cambio al inicio y final de la experiencia (0 y 84 dpi) no se registraron diferencias significativas entre los lotes. Fue al día 14 post-infección, cuando se detectaron las primeras diferencias, distinguiéndose dos grupos estadísticos; el primero, formado por los lotes 2 y 4 que disminuyeron sus porcentajes de macrófagos alveolares y el segundo constituido por los lotes 3 y 1 que aumentaron sus proporciones de macrófagos. De nuevo, al día 35 post-infección no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales, aunque se mantenían los lotes 1 y 3 como los que presentaban valores más elevados de esta población celular. Al final de la experiencia (84 dpi) se observó un descenso muy marcado de los macrófagos alveolares en el lote 1 y algo más suave en los lotes 3 y 4, en cambio en el lote 2 se produjo un incremento de los mismos.

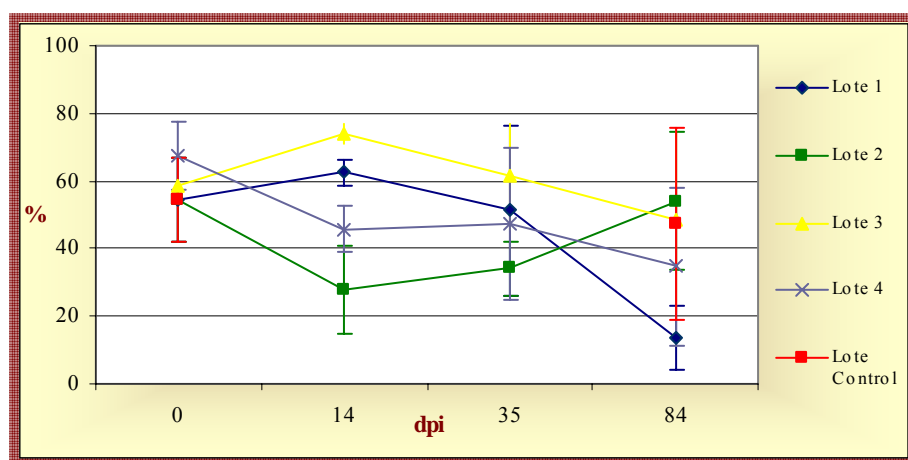


Fig. 4.70. Evolución de los porcentajes de macrófagos alveolares en muestras de BAL en los diferentes lotes experimentales a lo largo de la infección.

4.5.1.4.- Respuesta inmune celular por grupos experimentales.

● Lote 1.

La evolución de los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares analizadas a lo largo del estudio en los animales pertenecientes al lote 1, que recibieron una única dosis infectiva de 3000 L3, se muestran en las siguientes gráficas según el tipo de muestra.

- En sangre periférica.

Las poblaciones celulares analizadas a nivel periférico han sido los linfocitos T, linfocitos B y los monocitos sanguíneos (Fig. 4.71.). Las células T son más abundantes en sangre que las B y que los monocitos. En líneas generales, observamos que las poblaciones linfocitarias tienden a disminuir conforme avanza la experiencia.

En el caso de los linfocitos T, fue a partir del día 35 post-infección cuando se produce un descenso significativo. Los porcentajes de células B no mostraron ninguna variación significativa a lo largo de la infección, aunque al día 14 se observó un ligero aumento, para finalmente presentar valores inferiores a los detectados al comienzo del estudio. Respecto a los porcentajes de monocitos circulantes se observó un incremento muy significativo al día 35 post-infección.

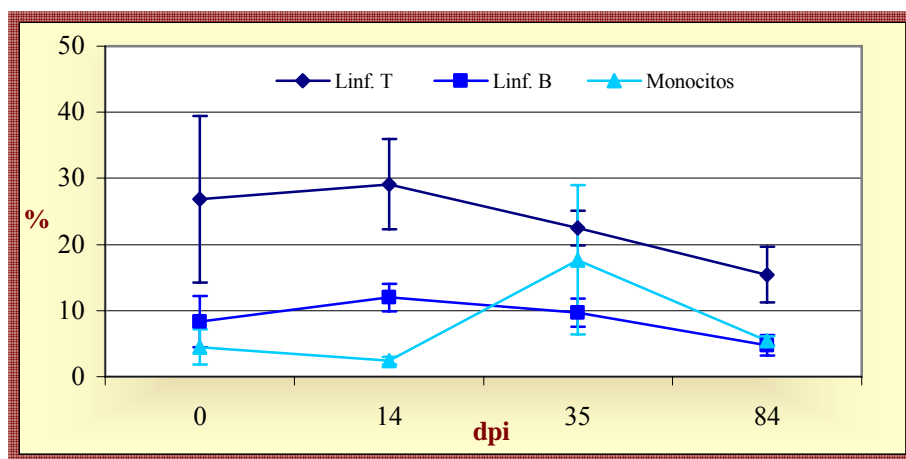


Fig. 4.71. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y monocitos, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de sangre periférica del lote 1.

El estudio comparativo de las diferentes subpoblaciones de células T ($CD3^+$) analizadas durante la experiencia en muestras sanguíneas de los animales del lote 1 se muestra en la figura 4.72.

Los resultados estadísticamente significativos obtenidos tras el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson entre la población de linfocitos T totales y las diferentes subpoblaciones T analizadas en sangre periférica fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación de Pearson	(R)	Significación (p)
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ⁺	0'90	0'001
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ^{hi}	0'87	0'002
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ^{lo}	0'91	0'001
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ⁻ CD4 ⁻	0'80	0'01

Los porcentajes de los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) sufren un ligero incremento al día 14 post-infección, a partir de este momento se produce un descenso no significativo. Al contrario ocurrió con los valores de los linfocitos T colaboradores (CD4⁺) que disminuyeron en sangre periférica al día 14 para finalmente, a partir del día 35 post-infección recuperar sus niveles iniciales. La proporción de las células CD4⁺/CD8⁺ en sangre se mantuvo favorable a los linfocitos T citotóxicos durante toda la experiencia, aunque de forma más significativa al día 14 post-infección.

Según los resultados obtenidos, la mayoría de las células CD8⁺ expresan con alta intensidad este antígeno, en cambio fue escasa la subpoblación de linfocitos T citotóxicos con baja expresión de CD8. Los linfocitos CD8^{hi} mostraron la misma evolución descrita para los linfocitos T citotóxicos totales. Sin embargo, las células T que expresan con baja intensidad el antígeno CD8 no manifestaron ninguna variación a lo largo de la infección.

Otra de las poblaciones, tan abundante en sangre periférica como los linfocitos T CD8⁺, son las células T dobles negativas (CD8⁻CD4⁻) o células $\gamma\delta$. Esta subpoblación no muestra ninguna variación significativa a lo largo de la infección, aunque al día 84 post-infección fueron registrados los porcentajes más bajos. Por su parte, la población de linfocitos T que coexpresan CD8 y CD4 resultó ser minoritaria respecto al resto de células CD3⁺. Además, en los animales pertenecientes al lote 1 no se registraron variaciones significativas de sus porcentajes a lo largo del estudio.

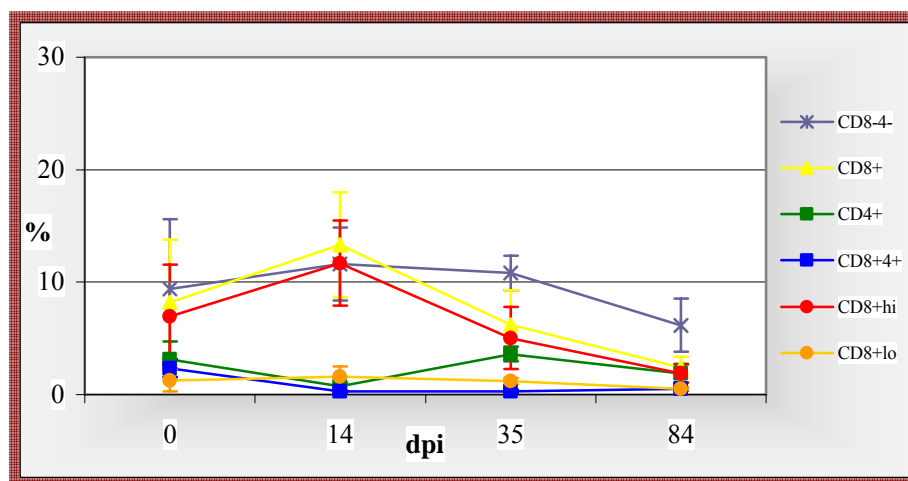


Fig. 4.72. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (CD3+) analizadas en muestras de sangre periférica del lote 1.

- **En ganglio linfático.**

La evolución seguida durante la experiencia por las diferentes poblaciones celulares presentes en las muestras de ganglio torácico-pulmonar en los animales del lote 1 se muestran en las figuras 4.73. y 4.74.

Dentro de las poblaciones celulares analizadas en los ganglios linfáticos, se describió un importante aumento de los porcentajes de linfocitos T al día 35 post-infección. Posteriormente (84 *dpi*) éstos valores disminuyeron de nuevo, aunque los niveles de células T se mantuvieron más elevados que al comienzo de la infección.

Sin embargo, ni los linfocitos B ni los macrófagos mostraron variaciones significativas de sus porcentajes a lo largo del ensayo. No obstante, al día 14 se registró un ligero incremento de los linfocitos B que superaron incluso a la población de células T, mientras que la evolución seguida por los macrófagos en las muestras ganglionares fue positiva.

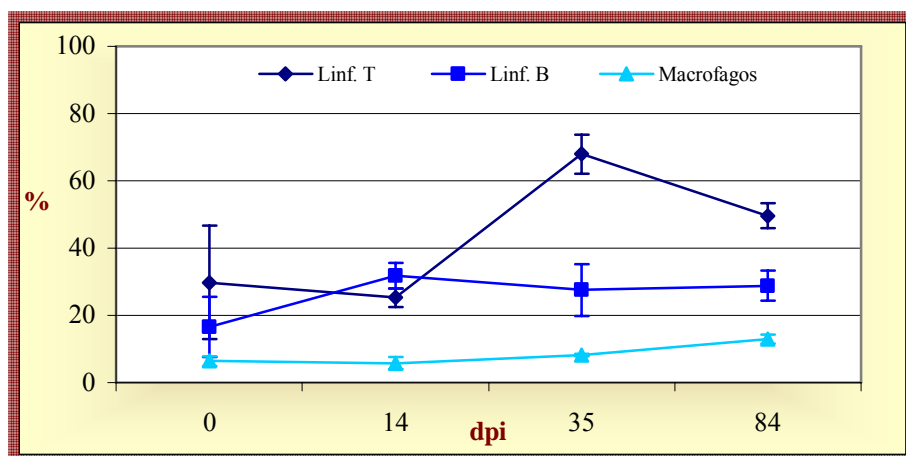


Fig. 4.73. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de ganglio del lote 1.

Como ya se ha resaltado anteriormente, la población celular que más reacciona a nivel ganglionar frente a la infección por *M. apri* en el lote 1 fue la de los linfocitos T. Dentro de esta población linfocitaria reconocemos a los linfocitos T colaboradores y a los dobles negativos como responsables del significativo incremento producido al día 35 post-infección. Así, lo corroboran los resultados estadísticamente significativos obtenidos tras calcular el coeficiente de correlación de Pearson entre la población de linfocitos T totales y las diferentes subpoblaciones T analizadas en ganglio:

Coefficiente de correlación de Pearson	(R)	Significación (p)
Linfocitos T- Linfocitos CD4 ⁺	0'96	0'000
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ^{+lo}	0'77	0'009
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ⁻ CD4 ⁻	0'86	0'001

En menor proporción, se produce la participación de los linfocitos T citotóxicos, especialmente aquellos que muestran una alta expresión de CD8 que también, sufren un aumento significativo de sus porcentajes en ese momento de la infección. Por tanto, la proporción celular CD4⁺/CD8⁺ en las muestras ganglionares se mantuvo positiva a lo largo la infección, aumentando significativamente durante los días 35 y 84 post-infección.

Al igual que en la muestras de sangre periférica, las poblaciones minoritarias en ganglio son los linfocitos T $CD8^{+lo}$ y $CD8^{+}CD4^{+}$, los cuales no mostraron ninguna variación significativa durante la experiencia.

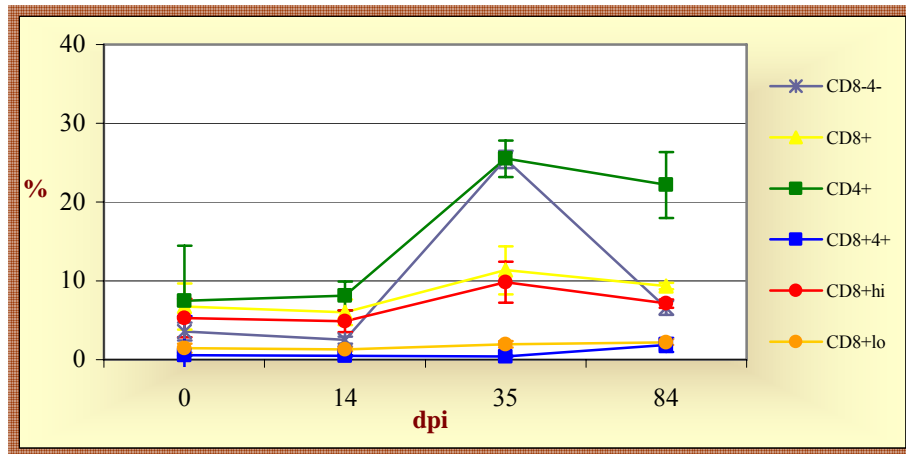


Fig. 4.74. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T ($CD3^{+}$) analizadas en muestras de ganglio del lote 1.

- **En BAL.**

Las poblaciones celulares predominantes en BAL son los macrófagos alveolares, seguidos en importancia por los linfocitos T y por último, los linfocitos B (Fig. 4.75.).

En el lote 1, se produjo un descenso progresivo muy significativo de la población de los macrófagos alveolares desde el día 35 y hasta el final de la infección, de más del 40%. Incluso, se llegó a observar una mayor proporción de linfocitos T que de macrófagos a nivel pulmonar.

Los linfocitos B y T se hallaban positivamente correlacionados ($R= 0.84$; $p<0.00$). Ambas poblaciones, sufrieron un descenso al día 14 post-infección tras el que recuperaron e incluso superaron sus niveles iniciales.

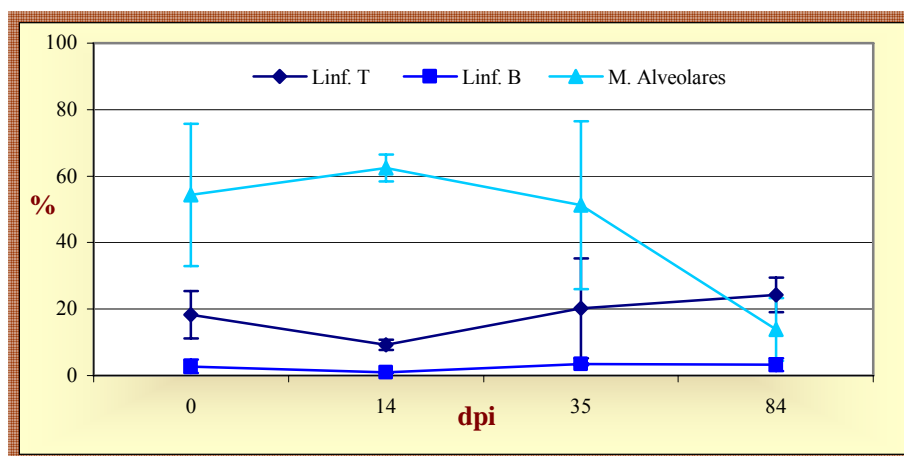


Fig. 4.75. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos alveolares, respecto al total de las células adquiridas, en muestras BAL del lote 1.

La subpoblación de células T citotóxicas y las células $\gamma\delta$, aunque en menor proporción, fueron las responsables de la respuesta general desencadenada a nivel pulmonar por los linfocitos T. En este caso, las poblaciones de células $CD3^+$ minoritarias en BAL fueron los linfocitos $CD4^+$, los $CD8^{+lo}$ y los $CD8^+CD4^+$. Se registraron correlaciones positivas muy significativas entre la población de linfocitos T y todas las subpoblaciones $CD3^+$ estudiadas.

La proporción celular $CD4^+/CD8^+$ hallada en las muestras de BAL del lote 1 mostró una tendencia favorable a una respuesta celular mediada por los linfocitos T citotóxicos durante el transcurso de la infección. Además, se describió una correlación positiva entre las células $CD4^+$ y $CD8^+$ ($R=0'841$; $p<0'00$).

La población de células $CD4^+$ se correlacionaba positivamente con los linfocitos B ($R=0'84$; $p<0'00$) y negativamente con los macrófagos alveolares ($R=-0'69$; $p<0'05$). Por su parte, los linfocitos $CD8^+$ se correlacionaban positivamente con las células B ($R=0'77$; $p<0'05$).

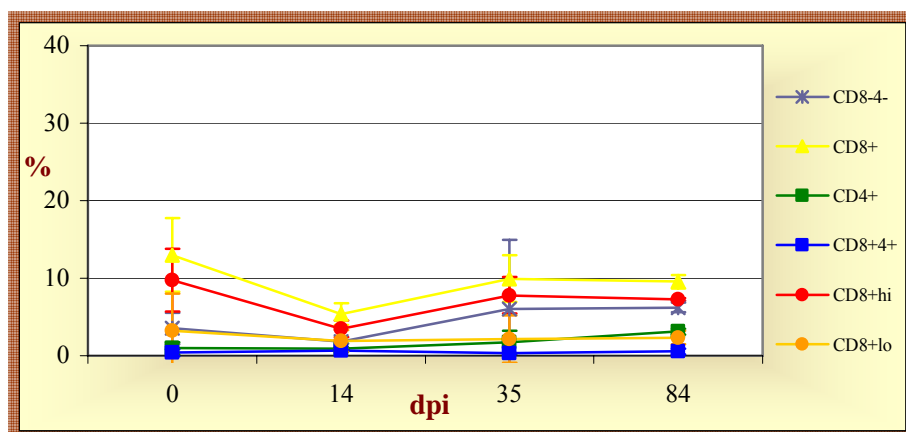


Fig. 4.76. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (CD3+) analizadas en muestras de BAL del lote 1.

● Lote 2.

La evolución a lo largo del estudio de las poblaciones celulares en los animales del lote 2, que recibieron una única dosis infectiva de 1000 L3, se muestran en las siguientes gráficas:

● En sangre periférica.

La población más abundante en sangre periférica fueron los linfocitos. Se detectó un descenso de sus porcentajes entre los días 14 y 35 post-infección, aunque no fue estadísticamente significativo. Respecto a las variaciones de los linfocitos B periféricos, destacó el descenso significativo del 4%, producido al día 14 post-infección. En el lote 2 los monocitos sanguíneos mantuvieron sus niveles constantes durante todo el estudio. No obstante, fue detectada una correlación negativa entre ellos y los linfocitos T ($R=-0,74$; $p<0,05$).

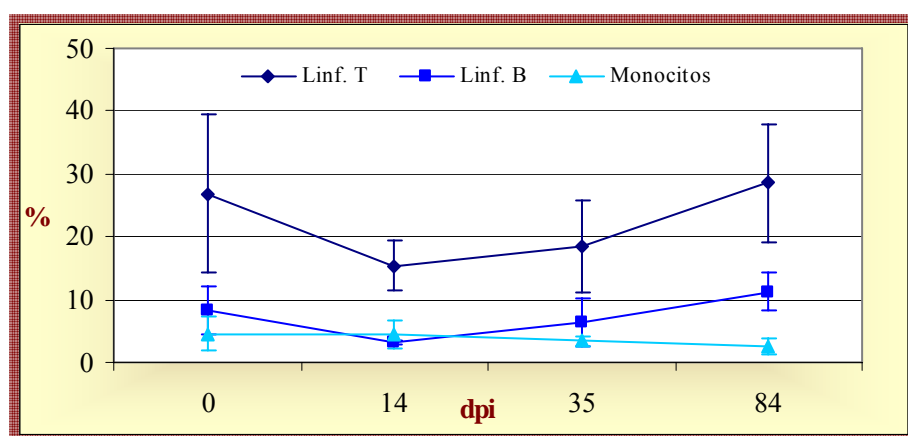


Fig. 4.77. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y monocitos, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de sangre periférica del lote 2.

La evolución de las diferentes subpoblaciones de células T mostraron un claro aumento de sus porcentajes al final de la infección (Fig. 4.78.). La correlación positiva detectada entre los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica fue muy significativa ($R=0'99$; $p<0'00$). Además, la proporción CD4⁺/CD8⁺ se mantuvo constante durante toda la experiencia, aunque a favor de la respuesta de las células citotóxicas. Además, las poblaciones de linfocitos T citotóxicos y colaboradores presentaban correlaciones positivas respecto a las células B ($p<0'01$).

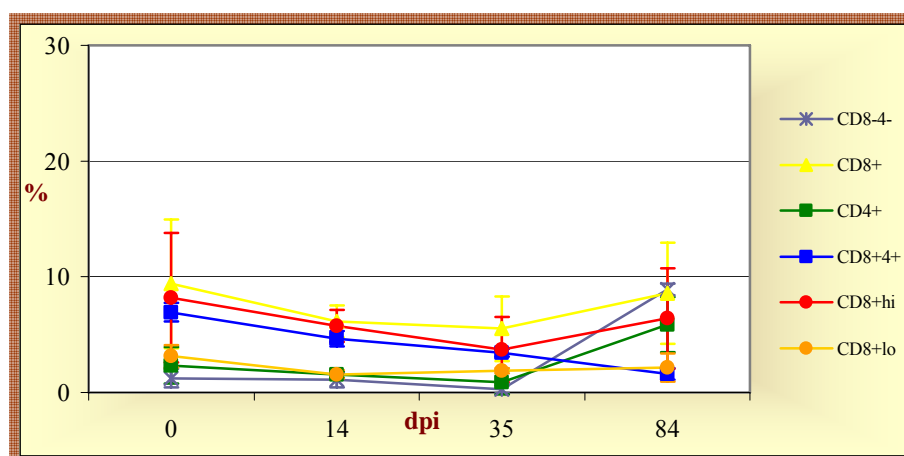


Fig. 4.78. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (CD3+) analizadas en muestras de sangre periférica del lote 2.

Tras calcular el coeficiente de correlación de Pearson entre la población de linfocitos T totales y las diferentes subpoblaciones T analizadas en sangre periférica del lote 2, los resultados estadísticamente significativos obtenidos fueron los siguientes:

Coeficiente de correlación de Pearson	(R)	Significación (p)
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ⁺	0'73	0'03
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ^{+hi}	0'74	0'02
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ^{+lo}	0'69	0'04
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ⁻ CD4 ⁻	0'75	0'02

- En ganglio linfático.

El aumento de la presencia de linfocitos T en ganglio torácico-pulmonar fue notable en los animales del lote 2. Los incrementos más significativos fueron registrados durante

los días 14 y 84 post-infección. Los linfocitos B, siempre presentes en menor proporción que las células T en ganglio, no mostraron ninguna variación significativa a lo largo de la experiencia.

Respecto a los porcentajes de macrófagos detectados en ganglio, se observó un pico muy significativo al día 14 post-infección cuando se alcanzaron sus niveles máximos ($46'6 \pm 12'6\%$).

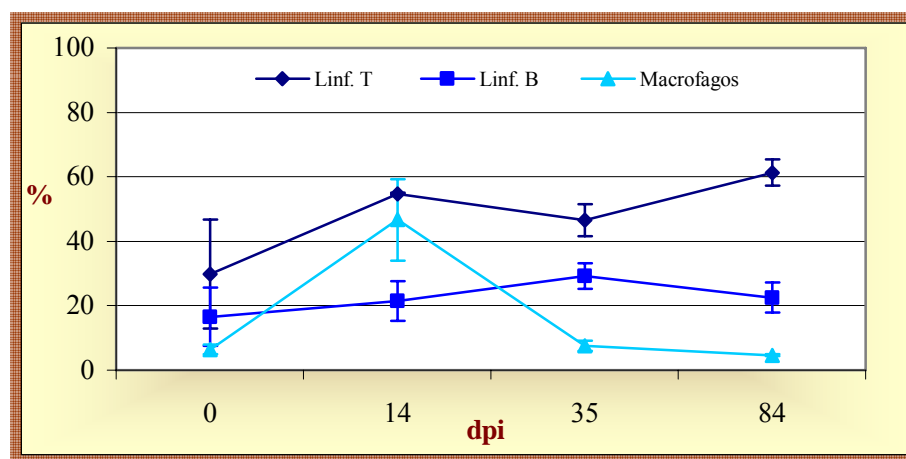


Fig. 4.79. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de ganglio del lote 2.

La proporción $CD4^+/CD8^+$ en ganglio torácico-pulmonar se mantiene a lo largo de la infección, siendo favorable para los linfocitos T colaboradores. Sin embargo, a partir del día 35 y especialmente, al día 84 post-infección tuvo lugar un aumento del ratio $CD4^+/CD8^+$, aunque ambas poblaciones estuvieran altamente correlacionadas ($R=0'73$; $p<0'05$). En todas las subpoblaciones celulares $CD3^+$ analizadas, exceptuando los linfocitos T dobles positivos se produjeron dos incrementos significativos de los porcentajes, el primero al día 14 y el segundo y más acentuado al 84 post-infección.

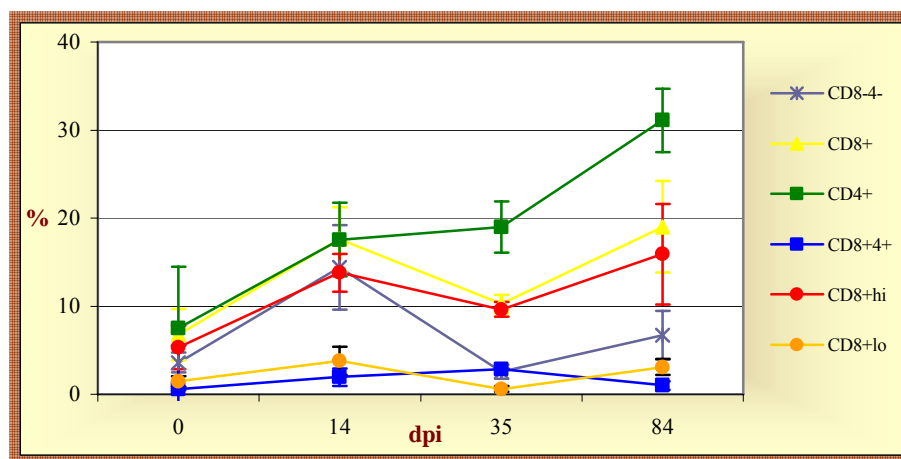


Fig. 4.80. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (CD3+) analizadas en muestras de ganglio del lote 2.

Los resultados estadísticamente significativos del coeficiente de correlación de Pearson entre la población de linfocitos T totales y las diferentes subpoblaciones T analizadas en ganglio, fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación de Pearson (R)	Significación (p)
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ⁺	0'87 0'002
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ^{+hi}	0'85 0'004
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ^{+lo}	0'68 0'05
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ⁻ CD4 ⁻	- 0'85 0'004
Linfocitos T- Linfocitos CD8 ⁺ CD4 ⁺	-0'68 0'04

- En BAL.

La evolución de los porcentajes de los linfocitos T, linfocitos B y macrófagos alveolares presentes en las muestras de BAL de los porcinos pertenecientes al lote 2 se exponen en la figura 4.81.

Respecto a los porcentajes de las células T, destacamos el significativo incremento que se produjo al día 14 post-infección. Tras ello, se recuperaron los niveles iniciales que presentaba esta población. En cambio, la presencia de los linfocitos B en los BAL fue muy escasa, apreciándose un ligero aumento al final de la experiencia (35-84 dpi). Por su parte, los porcentajes de macrófagos alveolares sufrieron un significativo

descenso entre los días 14 y 35 post-infección, finalmente éstos recuperaron sus niveles iniciales.

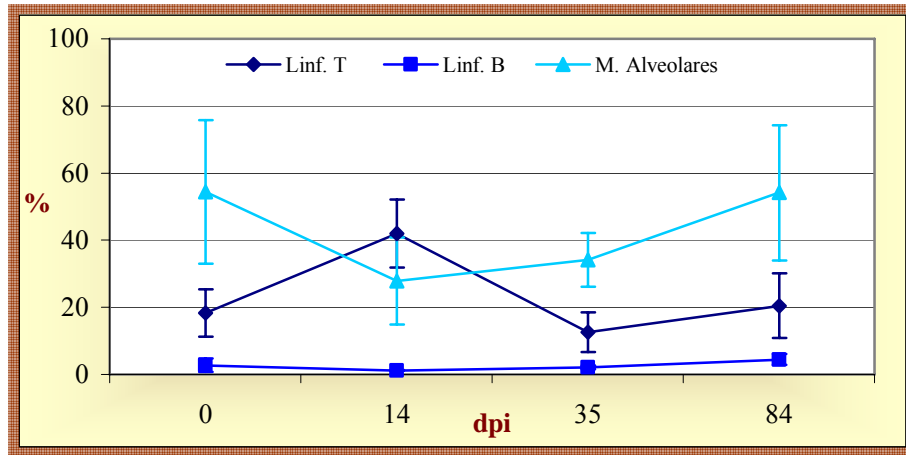


Fig. 4.81. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos alveolares, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de BAL del lote 2.

Los linfocitos T citotóxicos, principalmente los que expresan con alta intensidad el CD8, experimentaron un aumento del 20% de sus niveles desde el comienzo de la experiencia hasta el día 14 post-infección. En el resto de poblaciones celulares CD3⁺ analizadas, excepto en los linfocitos T dobles positivos, se produjo un ligero aumento en ese mismo día post-infección. La proporción CD4⁺/CD8⁺ fue favorable a los linfocitos T citotóxicos durante toda la infección, siendo significativamente más evidente al día 14 post-infección.

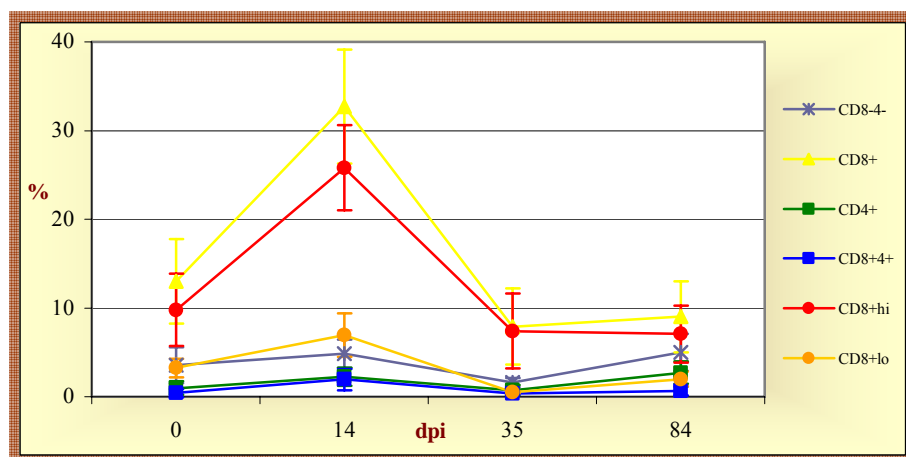


Fig. 4.82. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (CD3⁺) analizadas en muestras de BAL del lote 2.

No se han registrado coeficientes de correlación estadísticamente significativos entre la población de CD3⁺ total y sus diferentes subpoblaciones en los BAL del lote 2. Además, la población de linfocitos B presente en BAL se correlacionó positivamente con los linfocitos T colaboradores y con los dobles negativos, siendo los valores de R de 0'83 y 0'75 ($p < 0'05$), respectivamente.

● Lote 3.

Los porcinos pertenecientes al lote 3 que fueron infectados previamente con tres dosis progresivas de 200, 400 y 800 L3 y posteriormente retados con 1000 L3 de *M. apri*, presentaron los siguientes porcentajes de las poblaciones celulares analizadas:

• En sangre periférica.

Los porcentajes de linfocitos en sangre registrados en los cerdos del lote 3 fueron muy bajos respecto a los niveles controles. Incluso, a partir del día 14 post-infección experimentaron un descenso muy significativo que continuó de forma progresiva hasta el final del experimento. El coeficiente de correlación detectado entre los linfocitos B y T fue significativamente positivo ($R = 0'61$; $p < 0'05$). Asimismo, los linfocitos B se correlacionaban positivamente con los CD4⁺ ($R = 0'64$; $p < 0'05$). En cambio, la población de los monocitos sanguíneos presentó unos niveles iniciales ($8'1 \pm 5'5\%$) muy elevados respecto a los valores controles, manteniéndose hasta el día 35 post-infección. A partir de este momento, se produjo una caída significativa de los mismos del 7%, recuperando al día 84 los niveles controles en sangre periférica ($4'8 \pm 1'1\%$).

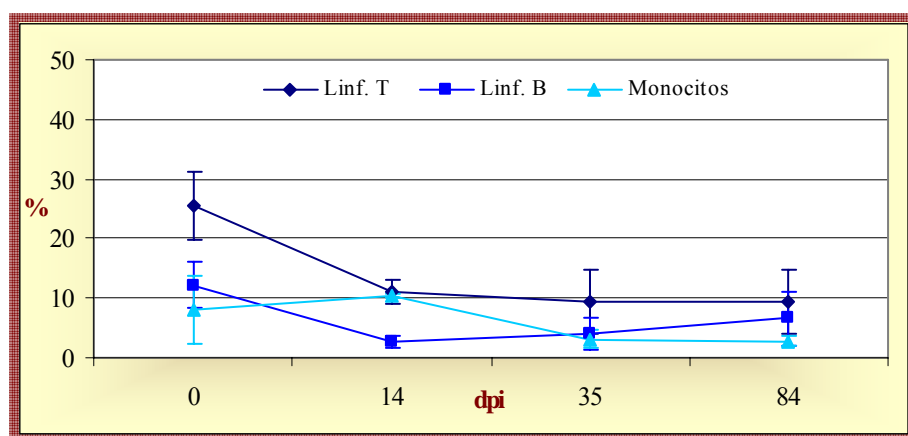


Fig. 4.83. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y monocitos, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de sangre periférica del lote 3.

Así mismo, cuando analizamos los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T se observó un declive progresivo de los mismos (Fig. 4.84.). En las poblaciones de células $CD8^{+hi}$, $CD8^{+lo}$ y $CD8^{+}CD4^{+}$ no se registraron variaciones significativas a lo largo de la experiencia. Los linfocitos T citotóxicos y los $CD8^{-}CD4^{-}$ fueron las subpoblaciones de células de T más abundantes de las analizadas en las muestras de sangre periférica del lote 3. Todas las subpoblaciones celulares $CD3^{+}$ se hallaban altamente correlacionadas con la población de linfocitos T totales ($p < 0.05$). Por lo demás, durante el transcurso de la infección la proporción $CD4^{+}/CD8^{+}$ fue favorable a los linfocitos T citotóxicos de una manera constante.

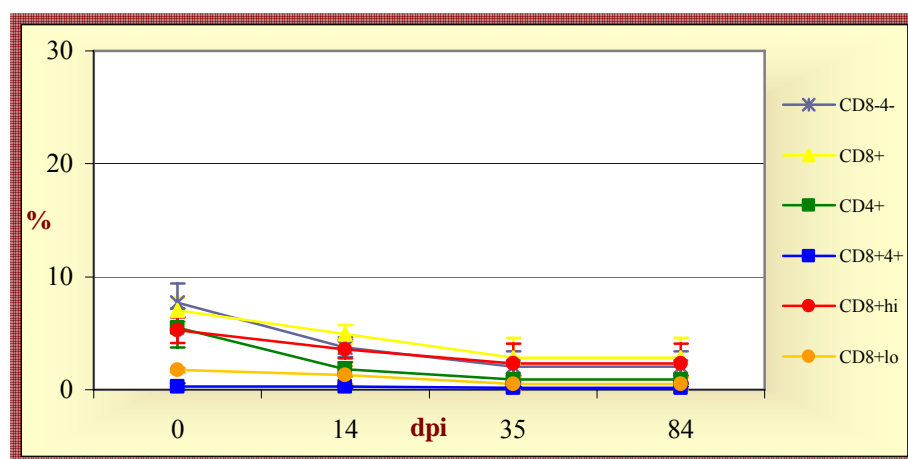


Fig. 4.84. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T ($CD3^{+}$) analizadas en muestras de sangre periférica del lote 3.

- **En ganglio linfático.**

Al inicio de la experiencia, los porcentajes de las poblaciones celulares presentes en los ganglios torácico-pulmonares fueron diferentes a las descritas hasta ahora. Los niveles de linfocitos B y macrófagos fueron especialmente elevados respecto a los controles (Fig. 4.85.).

Al día 14 post-infección la población mayoritaria en los ganglios torácico-pulmonares fueron los linfocitos T ($49 \pm 0.5\%$), seguidos por los macrófagos ($28.9 \pm 14.0\%$) y los linfocitos B ($13.4 \pm 2.8\%$). Sin embargo, al día 35 post-infección, mientras que los macrófagos mantuvieron esos elevados niveles, los linfocitos B experimentaron un significativo aumento. Por el contrario, las células T experimentaron un significativo descenso, del cual, posteriormente se recuperaron hasta alcanzar sus

valores más elevados ($60'9 \pm 4'6\%$). Igualmente, los linfocitos B y los macrófagos lograron recuperar niveles compatibles con los valores controles detectados.

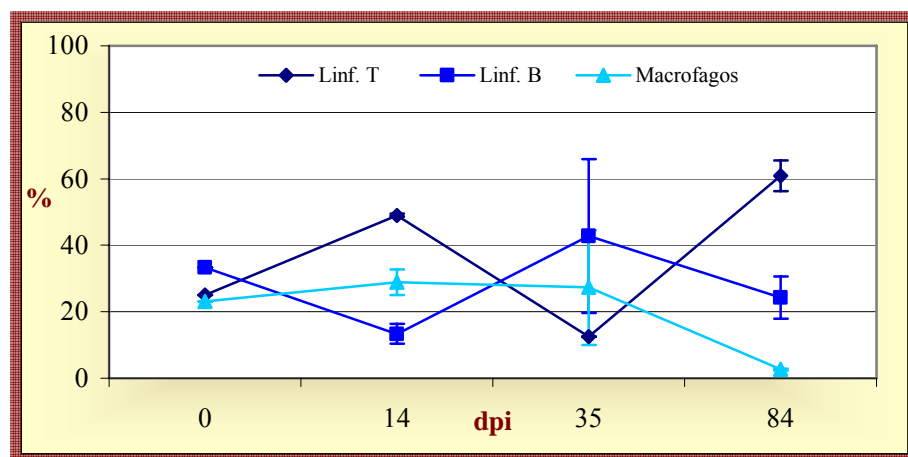


Fig. 4.85. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de ganglio del lote 3.

La evolución que siguen las diferentes subpoblaciones $CD3^+$ analizadas en ganglio es prácticamente idéntica a la ya descrita para los linfocitos T totales. Efectivamente, los resultados obtenidos del factor de correlación entre todas ellas fueron significativamente positivos ($p < 0'05$). Por tanto, se destacaron claramente dos eventos; al día 14 post-infección cuando se registró una subida de todos los porcentajes, menos en las células $CD8^+CD4^-$ que se mantuvieron constantes durante toda la experiencia y al día 84 post-infección, momento en el que se produjo un nuevo incremento de los niveles de linfocitos T. La proporción $CD4^+/CD8^+$ detectada en ganglio fue favorable a las células colaboradoras durante la infección, especialmente al día 84 post-infección. Además, se detectó una correlación negativa entre los linfocitos citotóxicos y los linfocitos B ($R = -0'71$; $p < 0'05$).

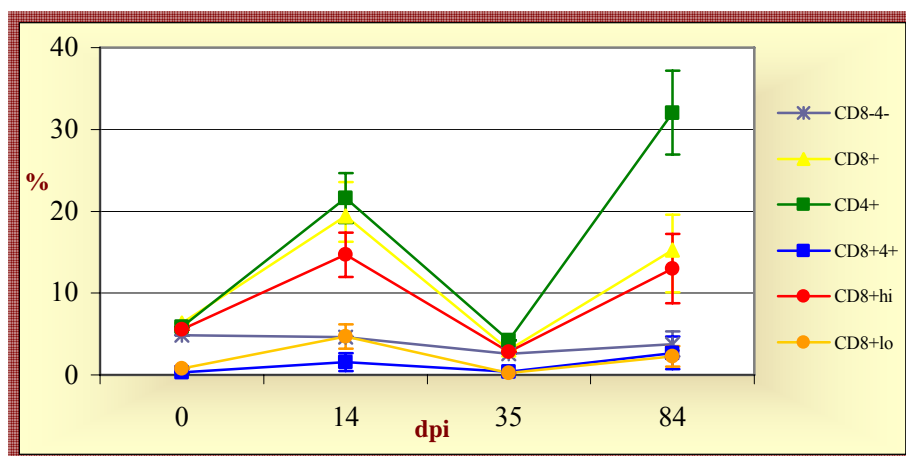


Fig. 4.86. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (CD3+) analizadas en muestras de ganglio del lote 3.

- En BAL.

Los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras de BAL en el lote 3 nos indicaron la existencia de diferencias significativas en las poblaciones de linfocitos B y macrófagos alveolares a lo largo de la infección. Señalando a estas dos poblaciones celulares, como responsables de la inmunorespuesta a nivel pulmonar frente a la infección por *M. apri* en los animales re infectados (Fig. 4.87.).

Durante el desarrollo de la infección no se registraron diferencias significativas en los porcentajes de linfocitos T, ni siquiera respecto a los niveles controles. Los macrófagos alveolares se presentaron en porcentajes superiores a los detectados en los animales controles. Así, entre los días 14 y 35 post-infección se detectó un incremento puntual de más del 20%. Entre la población de linfocitos T y los macrófagos alveolares existe una correlación negativa ($R=-0.91$; $p<0.00$).

Por su parte, los porcentajes de linfocitos B presentes en BAL fueron aumentando progresivamente hasta alcanzar su máximo ($4.45 \pm 0.4\%$) al día 35 post-infección.

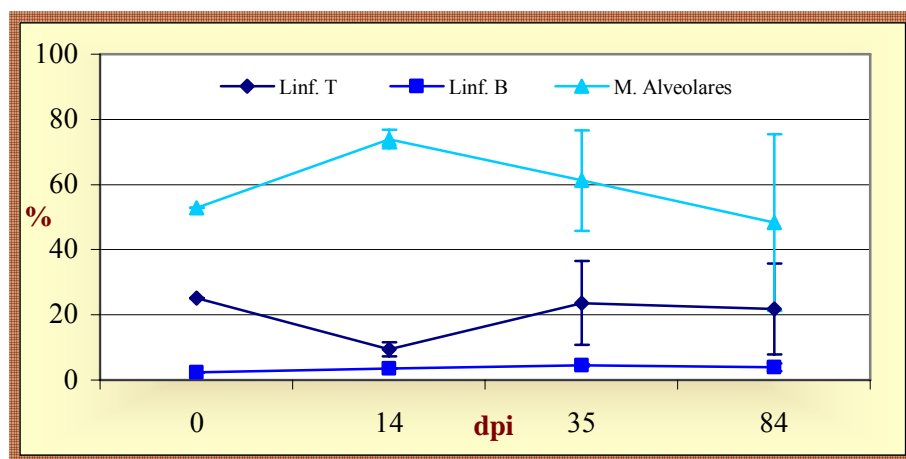


Fig. 4.87. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos alveolares, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de BAL del lote 3.

La población de células T más destacada, especialmente al inicio de la experiencia fueron los linfocitos $CD8^+CD4^-$ que presentaron unos porcentajes muy superiores a los niveles controles, aunque a medida que fue avanzando la infección éstos disminuyeron. La población total de linfocitos T se correlacionaba positivamente con la subpoblación de dobles negativos y con los linfocitos T colaboradores ($p < 0.05$). En el resto de las subpoblaciones $CD3^+$ no se detectaron diferencias significativas.

La proporción celular $CD4^+/CD8^+$ se mantuvo constante durante el estudio a favor de los linfocitos T citotóxicos, aunque los niveles generales de éstos fueron significativamente inferiores a los mostrados por el grupo control.

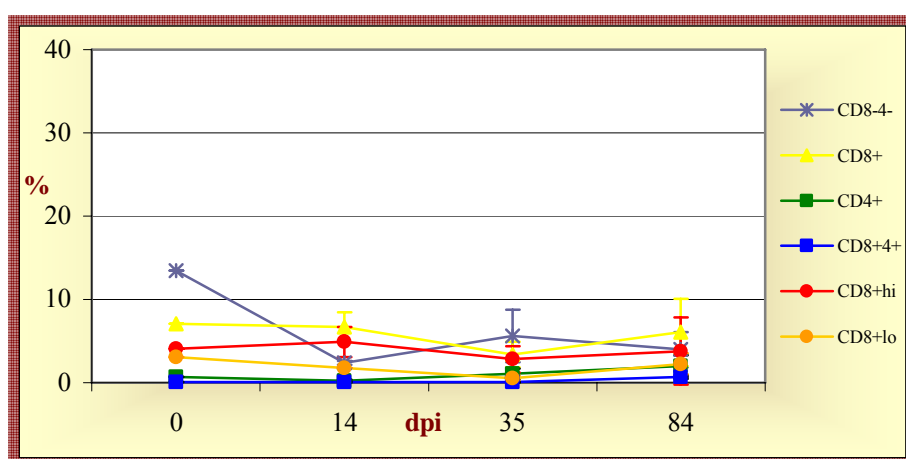


Fig. 4.88. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T ($CD3^+$) analizadas en muestras de BAL del lote 3.

● Lote 4.

La evolución de las diferentes poblaciones celulares analizadas a lo largo del estudio en el lote 4, constituido por los animales preinmunizados con inóculos elaborados a partir de antígenos larvarios y de adultos de *M. apri* y retados, posteriormente con 1000 L3, se muestra en las siguientes gráficas:

- En sangre periférica.

Los porcentajes de monocitos circulantes entre el día 0 y 14 presentaron unos niveles ligeramente superiores a los registrados en los animales controles ($\Delta 10\%$). Sin embargo, a partir del día 14 post-infección las poblaciones linfocitarias experimentaron un importante descenso a nivel periférico. En el caso de los linfocitos B, se observaron unos niveles bajos, entre 1'5-2'7% desde el día 14 tras la infección que se mantuvieron hasta el final del ensayo. Por su parte, en la población de linfocitos T se advirtió una evolución contraria a la descrita para el resto de grupos. Desde el día 35 se detectó un incremento progresivo, especialmente significativo al día 84 post-infección cuando fueron alcanzados los niveles máximos ($34'7 \pm 6'5\%$).

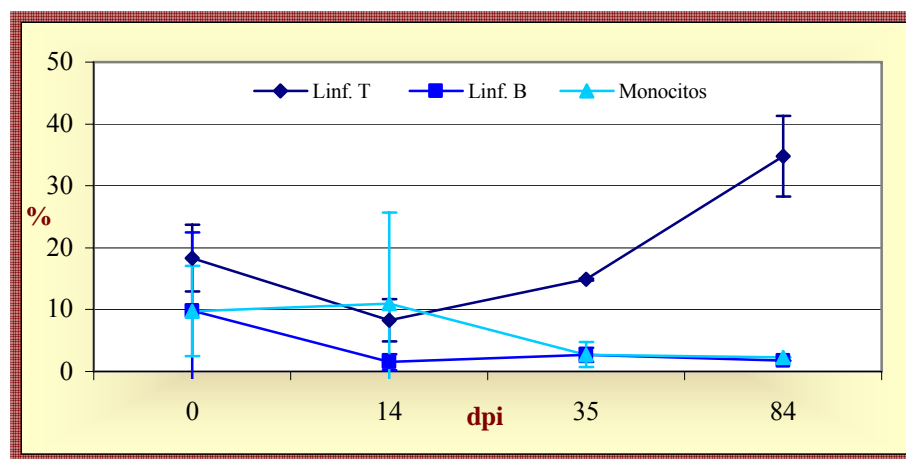


Fig. 4.89. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y monocitos, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de sangre periférica del lote 4.

Se detectaron correlaciones positivas estadísticamente significativas ($p < 0'05$) entre las diferentes subpoblaciones $CD3^+$ y la población total de células T. Así, el incremento señalado en la población total de linfocitos $CD3^+$ al día 84 post-infección, se reflejó en todas las subpoblaciones consideradas en el estudio (Fig. 4.90.).

Conjuntamente, se registró un significativo descenso durante los días 14 y 35 post-infección en los porcentajes de las células $CD4^+$, $CD8^+$ y $CD8^{hi}$.

En las muestras sanguíneas del lote 4, aunque el ratio $CD4^+/CD8^+$ se mantuvo a favor de los linfocitos T citotóxicos durante toda la infección, la diferencia entre ambas poblaciones resultó mínima.

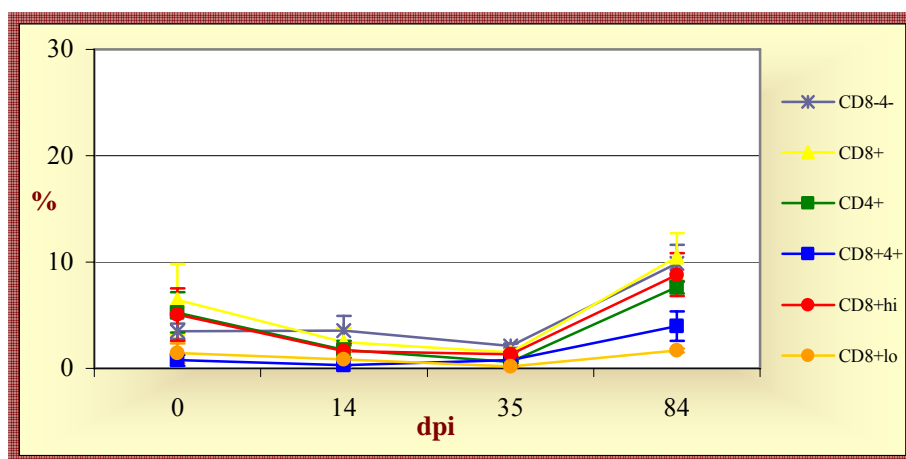


Fig. 4.90. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T ($CD3^+$) analizadas en muestras de sangre periférica del lote 4.

- **En ganglio linfático.**

La población de macrófagos en ganglio durante los días 14 y 35 post-infección experimentó un significativo aumento, del 40% respecto a sus niveles iniciales y finales. En relación a los linfocitos B, debemos destacar el pico registrado al día 35 post-infección, momento en el que se alcanzaron sus niveles más elevados ($47.4 \pm 4.3\%$). La población de linfocitos T descrita al comienzo de la experiencia (0 dpi) resultó especialmente elevada respecto a los niveles controles. A partir de este momento, los valores detectados para las células $CD3^+$ disminuyeron significativamente al día 14 y 35 post-infección, produciéndose una bajada de más del 60%. Finalmente, los niveles de linfocitos T se recuperaron, alcanzándose un porcentaje del $57.1 \pm 11.2\%$. La correlación detectada entre los linfocitos T y los macrófagos fue negativa ($R = -0.86$; $p < 0.00$), al igual que entre los linfocitos T y B ($R = -0.70$; $p < 0.05$).

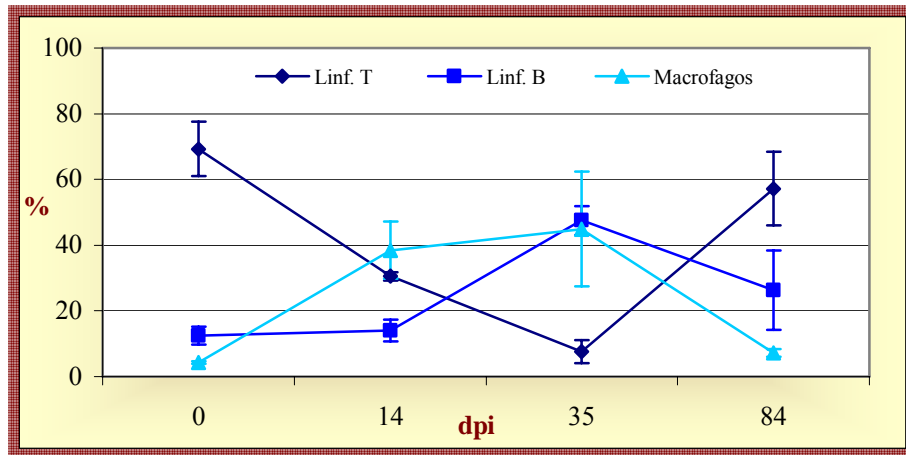


Fig. 4.91. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de ganglio del lote 4.

Las subpoblaciones de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$, sobre todo aquellos que expresan con alta intensidad el antígeno CD8, siguieron la misma tendencia al descenso mostrada por la población total de células $CD3^+$ durante los días 14 y 35 post-infección. El ratio $CD4^+/CD8^+$ en las muestras ganglionares se manifestó a favor de los linfocitos colaboradores, principalmente al día 84 post-infección.

En el caso de los porcentajes registrados de la población de células $\gamma\delta$ ($CD8^- CD4^-$) no se detectaron diferencias significativas. Por su parte, los linfocitos T dobles positivos que coexpresan CD4 y CD8 mostraron un aumento significativo de su porcentaje respecto a la población $CD3^+$ total al final de la experiencia.

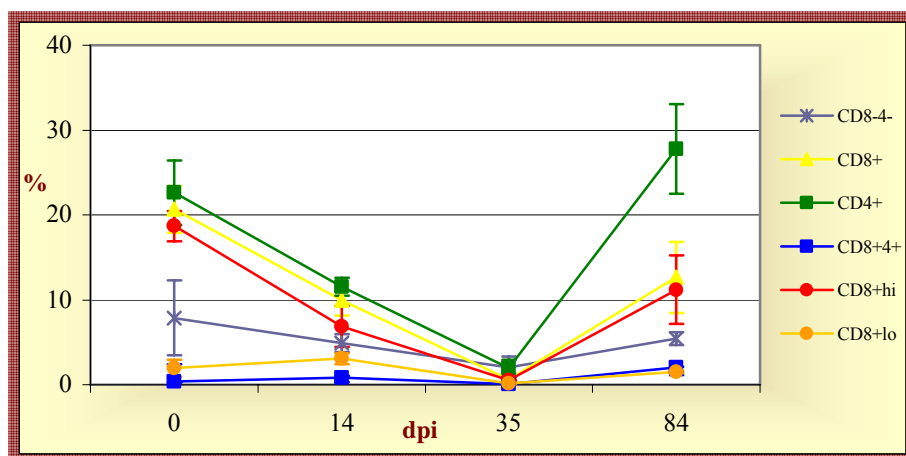


Fig. 4.92. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T ($CD3^+$) analizadas en muestras de ganglio del lote 4.

- En BAL.

La población celular más abundante en los BAL, los macrófagos alveolares, experimentaron un importante descenso de su presencia desde el inicio ($67'6 \pm 9'8\%$) hasta el final ($34'6 \pm 23'5\%$) de la experiencia.

Los porcentajes de los linfocitos T a nivel pulmonar durante los días 0 y 35 post-infección se hallaron ligeramente bajos respecto a los niveles normales. Sin embargo, al final de la infección (84 dpi) éstos linfocitos CD3⁺ incrementaron su porcentaje hasta un 30%. En el caso de la población de células B detectadas en las muestras de BAL del lote 4 se registró un incremento significativo entre los días 14 y 35 post-infección, hasta alcanzar unos porcentajes de $3'58 \pm 0'84\%$.

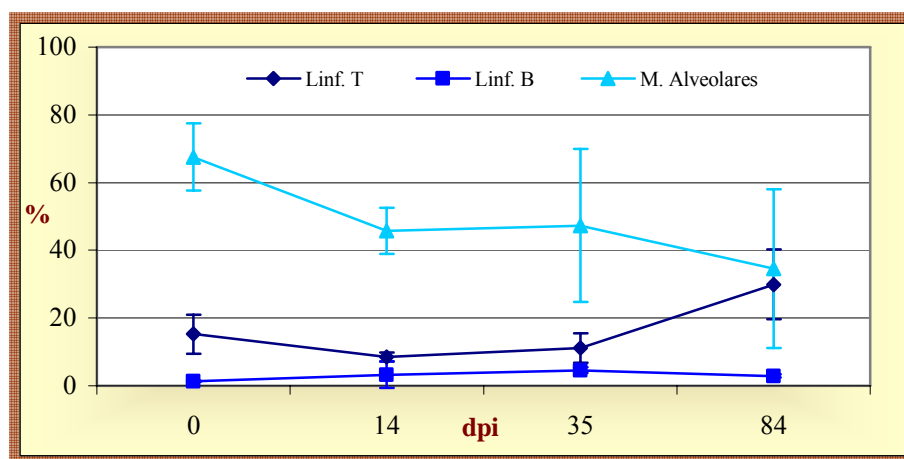


Fig. 4.93. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos alveolares, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de BAL del lote 4.

Tras el análisis de los resultados obtenidos de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T presentes en BAL, se observó que los niveles, fundamentalmente de los CD8⁺ fueron muy inferiores a lo niveles detectados en los animales controles. Aún así, la proporción CD4⁺/CD8⁺ se mantuvo favorable a los linfocitos T citotóxicos durante toda la infección. La población de linfocitos T dobles negativos a partir del día 14 y hasta el final de la infección experimentaron un evidente descenso de sus porcentajes respecto del total de células CD3⁺, desde $7'5 \pm 4'9\%$ hasta un $3'1 \pm 0'8\%$.

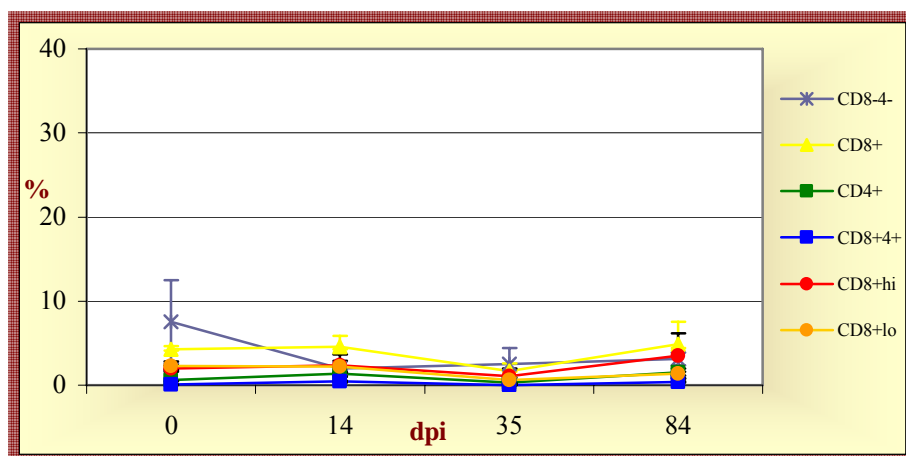


Fig. 4.94. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (CD3+) analizadas en muestras de BAL del lote 4.

● Lote control.

La evolución de los porcentajes medios de las diferentes poblaciones celulares analizadas en las muestras de sangre periférica, ganglio y BAL en los animales utilizados como grupo control, a los que no se les practicó ningún tipo de tratamiento, se exponen a continuación:

- En sangre periférica.

En los animales utilizados como controles, los niveles medios detectados de los porcentajes de linfocitos T fueron de $26'86 \pm 12'00\%$; de linfocitos B de $8'34 \pm 4'80\%$ y de monocitos de $4'50 \pm 2'88\%$. A medida que la experiencia avanzaba se observó un descenso de los niveles periféricos de linfocitos, principalmente de la subpoblación T. En cambio, todo lo contrario ocurrió con los monocitos sanguíneos que aumentaron al día 14 post-infección.

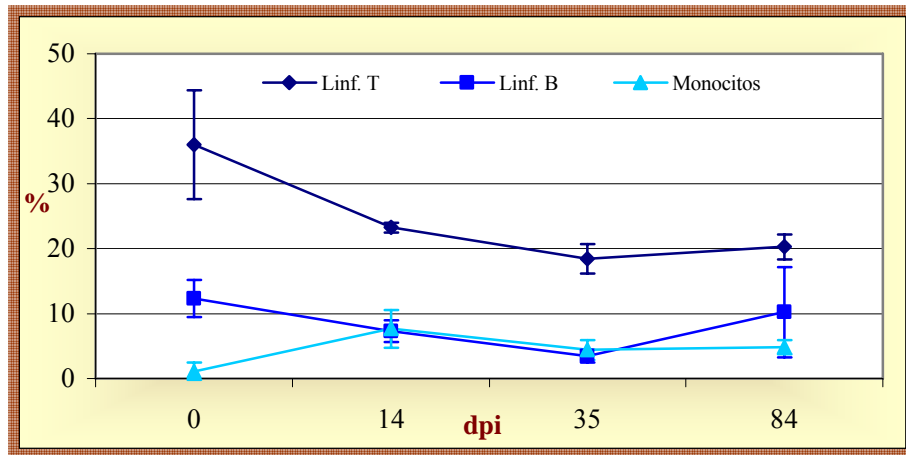


Fig. 4.95. Evolución de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y monocitos, respecto al total de las células adquiridas, en muestras de sangre periférica del lote Control.

Los linfocitos T colaboradores, citotóxicos, fundamentalmente los $CD8^{hi}$ y los dobles negativos experimentaron un significativo descenso de sus porcentajes al día 14 post-infección. A partir de este momento sus niveles se mantuvieron constantes hasta el final de la experiencia. Por su parte, la población de células T que coexpresan los antígenos CD8 y CD4 no experimentó ninguna variación significativa durante el transcurso del ensayo. El ratio celular $CD4^{+}/CD8^{+}$ en las muestras sanguíneas del lote control se mostró a favor de los linfocitos T citotóxicos, especialmente al día 0 post-infección.

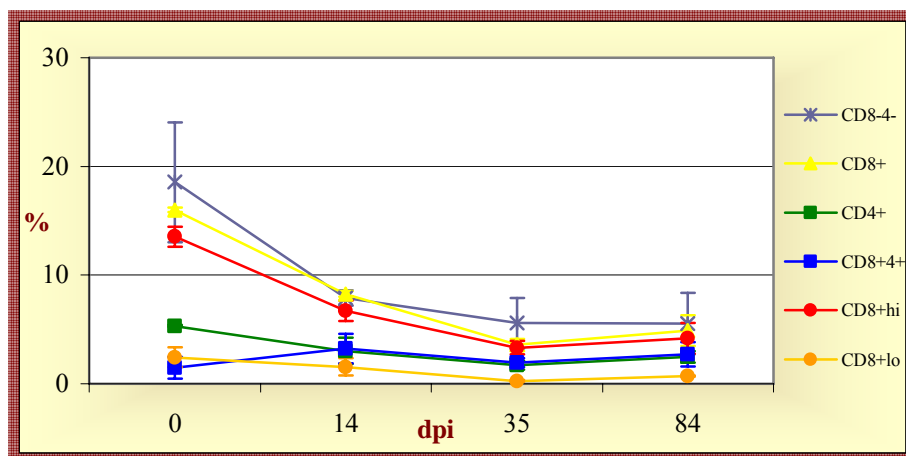


Fig. 4.96. Evolución de los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T ($CD3^{+}$) analizadas en muestras de sangre periférica del lote Control.

- En ganglio linfático.

Los porcentajes de las poblaciones linfocitarias en las muestras de ganglio torácico-pulmonar en el grupo control aumentaron a lo largo del tiempo. En cambio, los macrófagos experimentaron una ligera disminución de sus niveles en ganglio. Aún así, ninguna de las variaciones de las proporciones celulares registradas fue significativa.

Tabla 4.4. Resultados de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos en las muestras de ganglio del lote control.

dpi	Linfocitos T (%)	Linfocitos B (%)	Macrófagos (%)
0	29'78±20'46	16'60±12'31	6'40±0'50
84	50,53±10'06	25'37±6'23	4'80±1'67
Total	42'23±16'87	21'86±8'97	5'43±1'49

La proporción celular $CD4^+/CD8^+$ en las muestras ganglionares fue favorable a los linfocitos T colaboradores, especialmente al final de la experiencia. El aumento detectado en los linfocitos T citotóxicos a lo largo del tiempo se debe, principalmente a la subpoblación de los $CD8^{+hi}$, puesto que los valores registrados para los $CD8^{+lo}$ fueron idénticos al inicio y final del ensayo.

Las únicas diferencias significativas descritas en los porcentajes celulares $CD3^+$ analizados se debieron a los linfocitos T dobles positivos que experimentaron un incremento desde el comienzo de la experiencia del 8%.

Tabla 4.5. Resultados de los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T ($CD3^+$) en las muestras de ganglio del lote control.

dpi	$CD8^+$ (%)	$CD8^{+hi}$ (%)	$CD8^{+lo}$ (%)	$CD4^+$ (%)	$CD8^+CD4^+$ (%)	$CD8^-CD4^-$ (%)
0	6'75±3'72	5'29±2'78	1'46±0'95	7'50±5'50	0'58±0'45*	3'59±2'07
84	9'21±2'52	7'82±2'13	1'39±0'43	16,33±5'94	9'05±2'55*	4'20±0'49
Total	8'22±2'91	6'81±2'47	1'42±0'56	12'78±6'99	5'66±4'99	3'95±1'14

(*) La diferencia es significativa ($p < 0'05$).

- En BAL.

En las muestras de BAL, no se registraron diferencias significativas entre los porcentajes detectados al día 0 y 84 post-infección. No obstante, se observó un ligero descenso de la población de los macrófagos alveolares al final de la experiencia. En cambio, los linfocitos T y B se mantuvieron constantes durante los 84 días que duró el experimento.

Tabla 4.6. Resultados de los porcentajes de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos alveolares en las muestras de BAL del lote control.

dpi	Linfocitos T (%)	Linfocitos B (%)	M. alveolares (%)
0	18'27±1'53	2'73±1'70	54'35±12'49
84	18'99±9'97	2'88±2'04	47'47±28'41
Total	18'70±7'10	2'81±1'95	50'22±21'37

Los linfocitos T citotóxicos, incluidos los CD8^{hi} y CD8^{lo}, así como la población celular de dobles negativos mostraron un ligero descenso a lo largo del tiempo. Sin embargo, la población de linfocitos T colaboradores y de dobles positivos experimentaron una subida no significativa de sus porcentajes medios al día 84 post-infección. Aún así, el ratio CD4⁺/CD8⁺ fue favorable durante toda la experiencia a los linfocitos T citotóxicos a nivel pulmonar.

Tabla 4.7. Resultados de los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T (CD3⁺) en las muestras de ganglio del lote control.

dpi	CD8 ⁺ (%)	CD8 ^{hi} (%)	CD8 ^{lo} (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁻ CD4 ⁻ (%)
0	12'99±4'53	9'77±5'11	3'22±0'58	0'96±0'64	0'41±0'91	3'52±2'79
84	6'16±2'65	4'48±1'85	1'68±0'80	1'12±1'05	0'85±0'54	1'63±1'49
Total	8'89±4'76	6'59±4'08	2'30±1'06	1'05±0'75	0'67±0'45	2'38±2'03

4.5.1.5.- Correlaciones entre los resultados parasitológicos y de la respuesta celular.

Los resultados de los coeficientes de correlación entre las principales poblaciones celulares analizadas y los parámetros parasitológicos, estadísticamente significativos y aquellos que están cercanos a la significación registrados en los animales infectados, se exponen de forma resumida en el siguiente cuadro:

Coeficiente de correlación de Pearson	(R)	Significación (p)
Larvas totales - Linfocitos B en Ganglio	0'763	0'006
Larvas totales - Linfocitos T en Ganglio	-0'484	0'1
Larvas totales - Linfocitos CD4 ⁺ en Ganglio	-0'702	0'016
Larvas totales - Linfocitos CD8 ⁺ en Ganglio	-0'495	0'1
Adultos totales - Linfocitos CD4 ⁻ CD8 ⁻ en Ganglio	0'573	0'005
Huevos en heces – Macrófagos en Ganglio	-0'241	0'14
Manchas de leche - Linfocitos T en Ganglio	-0'301	0'05
Manchas de leche - Linfocitos B en Ganglio	0'276	0'07
Huevos en heces – Macrófagos alveolares en BAL	-0'45	0'005
Huevos en heces – Linfocitos B en BAL	0'276	0'09
Manchas de leche – Macrófagos alveolares en BAL	0'281	0'07
Adultos – Linfocitos B en SP	0'501	0'1
Huevos en heces – Linfocitos B en SP	0'260	0'1
Manchas de leche - Monocitos en SP	-0'689	0'009
Eosinófilos - Linfocitos CD4 ⁺ en SP	-0'193	0'16
Eosinófilos - Linfocitos CD4 ⁺ CD8 ⁺ en SP	-0'241	0'08

4.5.2.- Respuesta inmune humoral.

La respuesta inmunológica de tipo humoral desarrollada en los cerdos infectados con *M. apri* ha sido analizada mediante la técnica inmunoenzimática ELISA, utilizando para ello, diferentes clases de inmunoglobulinas, como son la IgM, IgG, IgG₁ e IgG₂.

Como ha sido expuesto en el capítulo de material y métodos (3.13.), primeramente, procedimos a la estandarización de dicha técnica para los dos antígenos

obtenidos, así como para los diferentes conjugados utilizados. Las condiciones de elección fijadas, para la consecución del método, se muestran de forma resumida en la siguiente tabla:

Tabla 4.8. Condiciones idóneas estandarizadas para el desarrollo de la técnica ELISA, para los antígenos e inmunoglobulinas testadas.

		IgG	IgG₁	IgG₂	IgM
ASA	Concentración de ASA	3 µg/ml	3 µg/ml	3 µg/ml	3 µg/ml
	Dilución del suero	1/1000	1/200	1/50	1/400
	1 ^{er} Conjugado (Anti-porcine)	1/10000	1/400	1/100	1/500
	2 ^o Conjugado (anti-mouse IgG)	---	1/5000	1/5000	1/5000
ASL	Concentración de ASL	3 µg/ml	3 µg/ml	3 µg/ml	3 µg/ml
	Dilución del suero	1/1000	1/100	1/100	1/400
	1 ^{er} Conjugado (Anti-porcine)	1/10000	1/400	1/200	1/500
	2 ^o Conjugado (anti-mouse IgG)	---	1/5000	1/5000	1/5000

Para la interpretación de los resultados obtenidos en el test ELISA, se han tomado los valores de las densidades ópticas (D.O.) obtenidas para cada animal, que se corresponde con la media de las D.O. del duplicado testado. A partir de estos resultados, se calcularon los valores promedio de las D.O., para cada lote experimental.

4.5.2.1.- Estudio de la evolución de la IgM.

La IgM es el isotipo predominante en las respuestas inmunitarias primarias. Además, es conocido que su papel defensivo es primordial en el desarrollo de la respuesta humoral, aunque su grado de afinidad para reaccionar con el antígeno es bajo.

La evolución del isotipo IgM para cada uno de los antígenos analizados se muestran en las figuras 4.97. y 4.98. Como se puede observar, el comportamiento de la IgM es bastante heterogéneo en todos los lotes examinados a lo largo del periodo de estudio, incluido el grupo control. En líneas generales, la reactividad descrita frente a los dos antígenos ensayados con esta inmunoglobulina fue muy similar, siendo las D.O. ligeramente superiores para ASL en todos los lotes, excepto en el control.

Concretamente, las D.O. medias registradas para cada grupo, frente a ASL a lo largo del estudio, presentaron pocas diferencias significativas. Al día 7 post-infección se

observa una evidente bajada de la IgM en sangre periférica de los animales pertenecientes al lote 1. Sin embargo, al día 28 se registró un aumento significativo de los niveles de IgM, en los lotes 4 y 2, respecto al grupo control. Prácticamente, fue al final de la experiencia (70 dpi), cuando se evidenciaron en todos los lotes, niveles significativamente más elevados que los del grupo control.

Los niveles de IgM frente a ASA experimentaron pocas variaciones significativas a lo largo de la infección. Fue destacable la baja reactividad detectada por ASA en el lote 1 a lo largo de toda la experiencia (0, 7, 42, 49, 56, 63 y 77 dpi; $p < 0,05$). Al día 0, se observó que los lotes previamente infectados o inmunizados (lote 3 y 4) presentaron valores más elevados que los registrados en los demás grupos. Sin embargo, en el lote 4 no se volvió a detectar un aumento significativo de los niveles de IgM, hasta el día 63 post-infección. Éstos se mantuvieron hasta el día 77, en un rango de D.O. superior a 1'00.

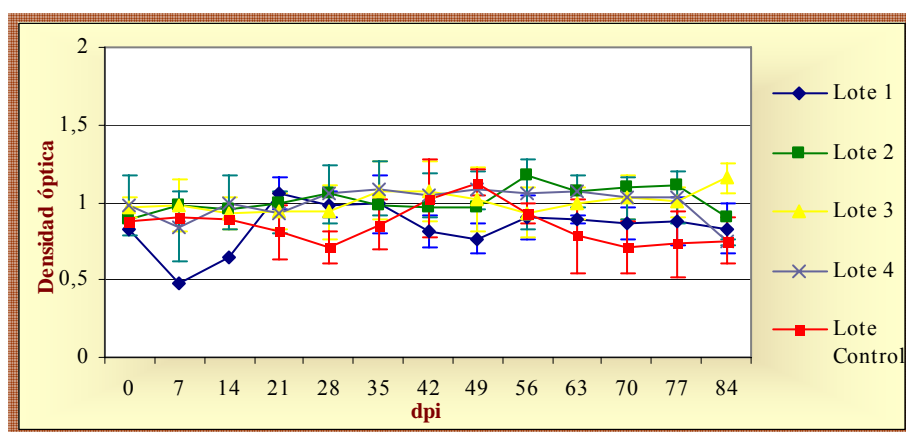


Fig. 4.97. Evolución media de los niveles de IgM frente a ASL en los diferentes lotes objeto de estudio a lo largo de la experiencia.

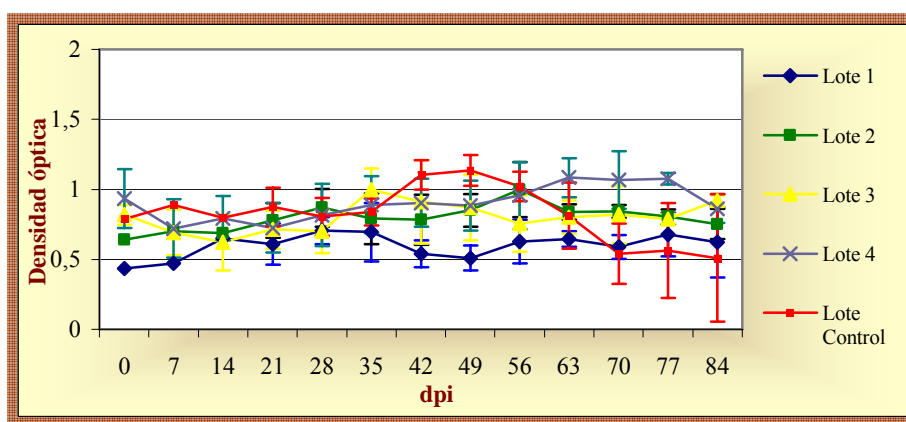


Fig. 4.98. Evolución media de los niveles de IgM frente a ASA en los diferentes lotes objeto de estudio a lo largo de la experiencia.

4.5.2.2.- Estudio de la evolución de la IgG.

La IgG es la más importante y abundante en la especie porcina, su papel es vital en las respuestas inmunitarias frente a la invasión de cualquier agente extraño.

En conjunto, la respuesta humoral medida a partir de los niveles medios de las D.O. de IgG frente a ASL en los diferentes grupos experimentales, se clasifica en cuatro grupos diferenciados estadísticamente ($p < 0.05$), los cuales son presentados en la tabla 4.9.

Tabla 4.9. Valores medios de las D.O. de IgG frente a ASL en los diferentes lotes experimentales.

Respuesta de IgG muy elevada	Lote 3	0.75 ± 0.32
Respuesta de IgG elevada	Lote 4	0.63 ± 0.33
Respuesta de IgG intermedia	Lote 1	0.44 ± 0.18
	Lote 2	0.44 ± 0.17
Sin respuesta de IgG	Lote control	0.18 ± 0.09

En el caso de los valores medios de las D.O. registradas de IgG frente a ASA, se definen cuatro grupos significativamente diferentes ($p < 0.05$), mostrados en la tabla 4.10.

Tabla 4.10. Valores medios de las D.O. de IgG frente a ASA en los diferentes lotes experimentales.

Respuesta de IgG muy elevada	Lote 4	0.60 ± 0.29
Respuesta de IgG elevada	Lote 3	0.51 ± 0.24
Respuesta de IgG intermedia	Lote 1	0.41 ± 0.18
	Lote 2	0.35 ± 0.14
Sin respuesta de IgG	Lote control	0.17 ± 0.12

La evolución de los niveles periféricos de IgG, frente a los dos tipos de antígenos somáticos elaborados a partir de los estados larvarios y adultos de *M. apri*, detectados en los animales pertenecientes a los diferentes grupos del estudio, quedan reflejados en las figuras 4.99. y 4.100.

Al inicio de la experiencia (0 dpi), no se detectaron diferencias significativas en las D.O. registradas frente a ASL y ASA, entre el grupo control y los lotes 1 y 2. En cambio, se describieron D.O. muy elevadas, tanto en el lote previamente infectado (Lote 3) como en el inmunizado (Lote 4) al día 0. Las D.O. registradas para el lote 3 fueron significativamente superiores, al enfrentar los sueros de estos animales al antígeno larvario. Además, en el lote 3 se produjo un aumento progresivo, hasta alcanzar sus niveles máximos de IgG al día 14 post-infección ($1'19 \pm 0'14$), cuando se utiliza como base antigénica ASL. Y entre el día 21 y 28 post-infección ($0'69 \pm 0'07$ y $0'76 \pm 0'16$), cuando el antígeno usado procedía de ejemplares adultos del nematodo.

Los resultados de las D.O. detectadas durante las dos primeras semanas tras la infección, mostraron un comportamiento diferente en función del antígeno empleado en el análisis inmunoenzimático. Así, las D.O. medias de IgG frente a ASL en los animales reinfectados, fueron significativamente más elevadas que las mostradas por los porcinos inmunizados. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa entre el lote 3 y 4 cuando se utilizó ASA como antígeno.

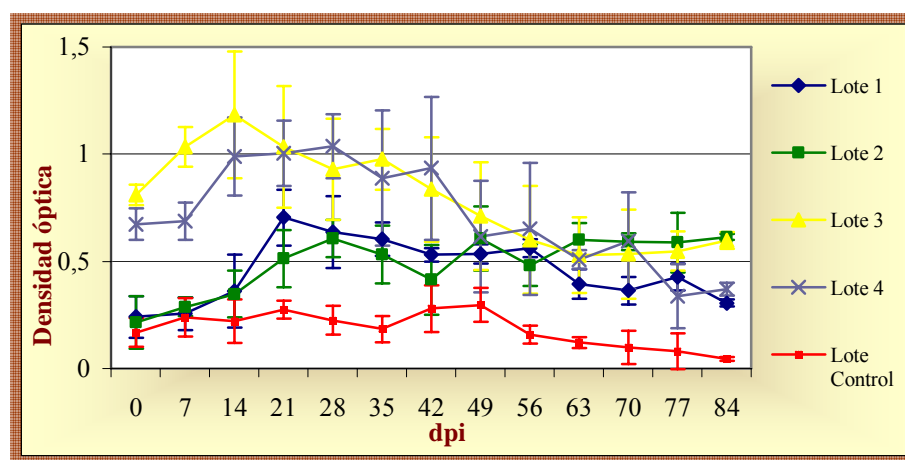


Fig. 4.99. Evolución media de los niveles de IgG frente a ASL en los diferentes lotes objeto de estudio a lo largo de la experiencia.

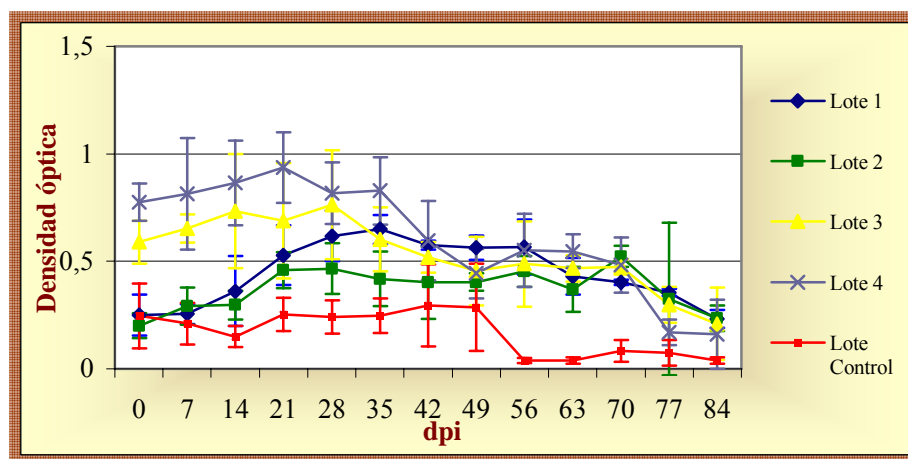


Fig. 4.100. Evolución media de los niveles de IgG frente a ASA en los diferentes lotes objeto de estudio a lo largo de la experiencia.

Respecto a la evolución de los niveles de IgG desarrollados por los lotes que recibieron una única dosis infectiva de *M. apri* (Lotes 1 y 2), cabe destacar, que la intensidad de la respuesta humoral descrita en ambos lotes fue muy similar. No obstante, el lote 1 presentó D.O. más elevadas que el lote 2 al principio de la experiencia.

El comienzo de la respuesta inmune humoral en estos lotes primoinfectados, se fijó al día 21 post-infección, fecha en la que se hallaron diferencias significativas de los niveles periféricos de IgG, respecto al del grupo control. Además, estos niveles máximos de IgG se detectaron frente a ASL y ASA, en el lote 2. Por su parte, en el lote 1, los valores más elevados frente a ASL, se produjeron al día 21 y frente a ASA, al día 35 post-infección.

La respuesta humoral desencadenada por la IgG en los lotes 3 y 4, frente a ASL y ASA, fue más intensa y duradera, que la desarrollada por los lotes 1 y 2. De cualquier manera, a partir del día 21 post-infección, se observaron diferencias entre los valores medios de IgG de todos los grupos analizados, respecto al grupo control, hasta el final de la experiencia.

4.5.2.3.- Estudio de la evolución de la IgG₁.

La IgG₁ es una de las cinco subclases definidas del isotipo IgG en la especie porcina. Se caracteriza por su presencia en las respuestas inmunes T-dependientes del tipo Th2, ya que, se ha demostrado que la expresión del isotipo IgG₁ está controlada por citoquinas del perfil Th2. Concretamente, se ha observado que la IL-4 producida por los linfocitos CD4⁺ Th2 es capaz de inducir a las células B, para diferenciarse preferentemente, en

células plasmáticas que segreguen anticuerpos del isotipos IgG₁ (Finkelman *et al.*, 1997).

Los valores medios de las D.O. de IgG₁ frente al antígeno larvario, definieron tres intensidades de respuesta. Los grupos estadísticos, significativamente diferentes ($p < 0.05$), se muestran en la tabla 4.11.

Tabla 4.11. Valores medios de las D.O. de IgG₁ frente a ASL en los diferentes lotes experimentales.

Respuesta de IgG ₁ muy elevada	Lote 3	0'97 ± 0'75
	Lote 1	0'48 ± 0'54
Respuesta de IgG ₁ intermedia	Lote 2	0'32 ± 0'31
	Lote 4	0'28 ± 0'38
Sin respuesta de IgG ₁	Lote control	0'03 ± 0'08

Por su parte, los grupos estadísticos significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), descritos para los niveles medios de IgG₁ frente a ASA, se muestran en la tabla 4.12.

Tabla 4.12. Valores medios de las D.O. de IgG₁ frente a ASA en los diferentes lotes experimentales.

Respuesta de IgG ₁ elevada	Lote 4	0'53 ± 0'49
	Lote 3	0'44 ± 0'36
Respuesta de IgG ₁ intermedia	Lote 1	0'43 ± 0'42
	Lote 2	0'34 ± 0'36
Sin respuesta de IgG ₁	Lote control	0'02 ± 0'06

La evolución de las D.O. detectadas para IgG₁ frente a ASA y ASL a lo largo del estudio, se muestra en las figuras 4.101. y 4.102. Como se puede apreciar *a priori*, las tendencias seguidas por los valores medios de la IgG₁ detectados en los lotes 3 y 4, para ambos antígenos fue muy diferente.

El grupo de animales re infectados (Lote 3) mostró valores de IgG₁, significativamente mayores que el resto de los grupos desde el día 0 de la experiencia. El nivel máximo de D.O. de esta subclase (1'71±0'15), se detectaron al día 14 en el lote 3. Además, esta situación de predominancia se mantiene hasta el día 49 post-infección,

fecha a partir de la cual no se observaron diferencias significativas de las D.O. medias registradas entre los cuatro lotes experimentales.

A partir del día 14 post-infección, se registró un significativo aumento de los valores de IgG₁ frente a ASL en el lote 4, alcanzándose los niveles más elevados ($0'64 \pm 0'62$) al día 35 post-infección. Posteriormente, fueron descendiendo paulatinamente, hasta el día 42 ($0'31 \pm 0'24$), manteniendo estos valores hasta el final de la experiencia.

El comienzo de la respuesta inmune humoral desarrollada por IgG₁ en los lotes primoinfectados (Lotes 1 y 2) se produjo entre la 2^a y 3^a semana tras la infección. Este momento coincide con los valores máximos de las D.O. de IgG₁ frente a ASL en el lote 1. En cambio, los niveles máximos registrados en el lote 2, no se produjeron hasta el día 28 post-infección ($0'65 \pm 0'44$). A partir de este momento, los niveles medios de IgG₁ registrados en los lotes 1 y 2, comenzaron a disminuir. Tanto el lote 1 como el lote 2, formaron un único grupo estadístico significativamente diferente ($p < 0'05$), a los valores controles hasta el final del estudio (77 dpi). Previamente, durante el periodo comprendido entre el día 21 y 49 post-infección, se establecieron de forma evidente los lotes estadísticos mostrados en la tabla 4.10.

Finalmente, desde el día 77 post-infección no se registraron diferencias significativas de las D.O. medias entre los lotes infectados y control. Por ello, fijamos en ese momento de la infección, el fin de la respuesta inmune humoral desencadenada por IgG₁.

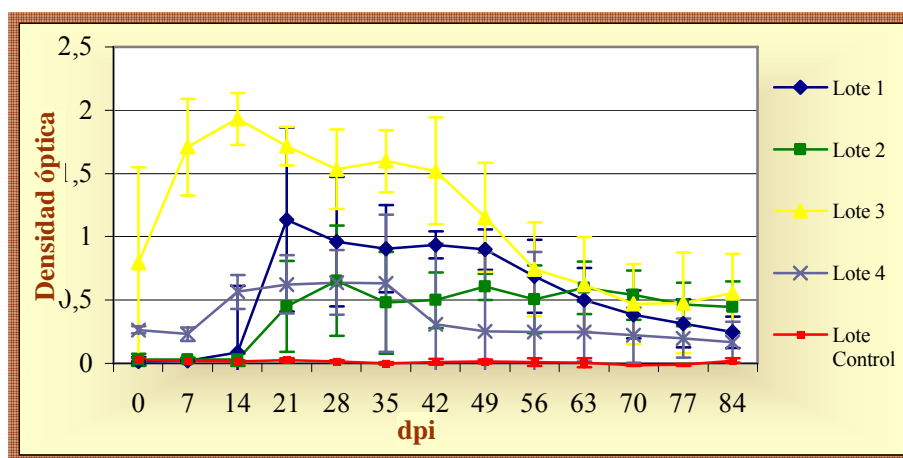


Fig. 4.101. Evolución media de los niveles de IgG₁ frente a ASL en los diferentes lotes objeto de estudio a lo largo de la experiencia.

Los valores de IgG₁ al enfrentar los sueros a los antígenos de adultos fueron inferiores a los detectados frente al antígeno larvario de *M. apri*. Durante las tres primeras semanas del estudio, se observó una diferencia significativa entre los niveles de IgG₁ manifestados por los lotes de animales re infectados (Lote 3) e inmunizados (Lote 4) y el resto de grupos de la experiencia.

Fue a partir del día 21 post-infección, cuando se evidenció el comienzo de la respuesta desarrollada por la IgG₁ frente a ASA, en los cerdos del lote 1 ($1'004 \pm 0'26$). Por su parte, en los animales del lote 2, fue a partir del día 28 ($0'378 \pm 0'21$), aunque estos no alcanzaron sus niveles más elevados hasta el día 63 post-infección ($0'918 \pm 0'26$). No obstante, el lote 2 desarrolló una respuesta más tardía y menos intensa y mantuvo una tendencia ascendente hasta el final del estudio.

Exceptuando situaciones puntuales, como la significativa bajada de IgG₁ al día 49 en el lote 4, o la subida al día 63 mostrada por el lote 2, desde la 4ª semana post-infección y hasta el final de la experiencia, no se registraron diferencias significativas entre los grupos infectados, a lo largo del estudio.

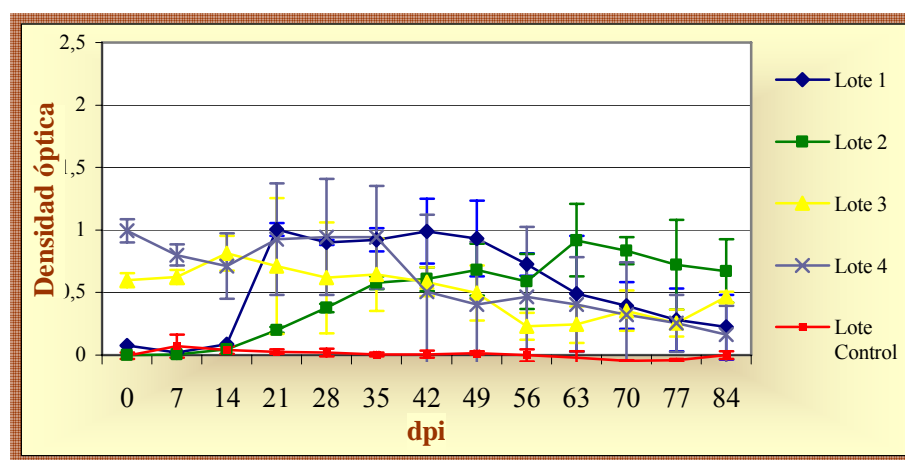


Fig.4.102. Evolución media de los niveles de IgG₁ frente a ASA en los diferentes lotes objeto de estudio a lo largo de la experiencia.

4.5.2.4.- Estudio de la evolución de la IgG₂.

La IgG₂ es otra de las subclases definidas del isotipo IgG, propia de las respuestas inmunes de tipo Th1. Según Urban *et al.* (1996), en general, los agentes intracelulares estimulan este tipo de respuesta Th1, donde el INF- γ es el activador inmune predominante. Esta citoquina inhibe la actividad que la IL-4 desarrolla sobre las células

B, promoviendo que las células plasmáticas sinteticen anticuerpos del tipo IgG₂ (Paul, 1987).

En conjunto, la respuesta humoral desencadenada por la IgG₂ frente al antígeno larvario en los animales pertenecientes a los diferentes lotes, se clasifica en dos grupos estadísticos significativamente diferentes ($p < 0.05$), mostrados en la tabla 4.13.

Tabla 4.13. Valores medios de las D.O. de IgG₂ frente a ASL en los diferentes lotes experimentales.

Respuesta de IgG ₂ elevada	Lote 4	0'70 ± 0'57
	Lote 2	0'33 ± 0'23
Sin respuesta de IgG ₂	Lote 3	0'30 ± 0'30
	Lote 1	0'29 ± 0'21
	Lote control	0'21 ± 0'12

En cambio, la respuesta humoral de IgG₂ frente a ASA en los diferentes lotes experimentales, se encuadra en cuatro grupos diferenciados estadísticamente ($p < 0.05$), los cuales son presentados en la tabla 4.14.

Tabla 4.14. Valores medios de las D.O. de IgG₂ frente a ASA en los diferentes lotes experimentales.

Respuesta de IgG ₂ muy elevada	Lote 4	1'05 ± 0'58
Respuesta de IgG ₂ elevada	Lote 2	0'63 ± 0'34
	Lote 1	0'52 ± 0'35
Respuesta de IgG ₂ intermedia	Lote 3	0'40 ± 0'23
Sin respuesta de IgG ₂	Lote control	0'28 ± 0'12

Los valores medios de IgG₂ registrados frente al antígeno de adultos de *M. apri*, fueron superiores a los detectados frente al antígeno larvario, en todos los grupos experimentales analizados.

La evolución de la respuesta humoral, mostrada por los niveles medios de este isotipo frente a ASL y ASA detectados en cada uno de los diferentes grupos del estudio se expone en las figuras 4.103. y 4.104.

Los valores medios de IgG₂ frente a ambos antígenos en el lote 4 fueron muy elevados respecto al resto de grupos. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre el día 0 y 28 post-infección frente a ambos antígenos.

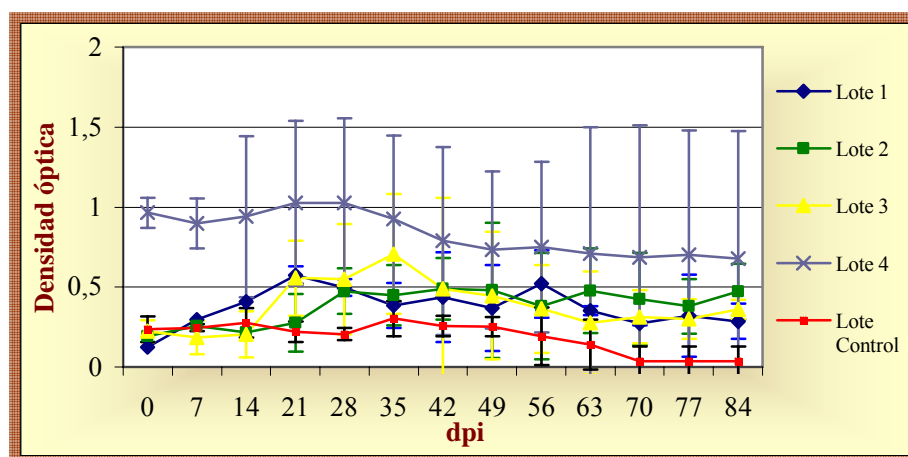


Fig. 4.103. Evolución media de los niveles de IgG₂ frente a ASL en los diferentes lotes objeto de estudio a lo largo de la experiencia.

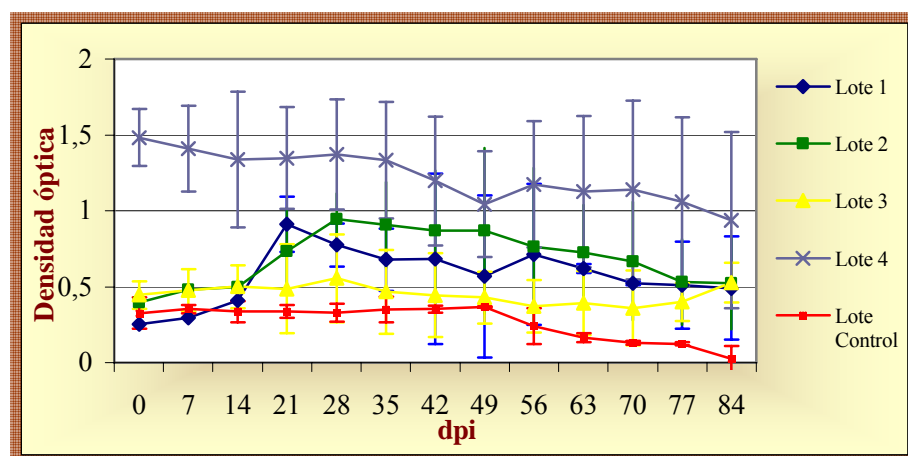


Fig. 4.104. Evolución media de los niveles de IgG₂ frente a ASA en los diferentes lotes objeto de estudio a lo largo de la experiencia.

En relación a las respuestas desencadenadas por el resto de los grupos, cabe destacar los bajos niveles de IgG₂ que presentaron frente a ambos antígenos, a lo largo de todo el estudio. Tan sólo se detectó un ligero aumento de los valores medios de IgG₂ frente a ASL en el lote 3, al día 35 post-infección. También hubo un incremento de las D.O. de IgG₂ frente a ASA en los lotes 1 y 2, entre la 3^a y 4^a semana de la infección, respecto al grupo control.

4.5.2.5.- Respuesta inmune humoral por grupos experimentales.

● Lote 1.

La evolución de los niveles de las diferentes inmunoglobulinas analizadas, a lo largo del estudio, en los animales pertenecientes al lote 1 (3000 L3), se muestran en la figura 4.105.

Al analizar los niveles de las D.O. de cada una de las inmunoglobulinas estudiadas frente al antígeno larvario y de adultos de *M. apri*, se ha registrado una altísima correlación (Tabla 4.15.). Aún así, excepto en el caso de la subclase IgG₂, el antígeno larvario desencadena una respuesta más elevada que el de adultos, principalmente durante el primer tercio de infección.

Tabla 4.15. Coeficientes de correlación de Pearson para el lote 1, entre las D.O. de las diferentes inmunoglobulinas detectadas frente a ASL y ASA.

Coeficiente de correlación de Pearson (R)	
IgM (ASL) y IgM (ASA)	0'79 (p<0'000)
IgG (ASL) y IgG (ASA)	0'78 (p<0'000)
IgG1 (ASL) y IgG1 (ASA)	0'82 (p<0'000)
IgG2 (ASL) y IgG2 (ASA)	0'86 (p<0'000)

Respecto a la evolución seguida por los valores medios de la IgM frente a ASL en el lote 1 (Figura 4.105.gráfica (a)), sólo se registró un incremento significativo de las D.O. entre el día 14 y el día 21 post-infección. Momento a partir del cual, los valores van disminuyendo, hasta mantenerse en los niveles detectados en la 1ª semana de infección. Los valores medios de IgM detectados frente a ASA siguieron un patrón muy similar, aunque de menor intensidad que el de ASL. No obstante, la respuesta frente a ASA se prolongó hasta el día 35 post-infección.

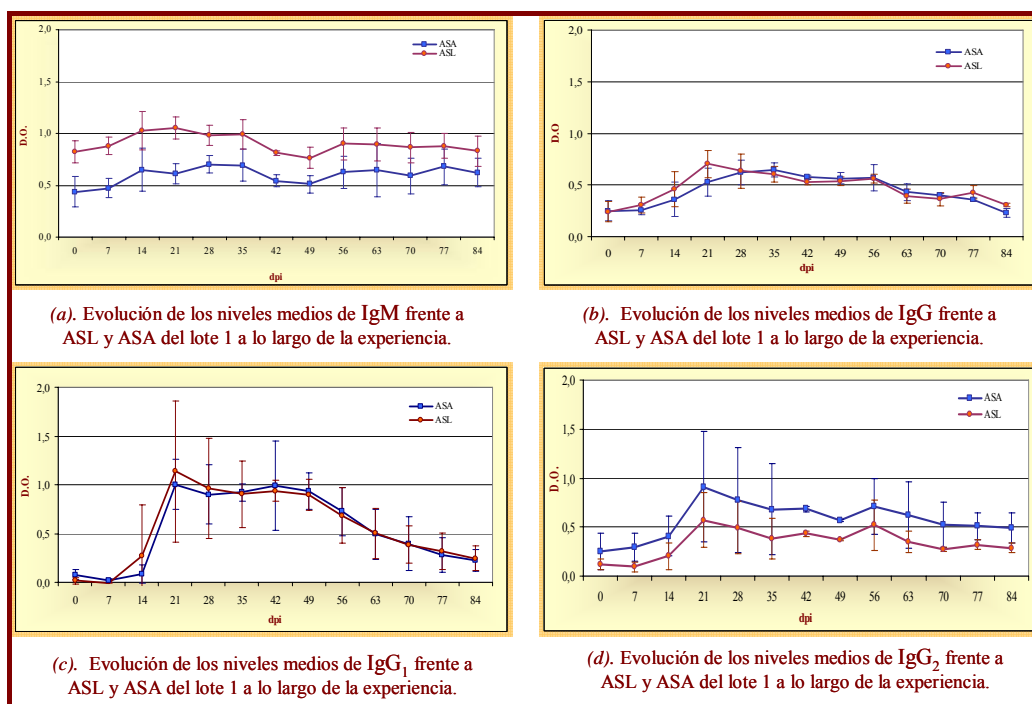


Fig. 4.105. Evolución de las inmunoglobulinas frente a ASL y ASA en el lote 1.

Las D.O. medias de IgG frente ASL y ASA en el lote 1, son muy similares a lo largo de toda la experiencia (Figura 4.105. gráfica (b)). Al día 14 y 21 post-infección, se detectó un primer aumento significativo en la producción de IgG frente a ASL y ASA, respectivamente. Los niveles máximos de la IgG frente a ASL, se detectaron al día 21 y se mantuvieron constantes hasta el día 42 post-infección. A partir de este día, se registró un descenso significativo de las D.O. hasta el día 63 post-infección, cuando se alcanzaron los niveles iniciales de IgG. En cambio, los niveles máximos de IgG frente a ASA se registraron al día 35, manteniéndose estos elevados valores hasta el día 56 post-infección. En este momento los valores periféricos de IgG comenzaron a disminuir, hasta alcanzar los valores iniciales al día 70 post-infección.

Al igual que en el caso anterior, los valores medios de IgG₁ frente a ASA y ASL siguieron un patrón análogo (Figura 4.105. gráfica (c)). Tan sólo, se observó un adelanto en el comienzo de la respuesta de IgG₁ detectada por el antígeno larvario (14 dpi) respecto del de adultos (21dpi). Los niveles máximos de IgG₁, en ambos casos, se detectaron al día 21, manteniéndose esos valores hasta el día 49 post-infección. A partir de este momento, se describió una disminución progresiva de IgG₁ en los animales del lote 1, hasta el día 77 post-infección, cuando se recuperaron los valores iniciales. Los

valores medios detectados de IgG₁ fueron significativamente más elevados que los registrados para el resto de las inmunoglobulinas analizadas en el lote 1 ($p < 0.05$).

Las D.O. medias descritas en los análisis serológicos sobre la IgG₂ se muestran en la gráfica (d) (Figura 4.105.). En líneas generales, las D.O. registradas frente a ASL, fueron las más bajas de todas las detectadas en el lote 1. El primer aumento estadísticamente significativo se produjo al día 21 post-infección, coincidiendo con su máximo nivel a lo largo del estudio. Desde este día, se desarrolló un paulatino descenso de los valores de IgG₂, hasta el día 42-49 post-infección, seguido de nuevo aumento al día 56 tras la infección. A partir de este tiempo, se retomó un nivel más bajo y constante de los valores medios periféricos de IgG₂, hasta el final de la experiencia.

● Lote 2.

La evolución de las D.O. registradas para las diferentes inmunoglobulinas analizadas a lo largo del estudio, en los animales pertenecientes al lote 2 (1000 L3), se muestran en la figura 4.106. En líneas generales, las D.O. medias detectadas mediante serología en los animales de este grupo experimental, son similares o ligeramente inferiores a las mostradas por el lote 1 (3000 L3).

Al igual que en el lote anterior, se describieron unas correlaciones muy positivas, entre las D.O. de ASL y ASA en todas las inmunoglobulinas analizadas (Tabla 4.16.).

Tabla 4.16. Coeficientes de correlación de Pearson para el lote 2, entre las D.O. de las diferentes inmunoglobulinas detectadas frente a ASL y ASA.

Coeficiente de correlación de Pearson (R)	
IgM (ASL) y IgM (ASA)	0'63 ($p < 0.000$)
IgG (ASL) y IgG (ASA)	0'40 ($p < 0.000$)
IgG1 (ASL) y IgG1 (ASA)	0'77 ($p < 0.000$)
IgG2 (ASL) y IgG2 (ASA)	0'85 ($p < 0.000$)

Así mismo, en el lote 2 se apreció que la respuesta frente a ASL fue más temprana y elevada que la observada frente a ASA. Excepto en el caso de la subclase IgG₂, que precisamente se mostró el fenómeno inverso (Fig. 4.106.).

En los porcinos del lote 2, la respuesta de IgM frente a los dos antígenos (Fig. 4.106. gráfica (a)) no fue evidente hasta el día 56 post-infección, fecha en la que se observaron diferencias significativas respecto a los valores iniciales de ésta inmunoglobulina.

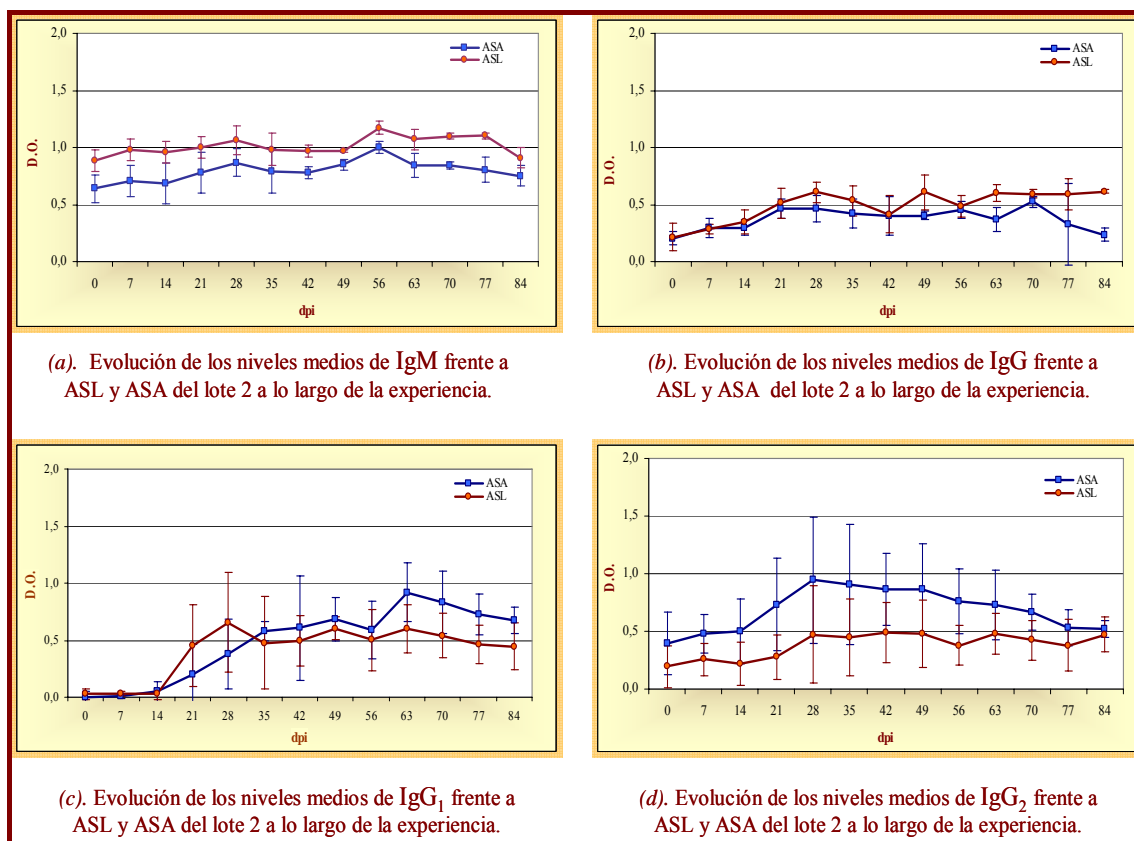


Fig. 4.106. Evolución de las inmunoglobulinas frente a ASL y ASA en el lote 2.

Sin embargo, el comienzo de la inmunorespuesta del tipo IgG frente a ASL y ASA, se fijó al día 21 post-infección (Fig. 106. gráfica (b)). En la evolución de los valores medios de esta inmunoglobulina se manifestaron dos picos de producción. El primero se produjo entre los días 28 y 35, mientras que el segundo pico en el caso de ASL, se presentó al día 49 y en el caso de ASA, al día 70, manteniéndose estos niveles elevados, hasta el día 84 post-infección. Por tanto, la respuesta humoral dependiente de la IgG en el lote 2, se puede definir como intermedia en intensidad pero constante hasta el final de la infección.

La evolución seguida por los valores medios de IgG₁ frente ASL fue diferente a la seguida al utilizar ASA (Fig. 4.106. gráfica (c)). Puesto que, la respuesta detectada por ASL (21 dpi) fue anterior a la detectada por ASA (28 dpi), la cual superó en intensidad

a la anterior, aproximadamente hacia la mitad de la experiencia. Los niveles de IgG₁ frente a ASL, más elevados se observaron al día 28 post-infección ($0'65 \pm 0'44$). A partir de ese momento, disminuyeron ligeramente, para mantenerse hasta el final las diferencias significativas con los niveles iniciales. En cambio, cuando la respuesta humoral de IgG₁ se midió frente a ASA, el primer pico descrito se produjo al día 35 ($0'58 \pm 0'22$). Desde este momento, se mantuvieron constantes estos elevados valores, hasta alcanzar sus máximos valores al día 63 post-infección ($0'92 \pm 0'22$). Nuevamente, las D.O. descendieron paulatinamente hasta el final de la infección, si bien siempre resultaron significativamente más elevados que los iniciales.

Por último, el análisis de la evolución de los valores medios de IgG₂ frente a ASL y ASA, reveló una escasa intervención de esta inmunoglobulina en el lote 2 frente a la infección (Figura 4.106. gráfica (d)). Puesto que, en el caso concreto de la respuesta detectada frente a ASL, no se registraron diferencias significativas a lo largo de toda la experiencia respecto de los valores iniciales. Sin embargo, cuando ASA es utilizado como antígeno, observamos un incremento significativo de los niveles periféricos de IgG₂ a partir del día 28 y hasta el 49 post-infección, que progresivamente van disminuyendo hasta equipararse a los valores registrados previamente a la infección.

● Lote 3.

Los porcinos pertenecientes al lote 3 fueron infectados con dosis progresivas de 200, 400 y 800 L3, anteriormente a la infección definitiva con 1000 L3 de *M. apri*. Por ello, también se registraron los niveles de las diferentes inmunoglobulinas analizadas durante este periodo previo al reto, concretamente, en los días de infección, marcados como días 60, 50 y 40 pre-infección.

La evolución de las diferentes inmunoglobulinas analizadas a lo largo del estudio, en los animales pertenecientes al lote 3, se muestra en la figura 4.107.

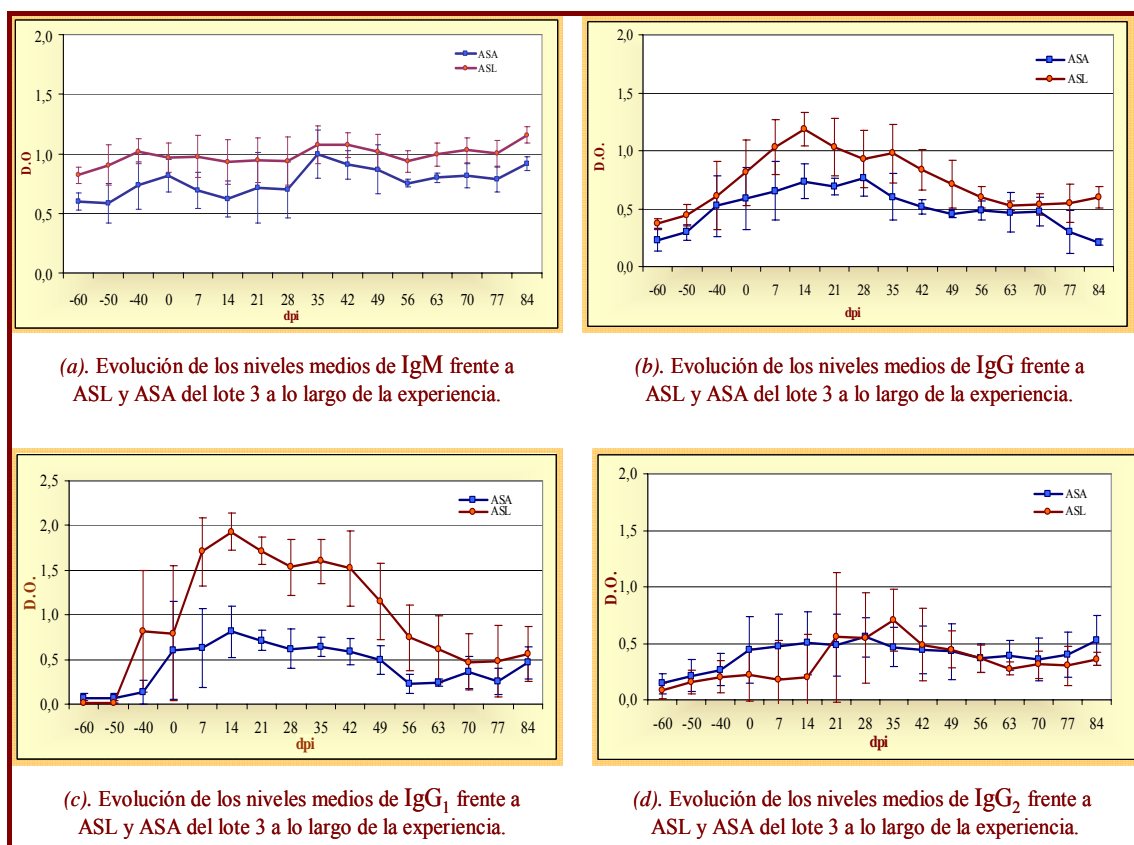


Fig. 4.107. Evolución de las inmunoglobulinas frente a ASL y ASA en el lote 3.

Según los resultados analizados, la respuesta desencadenada frente a ASL es más elevada que frente a ASA, excepto en el caso de la subclase IgG₂, y sólo durante ciertos periodos de la infección. Además, es precisamente en este lote y frente a ASL, cuando se registraron las D.O. más elevadas entre todas las inmunoglobulinas analizadas, especialmente de IgG₁.

En todos los casos ha sido detectada una correlación muy positiva ($p < 0'000$) entre las D.O. detectadas frente al antígeno larvario y de adultos de *M. apri* en cada una de las inmunoglobulinas estudiadas (Tabla 4.15.).

Tabla 4.17. Coeficientes de correlación de Pearson para el lote 3, entre las D.O. de las diferentes inmunoglobulinas detectadas frente a ASL y ASA.

Coeficiente de correlación de Pearson (R)	
IgM (ASL) y IgM (ASA)	0'72 ($p < 0'000$)
IgG (ASL) y IgG (ASA)	0'48 ($p < 0'000$)
IgG ₁ (ASL) y IgG ₁ (ASA)	0'78 ($p < 0'000$)
IgG ₂ (ASL) y IgG ₂ (ASA)	0'55 ($p < 0'000$)

Respecto a la evolución de los valores medios de IgM frente a ASL en el lote 3, cabe destacar que no se detectaron diferencias significativas a lo largo de toda la infección (Fig.4.107. gráfica (a)). Por el contrario, si el antígeno empleado es ASA, se detectó un incremento significativo de IgM al día 35 post-infección.

El análisis de IgG en el lote 3 (Fig. 4.107. gráfica (b)) demostró los niveles elevados de esta inmunoglobulina, puesto que al día 0, se observó un incremento significativo de las D.O. registradas, respecto a las de los días 60 y 50 pre-infección. Asimismo, los valores más elevados en el caso de ASL, se produjeron entre los días 7 y 14, y entre los días 14 y 28 post-infección, en el caso de ASA. A partir de que son alcanzados estos niveles máximos, se manifestó un ligero descenso de las D.O. No obstante, la respuesta humoral del tipo IgG se mantuvo hasta el día 42 post-infección, momento a partir del cual no se detectaron diferencias significativas respecto a los niveles de partida.

Los valores medios de IgG₁ frente a ASL, fueron significativamente superiores a los detectados frente a ASA (Fig. 4.107 gráfica (c)). Tan sólo, al comienzo (-60 y -50 dpi) y al final de la experiencia (a partir del 63 dpi) se observaron densidades ópticas medias similares frente a ambos antígenos. Además, la respuesta desarrollada por IgG₁ frente a ASL fue de mayor duración que frente a ASA, concretamente desde día 40 pre-infección hasta el día 56 post-infección. Los niveles máximos detectados se produjeron al día 14 ($1'93 \pm 0'21$), manteniéndose, aunque algo menos elevados, durante tres semanas más. Momento a partir del cual, los niveles periféricos de IgG₁ comenzaron un descenso progresivo hasta el día 56 tras la infección. En cambio, la persistencia de la respuesta de IgG₁ detectada por ASA, se fijó entre el día 0 y el día 49 post-infección. Los niveles máximos de la IgG₁, también se detectaron al día 14 ($0'81 \pm 0'29$), describiéndose una discreta disminución de los valores hasta el día 49 post-infección, cuando se recuperaron los valores iniciales.

Las D.O. de IgG₂ frente a los dos antígenos utilizados no experimentaron importantes variaciones a lo largo del estudio (Fig. 4.107. gráfica (d)). En el caso de ASL, se observó un incremento significativo de los niveles registrados a partir del día 21 y hasta el día 49 post-infección, alcanzando el pico máximo al día 35 ($0'65 \pm 0'27$). Respecto a las D.O. de IgG₂ detectadas frente a ASA, se presentaron diferencias significativas desde el día 14 y hasta el 35 post-infección, periodo en el que se

describieron los niveles más elevados de IgG₂ ($0'56 \pm 0'17$). Finalmente, estos valores se mantuvieron constantes hasta el día 84 post-infección.

🍷 Lote 4.

En los animales pertenecientes a este lote, que fueron preinmunizados con extractos proteicos procedentes de los estados larvarios y adultos de *M. apri*, se midieron los niveles de inmunoglobulinas durante este periodo de estimulación antigénica anterior a la infección definitiva con 1000 L3 (días 35, 25 y 15 pre-infección).

La evolución de las D.O. registradas para las diferentes inmunoglobulinas a lo largo del estudio, se muestran en la figura 4.108.

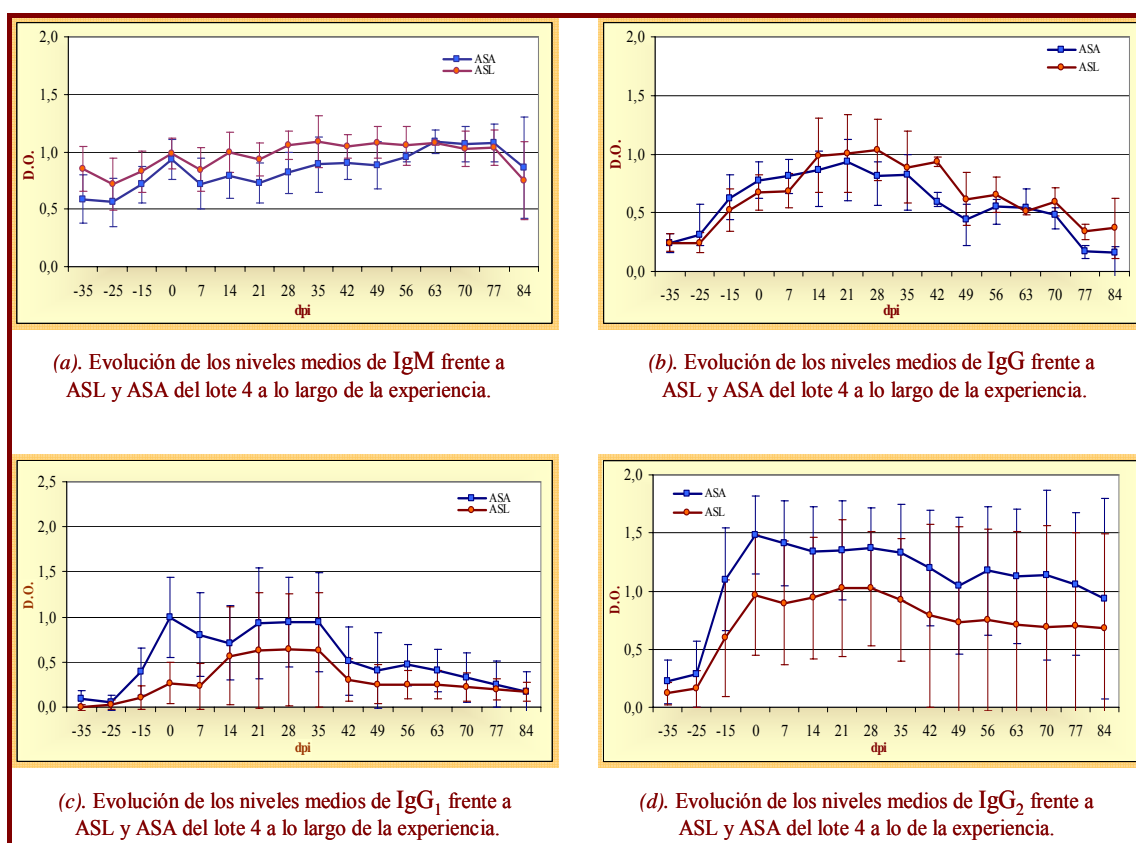


Fig. 4.108. Evolución de las inmunoglobulinas frente a ASL y ASA en el lote 4.

En todos los casos, ha sido detectada una altísima correlación positiva entre los niveles detectados de cada una de las inmunoglobulinas frente al antígeno larvario y de adultos de *M. apri* (Tabla 4.18.).

Tabla 4.18. Coeficientes de correlación de Pearson para el lote 4, entre las D.O. de las diferentes inmunoglobulinas detectadas frente a ASL y ASA.

Coeficiente de correlación de Pearson	(R)
IgM (ASL) y IgM (ASA)	0'84 (p<0'000)
IgG (ASL) y IgG (ASA)	0'62 (p<0'000)
IgG1 (ASL) y IgG1 (ASA)	0'69 (p<0'000)
IgG2 (ASL) y IgG2 (ASA)	0'87 (p<0'000)

Los niveles de IgM en el lote 4 a lo largo de la infección experimentaron dos picos significativos, el primero al día 0 y el segundo y más elevado, al día 35 post-infección (Fig. 4.108. gráfica (a)). A partir de este momento, si el antígeno utilizado era ASL, estos elevados niveles se mantuvieron hasta el final de la experiencia. En cambio, si ASA era empleado como base antigénica, los niveles detectados de IgM sufrían un ligero aumento, hasta el día 77 post-infección.

Las D.O. registradas para IgG, siguieron la misma tendencia que había mostrado el resto de grupos experimentales, es decir, un aumento progresivo de sus niveles, hasta alcanzar cotas máximas, para posteriormente ir descendiendo progresivamente. Concretamente, en el lote 4 (Fig. 4.108. gráfica (b)), la primera diferencia significativa entre las D.O. a lo largo del experimento se produjo al día 15 pre-infección. Sin embargo, no fue hasta los días 14, 21 y 28, cuando se alcanzaron los niveles más elevados de IgG. A partir del día 35, comenzó un progresivo descenso, para estabilizarse de nuevo durante los días 56, 63 y 70 post-infección.

La evolución de las D.O. de IgG₁ frente ASL fue diferente a la de ASA durante el primer tercio del estudio (Fig. 4.108. gráfica (c)). La reactividad detectada por ASA, previa a la infección, resultó más elevada que la detectada por ASL y hasta el día 14 post-infección, momento en el que se volvieron a igualar. Los niveles máximos de IgG₁ observados tras el reto, se produjeron entre los días 21 y 42. A partir de ese momento, los niveles de IgG₁, experimentaron un descenso paulatino y significativo, aunque se mantuvieron unos valores de D.O. superiores a 1'00 hasta el final de la infección.

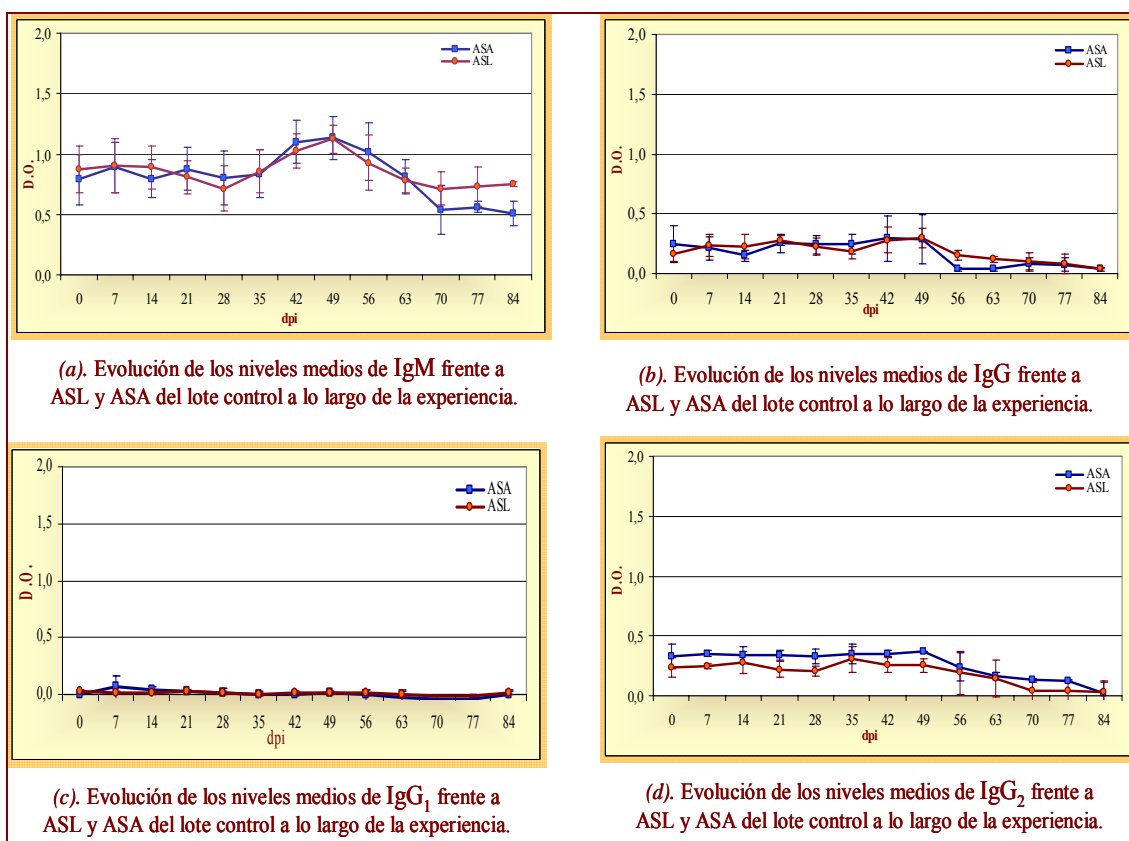
La evolución de IgG₂ se muestra en la gráfica (d) (Fig. 4.108.). Las primeras diferencias significativas detectadas respecto a los valores mostrados al comienzo de la experiencia se produjeron al día 15 pre-infección, en el caso de ASA y al día 0, en el caso de ASL. Los niveles máximos de esta inmunoglobulina tras la infección, se

registraron entre los días 7 y 35 post-infección. Desde este día, se produjo un ligero descenso de los valores de IgG₂ hasta el final de la experiencia.

🍷 Lote Control.

La evolución de las diferentes inmunoglobulinas detectadas en los animales utilizados como grupo control, se muestran en la figura 4.109. Como se presenta en estas gráficas, las D.O. de las diferentes inmunoglobulinas en los porcinos del grupo control no registraron variaciones significativas a lo largo del ensayo.

La evolución de la respuesta de las distintas inmunoglobulinas frente a ASL fue casi idéntica a la de ASA. De hecho, existe una alta correlación positiva entre los niveles de las D.O. detectados frente a ambos antígenos (Tabla 4.19.).



4.109. Evolución de las inmunoglobulinas frente a ASL y ASA en el lote control.

Tabla 4.19. Coeficientes de correlación de Pearson para el lote Control, entre las D.O. de las diferentes inmunoglobulinas detectadas frente a ASL y ASA.

Coeficiente de correlación de Pearson	(R)
IgM (ASL) y IgM (ASA)	0'71 (p<0'000)
IgG (ASL) y IgG (ASA)	0'74 (p<0'000)
IgG1 (ASL) y IgG1 (ASA)	0'79 (p<0'000)
IgG2 (ASL) y IgG2 (ASA)	0'80 (p<0'000)

4.5.2.5.- Correlaciones entre los resultados parasitológicos y la respuesta humoral.

El número total de larvas halladas al día 14 post-infección se correlacionaba negativamente con los niveles de IgG ($R=-0'705$; $p<0'05$) e IgG₁ ($R=-0'720$; $p<0'05$) frente a ASL. En el lote 1, tan sólo se ha registrado una correlación positiva estadísticamente significativa entre las larvas totales recopiladas y los niveles de IgG₂ frente a ASA, $R=0'997$ ($p<0'05$). En el lote 3, el número total de larvas estaba negativamente correlacionado con IgG frente a ASA y con IgG₂ frente a ASL ($p<0'000$). Por el contrario, el número total de larvas presentes en los animales del lote 3 se hallaban positivamente correlacionado con IgG frente a ASL, con IgG₁ frente a ASA y ASL, con IgG₂ frente a ASA y con IgM frente a ASA y ASL ($p<0'000$). Por último, el número de larvas totales cuantificadas en los porcinos del lote 4 se correlacionaba negativamente con los niveles de IgG₁ frente a ASL ($R=-0'99$; $p=0'05$).

El número total de adultos recopilados en los días 35 y 84 post-infección en los animales se correlacionaban negativamente con los niveles detectados de IgM frente a ASA ($R=-0'422$; $p<0'05$). Por su parte, los adultos recopilados en los porcinos del lote 3 estaban negativamente correlacionados con los niveles de IgG₂ frente a ASA, $R=-0'926$ ($p<0'05$). En cambio, en el lote 4 el número de adultos totales y los niveles de IgG e IgG₁ frente a ASA se hallaban positivamente correlacionados ($R=0'82$ y $R=0'80$; $p<0'05$).

La concentración de huevos en heces registrada en los animales infectados se correlacionaba negativamente con los niveles de IgM e IgG frente a ASL ($R=-0'160$ y $R=-0'162$; $p<0'05$). Sin embargo, el número de huevos embrionados del nematodo por

g de heces se correlacionaba positivamente con los niveles de IgG₁ frente a ASA (R=0'141; p<0'05).

Entre el número de manchas de leche cuantificadas en los hígados de los porcinos infectados y los niveles de IgG e IgG₁ frente a ASL se registraron correlaciones positivas estadísticamente significativas (R=0'373 y R=0'535; p<0'05).

Finalmente, los niveles de eosinófilos circulantes se correlacionaban negativamente con los niveles de IgM frente a ASA (R=-0'178) y positivamente con los niveles de IgG₁ frente a ASL (R=0'194) (p<0'05).

4.6.- Correlaciones entre las respuestas celulares y humorales.

Para determinar el grado de correlación existente entre la respuesta celular y humoral desencadenada en los animales tras la infección con *M. apri*, se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre los diversos parámetros inmunológicos analizados. A continuación, se exponen de forma resumida los resultados obtenidos por grupos experimentales:

● Lote 1.

Coeficiente de correlación de Pearson		(R)	Significación (p)
IgM (ASL)	Macróf. alveolares en BAL	0'742	0'04
IgG (ASA)	Linfocitos T en G	0'734	0'04
	Linfocitos CD4 ⁺ en SP	0'735	0'02
IgG ₁ (ASA)	Linfocitos T en G	0'894	0'003
	Linfocitos CD8 ⁺ en G	0'803	0'02
	Linfocitos CD4 ⁺ en G	0'753	0'03
	Linfocitos CD8 ⁺ en BAL	0'817	0'01
	Linfocitos CD4 ⁺ en SP	0'954	0'000
	Monocitos en SP	0'750	0'02
IgG ₁ (ASL)	Linfocitos T en G	0'874	0'005
	Linfocitos CD8 ⁺ en G	0'858	0'006
	Linfocitos T en BAL	0'712	0'048
	Linfocitos CD8 ⁺ en BAL	0'806	0'02

IgG ₂ (ASA)	Linfocitos T en BAL	0'796	0'02
	Linfocitos CD8 ⁺ en G	0'756	0'03
	Linfocitos CD4 ⁺ en SP	0'813	0'008
IgG ₂ (ASL)	Linfocitos T en BAL	0'896	0'003
	Linfocitos CD8 ⁺ en BAL	0'814	0'014
	Linfocitos CD4 ⁺ en BAL	0'818	0'01
	Linfocitos T en G	0'761	0'03
	Linfocitos CD8 ⁺ en G	0'858	0'006
	Linfocitos CD4 ⁺ en G	0'729	0'04

● Lote 2.

Coeficiente de correlación de Pearson (R)		Significación (p)	
IgG (ASA)	Linfocitos CD4 ⁺ en G	-0'715	0'03
	Linfocitos CD8 ⁺ en G	-0'713	0'03
IgG (ASL)	Macrófagos en G	-0'690	0'04
	Linfocitos B en SP	0'680	0'04
IgG ₁ (ASA)	Linfocitos B en BAL	0'859	0'003
	Macrófagos en G	-0'794	0'02
IgG ₂ (ASL)	Linfocitos T en G	0'701	0'04
	Macrófagos en G	0'695	0'04

● Lote 3.

Coeficiente de correlación de Pearson		(R)	Significación (p)
IgM (ASA)	Linfocitos B en BAL	0'691	0'04
	Linfocitos B en G	0'693	0'04
	Monocitos en SP	-0'755	0'005
IgM (ASL)	Monocitos en SP	-0'601	0'04
IgG (ASL)	Macrófagos en G	0'858	0'003
IgG ₁ (ASA)	Linfocitos CD4 ⁺ en SP	0'689	0'01
IgG ₁ (ASL)	Macrófagos en G	0'805	0'009

IgG ₂ (ASA)	Linfocitos CD8 ⁺ en BAL	-0'667	0'05
IgG ₂ (ASL)	Linfocitos B en BAL	0'920	0'000
	Linfocitos B en G	0'734	0'02

● Lote 4.

Coeficiente de correlación de Pearson		(R)	Significación (p)
IgM (ASL)	Linfocitos T en G	-0'729	0'01
	Linfocitos CD4 ⁺ en G	-0'714	0'01
	Linfocitos CD8 ⁺ en G	-0'625	0'04
IgG (ASA)	Linfocitos T en BAL	-0'818	0'002
	Linfocitos CD4 ⁺ en G	-0'724	0'01
	Macrófagos en G	0'634	0'04
	Linfocitos T en SP	-0'865	0'000
	Linfocitos CD8 ⁺ en SP	-0'801	0'002
	Linfocitos CD4 ⁺ en SP	-0'814	0'001
IgG (ASL)	Linfocitos T en BAL	-0'616	0'04
	Linfocitos T en G	-0'617	0'04
	Linfocitos CD4 ⁺ en G	-0'678	0'02
	Macrófagos en G	0'674	0'02
	Linfocitos T en SP	-0'582	0'05
	Linfocitos CD4 ⁺ en SP	-0'597	0'04
IgG ₁ (ASA)	Linfocitos T en BAL	-0'727	0'01
	Linfocitos CD4 ⁺ en BAL	-0'697	0'01
	Linfocitos CD4 ⁺ en G	-0'727	0'01
IgG ₁ (ASL)	Linfocitos T en BAL	-0'628	0'04
	Linfocitos CD4 ⁺ en G	-0'675	0'02
	Macrófagos en G	0'741	0'009
IgG ₂ (ASA)	Linfocitos T en BAL	-0'722	0'01
IgG ₂ (ASL)	Linfocitos T en BAL	-0'724	0'01

● **Lote Control.**

Los coeficientes de correlación significativos ($p < 0.05$) registrados, entre los parámetros inmunológicos celulares y humorales en el grupo control, fueron entre los linfocitos T citotóxicos presentes en las muestras de BAL y las IgM (ASL) y IgG (ASL). Los valores de R calculados en cada caso, fueron 0.895 y 0.887, respectivamente.

5. DISCUSIÓN



5.1.- Sobre la respuesta biopatológica de los cerdos frente a *M. apri*.

Las inspecciones clínicas diarias practicadas a los animales, revelaron que el principal síntoma producido por la infección de *M. apri* fue la tos. Todos o algunos de los animales integrantes de cada uno de los grupos infectados, mostraron este signo en algún momento de la experiencia.

Los primeros signos se registraron en el lote 1 y 2, a partir del día 9 post-infección. Autores como Mackenzie (1956 y 1959), Jagers (1964) o Ferguson (1981), también detectaron el comienzo de las toses, en animales experimentalmente infectados con *Metastrongylus spp.*, en torno a los 10-12 días tras la infección, fecha en la que las larvas 4 acceden al tejido pulmonar.

En los animales que recibieron una dosis de infección más alta (Lote 1), los síntomas se recrudecieron de forma significativa, respecto al resto de lotes, entre los días 28 y 35 post-infección. Además, los brotes de tos sufridos por estos animales, junto a otros signos descritos como respiración abdominal y disnea, se prolongaron más en el tiempo que en el resto de lotes. En cambio, en los porcinos que recibieron una dosis más baja (Lote 2), los golpes de tos se observaron principalmente, entre los días 10 y 30 post-infección.

Por su parte, los animales de los grupos previamente tratados (Lotes 3 y 4), mostraron una sintomatología muy leve. En el caso del lote 3, no se registraron las primeras toses hasta el día 30. Por su parte, en el lote 4 se produjeron alrededor del día 21 post-infección.

Estas observaciones, nos permiten afirmar que la intensidad y frecuencia con la que se producen los brotes de tos en los animales parasitados por *M. apri*, se correlacionaron positivamente con la dosis infectiva. Así mismo, se evidenció que las reinfecciones progresivas con pequeñas dosis y la inmunización con inóculos elaborados a partir de larvas y adultos del parásito, reducían en gran medida la gravedad de los signos causados por éste parásito.

Respecto a la posible pérdida de peso sufrida por los animales infectados, no se observó ni disminución del apetito, ni diferencias en la conformación entre los animales infectados y los controles. Asimismo, Mackenzie (1956 y 1959) durante las infecciones

experimentales llevadas a cabo en cerdos de diferentes edades, no evidenció ninguna interferencia en el crecimiento, ni en la ganancia media de peso de los animales.

5.2.- Sobre las lesiones anatomopatológicas.

Las lesiones pulmonares descritas en los animales a lo largo de la infección, se pueden encuadrar dentro de una típica neumonía parasitaria con tendencia a la cronicidad.

Las L3 en su recorrido hasta los pulmones sufren dos mudas, de L3 a L4 y de L4 a L5. Generalmente, la primera de estas mudas tienen lugar entre los días 3 y 5 post-infección en los ganglios ileocecales y cólicos. No se han descrito lesiones inflamatorias asociadas a la migración de los estados larvarios en estos ganglios. Por el contrario, los ganglios linfáticos bronquiales mostraron un aumento de tamaño causado por una importante hiperplasia del tejido linfoide acompañado por un infiltrado de eosinófilos en los senos y trabéculas ganglionares. Estos cambios comenzaron a producirse a partir del día 10 post-infección, tornándose más severos a medida que avanzaba la infección (Mackenzie, 1959).

En el parénquima de los ganglios torácico-pulmonares analizados en el estudio, se observó un proceso muy similar al descrito por Mackenzie (1959), caracterizado por la hiperplasia e hipertrofia de los folículos linfoides. Estos folículos linfoides contenían un centro germinativo muy desarrollado, una escasa corona folicular y estaban repletos de células inmunocompetentes, propio de folículos muy activos. Esta hiperproducción de células defensivas se produce como consecuencia de la presencia de los nematodos en el pulmón.

Desde la llegada de los estados larvarios a los bronquios y alveolos, se observó un importante infiltrado celular en el tejido pulmonar. Las principales poblaciones celulares, eosinófilos, linfocitos, neutrófilos y macrófagos, llegaron desde la circulación periférica a través de los capilares pulmonares hasta la lámina adventicia y propia de los bronquiolos afectados. En ocasiones, el epitelio y el lumen de los bronquios se llenan de tanto infiltrado celular y de parásitos, que se produce una oclusión de estos y una incipiente bronquilitis (Stockdale, 1976). Mackenzie (1959), durante una infección experimental en porcinos con dosis de 4000 L3 de *M. apri*, observó entre los días 10 y 14, un significativo aumento de las poblaciones celulares en los alveolos,

principalmente, se trataba de exudados de células mononucleares y células gigantes, rodeando a las larvas 4. En esta fase prepatente, también se describieron pequeñas hemorragias interalveolares, como consecuencia de la migración larvaria a través del sistema respiratorio.

Otra de las lesiones observadas durante los primeros 14 días tras la infección, principalmente en los animales del lote 3, fue una neumonitis o inflamación de los septos y conductos alveolares, junto a la hiperplasia de las células que forman la pared de los alveolos, aumentando la presencia de eritrocitos y leucocitos.

A medida que avanza la infección, y por tanto la transformación de los estados larvarios a adultos, observamos un importante enfisema vesicular, focos atelectásicos, hiperplasia del tejido linfoide peribronquial y un infiltrado de eosinófilos más pronunciado y extendido. A nivel macroscópico, el pulmón muestra un aumento de su volumen, evidentes áreas enfisematosas y signos de congestión pasiva principalmente, en los bordes de los lóbulos diafragmáticos, aunque en los lotes 1, 2 y 4, también se hallaban afectados los lóbulos craneales y el accesorio. Resulta obvio que la presencia de los estados larvarios y posteriormente de los adultos, en los espacios broncoalveolares tienen un efecto mecánico-obstrutivo, por ello el pulmón tiende a compensar esta deficiencia del intercambio gaseoso en las regiones ocupadas por los parásitos aumentando de volumen (áreas atelectásicas). De la misma forma, la acción irritante de *M. apri* en el tejido pulmonar, principalmente provocada por las mudas y sus productos de secreción-excreción, es la causante de las áreas congestivas y del importante infiltrado celular presente alrededor de los parásitos. Esto a su vez, produce una importante inflamación y estrechamiento de los bronquiolos, que agrava la disminución de la capacidad respiratoria.

Whittlestone (1957) durante el desarrollo de un estudio de campo en 4457 porcinos, sobre la etiología de los problemas respiratorios, denunció que el 29% de estos animales se hallaban parasitados por *Metastrongylus spp.* En ellos, describió importantes áreas enfisematosas y pequeñas regiones de consolidación en los lóbulos diafragmáticos, y tan sólo en el 2% de los casos se presentaban lesiones neumónicas.

La tendencia a la cronicidad se evidencia especialmente, a partir del día 35 post-infección con la aparición de granulomas. La formación de este tejido de granulación se inicia con la llegada de células mononucleares, macrófagos alveolares y células gigantes

alrededor de la cutícula de larvas, huevos o parásitos muertos, que están acompañados por capilares neoformados. Con esta reciente formación vascular emigran fibroblastos, que sintetizan y secretan microfibrillas de colágeno, conformándose un tejido reparador (Gázquez, 1991). Cuando este proceso de cicatrización se va extendiendo por gran parte del parénquima pulmonar, se produce la formación de lesiones nodulares, que son visualizadas en la superficie del pulmón (Whittlestone, 1957; Mackenzie, 1958 y 1959; Stockdale, 1976). Estas lesiones granulomatosas fueron halladas en los animales del lote 3 al día 0 de la experiencia, que se corresponden a las antiguas reacciones sufridas durante las reinfecciones sucesivas previas al reto. Independientemente de ello, el resto de los animales comenzaron a presentar este tipo de lesiones entre los días 35 y 84, siendo más evidentes en el lote 1.

Las lesiones blanquecinas descritas en los hígados, denominadas manchas de leche, son propias de la migración visceral de *A. suum* (Roneus, 1996; Taffs, 1968). Se han descrito macroscópicamente tres tipos de manchas de leche:

- a) Las pequeñas manchas de tejido de granulación, denominadas manchas reticulares. Se trata de manchas grises en los septos interlobulares, se generan a lo largo de los trayectos migratorios.
- b) Las grandes manchas de tejido de granulación. Poseen un tejido central compacto grisáceo-blanco, que se forma alrededor de una larva atrapada.
- c) Las manchas linfonodulares. Son redondas, con nódulos de linfocitos marcadamente definidos.

Pero, son diversos los autores que han determinado que estas lesiones hepáticas, también pueden ser provocadas por la migración errática de las larvas de *Metastrongylus spp.* hacia el hígado, durante su recorrido por el organismo (Dunn, 1956; Yoshihara *et al.*, 1990).

Desde el punto de vista histológico, esta lesión hepática se define como una hepatitis eosinofílica intersticial acompañada de necrosis intralobular, degeneración arteriolar y aparición de granulomas con posible presencia de restos de larva en el centro de la lesión (Nakagawa *et al.*, 1983; Yoshihara *et al.*, 1987). Resulta evidente que se trata de un mecanismo de respuesta frente a la presencia de los estados larvarios. Así, los animales pertenecientes al lote reinfestado (Lote 3) fueron los que presentaron un mayor número de manchas de leche en el tejido hepático.

Respecto al resto de alteraciones definidas a nivel del hígado, resultó especialmente común y extendida entre los animales experimentales, una tumefacción turbia focal del parénquima hepático. Esta degeneración grasa del hígado no es característica de la parasitación, si no más bien se le podría atribuir un origen nutricional.

5.3.- Sobre los resultados parasitológicos.

5.3.1.- Cuantificación, longitud, ratio hembra/macho y distribución de *M. apri* en pulmón.

Según los resultados obtenidos de la cuantificación de los estados larvarios y adultos de *M. apri*, en los lotes experimentales primoinfectados, podemos afirmar que este parásito posee una alta capacidad de desarrollo en el tejido pulmonar de los porcinos. Además, la intensidad de parasitación fue dosis-dependiente, ya que las dosis de infección larvaria en el lote 1 (3000 L3) y lote 2 (1000 L3) fueron proporcionales al número de larvas y adultos recuperados durante la experiencia. Así, a mayor dosis infectiva mayor número de vermes presentes en el pulmón. La tasa de recuperación de adultos en los lotes primoinfectados osciló entre 10-20%. Por su parte, Ferguson (1981) durante un estudio sobre la eficacia del albendazol contra los nematodos pulmonares del cerdo, registró tasas de recuperación de más del 50%, en los animales no tratados. La dosis infectiva fue de 3000 L3 y se recuperaron al día 45 post-infección, un total de 1543 adultos. En cambio, en las infecciones experimentales realizadas por otros autores, como Dunn (1956) y Jagers y Herbert (1964) las tasas de recuperación registradas no fueron superiores al 5%.

En los lotes 1 y 2 se apreció un aumento progresivo del número de parásitos recolectados en los pulmones a lo largo de la experiencia. De lo cual, se deriva que los parásitos no sufrieron ningún tipo de obstáculo en el proceso de implantación y posterior desarrollo en el sistema respiratorio de los animales primoinfectados.

Por el contrario, en los animales del lote 3 (Reinfecciones + Reto) no se detectaron diferencias significativas en el número de parásitos cuantificados entre los días 14 y 84 post-infección. Sin embargo, es de resaltar, la bajísima tasa de recuperación hallada, aproximadamente del 1%. Según estos resultados, los animales del lote 3

exhibieron una evidente resistencia frente a *M. apri*. Desde el principio de la infección no se permitió el establecimiento del parásito en el tejido pulmonar, lo cual nos permite considerar, que los mecanismos responsables de esta resistencia inician su actuación desde la fase inicial de la infección.

En 1968, Dixon llevó a cabo un estudio sobre la inmunidad desarrollada por los porcinos frente a *M. apri*. Para ello, estableció 2 grupos experimentales, en uno de ellos, los animales se infectaron previamente con pequeñas dosis progresivas de L3, posteriormente, al día 56 tras la primera infección, retó a todos los animales con 2000 L3. La conclusión final del ensayo, fue que en los animales previamente infectados con 6 pequeñas dosis de L3 de *M. apri*, se produjo un proceso inmunogénico, responsable de las leves infecciones registradas respecto a los infectados sólo con 2000 L3. Una experiencia similar fue realizada por Rose (1973), quien observó que los animales primoinfectados con una única de 500 L3, no desarrollaron protección alguna frente al reto de 2500 L3. En cambio, si esta misma dosis de 500 L3, era administrada en 7 dosis durante 40 días, patrón de infección similar al que probablemente, se produce en la naturaleza, el número de parásitos recopilados tras el reto, fue significativamente inferior.

Barriga (1981) demostró que la resistencia de los porcinos frente a *Metastrongylus spp.* se manifestaba por la expulsión de los adultos, más que por la inhibición de su desarrollo en el pulmón. Así, en el caso del lote 4 (Inmunizados + Reto), aunque se registró un número similar de larvas y de adultos al día 35 post-infección que en el lote 2 (Monodosis: 1000 L3), al día 84 tras la infección, la población de vermes se redujo casi un 50%. Esta disminución significativa del número total de parásitos recolectados, nos permite afirmar que los mecanismos efectores desarrollados por una previa inmunización con extractos del parásito vía subcutánea, son más tardíos y menos efectivos, que los desarrollados por una infección oral repetida y progresiva con L3 de *M. apri*.

No sólo se observaron diferencias cuantitativas en las poblaciones de nematodos examinadas, también morfológicas, concretamente en la longitud de las hembras adultas. En los lotes 2, 3 y 4 se detectó una disminución del tamaño de las hembras a medida que avanzaba la infección. Sin embargo, en el lote 1, se describió la situación contraria,

a medida que aumentaba la población de nematodos, las hembras incrementaban su longitud, y por tanto, su capacidad para albergar huevos.

En los nematodos se ha definido un fenómeno denominado “efecto de masificación” (Read, 1951), según el cual, cuando una población de parásitos alcanza un número suficientemente importante, los individuos disminuyen su tamaño. Dixon (1971) pretendió determinar si este fenómeno se producía en las parasitaciones por *M. apri*. Para ello, correlacionó el número total de parásitos y la media de huevos por hembra. Tras los resultados obtenidos en el estudio, se confirmó que *M. apri* sufría el fenómeno contrario. Es decir, a medida que aumentaba el número total de parásitos también aumentaba la cantidad de huevos por hembra grávida. Dixon sugirió que la efectividad de las defensas que el hospedador dirige frente al parásito individualmente, disminuía a medida que se presenta un mayor número de vermes en pulmón.

Respecto a la ubicación de elección de *M. apri* en el tejido pulmonar, son numerosos los estudios realizados en animales naturalmente infectados, que expresan que el pulmón derecho es la localización predilecta, concretamente el lóbulo diafragmático derecho (Swing y Todd, 1960; Dixon, 1971). Jericho *et al.* (1971) tras la inoculación vía oral de larvas de *M. apri* observaron que se producía una distribución uniforme de éstas por todos los lóbulos pulmonares. Pero a medida que avanzaba la infección, se hallaron más parásitos por unidad de tejido en la parte posterior de los lóbulos diafragmáticos. Según los datos recavados en nuestra experiencia, *M. apri* tiende a situarse en las regiones caudales de los lóbulos diafragmáticos, principalmente en la mitad derecha del pulmón. Si bien, el único lote que mostró realmente una diferencia significativa entre el número total de nematodos entre el pulmón derecho e izquierdo fue el lote 1 al día 84 post-infección. No obstante, la distribución de los parásitos en el pulmón durante las primeras fases de la infección fue uniforme. Posteriormente, los adultos de *M. apri* van ocupando las zonas más distales de los lóbulos diafragmáticos (Jericho *et al.*, 1971). La razón por la que las zonas más caudales del pulmón derecho presentasen cierta tendencia a albergar un mayor número de parásitos que el izquierdo, puede deberse a la mayor capacidad y volumen que posee el pulmón derecho. Parece que el parásito trata de ocupar lugares poco molestos para el buen desarrollo del intercambio gaseoso a nivel del tejido pulmonar. Este proceder pone

de manifiesto que el parásito pretende ocupar zonas marginales del pulmón para evadir los mecanismos inmunológicos locales desarrollados por los porcinos.

En los lotes 1 y 2 el ratio hembra/macho fue de 1'56 y 1'90, respectivamente. El resultado de la proporción hembra/macho detectada para *M. apri* en condiciones naturales fue de 1'74 (Ewing y Todd, 1960). Sin embargo, los animales pertenecientes a los lotes 3 y 4 presentaron una mayor población de hembras respecto a los machos. En las situaciones donde se contabilizaron un menor número de adultos totales, el sexo predominante fue el femenino. Según estos resultados, parece evidente que los machos de *M. apri* son menos resistentes que las hembras a los mecanismos de defensa desarrollados, principalmente en los animales re infectados (Lote 3).

Esta misma situación se sucedió en la experiencia llevada a cabo por Dixon (1968), quien observó como aumentaba significativamente la proporción hembra/macho en los animales re infectados respecto a los primoinfectados. Este autor apuntó la existencia de algún factor que operase selectivamente sobre los machos en los animales re infectados. Este comportamiento mostrado por el parásito, no es más que otro mecanismo para sobrevivir en condiciones extremas. Pues, si las hembras son más resistentes y presentan una capacidad de permanecer en el hospedador eliminando huevos al medio exterior, se mantendrán las expectativas de perpetuar la especie y la posibilidad de parasitar a otros hospedadores.

5.3.2.- Resultados coprológicos.

Los huevos embrionados de *M. apri* no fueron detectados en las heces de los animales infectados hasta el día 28 post-infección, tiempo fijado como periodo de prepatencia en el ciclo biológico del parásito (Dunn, 1956 y 1959; Ferguson, 1981).

En los lotes 1, 2 y 4 todos los animales resultaron positivos al análisis coprológico, en cambio en el lote 3 tan sólo un animal fue el responsable de los valores medios registrados en este grupo experimental. En todos los lotes infectados los resultados coprológicos fueron positivos hasta el final de la experiencia (84 dpi).

Globalmente, podemos afirmar que los animales del lote 1 presentaron los valores medios de huevos por gramo de heces significativamente más elevados de todos los registrados. Además, se detectaron correlaciones positivas significativas entre el

número de adultos presentes y la carga de huevos en heces, así como entre el tamaño de las hembras adultas de *M. apri* y los huevos por gramo de heces. Este hecho confirma que en la parasitación sufrida por los porcinos del lote 1, se produjo el fenómeno contrario al “*efecto de masificación de Read*”, a mayor número de parásitos, mayor tamaño de las hembras y mayor número de elementos de diseminación en las heces.

El mayor número de huevos/g de heces fue 3120, que se detectó al día 49 post-infección en los animales infectados con una dosis de 3000 L3 (Lote 1). En el resto de lotes experimentales, los picos de eliminación de huevos en las heces se detectaron entre los días 35 y 42 tras la infección. Estos resultados máximos fueron ligeramente superiores a los registrados por Ferguson (1981), quien registró unos valores máximos de huevos/g de heces de 2300 entre los días 35 y 37 post-infección en porcinos infectados con 3000 L3 de *M. apri*.

Por el contrario, los niveles más bajos de huevos/g de heces siempre fueron registrados en el lote 3. Los porcinos pertenecientes a este grupo experimental, desarrollaron los mecanismos de respuesta necesarios para mantener una carga parásita residual y por tanto, una escasa capacidad de diseminar la especie.

5.3.3.- Recuento de manchas de leche en hígado.

Como ya ha sido comentado anteriormente, este tipo de lesiones en el tejido hepático, más propias de otras parasitosis como la ascariosis, fueron descritas por primera vez en infecciones experimentales con *M. apri* en 1956 por Dunn. Este autor observó como 4 de los 6 animales infectados presentaron este tipo de lesiones. En este caso no fueron cuantificadas, tan sólo se indicó que se debían a la migración errónea de las larvas en su camino hacia el pulmón.

A tenor de los resultados obtenidos del recuento de las manchas de leche en los animales de los diferentes lotes, podemos afirmar que el lote 3 fue el que mostró significativamente un mayor número de lesiones hepáticas ($8'33 \pm 7'38$). El resto de grupos infectados presentaron una media de lesiones entre 2 y 3. Todos los lotes mostraron el mayor número de lesiones hepáticas al día 35, mientras que la menor cantidad de manchas de leche se registraron al día 84 post-infección. Según esto, podemos afirmar que este tipo de lesiones son temporales. Puesto que, el número de

manchas de leche se redujo significativamente en todos los grupos experimentales entre los días 35 y 84 post-infección, debido probablemente a la existencia de un proceso de auto-curación.

Estas lesiones son provocadas por una reacción inflamatoria, especialmente de un infiltrado de eosinófilos que se produce a nivel perilobulillar (Dunn, 1956). Por tanto, la presencia de manchas de leche, se relaciona con la capacidad del organismo a responder frente al parásito. En infecciones experimentales con *M. apri* en hámsteres, Yoshihara (2004) observó que los animales que recibieron múltiples dosis infectivas presentaban un mayor número de lesiones hepáticas y un menor número de parásitos pulmonares, que aquellos que recibieron una única dosis infectiva. Por tanto, estos datos sugirieron que el desarrollo de la resistencia en los hospedadores se mostraba en la patogénesis del hígado, al producirse este tipo de lesiones.

En nuestro estudio, esta relación entre el desarrollo de resistencia y la formación de lesiones hepáticas, se hace especialmente evidente en los animales pertenecientes al lote 3. Estos cerdos presentaron la sintomatología y lesiones más leves, el menor número de parásitos, el menor tamaño de las hembras y la menor concentración de huevos en heces y sin embargo, mostraron el número más elevado de manchas de leche en el hígado. Esto significaría que la actuación celular a nivel hepático resulta eficaz para frenar el avance de las larvas hacia su localización definitiva.

5.4.- Sobre la respuesta eosinofílica.

Los resultados obtenidos durante el análisis de los niveles de eosinófilos en sangre periférica de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales son comparables con los obtenidos por otros autores en diferentes ensayos experimentales. En nuestra experiencia el primer incremento significativo se registró al día 14 post-infección. No obstante, no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes lotes, los grupos 1 y 2 fueron los que alcanzaron los niveles más elevados (9-10%). Concretamente, Dixon (1971) observó que los niveles máximos de eosinófilos se producían a los 15 días tras la infección con *M. apri*. Así mismo, Ferguson (1981) detectó que entre los días 15 y 30 tras la infección, los niveles de eosinófilos circulantes eran significativamente superiores a los detectados en animales sanos.

Según nuestros datos, no se puede afirmar que la respuesta eosinofílica desencadenada por *M. apri* sea dosis-dependiente. Sin embargo, Dunn (1956) evidenció que según aumentaba la dosis de infección, se alcanzaban mayores niveles de eosinófilos, principalmente entre la 2ª y 3ª semana post-infección.

Tras este primer pico, se describió un ligero descenso de los eosinófilos periféricos, incluso en algunos casos se alcanzaron niveles inferiores a los detectados en los animales controles. Presumiblemente, este descenso se debe a la migración de éstos hacia los focos de la infección, principalmente al pulmón e hígado. El estudio histopatológico desarrollado a nivel pulmonar corrobora esta afirmación, puesto que desde el día 14 post-infección fue observado un importante infiltrado eosinofílico. De hecho, Sasaki (1984) describió una fracción proteica presente, principalmente en los estados larvarios y en los adultos de *M. apri* que poseen actividad quimiotáctica sobre los eosinófilos.

5.5.- Sobre la respuesta inmunológica de los porcinos frente a *M. apri*.

Los parásitos de forma general, son capaces de evadir con cierta facilidad los sistemas defensivos puestos en marcha por el hospedador. En nuestro caso, *M. apri* es un parásito capaz de sobrevivir en los pulmones del cerdo durante largos periodos de tiempo (Dunn, 1956; Mackenzie, 1958). La persistencia de la estimulación antigénica en las infecciones parasitarias crónicas, generalmente producen una polarización de la subpoblación linfocitaria CD4⁺, e incluso en casos extremos se producen estados de inmunoregulación (Respuesta Th1 y Th2). Estos fenómenos de inmunoregulación, en muchos de los casos de inmunosupresión, están inducidos deliberadamente por los parásitos para promover su supervivencia (Sher y Colley, 1989; Mitchell, 1991).

Las *artimañas* de las que se valen los vermes para eludir los mecanismos inmunológicos son muy variados. Entre ellos; el cambio de estructura antigénica en sus diferentes mudas larvarias, modificación de los antígenos de superficie, migración por diferentes órganos, asentamiento en localizaciones donde no provocan importantes alteraciones orgánicas, etc.

A lo largo de esta discusión, según desgranamos todos los resultados parasitológicos y anatomopatológicos obtenidos durante la experiencia, hemos podido

conformar *a priori* la idea de que los animales pertenecientes al lote 3 (Reinfecciones + Reto) presentaron un elevado nivel de resistencia frente a *M. apri*. Por el contrario, observamos que los animales más afectados por esta parasitación fueron los integrantes del lote 1 y 2 (Monodosis: 3000 y 1000 L3, respectivamente).

Por tanto, en este apartado pretendemos definir cuales son los mecanismos inmunológicos celulares y humorales que actúan, tanto a nivel periférico como local, responsables de los diferentes perfiles de las respuestas descritas.

5.5.1.- Respuesta inmune celular.

En los diversos estudios llevados a cabo sobre infecciones experimentales de *Metastrongylus spp.* en cerdos, se han descrito importantes infiltrados celulares a nivel del parénquima pulmonar, principalmente de eosinófilos, neutrófilos y macrófagos (Mackenzie, 1958 y 1959).

Incluso, se ha descrito una densa infiltración de eosinófilos en el pulmón y eosinofilia en sangre periférica, en el momento de la llegada de las primeras larvas de *M. apri* al pulmón proporcional a la carga parásita (Sasaki y Hyogo, 1977). Mediante ensayos *in vitro*, Sasaki y Katsuno (1982) confirmaron que los extractos solubles de adultos de *M. apri* usados como estimuladores celulares, poseían actividad quimiotáctica para los eosinófilos y neutrófilos. En ulteriores estudios *in vitro*, Sasaki y Katsuno (1983 y 1984) identificaron que los antígenos elaborados a partir de L3 de *M. apri* eran estimuladores de los eosinófilos, mientras que los obtenidos a partir de huevos embrionados y de adultos del nematodo, presentaron actividad quimiotáctica por los neutrófilos y macrófagos.

El grado de importancia que poseen los linfocitos T en la respuesta inmune celular desencadenada frente a *M. apri*, se basó fundamentalmente en la posibilidad de reconocimiento de los antígenos larvarios (Koga *et al.*, 1976). Esto se puso de manifiesto mediante el análisis comparativo de la respuesta celular desencadenada en animales sanos y timentomizados, tras la infección experimental siguiendo diferentes patrones de dosificación. Se observó que las cargas parasitarias en los animales timentomizados eran significativamente superiores a las detectadas en los animales sanos infectados y vacunados.

Con la finalidad de alcanzar un mayor conocimiento de los mecanismos celulares desarrollados en animales vacunados con L3 atenuadas, sus células esplénicas fueron cultivadas *in vitro* en presencia de L3 de *M. apri*. A tenor de los resultados obtenidos en estos ensayos, Sakamoto (1978) señaló la importancia tanto de los linfocitos T como de los linfocitos B, ambos presentes en los folículos esplénicos, en la respuesta inmune celular frente a las L3 de *M. apri*.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, tras el análisis de las diferentes poblaciones celulares presentes en muestras de sangre periférica, ganglio torácico-pulmonar y BAL por citometría de flujo laminar, nos han permitido realizar un estudio completo de los mecanismos inmunes celulares más importantes que se desarrollaron en los porcinos durante la infección experimental con *M. apri*.

Como ha sido comprobado, los animales pertenecientes al lote 1 infectados con una dosis de 3000 L3, han sido los más afectados por la parasitación. La respuesta de estos porcinos frente a la infección por *M. apri* a nivel periférico, se caracterizó por un aumento significativo de los eosinófilos y monocitos circulantes al día 14 y 35, respectivamente. Asimismo, se describió un ligero aumento de los linfocitos T, causado principalmente por el incremento de los CD8⁺ y de las células $\gamma\delta$, entre los días 14 y 35 post-infección. Se evidenció una correlación negativa entre la concentración de huevos de *M. apri* en las heces y los porcentajes de linfocitos CD8⁺ presentes en sangre periférica. El rol que estas poblaciones celulares de eosinófilos, monocitos, células CD8⁺ y $\gamma\delta$ van a desempeñar, es claramente de naturaleza citolítica. A pesar de esto, se evidenció que esta respuesta sistémica no fue suficientemente eficaz para frenar la llegada y posterior asentamiento del parásito en sus localizaciones pulmonares, no se trató de una respuesta protectora.

Durante la primera fase de la infección (0-35 *dpi*), tiene lugar la migración larvaria a través del sistema linfático, la llegada de éstas al pulmón, así como su evolución a estado adulto y finalmente, su establecimiento en el tracto respiratorio. Por ello, las primeras semanas tras la infección engloban el periodo de mayor inmunogenicidad, donde se establecen la mayoría de los mecanismos de defensa, tanto a nivel sistémico como local. Freigofas *et al.* (2001) observaron que las L3 de *Oesophagostomum dentatum* contenían y secretaban sustancias con actividad

inmunomoduladora sobre las células mononucleares sanguíneas que además, podían variar a lo largo de su desarrollo en el hospedador.

En este momento inicial de la infección se observó un ligero aumento de la población circulante de linfocitos B, siendo el lote 1, el que presentó los niveles más elevados de estas células respecto al resto de grupos experimentales. Precisamente, en el lote 1 se fijó el comienzo de la respuesta inmune humoral (IgG, IgG1 e IgG2) desencadenada por las células plasmáticas provenientes de linfocitos B activados el día 21 post-infección. A nivel local, concretamente en los ganglios torácico-pulmonares, no se registró ningún cambio en la población de macrófagos a lo largo de la infección. Sin embargo, se observaron ciertas variaciones en las poblaciones linfocitarias. En el caso de las células B, se presentó un incremento del 10% al día 14 tras la infección. Por su parte, los linfocitos T aumentaron en un 40% al día 35. Esta subida se debió fundamentalmente a las células CD4⁺ y $\gamma\delta$.

Del mismo modo, los animales integrantes del lote 1 fueron los que presentaron mayores lesiones histopatológicas en el tejido pulmonar. En cambio, no parece que esto se correlacione con la intensidad de la respuesta celular desencadenada a nivel pulmonar. En las muestras de BAL analizadas al día 35 post-infección, se describió un ligero aumento de la población de células T, principalmente de CD8⁺ y $\gamma\delta$, evidenciando la tendencia a desencadenar una respuesta celular citotóxica primaria frente al parásito. Además, fue observado un importante descenso de los macrófagos alveolares, alrededor del 40% de la población, a partir del día 35 y hasta el final de la experiencia.

Como ha sido comentado con anterioridad, los macrófagos alveolares porcinos son muy importantes en el desarrollo de las respuestas inmunológicas a nivel del tracto respiratorio. No son células consideradas accesorias en respuestas antígeno-dependientes, si no que son varias las funciones defensivas atribuidas a tales células. La de mayor relevancia es la actividad fagocítica, puesto que los macrófagos alveolares poseen una enorme capacidad de acidificar rápidamente sus endosomas, eliminando eficazmente las partículas extrañas (Basta *et al.*, 1999). A su vez, son considerados como reguladores de la respuesta local en el pulmón, puesto que son competentes productores de factores inmunoreguladores o interleuquinas que estimulan la actividad inicial de los linfocitos (Basta *et al.*, 2000). Además, poseen la capacidad de limitar las posibles lesiones inflamatorias que se produzcan en el pulmón (Herscowitz *et al.*, 1979;

Ettensonh *et al.*, 1988). Por ello, atendiendo a las funciones específicas de los macrófagos alveolares, este marcado descenso que sufrieron los animales del lote 1 a partir del día 35, podría deberse al importante desgaste sufrido por esta población en su intento de eliminar o en su caso de reducir, el número de las larvas de *M. apri* a su llegada al pulmón.

Autores como Shope (1941, 1943, 1955), Sen *et al.* (1961), Kammer y Hanson (1962) o Wallace (1977), han tratado la posible interacción existente entre *Metastrongylus spp.* y el virus de la influenza porcina. Los nematodos pulmonares fueron considerados como potenciadores de esta patología en animales portadores del virus. Pero no se demostraron que factores inmunológicos estaban implicados en este fenómeno. A tenor de nuestros resultados, la fase inicial de la infección por *M. apri* (14-35 dpi) podría ser considerada como un momento crítico para que otros microorganismos aprovechen para invadir el sistema respiratorio.

Respecto al perfil de la respuesta inmune celular desencadenada en los porcinos integrantes del lote 2, que recibieron una única dosis de 1000 L3, cabe destacar que ésta fue prácticamente indetectable a nivel periférico. Tan sólo, se detectó un incremento aproximado del 10%, en la población circulante de linfocitos T, principalmente CD8⁺ y $\gamma\delta$, al día 84 post-infección.

Por su parte, a nivel ganglionar se produjo una subida muy significativa, casi del 40%, de la población de macrófagos al día 14 post-infección. Posteriormente, al día 35 se describió, al igual que en los animales del lote 1, un ligero incremento de los linfocitos B. Las células T, concretamente los CD4⁺ experimentaron un aumento progresivo a partir del día 14 y hasta el final de la experiencia, del 30%. La secuencia temporal de estas variaciones descritas en los ganglios linfáticos, nos indican una tendencia a desarrollar una respuesta humoral mediada por las células T colaboradoras. Puesto que, los macrófagos actuarían como células presentadoras de antígeno, las células CD4⁺ como estimuladoras de los linfocitos B, para estos transformarse a su vez, en células plasmáticas productoras de anticuerpos antígeno-dependientes.

A nivel pulmonar, la respuesta primaria desarrollada fue de carácter citotóxico frente a los estados larvarios del parásito. Así, se produjo un significativo aumento de los linfocitos T CD8⁺, aproximadamente del 30%, al día 14 post-infección. Igualmente,

entre los días 14 y 35 se detectó un descenso del 30% de la población de macrófagos alveolares, al igual que ocurriese en los animales del lote 1.

Los animales pertenecientes al lote 3, que recibieron varias dosis progresivas de L3 previas al reto de 1000 L3, exhibieron un elevado nivel de resistencia frente a la parasitación por *M. apri*. La respuesta de memoria celular desencadenada a nivel local frente al reto fue muy importante. Por el contrario, en sangre periférica sólo se registró una subida puntual, aproximadamente del 10%, en los porcentajes de monocitos circulantes al día 14 post-infección. Asimismo, se observó que los valores iniciales de linfocitos T fueron significativamente más bajos que los descritos en los grupos de animales primoinfectados.

En los ganglios torácico-pulmonares se observó que el porcentaje de macrófagos era significativamente más elevado respecto al resto de grupos desde el día 0 del ensayo. Esto puede ser debido a la estimulación previa a la que estos animales habían sido sometidos durante la reinfecciones. Pero además, estos valores continuaban aumentando a lo largo de la infección, alrededor de un 30%, para finalmente, presentar niveles compatibles a los controles al día 84 post-infección. La población de linfocitos T presentes en el tejido linfoide difuso del área central de los ganglios torácico-pulmonares experimentaron un incremento del 20% al día 14 tras la infección. Este incremento se debía de forma equitativa a las células T CD4⁺ y CD8⁺. Posteriormente (35 dpi), se produjo una caída importante de los porcentajes de los linfocitos T, si bien al final de la experiencia se alcanzaron valores muy elevados (61±4'6%), principalmente de CD4⁺. Por su parte, los linfocitos B de los folículos linfoides manifestaron un incremento puntual desde un 13% hasta un 43% al día 35 post-infección.

Jungersen *et al.* (2001), durante el estudio de la respuesta inmune regional en los ganglios hepáticos y pulmonares de cerdos previamente inmunizados, frente a la migración larvaria de *A. suum*, resaltaron el aumento significativo de la proporción celular CD4⁺/CD8⁺ y detectaron un incremento de la población de linfocitos B del 10% al día 14 post-infección. Este incremento mostrado por las células B ganglionares, resulta modesto cuando es comparado con el incremento registrado en nuestro estudio, del 20%. Incluso, en otras afecciones pulmonares, como en el caso de las neumonías

causadas por *Mycoplasma hyopneumoniae* en los porcinos, se observó un aumento de los linfocitos B en los ganglios bronquiales desde el 20% al 40% (Walker *et al.*, 1996).

La reacción de los ganglios torácico-pulmonares frente a la llegada de los estados larvarios de *M. apri* al pulmón, en los animales del lote 3 ha sido trascendental y eficaz. Se han registrado correlaciones positivas estadísticamente significativas, entre el número de larvas totales recuperadas en los pulmones al día 14 y los porcentajes de linfocitos T CD8⁺, linfocitos B y macrófagos presentes a nivel ganglionar.

Respecto a las variaciones celulares detectadas en las muestras de BAL, observamos una evidente participación de los linfocitos B y de los macrófagos alveolares. Por el contrario, no se evidenció ningún cambio significativo en la población de células T a nivel pulmonar durante la experiencia. En casos de neumonías verminosas en el ganado caprino producidas por *Muellerius capillaris*, se observó que los animales reinfectados mostraban unos niveles de macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos en BAL significativamente más elevados que los primoinfectados (Berrag *et al.*, 1997).

Ya ha sido resaltada la importancia que poseen los macrófagos alveolares porcinos durante el desencadenamiento de una respuesta defensiva a nivel pulmonar. Ramaswamy *et al.* (1991) observaron *in vitro* como los macrófagos alveolares de ratas se adherían y mataban a las larvas de *Nippostrongylus brasiliensis*. Asimismo, comprobaron que en los individuos reinfectados se desarrollaba una reacción granulomatosa a nivel pulmonar más rápida y eficaz que en los primoinfectados. En el caso de las neumonías producidas por *Pasterella multocida* en los porcinos, se reveló un importante aumento de la población de macrófagos inmaduros, así como un descenso patente del MHC-II en los animales infectados (Berndt y Muller, 1997). En el caso de los porcinos reinfectados de nuestro estudio (Lote 3), se demostró el papel preponderante y decisivo de esta población celular. Puesto que, se trata del único grupo experimental del ensayo que no redujo los porcentajes de macrófagos alveolares presentes en BAL, si no que experimentó un incremento del 20%, a la llegada de las larvas de *M. apri* al tejido pulmonar (14 dpi). Además, se debe resaltar que los porcentajes de estas células fueron superiores al resto de grupos, desde el inicio hasta el final de la infección, independientemente del pico apreciado al día 14 post-infección.

Otro mecanismo efector responsable de la resistencia de los porcinos del lote 3 desencadenado a nivel pulmonar fue el significativo incremento de las células B, de un 0'5% a un 4%, entre los días 14 y 84 post-infección. Estos linfocitos actúan como células presentadoras de antígeno, ya que son capaces de unirse a través de sus inmunoglobulinas de superficie al antígeno libre sin necesidad de estar asociados al MHC. Una vez expresado el antígeno en la membrana de los linfocitos B, podría comenzar la producción de anticuerpos específicos si encontrase el estímulo adecuado de un linfocito CD4⁺. Estos datos nos indican la posible existencia de una importante respuesta humoral a nivel local a partir del día 14 post-infección que se acrecentaría con el tiempo.

La eficacia de la respuesta defensiva llevada a cabo principalmente, por los macrófagos alveolares y los linfocitos B contra los estados larvarios del parásito, se evidencia por las correlaciones positivas estadísticamente significativas detectadas entre el número total de L3 y el porcentaje de ambas poblaciones. Asimismo, entre los macrófagos alveolares y el número total de adultos presentes en los pulmones de los animales del lote 3 se describió una relación antagónica. Este hecho indica que estos macrófagos son efectivos contra las formas larvarias y los estados adultos de *M. apri*.

En último lugar, analizaremos los mecanismos inmunológicos desplegados por los animales inmunizados con extractos antigénicos procedentes de los estados larvarios y adultos de *M. apri*, antes de ser retados con 1000 L3 (Lote 4). Estos animales manifestaron una escasa resistencia a la implantación del parásito. No obstante, lo que resultó verdaderamente relevante fue la disminución significativa de los adultos en pulmón en la fase final de la infección.

Al día 14 de la experiencia, en los animales preinmunizados se observó una evolución de los linfocitos T circulantes inversa a la que ocurre en los animales controles. Esta población linfocitaria aumentó un 30% a lo largo del tiempo, principalmente a partir del día 35, al igual que se describió para el lote 2. Este aumento se debe fundamentalmente, a las células $\gamma\delta$ y CD8⁺. Incluso, se detectó una correlación negativa entre el número de adultos presentes en el pulmón y el porcentaje de linfocitos CD8⁺ en sangre periférica.

Hoy en día hay fuertes evidencias que sugieren que estas células CD8⁺, una vez que están convenientemente activadas, son capaces de matar al microorganismo

exógeno por gránulo-mediación o por citotoxicidad mediada (Harty *et al.*, 2000). Sin embargo, actualmente la función de las células CD4⁺CD8⁻ aun no ha sido determinada, aunque se sabe que son capaces de responder a mitógenos y muestran una actividad citolítica evidente en las primeras fases de infecciones víricas y bacterianas (Modlin *et al.*, 1989; Janis *et al.*, 1989; Hiromatsu *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1992). No obstante, Pauly *et al.* (1998), durante un estudio sobre la evolución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T en porcinos infectados con el virus de peste porcina clásica, observaron una importante reducción de estas células $\gamma\delta$ en sangre periférica.

Además, en estos animales preestimulados con los extractos proteicos del parásito, se evidenciaron unos niveles de monocitos circulantes más elevados que en el resto de grupos desde el día 0 y hasta el día 14 post-infección.

A nivel ganglionar, en los animales pertenecientes al lote 4 se describió una importante reacción por parte de los linfocitos B y macrófagos. Incluso, los porcentajes de células B alcanzados al día 35 post-infección fueron superiores a los mostrados por el lote 3. Igualmente, el incremento de los macrófagos entre los días 14 y 35 fue superior al registrado en el lote 3, aproximadamente del 40%. Los linfocitos T ganglionares se hallaban especialmente elevados antes de la infección, fue a partir del día 14 y hasta el 35, cuando tuvo lugar un progresivo descenso del 20% de esta población. Según afirman Pabst y Binns (1995) estas células no son efectoras y no se destruyen en el pulmón si no que retornan vía linfática a los ganglios bronquiales. Por tanto, el papel de los linfocitos en el espacio broncoalveolar es esencialmente inmunomodulador.

Las variaciones celulares más relevantes descritas en los animales del lote 4 en BAL se deben a los linfocitos B y a los macrófagos alveolares. Al igual que se describió en el lote 3, se detectó un incremento de los linfocitos B al día 35 tras la infección del 3%. Según los resultados obtenidos este aumento de las células predecesoras de las células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos, resultó llamativa en los lotes 3 y 4. A tenor de ello, se sugiere la existencia de una respuesta de tipo humoral en el tracto respiratorio decisiva en el asentamiento y avance del parásito en el pulmón. Así, en el caso de la ascariosis porcina, Frontera *et al.* (2004) indicaron una intervención significativa de la IgA en la resistencia frente a la migración larvaria a nivel del tejido pulmonar, demostrada por análisis inmunohistoquímicos. Por su parte, Scott *et al.* (1996) concluyeron que los vacunos completamente resistentes a *Dictyocaulus viviparus*

presentaron un aumento muy significativo de los niveles de IgG₁ e IgA en BAL, señalando el papel decisivo que desempeña la respuesta local mediada por anticuerpos frente al nematodo.

Respecto a la población de linfocitos T presentes en BAL, cabe destacar que éstos se hallaron en niveles más bajos que los registrados en los animales controles. Tan sólo al día 84 tras la infección, se describió un incremento significativo del 30% causado por las células CD8⁺, CD4⁺ y $\gamma\delta$. En los animales del lote 4, se apreció un marcado descenso de la población de macrófagos alveolares a partir del día 14 y hasta el final de la experiencia, como ya ha sido descrito para los lotes 1 y 2.

5.5.2.- Respuesta inmune humoral.

La respuesta inmune humoral dependiente de los linfocitos T es sumamente especializada, generándose anticuerpos de diferentes isotipos (IgG, IgE o IgA), cada uno de los cuales media funciones efectoras específicas. En cambio, las respuestas de los anticuerpos frente a antígenos T-independientes son relativamente sencillas y de escasa afinidad, dependiendo principalmente de la IgM (Abbas *et al.*, 2000).

Los primeros estudios sobre los mecanismos efectores de resistencia frente a *Metastrongylus spp.* en porcinos re infectados, apuntaron hacia la importancia de los eosinófilos y de las gammaglobulinas, los cuales sufrían un incremento mayor y más rápido en las segundas infecciones, junto con una caída simultánea de la seroalbúmina (Jaggers y Herbert, 1968). Este incremento de las gammaglobulinas en el suero, también ha sido relacionado con la resistencia mostrada frente a *M. apri* por los hámsteres después de la administración de 800 L3 tras una previa infección con 160 L3 (Kumar y Mortelmans, 1976). Posteriormente, Barratt (1972) demostró mediante inmunodifusión radial, que la reacción de hipersensibilidad desencadenada en los cerdos inmunizados y re infectados, estaba mediada por anticuerpos específicos del tipo IgA e IgE.

Así mismo, Barratt y Herbert (1972) mediante la técnica de hemaglutinación pasiva, detectaron la presencia de los primeros anticuerpos circulantes específicos al día 7 y 14 post-infección en infecciones simples con dosis de 1000 L3 y 5000 L3, respectivamente, alcanzando los niveles máximos entre los días 14 y 21 tras la infección (titulación de 1:81). En los casos ensayados de infecciones repetidas, los primeros

anticuerpos eran observados a los 7 días, mientras que los niveles máximos se detectaban a los 14 días tras el reto (titulación de 1:128). Resultados similares fueron manifestados durante la estandarización de un método diagnóstico inmunológico frente a la infección por *M. apri* en porcino (IFI), puesto que los niveles de fluorescencia más elevados se detectaban entre los días 14 y 33 tras la infección, aunque la presencia de fluorescencia persistía hasta el día 85 post-infección (Kumar *et al.*, 1978).

En nuestro estudio sobre la respuesta humoral desarrollada en los diferentes grupos experimentales, se han analizado dos isotipos de inmunoglobulinas, las IgG (T-dependientes) y las IgM (T-independientes). Asimismo, dentro de las IgG se analizaron las subclases IgG₁ e IgG₂, según sea la tendencia a producir unas u otras, podremos revelar qué tipo de respuesta inmunitaria es desencadenada en los porcinos frente a *M. apri*, Th1 o Th2.

En la mayoría de las helmintiasis se ha demostrado que la expresión del isotipo IgG₁ está controlada por citoquinas del tipo Th2, mientras que la regulación de la producción de IgG₂ es llevada a cabo por citoquinas del tipo Th1 (Sher y Coffman, 1992). Se ha comprobado que la mayor producción de IgG₁ respecto a IgG₂ por parte de linfocitos B cultivados *in vitro*, se incrementaba significativamente en presencia de la IL-10, si bien la respuesta inversa tenía lugar cuando se cultivaban en presencia de IFN- γ o IL-12 (Crawley y Wilkie, 2003). Según Crawley *et al.* (2003) en la especie porcina, la expresión del isotipo IgG₁ e IgG₂ está controlada por la producción de citoquinas derivadas de los linfocitos T colaboradores del tipo 2 como la IL-4 y la IL-10 (Respuesta Th2) y del tipo 1 como el IFN- γ y la IL-12 (Respuesta Th1), respectivamente. Hecho que define la polarización de la respuesta inmune hacia una inmunidad mediada por células (Inmunidad celular o Th1) o por anticuerpos (Inmunidad humoral o Th2).

Los resultados obtenidos del análisis de los niveles de IgM en los diferentes lotes del estudio, son poco esclarecedores respecto al papel que desempeña esta inmunoglobulina en el desarrollo de una respuesta primaria frente a *M. apri*. Aunque, parece evidente que su actividad no es transcendental en la lucha frente al parásito. Según los datos obtenidos, la IgM reacciona más intensamente frente al antígeno larvario que frente al de adultos. No obstante, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos infectados y el control a lo largo de la experiencia.

A tenor de los resultados parasitológicos y anatomopatológicos obtenidos durante el estudio, los porcinos pertenecientes al lote 1 y 2, infectados con una única dosis de 3000 y 1000 L3, respectivamente, han sido los de menor éxito en el desarrollado de su respuesta inmunológica frente a la implantación del parásito en el tejido pulmonar.

La respuesta de IgG a nivel sistémico en los porcinos del lote 1 frente a la infección por *M. apri*, se hace evidente a partir del 21 *dpi* y se mantiene más o menos constante, hasta el 56 *dpi*. Los valores de D.O. obtenidos a partir del antígeno larvario, fueron más elevados que los mostrados por el antígeno somático de adultos durante las tres primeras semanas de la infección. A partir del día 28 post-infección, se igualaron los resultados registrados por ambos antígenos. Esto indica, que los animales reaccionan en la fase inicial de la infección (14-21 *dpi*) frente a los antígenos propios de los estados larvarios. Sin embargo, el hecho de que la intensidad de respuesta entre ambos tipos de antígenos se iguale a mediados de la experiencia, demuestra que poseen muchos epítomos en común.

Respecto al perfil de la respuesta inmune humoral desencadenada por la IgG en los porcinos del lote 2, cabe destacar que siguió un patrón muy similar, aunque menos intenso, que el descrito para el lote 1. En este caso la reactividad detectada por el antígeno larvario fue superior al de adultos durante toda la experiencia.

Sobre la disyuntiva entre IgG₁/IgG₂, parece evidente que ambas inmunoglobulinas fueron responsables de la respuesta desencadenada por IgG en los animales primoinfectados del lote 1 y 2. No obstante, en el lote 1 la respuesta desarrollada por el isotipo IgG₁ fue más intensa que la mostrada por IgG₂, especialmente entre los días 21 y 49 post-infección. Esto indica, que la reacción de IgG frente a los antígenos de *M. apri* estaba fundamentada en la IgG₁ (Respuesta Th2). En cambio, se detectó una correlación positiva entre el número de larvas presentes y los niveles de IgG₂ frente a ASA. La selectiva inducción de la respuesta Th2 por los helmintos, puede ser debida a la estructura de las distintas moléculas que los conforman, las cuales son capaces de desencadenar preferentemente una expansión de los linfocitos T colaboradores del tipo 2, si bien la base molecular de este fenómeno no se ha definido aun, como ya han indicado otros autores previamente (Sher y Coffman, 1992; Holland *et al.*, 2000).

Por el contrario, en el lote 2 se observó una reacción más intensa de la IgG₂, especialmente frente a ASA, desde el día 21 y hasta el día 49 post-infección. No obstante, entre los días 21-28 se registró un importante aumento de la IgG₁ frente a ASL. Por tanto, en las infecciones simples con dosis menores de *M. apri*, la respuesta humoral desencadenada por IgG en la primera fase de la parasitación (21-28 dpi) se debe a ambas isotipos, IgG₁ e IgG₂. Sin embargo, desde el día 28 post-infección se produce una clara inclinación hacia una respuesta producida principalmente por la IgG₂ frente a ASA (Respuesta Th1). Finalmente, a partir del 63 dpi se observó un incremento significativo de la reactividad de la IgG₁ frente al antígeno de adultos.

No parece estar muy claro, cuál de los isotipos predomina en una respuesta primaria frente a *M. apri*. Sin embargo, durante el estudio del perfil de inmunoglobulinas desarrolladas en la infección experimental con altas y pequeñas dosis de *T. spiralis* y *T. britovi* en cerdos, se observó que las IgG e IgG₁ eran responsables de la respuesta protectora en todos los casos. En cambio, la IgM sólo aumentó durante las primeras semanas de la infección e IgG₂ apenas se registró, aunque el patrón que ésta seguía fue similar al de IgG e IgG₁ (Serrano *et al.*, 2001).

Los animales reinfectados con dosis progresivas de L3 de *M. apri* pertenecientes al lote 3, exhibieron un elevado nivel de resistencia frente al reto de 1000 L3. Durante el periodo de reinfecciones (200+400+800 L3) previas al reto, se observó un incremento significativo de IgG e IgG₁, concretamente al día 20 tras la primera dosis de 200 L3. Los niveles de ambas inmunoglobulinas continuaron subiendo durante este periodo de inmunización, pero fue a partir del día 7 tras el reto, cuando se detectó un significativo aumento de los valores de IgG e IgG₁, principalmente frente a ASL. Sin embargo, la respuesta de IgG₂ fue muy leve durante el periodo pre- y post-reto.

Esta precocidad en el desencadenamiento de la respuesta humoral en animales anteriormente infectados, también ha sido descrita en la ostertagiosis experimental caprina. En los animales primoinfectados con una dosis de 20000 L3 de *Teladorsagia circumcincta* se registraron los primeros incrementos significativos de IgG tras la 4ª semana post-infección. Sin embargo, en los individuos previamente infectados seriadamente con un total de 10000 L3, mostraron los primeros picos de IgG significativos en la 1ª semana tras el reto (González, 2002).

Asimismo, Scott *et al.* (1996) analizaron la presencia de las IgA, IgM, IgG₁ e IgG₂ en suero sanguíneo de bóvidos infectados repetidamente con L3 de *D. viviparus*. Los niveles de IgG e IgG₁ en el suero sanguíneo, siguieron un patrón similar a lo largo del experimento, alcanzando los niveles máximos a partir del día 21 tras la primera infección y de igual manera tras la segunda, aunque no se apreciaron nuevas elevaciones de los niveles tras la tercera dosis de L3. Respecto a la respuesta de la IgG₂, se observó que los niveles más elevados se correlacionaban positivamente con una mayor expulsión de larvas, responsabilizándola de la susceptibilidad de los bovinos frente a *D. viviparus*.

La respuesta inmune humoral defensiva desarrollada por los animales previamente infectados (Lote 3) está basada en gran medida en las inmunoglobulinas, IgG e IgG₁. Los niveles de IgG y sobre todo de IgG₁ detectados frente al antígeno larvario de *M. apri* han sido los más elevados respecto al resto de lotes. Por tanto, podemos afirmar que la respuesta desencadenada por IgG₁ (Respuesta Th1) ha sido muy eficaz contra la colonización del pulmón por parte de los estados larvarios de *M. apri*. Aún así, se demostró que cuanto mayor era el número total de larvas presentes en el pulmón, más elevados eran los niveles producidos de IgG frente a ASL, de IgG₁ frente a ASL y ASA e incluso de IgM. Por el contrario, a mayor cantidad de larvas, menores fueron los niveles de IgG frente a ASA y de IgG₂ frente a los dos antígenos.

Al analizar la producción y evolución de las inmunoglobulinas en los animales inmunizados con extractos proteicos procedentes de los estados larvarios y adultos de *M. apri*, antes de recibir una dosis de 1000 L3 (Lote 4), se comprobó que el empleo de dichos extractos antigénicos provocó el desarrollo de una fuerte respuesta de tipo Th1. Debemos indicar, que se han denunciado casos en los que antígenos derivados de helmintos que normalmente están asociados a una respuesta del tipo Th2, inducen una fuerte respuesta Th1 cuando son administrados junto al adyuvante de Freund (Grzych *et al.*, 1991; Pearce *et al.*, 1991; Pearce, 2003), como es el caso que nos ocupa. La alternativa a esta problemática sería encontrar un adyuvante que no interfiriese en la inducción de la respuesta inmune del hospedador o un extracto antigénico que desarrolle una potente respuesta Th2. Holland *et al.* (2000) sugirieron que los responsables de promover una respuesta de tipo Th2 eran las proteínas secretadas por el parásito. Para ello, administraron en ratón los productos de excreción-secreción de *Nippostrongylus*

brasiliensis sin adyuvante y con adyuvante completo de Freund, en ambos casos se observó que la respuesta inmune desarrollada fue del tipo Th2.

Desde los días 20 y 30 tras la aplicación de la primera dosis del inóculo, se produjo un incremento significativo de IgG e IgG₁ frente a ASA, pero de forma muy especial de IgG₂ frente a las dos clases de antígenos. Una vez retados los animales, la evolución seguida por IgG e IgG₁ fue muy similar, detectándose un aumento significativo de los niveles al día 14 post-infección y manteniéndose más o menos constantes hasta el día 35 post-infección. A partir de este momento, los niveles de IgG e IgG₁ experimentaron un descenso progresivo hasta el final de la experiencia. En cambio, los valores de IgG₂ frente a los dos antígenos, sobre todo frente a ASA, se mantuvieron en cotas muy elevadas durante todo el periodo de infección.

Es evidente que en los animales del lote 4, la respuesta inmune humoral provocada mediante la inmunización con extractos proteicos del parásito se inclina hacia una respuesta Th1. Sin embargo, la resistencia mostrada por estos animales según se ha comprobado fue moderada. Probablemente, esta predominancia constante del isotipo IgG₂ frente a ASA, sea la responsable de la susceptibilidad mostrada por los animales del lote 4, permitiendo que los adultos de *M. apri* se instalaran en el tejido pulmonar. Es evidente, que no se indujo una eficaz respuesta Th2 frente a los estados larvarios, puesto que cuanto mayor era el número de larvas recopiladas al día 14 post-infección menores eran los niveles de IgG₁. Sin embargo, al final de la experiencia se detectó una importante disminución de la carga parasitaria, lo cual se ajusta a la relación positiva descrita entre las D.O. de IgG e IgG₁ y el número de adultos presentes en el pulmón.

Similares resultados han sido obtenidos en cerdos inoculados con *A. suum* que exhibieron un perfil de anticuerpos del tipo IgG₁ e IgM, en el caso de los individuos más jóvenes. Por su parte, aquellos cerdos inmunizados con diferentes fracciones antigénicas de *A. suum* desarrollaron principalmente el isotipo IgG₂ y en menor medida IgG₁ e IgM. Estos resultados sugirieron, que la resistencia adquirida frente a las larvas migratorias de *A. suum* estaba correlacionada con la producción de anticuerpos específicos del tipo IgG₁ e IgM, por lo que los futuros protocolos de inmunización investigados deberían centrarse en la estimulación de una respuesta del tipo Th2 y no del tipo Th1, como fue descrita (Frontera *et al.*, 2003).

En el caso de los bóvidos infectados experimentalmente con L3 de *D. viviparus*, se ha mostrado un papel primordial de la IgM durante las primeras semanas de la parasitación. Sin embargo, a partir de los dos meses tras la infección se registró una respuesta de IgG₁ e IgG₂, aunque la inmunoglobulina más significativa fue la IgG₁. Por el contrario, en animales previamente inmunizados con larvas irradiadas y posteriormente retados, no se observó una respuesta evidente de ninguno de los isotipos analizados (McKeand *et al.*, 1996).

5.6.- Correlación entre la respuesta inmune celular y humoral frente a *M. apri*.

Como ocurre en la mayoría de las infecciones tanto parasitarias como víricas o bacterianas, los mecanismos efectores humorales y celulares del sistema inmunológico interaccionan entre sí, para estimularse o inhibirse.

Concretamente, en el caso de las parasitosis pulmonares, se ha indicado la dependencia existente entre los eosinófilos y la presencia de inmunoglobulinas específicas en las respuestas protectoras frente a *M. apri*. Sasaki y Katsuno (1986) observaron que durante el cultivo *in vitro* de L3 de *M. apri* en presencia de suero de hámsteres previamente infectados por el parásito, promovían un mayor grado de adherencia de los eosinófilos peritoneales obtenidos tanto de animales sanos como infectados.

Asimismo, se conoce que con la extirpación del timo a un cerdo neonato se impide el desarrollo de la respuesta celular y de la mediada por anticuerpos o humoral, con la única excepción de la producción de anticuerpos T-independientes. Por tanto, la producción de los anticuerpos se produce cuando existe una eficaz colaboración entre los linfocitos B y los linfocitos T colaboradores (Roitt *et al.*, 1998).

Este fenómeno de inmunidad humoral mediada por linfocitos, se pudo observar en el lote 1. Se describió una relación positiva entre los niveles de IgG, IgG₁ e IgG₂ respecto a los linfocitos T en ganglio y los CD4⁺ en sangre periférica. Para el lote 2, esta correlación positiva entre la población de los linfocitos T colaboradores en ganglio torácico-pulmonar y sangre se produjo tan sólo con las IgG₂. En el lote 3, se observó una correlación positiva entre los niveles de IgG₁ y los CD4⁺ circulantes, poniéndose

nuevamente de manifiesto, que la respuesta humoral desencadenada en los animales más resistentes a la parasitación por *M. apri*, estaba mediada por linfocitos CD4⁺ del tipo Th2.

La activación de los linfocitos T citotóxicos, generalmente se produce por la secreción de sustancias inmunomoduladoras, como la IL-2 o el IFN- γ , por parte de los linfocitos CD4⁺ del tipo Th1. En nuestro estudio, sólo en el lote 1 se mostró una relación positiva entre los linfocitos CD8⁺ presentes en BAL y los niveles de IgG₁ e IgG₂.

La relación entre los linfocitos B y los niveles de anticuerpos es indefectible, pues un linfocito B estimulado, tanto por antígenos T-dependientes como por T-independientes, se transforma en un clon de células plasmáticas que producirán y segregarán anticuerpos en gran cantidad (Abbas *et al.*, 2000). Esta correlación se mostró en el lote 2, concretamente entre los niveles de IgG y los linfocitos B presentes en sangre periférica, así como entre IgG₁ y las células B en BAL. En el caso de lote 3, se describió una relación positiva entre los linfocitos B presentes en ganglio y BAL con los niveles de IgG₂ circulantes.

En la respuesta inmune, además de los linfocitos T y B, intervienen otras células denominadas células accesorias. Estas células realizan una gran variedad de funciones y desempeñan un papel muy importante en la presentación y eliminación de antígenos, tanto en una respuesta natural como adquirida. Concretamente, en nuestro estudio hemos determinado el nivel de los eosinófilos, monocitos y macrófagos. Desde el punto de vista de la interacción existente entre las respuestas celular y humoral, nos interesan especialmente los monocitos y macrófagos, puesto que los eosinófilos, sólo poseen la capacidad de fagocitar y no son células presentadoras de antígeno. Es decir, los monocitos-macrófagos (expresan el MHC-II) son las únicas células junto con los linfocitos B, capaces de presentar antígenos a los linfocitos T colaboradores (Stokes *et al.*, 1996; Summerfield, 1999).

En el lote 1, se ha evidenciado una correlación positiva entre los monocitos circulantes y los niveles de IgG₁. En el lote 2, se demostró una relación positiva entre la población de macrófagos en el ganglio torácico-pulmonar y los niveles de IgG₂. Y en el caso de los lotes 3 y 4, esta correlación positiva entre los macrófagos presentes en ganglio y las inmunoglobulinas se evidenció para las IgG e IgG₁.

5.7.- Direcciones futuras.

Este estudio ha plasmado las primeras aportaciones al conocimiento de los mecanismos efectores defensivos a nivel sistémico y local inducidos por los porcinos ibéricos frente al parásito pulmonar, *Metastrongylus apri*.

Uno de los problemas más relevantes acontecidos en la inmunoparasitología tradicional ha sido la identificación de las respuestas inmunes biológicamente eficaces. Actualmente, y gracias a los importantes avances sucedidos en la ciencia de la Inmunología, se nos brinda la posibilidad de analizar más profundamente todos los componentes participantes del sistema inmunológico.

No obstante, a la vez que esclarecemos algunas de las cuestiones, se nos plantean otras nuevas y más desafiantes. Por ejemplo,

- ¿Cuáles son los mecanismos responsables de la diferenciación entre una respuesta del tipo Th1/Th2 en las nematodosis pulmonares porcinas?
- ¿Realmente, el parásito tiene el poder de dirigir el sistema inmune de los porcinos en su favor?
- ¿Cuáles son las poblaciones de células T y citoquinas que controlan la inmunidad e inmunopatología en las nematodosis pulmonares porcinas?
- ¿Cómo podríamos dirigir o seleccionar las respuestas efectivas desencadenadas por los linfocitos T colaboradores con el fin de obtener vacunas eficaces?
- ¿Qué fracciones antigénicas del parásito o de sus productos excretorios-secretorios podrían provocar una fuerte respuesta Th2 para utilizarlas como vacunas?

Apenas hemos comenzado a andar el camino.....

6. CONCLUSIONES



1. La intensidad de parasitación en la metastrongylosis experimental porcina, en cuanto al éxito de implantación de los adultos en el pulmón, fue dosis-dependiente.
2. Las reinfecciones con L3 de *Metastrongylus apri* confirieron un alto grado de resistencia a los animales posteriormente retados, especialmente frente a los estados larvarios. Sin embargo, las inmunizaciones seriadas con los propios extractos crudos parasitarios no protegieron a los cerdos en infecciones posteriores.
3. La tos fue el principal signo clínico de parasitación, comenzando entre los días 10-12 post-infección, fecha de llegada de las L4 al tejido pulmonar. La severidad de la sintomatología fue proporcional a la dosis infectiva.
4. Histopatológicamente, el cuadro lesional observado en los pulmones de los animales infectados definen un proceso neumónico típico parasitario con tendencia a la cronicidad. Las lesiones más características fueron la presencia de áreas atelectásicas, áreas enfisematosas compensatorias y un importante infiltrado de células fagocíticas desde el 14 dpi y de granulomas parasitarios a partir del 35 dpi.
5. Las lesiones hepáticas blanquecinas descritas en los animales infectados y denominadas manchas de leche, se definieron como una hepatitis eosinofílica intersticial, acompañada de granulomas con posible presencia de restos de larva en el centro de la lesión. Se trata de un mecanismo defensivo frente a la migración errática de los estados larvarios en el hígado. Los animales pertenecientes al lote re infectado fueron los que presentaron un mayor número de manchas de leche en el tejido hepático.
6. En las infecciones con dosis elevadas, las hembras adultas de *M. apri* aumentaban su tamaño y por ende su capacidad de albergar huevos, existiendo una elevada correlación entre el número de adultos y la concentración de huevos

del parásito en las heces. El ratio hembra/macho se incrementó a medida que la población parásita fue menor, indicando la capacidad de supervivencia de la especie en condiciones adversas.

- 7.** El análisis parasitológico demuestra que el periodo de prepatencia fue de 28 días en todos los grupos experimentales. No obstante, en los animales primoinfectados a dosis altas se produjo un significativo aumento en la expulsión de huevos hasta el día 63 post-infección. En el resto de lotes la eliminación de huevos se mantuvo constante durante los tres meses del estudio.
- 8.** Las respuestas primarias de los porcinos frente a la migración larvaria, tanto de tipo celular (eosinófilos y monocitos-macrófagos) como humoral (IgM), resultaron inefectivas.
- 9.** La respuesta inmune celular desencadenada a nivel local fue decisiva en la instauración del parásito en los pulmones. Esta respuesta estuvo basada en el incremento de la población de linfocitos B y macrófagos en los ganglios linfáticos torácico-pulmonares y de los macrófagos alveolares detectados en BAL.
- 10.** La respuesta inmune humoral fue diferente según los protocolos de infección. Los animales primoinfectados desarrollaron una respuesta dual IgG₁/IgG₂, aunque a mayores dosis se detectó una mayor producción de IgG₁. En los porcinos re infectados la respuesta dominante fue de tipo Th2, con niveles muy elevados de IgG₁, sobre todo frente al antígeno larvario. Por el contrario, en los animales inmunizados se observó una respuesta dual IgG₁/IgG₂, pero fue más dominante la del tipo Th1 con hiperproducción de IgG₂, evidenciada desde las primeras semanas tras la administración de los inóculos.

7. RESUMEN



La metastrongylosis es una de las parasitosis que en mayor medida afecta al ganado porcino criado en extensivo. Esta nematodosis pulmonar, durante muchos años ha sido olvidada por las connotaciones de su ciclo biológico, y es que la necesidad de la presencia de lombrices de tierra para su transmisión, no concordaban con las tecnificadas instalaciones requeridas para la explotación de las razas porcinas precoces. Pero el resurgimiento, con más vigor que nunca, de la cría tradicional del porcino Ibérico ha provocado que esta parasitosis esté en primera línea del panorama sanitario de las explotaciones ganaderas de porcino.

Con el desarrollo de esta experiencia, pretendemos conocer en profundidad la repercusión a nivel multiorgánico de la metastrongylosis en el ganado porcino, especialmente en la valoración de la respuesta inmune celular y humoral que desarrollaron los porcinos frente al parásito, con objeto de evaluar el grado de resistencia frente a los diferentes tratamientos seguidos en el experimento.

Para tal fin, se utilizaron 48 cerdos de raza Ibérica divididos en cinco grupos, a los que se les aplicaron diversas pautas de infección con *Metastrongylus apri*. Se trató de reproducir experimentalmente, diferentes situaciones de infección que pudieran darse en la naturaleza, desde infecciones simples, con 3000 L3 (Lote 1) y 1000 L3 (Lote 2), hasta infecciones con pequeñas dosis sucesivas (200+400+800 L3) y posterior reto con 1000 L3 (Lote 3). El lote 4 incluyó animales que fueron inmunizados con diferentes extractos antigénicos del parásito e igualmente, retados con 1000 L3. Finalmente, el lote 5 estaba constituido por un grupo de animales utilizados como control no infectados. Tres animales de cada grupo fueron sacrificados en los días 0, 14, 35 y 84 post-infección.

Se realizó un estudio comparativo entre los diferentes grupos experimentales, de los síntomas, de las lesiones macroscópicas en los pulmones e hígados, de la histopatología en pulmones, hígados y ganglios, del número de larvas y adultos presentes, de su morfología y localización en el pulmón, del número de huevos eliminados con las heces y del recuento diferencial de los eosinófilos en sangre. Para completar este análisis, fueron utilizadas técnicas como el ELISA y la citometría de flujo, para poder evaluar la respuesta inmunológica humoral y celular, tanto a nivel sistémico como local.

Los primeros signos clínicos, tos, respiración abdominal o disnea, fueron registrados entre los días 10 y 12 post-infección. La intensidad y frecuencia con la que se produjeron, principalmente la tos, se correlacionó positivamente con la dosis infectiva aplicada. Así mismo, se evidenció que las reinfecciones progresivas con pequeñas dosis y la inmunización con inóculos elaborados a partir de larvas y adultos del parásito, redujeron en gran medida la gravedad de la sintomatología causada por éste parásito.

Las lesiones descritas a nivel pulmonar, como enfisema, atelectasia, neumonía o granulomas, fueron significativamente más leves en los animales re infectados. En conjunto, las lesiones pulmonares causadas por *M. apri*, se pueden encuadrar dentro de una típica neumonía parasitaria con tendencia a la cronicidad. En los ganglios torácico-pulmonares, en todos los grupos experimentales, se observó un proceso caracterizado por la hiperplasia e hipertrofia de los folículos linfoides, los cuales presentaron un centro germinativo muy desarrollado y una escasa corona folicular, propios de folículos muy activos. Las lesiones hepáticas más relevantes fueron las manchas de leche, que son un mecanismo de reacción del organismo frente a la migración errática de los estados larvarios.

El parásito poseyó una alta capacidad de desarrollo en el tejido pulmonar de los porcinos, especialmente en los grupos primoinfectados, en los que la tasa de recuperación osciló entre el 18-20%. En el lote de animales re infectados, no se superó el 1%, lo cual evidenció la importante resistencia adquirida por estos, tras el contacto previo con dosis sucesivas de *M. apri*. Respecto al grupo de inmunizados, se observaron resultados muy similares a los detectados en los lotes 1 y 2, aunque al día 84 tras la infección, se observó una reducción del 50% de la población de vermes presentes en el pulmón.

Se comprobó que la intensidad de los signos clínicos, las lesiones anatomopatológicas pulmonares y la intensidad de parasitación fueron dosis-dependiente.

La proporción hembra/macho fue significativamente superior en los animales re infectados respecto a los primoinfectados, mostrando que el sexo predominante en los procesos parasitarios con escaso número de individuos fue el femenino. Este fenómeno señaló la importante capacidad de supervivencia de la especie parásita en condiciones

adversas. La longitud de las hembras adultas de *M. apri*, estuvo estrechamente relacionada con su capacidad de albergar huevos, puesto que se registró una correlación positiva entre la longitud media de las hembras y la concentración de los huevos en las heces. Los valores medios de la concentración de huevos en las heces en los animales infectados con una dosis alta de L3, fueron los más elevados de todos los registrados en el resto de grupos, seguidos por los animales de los lotes 2, 4 y por último, del 3. Además, se detectaron correlaciones positivas significativas entre el número de adultos presentes y la carga de huevos en heces.

Las lesiones más características observadas en el parénquima pulmonar fueron la presencia de áreas atelectásicas, áreas enfisematosas compensatorias y un importante infiltrado de células fagocíticas desde el 14 dpi. En las fases intermedias y finales del estudio se apreció la presencia de granulomas parasitarios, por ello el cuadro lesional definido en los pulmones de los animales infectados se encuadraron dentro de un proceso neumónico típico parasitario con tendencia a la cronicidad.

Todos los grupos experimentales presentaron el mayor número de lesiones hepáticas al día 35 tras la infección. La presentación de las manchas de leche en el hígado atiende al desarrollo de resistencia frente al parásito. Esta relación entre la capacidad de respuesta y la patogénesis hepática, se hace especialmente evidente en los animales pertenecientes al lote re infectado, que mostraron el número más elevado de manchas de leche en el hígado.

El primer incremento significativo del porcentaje de eosinófilos circulantes se registró al día 14 post-infección. No se detectaron diferencias significativas entre los diferentes lotes experimentales, aunque, los animales primoinfectados fueron los que alcanzaron los niveles más elevados.

Los resultados obtenidos tras el análisis de las diferentes poblaciones celulares presentes en muestras de sangre periférica, ganglio torácico-pulmonar y BAL, por citometría de flujo laminar, nos han permitido realizar un estudio completo de los mecanismos inmunes celulares más importantes que se desarrollaron en los porcinos durante la infección experimental con *M. apri* en diferentes condiciones.

Respecto al perfil de la respuesta inmune celular desencadenada en los porcinos infectados con una única dosis (lotes 1 y 2), cabe destacar que ésta fue casi indetectable a nivel periférico. Tan sólo, se detectó un ligero incremento en la población circulante

de monocitos y linfocitos T, CD8⁺ y $\gamma\delta$. Por su parte, los ganglios linfáticos torácico-pulmonares reaccionaron más activamente, de forma especial, la población de linfocitos T CD4⁺. En los fluidos broncoalveolares, lo más llamativo fue el descenso significativo de la población de los macrófagos alveolares.

En los animales reinfectados, a nivel sistémico se detectaron niveles significativamente elevados de monocitos. La reacción celular en los ganglios torácico-pulmonares frente a la llegada de los estados larvarios de *M. apri* al pulmón, fue trascendental y eficaz, debido a que se registraron correlaciones positivas muy significativas, entre el número de larvas totales recuperadas en los pulmones al día 14 y los porcentajes de linfocitos T CD8⁺, linfocitos B y macrófagos presentes a nivel ganglionar. Respecto a las variaciones celulares detectadas en las muestras de BAL analizadas, observamos una notable participación de los linfocitos B y de los macrófagos alveolares. Por el contrario, no se evidenció ningún cambio significativo en la población de células T a nivel pulmonar durante la experiencia.

Los animales pre-estimulados con antígenos del parásito (Lote 4), mostraron niveles elevados de monocitos circulantes. Igualmente, se registró una importante reacción de los linfocitos B y macrófagos, a nivel de los ganglios linfáticos torácico-pulmonares. En las muestras de BAL, se describió un incremento del 50% de la población de células B, aunque un significativo descenso de los macrófagos alveolares.

En nuestro estudio sobre la respuesta humoral desarrollada en los diferentes grupos experimentales, se han analizado dos isotipos de inmunoglobulinas, la IgM (T-independiente) y la IgG (T-dependiente), dentro de esta última, se analizaron las subclases IgG₁ e IgG₂. En líneas generales, los valores de densidad óptica obtenidos frente al antígeno larvario durante las tres primeras semanas de la infección fueron más elevados que los mostrados frente al antígeno somático de adultos. En cambio, a partir del día 28 post-infección, no se registraron diferencias significativas en los resultados detectados frente a ambos antígenos. Esto indicó, que los animales reaccionaron inicialmente frente a los antígenos propios de los estados larvarios, pero el hecho de que la intensidad de respuesta entre ambos tipos de antígenos se igualase, demostró que poseen muchos epítomos en común.

El comportamiento de la IgM no resultó decisivo en la respuesta primaria frente a la parasitación por *M. apri*, puesto que no se observaron diferencias significativas entre los lotes examinados, incluido el grupo control.

Sobre la disyuntiva entre IgG₁/IgG₂, parece evidente que ambas inmunoglobulinas fueron responsables de la respuesta desencadenada por IgG, en los animales primoinfectados. No obstante, en el lote infectado con dosis altas, la respuesta desarrollada por el isotipo IgG₁ fue más intensa que la mostrada por IgG₂, especialmente entre los días 21 y 49 post-infección. Lo cual indica, que la reacción de IgG frente a los antígenos de *M. apri*, estaba fundamentada en la IgG₁.

Los animales re infectados con dosis progresivas de L3 de *M. apri*, exhibieron un elevado nivel de resistencia frente al reto, aunque durante el periodo de reinfecciones previas al reto, se observó un incremento significativo de IgG e IgG₁. Los niveles de ambas inmunoglobulinas continuaron subiendo durante este periodo de inmunización, pero fue a partir del día 7 post-infección, cuando se detectó un significativo aumento de los valores de las densidades ópticas medias de IgG e IgG₁, principalmente frente a ASL. Sin embargo, la respuesta de IgG₂ fue muy leve durante el periodo pre- y post-reto.

El empleo de extractos parasitarios para inmunizar a los animales, provocaron el desarrollo de una fuerte respuesta de tipo Th1, debido a la predominancia del isotipo IgG₂ frente a los antígenos testados. Esta inmunoglobulina podría ser responsable de la susceptibilidad mostrada por los animales del lote 4, que permitieron a los adultos de *M. apri* instalarse en el tejido pulmonar.

8. SUMMARY



Cellular and humoral immune responses of iberian pigs against metastrongylosis.

Metastrongylus apri is one of the most common helminths in pulmonary alterations which has a big impact in domestic pigs reared under outdoor conditions. This respiratory disease has been forgotten for many years due to its biological cycle connotations, the essential of earthworm for its transmission, which is a rare circumstance in the high technological fattening-pig farms. Nevertheless, the strong resurgence of the traditional raising of the Iberian pigs, has situated this parasitism at the top the sanitary scene.

The aim of this experience is to know in depth the repercussion of metastrongylosis at multiorganic level in the pig cattle. With special emphasis in the valuation of cellular and humoral immune responses developed by the pigs against this parasite.

For such aim, 48 Iberian pigs were divided into five groups. To evaluate the degree of resistance of these different treatments, they were infected with *M. apri* in different conditions. An approach to the different situations from infection that could occur in the nature, such as simple infections with 3000 L3 (Group 1) and 1000 L3 (Group 2), or successive infections with moderate doses (200 L3 + 400 L3 + 800 L3) it was reproduced experimentally. Additionally, one batch was challenged with 1000 L3 (Group 3); another one (Group 4) were immunized with different antigenic extracts from the parasite and challenged with 1000 L3, and finally, the group 5 was constituted by uninfected animals. Three animals from each group were sacrificed at 0, 14, 35 and 84 days post-infections (dpi).

The comparative study between the different groups was made from the symptoms shown, the macroscopic and microscopic lesions in the lungs, livers and lymph-nodes, the number of larvae and adults presented in the lungs, the eggs number in the feces and the eosinophils differential count. In order to complete the analysis, the ELISA-test and the flow cytometry has been used to evaluate the humoral immune response at sistemyc level and the cellular immune response at sistemyc and local level.

The first clinical signs (cough, abdominal breathing or disnea) were observed between 10-12 dpi. The intensity and frequency of these symptoms were correlated positively with the infective doses. Also, it was proved that the progressive reinfections

with small doses and the immunization with the inocula elaborated from larvae and adults stages (ASA and ASL) of the parasite reduced significantly the intensity of the signs caused by this parasite.

The lesions described at lungs, emphysema, aethelectasic and pneumonic areas or granulomas, were significantly slighter in the reinfected animals. In general, the pulmonary lesions caused by *M. apri* could be fitted within a typical parasitic pneumonia with a tendency to the chronicity. In all groups the pulmonary lymph-nodes showed a process characterized by hyperplasia and hypertrophy of the lympho follicles, which contain a very developed germinative centre and little follicular crown; in all case this images are related with a very active follicles. The most important hepatic lesions were the white spots, that were considered as a mechanism of organic reaction in opposition to the erratic migration of the larva stages.

M. apri showed a high capacity of development in the pulmonary tissue of the pigs, specially in the primoinfected groups, in which the rate of recovery oscillated between 18-20%. In the reinfected group, the recovery rate were not higher than 1%. This data demonstrated the important resistance acquired by the animals after the previous contact with successive doses of *M. apri*. With regard to the immunized group, the results detected were very similar to the ones observed in groups 1 and 2, nevertheless, at 84 dpi, a reduction of 50% of the number of parasites was observed.

It was proved that the clinical signs, the macroscopic lesions and the intensity of parasitación were dose-dependence.

It was observed a significantly increase of the female/male ratio in the reinfected animals with respect to the primoinfected ones, showing that female were predominant in the parasitic processes with little number of parasites. The length of the adult females of *M. apri* was related to its capacity of lodge eggs, so, a positive correlation between the average length of the females and the eggs concentration in feces was detected. The average of eggs per gram of feces in the animals infected with high doses were highest. In order, they were followed by the animals of groups 2, 4 and 3. In addition, significant positive correlations between the number of adults and the eggs load were detected.

In all groups, the greatest number of hepatic lesions was observed at 35 dpi. The white spots in the liver are caused by the development of a resistance against the parasite. The relation between the organic response and the pathogenesis in the liver

became specially evident in the reinfected animals, which showed the highest number of white spots in the liver.

In our study, the first significant increase of circulating eosinophils was registered at 14 dpi. No significant differences were detected between different groups, although the primoinfected groups reached the highest levels.

The results obtained after the analysis of the different cellular populations in peripheral blood, toracic-pulmonary lymph-nodes and broncho-alveolar lavages (BAL) samples, using flow cytometry, have allowed us development a complete study about the most important cellular immune mechanisms that were generated in the different experimental animals.

With regard to the profile of the triggered cellular immune response at peripheral level was scanty in the infected pigs with high and moderate doses of L3. Only, it was detected a slight increase in the circulating monocytes, lymphocytes CD8⁺ and $\gamma\delta$ cells. On the other hand, the toracic-pulmonary lymph-node reacted more evidently, specially the CD4⁺ lymphocytes. BAL samples showed a significant reduction of the alveolar macrophages.

In group 3 a significantly increase of the peripheral monocytes was detected. In these reinfected animals, the reaction of the pulmonary lymph-node against the arrival of larvae to the lungs was very important and effective. Very significant positive correlations have been registered between the total number of larvae recovered in the lungs at 14 dpi and percentage of lymphocytes T CD8⁺, lymphocytes B and macrophages at lymph-node level. With respect to the cellular variations detected in BAL, an evident participation of lymphocytes B and the alveolar macrophages were observed. On the opposite, no significant change of T-cells was demonstrated during the experience.

The animals pre-stimulated with the antigenic extracts of the parasite, showed the highest levels of circulating monocytes. An important reaction of lymphocytes B and macrophages at pulmonary lymph-node was described. In BAL, a moderate increase of B-cells and an important reduction of the alveolar macrophages took place.

In the study about humoral response in the different experimental groups, two isotypes of immunoglobulins were analyzed, the IgG (T-dependent) and the IgM (T-independent). Also, the subclasses IgG₁ and IgG₂ were analyzed.

During the first three weeks of infection the optical density detected against larval antigens were higher than obtained against the adult antigen. However, since 28 dpi were not registered significant differences in the results detected against both antigens. This indicate that the animals has an initial reaction against larval antigens. Although, the intensity of response induced by both types of antigens finally equaled, it proved that there are many epitopes in common.

The behavior of the IgM was not decisive in the primary response against *M. apri*, because significant differences between the infected and control groups were not observed.

About the dilemma between IgG₁/IgG₂, in the primoinfected animals seemed evident that both immunoglobulins were responsible of the response triggered by IgG. However, in the high dose infected group the response developed by the isotype IgG₁ was more intense than the shown one by IgG₂, specially between 49-21 dpi., which indicates that the reaction of IgG detected by the antigens of *M. apri* was based on the IgG₁.

The animals reinfected with progressive doses of L3 exhibited a high level of resistance to the challenge of 1000 L3. During the period of reinfections previous to the challenge, a significant increase of IgG and IgG₁ was observed, concretely at 20 day after the first infective dose. The levels of both immunoglobulins continued raising during this period, but it was detected a significant increase of IgG and IgG₁, mainly registered by ASL at 7 day post-challenge. Nevertheless, the response triggered by IgG₂ was very slight during the period pre- and post-challenge.

The use of parasitic extracts to immunize the animals, caused the development of a strong Th1 response. The constant predominance of IgG₂ isotype, it could be the cause of the susceptibility shown by the group 4, allowing that the adults of *M. apri* settled in the lungs.

9. RESUMO



Resposta imune celular e humoral do porco ibérico frente à metastrongylosis.

A metastrongilose é uma das parasitoses que com maior frequência afeta aos animais da espécie suína, criados em regime extensivo. Esta nematodiose pulmonar durante muitos anos foi esquecida, pelas conotações de seu ciclo biológico, pois a necessidade da presença de lombrigas da terra para sua transmissão, não concordavam com as modernas instalações requeridas para a criação das raças suínas precoces. Mas o ressurgimento, com maior vigor que nunca, da criação tradicional do suíno Ibérico provocou que esta parasitose esteja em destaque no panorama sanitário das criações pecuárias de suíno.

Com o desenvolvimento desta experiência pretendemos conhecer a fundo a repercussão a nível orgânico da metastrongilose na espécie suíno dando uma grande importância na avaliação da resposta imune celular e humoral que desenvolveram os animais frente ao parasita, com objeto de avaliar o grau de resistência frente aos diferentes tratamentos seguidos no experimento.

Para tal fim, foram utilizados 48 animais da raça Ibérica divididos em cinco grupos, aos que foram aplicadas diversas pautas de infecção com *Metastrongylus apri*. Tratou-se de reproduzir experimentalmente diferentes situações de infecção que pudessem dar-se na natureza, desde infecções simples, com 3000 L3 (Lote 1) e 1000 L3 (Lote 2), até infecções com pequenas doses sucessivas (200 L3+400 L3+800 L3) e posterior desafio com 1000 L3 (Lote 3), inclusive, alguns dos animais foram imunizados com diferentes extratos antigênicos do parasita e igualmente, desafiados com 1000 L3 (Lote 4). Por último, o lote 5 foi constituído por um grupo de animais utilizados como controle. Três animais de cada grupo foram necropsiados nos dias 0, 14, 35 e 84 após a infecção.

Realizou-se um estudo comparativo dos sintomas, das lesões macroscópicas nos pulmões e fígados, da histopatológica em pulmões, fígados e gânglios, do número de larvas e adultos presentes, de sua morfologia e localização no pulmão, do número de ovos eliminados com as fezes e da recontagem diferencial dos eosinófilos no sangue, entre os diferentes grupos experimentais. Para completar esta análise, foram utilizadas técnicas como; ELISA e citometria de fluxo, para poder avaliar a resposta imunológica humoral e celular, tanto a nível sistêmico como local.

Os primeiros sinais clínicos como: tosse, respiração abdominal ou dispnéia, foram registrados entre os dias 10 e 12 após a infecção. A intensidade e frequência com a qual foram produzidas, principalmente a tosse, correlacionava-se positivamente com a dose infecciosa aplicada. Assim mesmo, evidenciou-se que as reinfecções progressivas com pequenas doses, e a imunização com inóculos elaborados a partir de larvas e adultos do parasita, reduzem em grande medida a gravidade da sintomatologia causada por este parasita.

As lesões descritas a nível pulmonar como: enfisema, atelectasia, pneumonia ou granulomas, foram significativamente mais leves nos animais reinfetados. Em conjunto, as lesões pulmonares causadas por *M. apri*, podem enquadrar-se dentro de uma típica pneumonia parasitária com tendência à cronicidade. Nos gânglios torácico-pulmonares, em todos os grupos, observaram-se um processo caracterizado pela hiperplasia e hipertrofia dos folículos linfóides, os quais contêm um centro germinativo muito desenvolvido e pouca corona folicular, próprios de folículos muito ativos. As lesões hepáticas mais relevantes foram as manchas de leite, que são um mecanismo de reação do organismo frente à migração errática dos estados larvários.

O parasita possui uma alta capacidade de desenvolvimento no tecido pulmonar dos suínos, especialmente nos grupos de animais infectados por primeira vez, nos quais a taxa de recuperação oscilava entre o 18-20%. No lote de animais reinfetados, não superou a 1%, o qual evidencia a importante resistência adquirida por estes, depois do contato prévio com dose sucessivas de *M. apri*. Com respeito ao grupo de imunizados, observou-se resultados muito similares aos detectados nos lotes 1 e 2, no entanto por volta do dia 84 depois da infecção, observou-se uma redução de 50% da taxa de parasitação.

Comprovou-se também que a intensidade dos sinais clínicos, das lesões anatomopatológicas pulmonares e da intensidade de parasitação foram dose-dependente.

A proporção fêmea/macho foi significativamente superior nos animais reinfetados respeito aos infectados por primeira vez, mostrando que o sexo predominante nos processos parasitários com pouco número de indivíduos, foi o feminino. A longitude das fêmeas adultas de *M. apri*, está estreitamente relacionada com sua capacidade de albergar ovos, já que registrou-se uma correlação positiva entre a longitude média das fêmeas e a concentração dos ovos nas fezes. Os valores médios

de ovos por grama de fezes nos animais infectados com uma dose alta de L3, foram os mais elevados de todos os registrados no resto dos grupos, seguidos pelos animais dos lotes 2, 4 e por último, do 3. Além disso, detectaram-se correlações positivas significativas entre o número de adultos presentes e a carga de ovos em fezes.

Todos os grupos experimentais apresentaram o maior número de lesões hepáticas por dia 35 depois da infecção. A apresentação das manchas de leite no fígado atende ao desenvolvimento de resistência frente ao parasita. Esta relação entre a capacidade de resposta e a patogenia hepática, encontra-se especialmente evidente nos animais pertencentes ao lote reinfestado, apresentando um número mais elevado de manchas de leite no fígado.

O primeiro aumento significativo da porcentagem de eosinófilos circulantes registrou-se aproximadamente pelo dia 14 após a infecção. Não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes lotes experimentais, mesmo que, os animais infectados por primeira vez foram os que alcançaram os níveis mais elevados.

Os resultados obtidos depois da análise das diferentes povoações celulares presentes em amostras de sangue periférica, gânglio torácico-pulmonar e BAL, por citometria de fluxo laminar, permitiram-nos realizar um estudo completo dos mecanismos de imunidade celular mais importantes, que desenvolveram-se nos suínos durante a infecção experimental com *M. apri* em diferentes condições.

Em relação ao perfil da resposta imune celular desencadeada nos suínos infectados com uma única dose (Lotes 1 e 2), é importante destacar que esta foi praticamente nula a nível periférico. Somente detectou-se um leve aumento na população circulante de monocitos e linfócitos T, CD8⁺ e $\gamma\delta$. Por outro lado, os gânglios linfáticos torácico-pulmonares reagiram de forma mais ativa, de forma especial, à população de linfócitos T CD4⁺. Com respeito ao nível pulmonar, o mais chamativo foi o descenso significativo da população dos macrófagos alveolares.

Nos animais reinfestados, em nível sistêmico foram detectados níveis significativamente elevados de monocitos. A reação celular nos gânglios torácico-pulmonares frente à chegada dos estados larvarios de *M. apri* ao pulmão, avaliou-se como transcendental e eficaz, já que, registraram-se correlações positivas muito significativas entre o número de larvas totais recuperadas nos pulmões por volta do dia 14 e as porcentagens de linfócitos T CD8⁺, linfócitos B e macrófagos presentes a nível

ganglionar. Com respeito às variações celulares detectadas nas mostras de BAL analisadas, observamos uma notável participação dos linfócitos B e dos macrófagos alveolares. Pelo contrário, não evidenciou-se nenhuma mudança significativa na população de células T em nível pulmonar durante a experiência.

Os animais pré-estimulados com antígenos do parasita, mostraram níveis elevados de monocitos circulantes. Igualmente, registrou-se uma importante reação dos linfócitos B e macrófagos, a nível dos gânglios linfáticos torácico-pulmonares. Nas amostras de BAL, descreveu-se um pequeno aumento da população de células B, no entanto aconteceu um significativo descenso dos macrófagos alveolares.

Em nosso estudo sobre a resposta humoral desenvolvida nos diferentes grupos experimentais, analisaram-se dois isotipos de imunoglobulinas, a IgM (T-independente) e a IgG (T-dependente), dentro desta última, foram analisadas as subclasses IgG₁ e IgG₂. Em linhas gerais, os valores de densidade ótica obtidos frente ao antígeno larvario foram mais elevados que os mostrados pelo antígeno somático de adultos, durante as três primeiras semanas da infecção. Por outro lado, a partir do dia 28 após a infecção, não foram registradas diferenças significativas nos resultados detectados frente a ambos antígenos. Isto indica, que os animais reagem inicialmente, frente os antígenos próprios dos estados larvarios. No entanto, o fato de que a intensidade de resposta entre ambos tipos de antígenos se iguale, demonstra que possuem muitos epítopes em comum.

O comportamento da IgM não resultou decisivo na resposta primária frente à parasitação por *M. apri*, já que, não foram observadas diferenças significativas entre os lotes examinados incluindo o grupo controle.

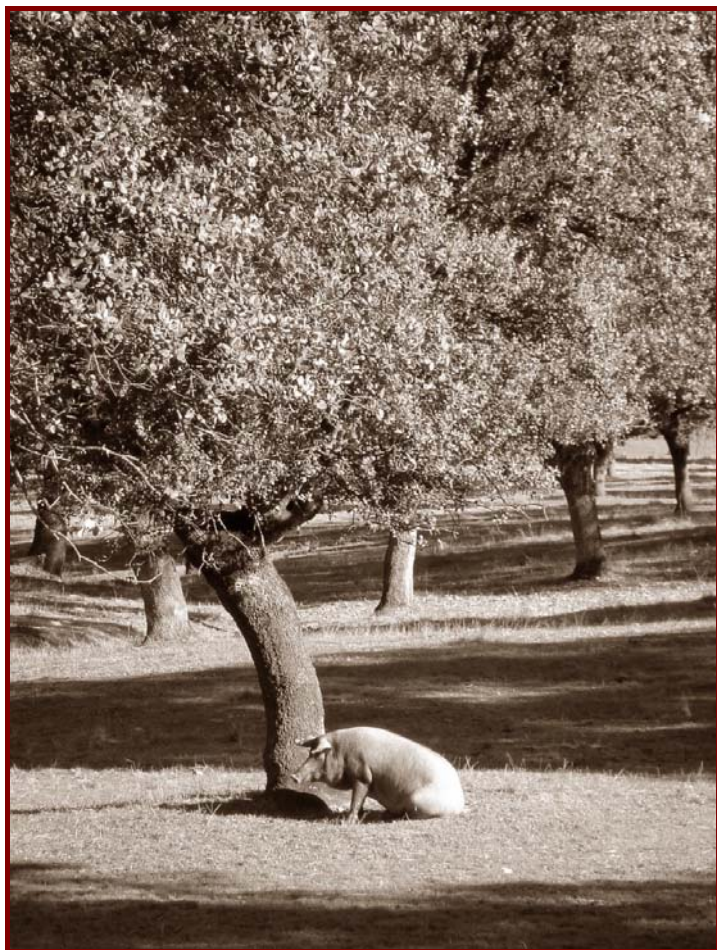
Sobre a disjuntiva entre IgG₁/IgG₂, parece evidente que ambas imunoglobulinas foram responsáveis pela resposta desencadeada por IgG, nos animais infectados por primeira vez. Não obstante, no lote infectado com doses altas, a resposta desenvolvida pelo isotipo IgG₁ foi mais intensa, que a mostrada por IgG₂, especialmente entre os dias 21 e 49 após a infecção, o qual indica, que a reação de IgG frente aos antígenos de *M. apri*, estava fundamentada na IgG₁.

Os animais reinfectados com doses progressivas de L3 de *M. apri*, exibiram um elevado nível de resistência frente ao desafio, mesmo que durante o período de reinfecciones prévias ao desafio, observou-se um aumento significativo de IgG e IgG₁. Os níveis de ambas imunoglobulinas continuaram subindo durante este período de

imunização, embora somente a partir do dia 7 post-infecção, foi quando detectou-se para IgG e IgG₁, principalmente frente a ASL, um significativo aumento dos valores das densidades ópticas medias. No entanto, a resposta de IgG₂ foi muito leve durante o período pre- e post-desafio.

O emprego de extratos parasitários para imunizar aos animais, provocaram o desenvolvimento de uma forte resposta de tipo Th1. Esta predominância constante do isotipo IgG₂ frente aos antígenos testados, poderia ser a responsável da suscetibilidade mostrada pelos animais do lote 4, que permitiram aos adultos de *M. apri* instalar-se no tecido pulmonar.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Ed. W.B. Saunders Company, 2000.
- Abeydeera LR, Jonson LA, Welch GR, Wang WH, Boquest AC, Cantley TC, Rieke A, Day BN. Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. Theriogenol. 1998; 50: 981-988.
- Alcaide M, Frontera E, Rodríguez MJ, Sáenz IE, Domínguez-Alpízar JL, Reina D, Navarrete I. Parasitosis pulmonares del cerdo Ibérico: Situación actual de la metastrongylosis en España. Mundo Ganadero 2005; 176: 40-44.
- Alcaide M, Frontera E, Domínguez-Alpízar JL, Navarrete I. Parasitosis pulmonares del cerdo Ibérico: Metastrongylosis. Porci 2005; 86: 53-72.
- Alicata JE. Life history of *Metastrongylus salmi* and remarks on the eggs of Swine Lungworms. Proc. Helm. Soc. Wash. 1934; 1, 12-16.
- Andersen S, Jorgensen J, Nansen P, Nielsen. Experimental *Ascaris suum* infection in piglets. Acta Path. Microbiol. Scand, 1973; 81: 650-656.
- Appleyard GD, Wilke BN. Characterization of porcine CD5 and CD5⁺ B cells. Clin. Exp. Immunol. 1998; 111: 225-230.
- Arambulo III, Soria-Abaga A, Sarmiento RV. On the presence of *Metastrongylus pudendotectus* Vostokov (1905) in swine in the Philippines. Acta Med. Philippina 1968; 4: 146-149.
- Bailey M, Birchall M.A, Haverson K, Gorti K, Wilson S. Pig defences against respiratory viruses. Vet. Res. 2000; 31: 40-41.
- Barratt MEJ. Immediate hypersensitivity to *Metastrongylus spp.* infection in the pig. I. The passive transfer of skin sensitivity to uninfected recipients. Immunol. 1972; 22: 601-614.
- Barratt MEJ, Herbert, IV. Homocytotropic and haemagglutinating antibody response of pigs to the lungworm *Metastrongylus spp.* J. Comp. Path. 1972; 82: 463-470.
- Barriga, OO. The immunology of parasitic infections. A Handbook for Physicians, Veterinarians and Biologists. Ed. University Park Press, Baltimore, 1981.
- Basta S, Knoetig SM, Spagnuolo-Weaver M, Allan G, McCullough KC. Modulation of monocytic cell activity and virus susceptibility during differentiation into macrophages. J. Immunol. 1999; 162: 3961-3969.

- Basta S, Carrasco CP, Knoetig SM, Rigden RC, Gerber H, Summerfield A, McCullough KC. Porcine alveolar macrophages: poor accessory or effective suppressor cells for T-lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2000; 77: 177-190.
- Bello TR. Comparison of the flotation of *Metastrongylus* and *Ascaris* eggs in three different levitation solutions. *Am. J. Vet. Res.* 1961; 5: 597-600.
- Berndt A, Muller G. Heterogeneity of porcine alveolar macrophages in experimental pneumonia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997; 57: 279-287.
- Berrag B, Rhalem A, Sahibi H, Dorchie P, Cabaret J. Bronchoalveolar cellular responses of goats following infections with *Muellerius capillaris* (Protostrongylidae, Nematoda). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997; 58: 77-88.
- Bianchi AT, Moonen-Leusen HW, MilliGen FJ, Savelkoul HF, Zwart RJ, Kimman TG. A mouse model to study immunity against pseudorabies virus infection: significance of CD4⁺ and CD8⁺ cells in protective immunity. *Vaccine* 1998; 16: 1550-1558.
- Binns RM, Pabst R. Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 43: 79-87.
- Binns RM, Pabst R. The functional structure of the pig's immune system, resting and activated. En: *Advances in Swine in Biomedical Research*. Ed. Plenum Press, 1996, pp. 253-265, Nueva York, USA.
- Binns RM, Pabst R, Licence ST. Lymphocyte emigration from lymphonodes by blood in the pig and efferent lymph in the sheep. *Immunol.* 1985; 54: 105-111.
- Boes J, Willingham AL, Fuhui S, Xuguang H, Eriksen L, Nansen P, Stewart TB. Prevalence and distribution of pig helminths in the Dongting Lake Region (Hunan Province) of the People's Republic of China. *J. Helminthol.* 2000; 74: 45-52.
- Boeker M, Pabst R, Rothkotter HJ. Quantification of B, T and null lymphocyte subpopulations in the blood and lymphoid organs of the pig. *Immunobiol.* 1999; 201: 74-87.
- Bokhout BA, Boon JH, Hendriks J. Operational diagnostics of lungworm infections in cattle. Preliminary investigation into the usefulness of the indirect haemagglutination. *Vet. Q. Neth.* 1979; 1: 195-203.

- Bokhout BA, Asten JLL, Stock W. Porcine IgG. Isolation of two IgG subclasses and anti-IgG class- and subclass-specific antibodies. *Molec. Immunol.* 1986; 23: 675-683.
- Borghetti P, Angelis E, Miduri F, Gozio S, Blanchaert A, Alborali LG, Cordioli P, Lombardi G, Quintavalla C, Guazzetti S, Martelli P. Intradermal and intramuscular porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccination in piglets: changes of peripheral lymphocyte subpopulations. En: 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, pp. 77-78, 2003; Rome, Italy.
- Bos HJ, Beekman J. Serodiagnosis of lungworm infections in calves using ELISA. *Dev. Biol. Stand.* 1985; 62: 45-52.
- Butler JE. Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1998; 17: 43-70.
- Butler JE, Sun J, Navarro P. The swine immunoglobulin heavy chain locus has a single J_H and no identifiable Ig D. *Int. Immunol.* 1996; 8: 1897-1904.
- Butler JE, Brown WR. The immunoglobulins and immunoglobulin genes of swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994; 43: 5-12.
- Butler JE, Sun J, Navarro P, Kacs Kovics I, Brown WR. The C_H and V_H immunoglobulin genes of swine: implications for repertoire development. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 54: 7-17.
- Buxadé C, Daza A. *Porcino Ibérico: aspectos claves*. Ed. Mundi Press, 2000, Madrid.
- Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R, Linett M, Tan JC, Chou CC, Narula S, Caligiuri MA. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killers cells. *Blood* 1995; 85: 3577-3585.
- Carstensen L, Vaarst M, Roepstorff A. Helminth infections in Danish organic swine herds. *Vet. Parasitol.* 2002; 106: 253-264.
- Chabaud AG, Gretillat S. *Metastrongylus madagascariensis*, a 4th species of pulmonary strongyle infesting the domestic swine. *Ann. Parasitol. Humaine Comparee.* 1956; 31; 5-6: 572-577.
- Chandler AC. *Introduction to Parasitology*. 9th edition, Ed. John Wiley, 1955, New York, USA.

- Chartier C, Mutesi U, Ndakala NO. Helminths of domestic porks in Ituri, Upper Zaire. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 1990; 70: 213-225.
- Cheng TC. *General Parasitology*, 2nd edition. Ed. A.C. Academia Press Inc., 1976, New York, USA.
- Chitko-McKown CG, Chapes SK, Brown RE, Phillips RM, McKown RD, Blecha F. Porcine alveolar and pulmonary intravascular macrophages: comparison of immune functions. *J. Leukocyte Bio.* 1991; 50, 364-372.
- Coffman RL, Seymour BWP, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to Interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989; 245: 308-310.
- Compagnoni L. *Cría moderna de las lombrices, el abono más económico y eficaz*. Ed. De Vecchi, 1985, Barcelona, España.
- Copland JW. *Metastrongylus* spp. infestations of village pigs in Papua New Guinea. *J. Helminthol.* 1974; 48: 25-32.
- Cordero del Campillo M. El problema de las parasitosis en las explotaciones porcinas. 1ª Jornadas Nacionales de Producción de Porcino, 1966, pp. 105-125, Valencia, España.
- Cordero del Campillo M. *Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos*. Ed Ministerio de Sanidad y Seguridad Social, 1980, Madrid, España.
- Cordero del Campillo M, Castañón L, Reguera, A. *Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos*. Ed Secretariado de Pub Univ de León, 1994, España.
- Crawley A, Raymond C, Wilkie BN. Control of immunoglobulin isotype production by porcine B-cells cultured with cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003; 91: 141-154.
- Crawley A, Wilkie BN. Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics. *Vaccine*, 2003; 21: 2911-2922.
- Dawson HD, Beshah E, Nishii S, Solano-Aguilar G, Morimoto M, Zhao A, Madden K, Kringel H, Ledbetter T, Dubey JP, Shea-Donohue T, Lunney JK, Urban JF. Localized multi-gene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. *Infect. Immunol.* 2004; 22: 39-45.

- Dawson HD, Royae AR, Nishii S, Kuhar D, Schnitzlein WM, Zuckermann F, Urban JF, Lunney JK. Identification of key immune regulating T helper 1 response in swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; 100: 105-111.
- Díaz MJ, Villalobos N, Aluja A, Rosas G, Gómez-Conde E, Hernández P, Sarralde C, Sciutto E, Fragoso G. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cisticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003; 93: 81-90.
- Dixon J.B. Immunity to *Metastrongylus apri*. *Vet. Rec.* 1968; 82: 417-418.
- Dixon J.B. A positive correlation between population size and egg-content in *Metastrongylus apri* (Gmelin, 1790). *Parasitol.* 1971; 63: 191-194.
- Drew TW. A review of evidence for immunosuppression due to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus. *Vet. Res.* 2000; 31: 27-39.
- Dunn D.R. Lungworms (*Metastrongylus spp.*) in pigs and their development in the guinea pigs. *Nature* 1954; 174: 1193-1194.
- Dunn D.R. The culture of earthworms and their infection with *Metastrongylus* species. *Br. Vet. J.* 1955; 111: 97-101.
- Dunn D.R. Studies on the pig lungworm (*Metastrongylus spp.*). II. Experimental infection of pigs with *M apri*. *Br. Vet. J.* 1956; 112: 327-337.
- Düwel VD, Schleich H. Das meerschweinchen-ein modellwirt für *Metastrongyliden*. *Berl. Münch. Tierarztl. Wschr.* 1971; 20: 405-408.
- Else KJ, Finkelman FD, Maliszewski CR, Grecis RK. Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 347-351.
- Estes DM, Hirano A, Heussler VT, Dobbelaere DA, Brown WC. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell Immunol.* 2002; 163: 268-279.
- Ettensonh DB, Lalor PA, Roberts NJ. Human alveolar macrophage suppression of lymphocyte proliferation. Accessory characteristics for the generation and functional expression of con A-induced suppressor cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988; 137: 765-773.

- Ewing SA, Todd AC. Metastrongylosis in the field: species and sex ratios of the parasites, preferential location in respiratory apparatus of the host, and concomitant lesions. *Am. J. Vet. Res.* 1961; 5:606-609.
- Ewing SA, Todd AC. Association among members of the genus *Metastrongylus* (Molin, 1861) (Nematoda, Metastrongylidae). *Am. J. Vet. Res.* 1961; 22: 1077-1080.
- Fabian G. *Metastrongylus* in the subarachnoid space of a cat brain. *Zentralblatt Fur Vet. Reihe. B.* 1975; 22 (6): 524-526.
- Faust EC, Russell PF. Craig and Faust's Clinical Parasitology (7^a edición). Ed. Lea and Fabiger, 1964, pp. 1099, Philadelphia, USA.
- Ferguson DL. Anthelmintic activity of albendazol against adult *Metastrongylus apri* in artificially infected swine. *J. Anim. Sci.* 1981; 53: 1511-1515.
- Ferruzzi C. Manual de lombricultura. Ed. Mundi Prensa, 1985, Madrid, España.
- Finkelman F, Katona IM, Urban JF, Colmes J, Ohara J, Tung AS, Simple JG, Paul WE. Interleukin 4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J. Immunol.* 1988; 141: 2335-2341.
- Finkelman F, Pearce EJ, Urban JF, Sher A. Regulation and biological function of helminth induced cytokine response. En: *Immuno-parasitology today*. Ed. C. Ash, R. Galagher, pp. A62-A66, 1991, Cambridge, England.
- Finkelman F, Shea-Donnohue DT, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban JF. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes. *Ann. Rev. Immunol.* 1997; 15: 505-534.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse helper T-cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 1989; 170: 2081-2095.
- Forrester DJ, Porter JH, Belden RC, Frankenberger WB. Lungworms of feral swine in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1982; 181: 1278-1280.
- Freigofas R, Leibold W, Dauschies A, Joachim A, Schuberth HJ. Products of fourth-stage larvae of *Oesophagostomum dentatum* induce proliferation in naive porcine mononuclear cells. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 2001; 48: 603-611.

- Frontera E, Carrón A, Serrano FJ, Roepstorff A, Reina D, Navarrete, I. Specific systemic IgG₁, IgG₂ and IgM responses in pigs immunized with infective eggs or selected antigens of *Ascaris suum*. Parasitol. 2003; 127: 291-298.
- Frontera E, Roepstorff A, Serrano FJ, Gázquez A, Reina D, Navarrete I. Presence of immunoglobulins and antigens in serum, lumen and small intestine in *Ascaris suum* infected and immunised pigs. Vet. Parasitol. 2004; 119: 59-71.
- Fuentes JL. La crianza de la lombriz roja. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1987, Madrid, España.
- Furesz SE, Wilkie BN, Mallard BA, Rosendal S, MacInnes JI. Anti-haemolysin Ig G₁ to Ig G₂ ratios correlate with haemolysin neutralization titres and lung lesion scores in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infected pigs. Vaccine 1998; 16: 1971-1975.
- Ganter M, Hensel A. Cellular variables in bronchiolar lavage fluids (BALF) in selected healthy pigs. Res. Vet. Sci. 1997; 63: 215-217.
- García Vallejo TB. Endoparasitosis del porcino Ibérico en Extremadura (España): epidemiología y control. Tesis de Licenciatura. Dpto. de Medicina y Sanidad Animal, Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria, Cáceres, 1999.
- Gázquez A. La técnica de necropsia en los mamíferos domésticos. Ed. Interamericana MacGraw-Grill, 1987, Madrid, España.
- Gázquez A. Patología Veterinaria. Ed. Interamericana MacGraw-Grill, 1991, Madrid, España.
- González Castro J. Hallazgo de *Metastrongylus apri* (Gmelin, 1790) Vostokov, 1905, en los pulmones de un niño. Rev. Ibérica Parasitol. 1951; 11: 265-270.
- González Pérez JF. Respuesta inmune celular y humoral en la ostertagiosis experimental caprina. Tesis de Licenciatura. Dpto. de Patología, producción Animal, Bromatología y tecnología de los alimentos, universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Facultad de Veterinaria, Las Palmas de Gran Canaria, 2002.
- Grob P, Schijns VE, Van den Broek MF, Cox SP, Ackermann M, Suter M. Role of interferon systems and specific immunity in mice controlling systemic dissemination of attenuated Pseudorabies virus infection. J. Virol. 1999; 73: 4748-4754.
- Grzych JM, Pearce EJ, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis FA, Sher A. Egg deposition is the major stimulus for the production is the major stimulus for

- the production of Th2 cytokines in murine Schistosomiasis mansoni. J. Immunol. 1991; 173: 1322-1327.
- Guidotti LG, Chisari PV. Cytokine induced viral purging-role in viral pathogenesis. Curr. Opin. Microbiol. 1999; 2: 388-391.
- Habela M, Reina D, Nieto CG, Serrano F. Influencia de la dehesa en la patología parasitaria del cerdo Ibérico. Act. Vet. 1987; 1: 63-69.
- Harty JT, Tyinnereim AK, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. Annu. Rev. Immunol. 2000; 18: 273-308.
- Heinen PP, Nieuwstadt AP, Boer-Luijtz EA, Bianchi ATJ. Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 2001; 82: 39-56.
- Hennig-Pauka I, Ganter M, Gerlach GF, Rothkotter HJ. Enzyme activities, protein content and cellular variables in the pulmonary epithelial lining fluid in selected healthy pigs. J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med. 2001; 48: 631-639.
- Herscowitz HB, Conrad RE, Pennline KJ. Alveolar macrophage-induced suppression of the immune response. Adv. Exp. Med. Biol. 1979; 121: 459-484.
- Hidalgo Argüello MR, Cordero del Campillo M, Díez Baños N. Parasitosis del aparato respiratorio. En: Parasitología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 1999.
- Hiromatsu K, Yoshikai Y, Matsuzaki G, Ohga S, Muramori K, Matsumoto K, Bluestone JA, Nomoto K. A protective role of γ/δ T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice. J. Exp. Med. 1992; 175: 49-56.
- Hobmaier A, Hobmaier M. Die Entwicklung der Larve des Lungenwurmes *Metastrongylus elongatus* (*Strongylus paradoxus*) des Schweines und ihr Invasionsweg, sowie vorläufige Mitteilung , zugleich eine vorläufige Mitteilung über die Entwicklung von *Choerostrongylus brevivaginitus*. München. Tierarztl. Wochenschr. 1929; 80: 365-369.
- Hobmaier A, Hobmaier M. Biologie von *Choerostrongylus* (*Metastrongylus*) *pudendotectus* (*brevivaginitus*) aus der Lunge des Schweines, zugleich eine vorläufige Mitteilung über die Entwicklung der Gruppe *Synthetocaulus* unserer Haustiere. München. Tierarztl. Wochenschr. 1929; 80: 433-436.

- Holland MJ, Harcus YM, Riches PL, Maizels RM. Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30: 1977-1987.
- Holló F. Investigations on *Metastrongylus* in swine. II. Some remarks to the morphology of *Metastrongylus salmi* (Gedolest, 1923) with special reference to its differentiation from *M. apri*. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 1965; 15: 259-268.
- Holz J, Tjioe Lian AG. Virulence differences of genus *Metastrongylus elongatus* (Dujardin, 1845) and *M. pudendotectus* (Wostokow, 1905) in *Sus scrofa* (Javanica). *Wiadom. Parazytol.* 1968; 14: 79-81.
- Horak IG. Parasites of domestic and wild animals in South Africa. VII. Helminths in pigs slaughtered at the Pretoria municipal abattoir. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1978; 45 (1): 43-47.
- Humbert JF. Les *Metastrongylus*, Nematodes parasites pulmonaires du sanglier (*Sus scrofa* L.) en France. Biologie, Epidemiologie et dynamique de la transmission. Ph. D. Thesis, University of Orleans, Orleans, France, 1988.
- Humbert JF. Histopathologic study of the host-parasite relationship: the earthworm-wild boar-*metastrongyle* model. *Rev. Sci. Tech.* 1992; 11: 1063-1070.
- Humbert JF. Studies on the output variations and determinism of *Metastrongylus spp.*, lungworms of the wild board (*Sus scrofa* L.). *Res. Rev. Parasitol.* 1993; 53: 27-31.
- Humbert JF, Drouet J. Enqueté épidémiologique sur la *metastrongylose* du sanglier (*Sus scrofa* L.). *Gibier Faune Sauvage* 1990; 7: 67-84.
- Humbert JF, Drouet J. Studies on the output variations and determinism of *Metastrongylus spp.*, lungworms of the wild board (*Sus scrofa* L.). *Res. Rev. Parasitol.* 1993; 53: 27-31.
- Humbert JF, Ferte H. Le parasitisme helminthique du sanglier (*Sus scrofa* L.) en France. *Symbioses* 1986; 18: 75-84.
- Humbert JF, Henry C. Studies on the prevalence and the transmission of lung and stomach nematodes of the wild boar (*Sus scrofa* L.) in France. *J. Wildl. Dis.* 1989; 25: 335-341.
- Hung NH. Study on Helminthes in pigs at Tan Phu Thanh Village. *Vietnam Husb. Vet. Med.* 1993.

- Hwan Jang D. Survey for internal parasites of swine in Korea. Korean J. Vet. Res. 1975; 15: 309-314.
- Jaggers S.E., Herbert I.V. Transmission of pig lungworms (*Metastrongylus sp.*). Nature 1964; 203: 987-988.
- Jaggers S.E., Herbert I.V. Studies on the resistance of pigs to the lungworm *Metastrongylus spp.* Infections in minimal disease pigs from eighth weeks of age. J. Comp. Pathol. 1968; 78: 161-172.
- Janis EM, Kaufmann SHE, Schwartz RH, Pardoll DM. Activation of gamma delta T cells in the primary immuneresponse to Mycobacterium tuberculosis. Science 1989; 244: 713-716.
- Jansen JJ. On the lungworms of the wild boar (*Sus scrofa*, L.) in the Netherlands, with a description of *Metastrongylus confusus* new sp. Tijdschr. Diergeneesk. 1964; 89: 1205-1211.
- Jenkins T, Erasmus DA. The ultrastructure of intestinal epithelium of *Metastrongylus sp.* (Nematoda: *Strongyloidea*). Parasitol. 1969; 59: 335-342.
- Jericho KWF, Austwick PKC, Hodges RT, Dixon JB. Intrapulmonary lymphoid tissue of pigs exposed to aerosols of carbon particles, of *Salmonella oranienburg*, of *Mycoplasma granularum*, and to an oral inoculum of larvae of *Metastrongylus apri*. J. Comp. Pathol. 1971; 81: 13-20.
- Jinquan T, Larsen CG, Gesser B, Matsushima K, Thestrup-Pedersen K. Human IL-10 is a chemoattractant for CD8⁺ T-lymphocytes and a inhibitor of IL-8 induced CD4⁺ T-lymphocyte migration. J. Immunol. 1993; 151: 4545-4551.
- Johnson RM, Lancki DW, Sperling AL, Dick RF, Spear PG, Fitch FW, Bluestone JA. A murine CD4⁺CD8⁻ T cell receptor- $\gamma\delta$ T lymphocyte clone specific for herpes simplex virus glycoprotein1. J. Immunol. 1992; 148: 983-988.
- Johnson DR, Sales J, Matthews JB. Local cytokine responses in *Dictyocaulus viviparus* infection. Vet. Parasitol. 2005; 128: 309-318.
- Jolie R, Bäckström L, Pickney R, Olson L. Ascarid infection and respiratory health in feeder pigs raised on pasture or in confinement. Swine Health Prod. 1998; 6: 115-120.

- Joling P, Bianchi ATJ, Kappe AL, Zwart RJ. Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994; 40: 105-117.
- Jurasek V. Results of the laboratory examinations of parasitoses in the animals of Mozambique. VI. Swine. *Folia Vet.* 1986; 30: 99-102.
- Jungersen G, Eriksen I, Nansen P, Lind P, Rasmussen T, Meeusem NT. Regional immune response in the pig to *Ascaris suum* larval migration. *Parasite Immunol.* 2001; 23: 185-194.
- Kacskovics I, Sun J, Butler JE. Five putative subclasses of swine Ig G identified from the cDNA sequences of a single animal. *J. Immunol.* 1994; 153: 3565-3573.
- Kaestner A. *Invertebrate zoology.* Ed. Interscience Publishers, 1967, Nueva York, USA.
- Kammer H, Hanson RP. Studies on the transmission of swine influenza virus with *Metastrongylus* species in specific pathogen-free swine. *J Infect Dis* 1962; 110: 99-102.
- Kates KC. Observations on the viability of eggs of lungworms of swine. *J. Parasitol.* 1941; 27: 265-272.
- Katiyar RD. Occurrence of *metastrongylus apri* in Indian sheep and goats. *Ind. J. Vet. Sci.* 1960; 30: 213-214.
- Kimman TG, Brouwers RA, Daus FJ, Oirschot JT, Zaane D. Measurement of isotype-specific antibody responses to Aujeszky's disease virus in sera and mucosal secretions of pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1992; 31: 95-113.
- Kolevatova AI. Adaptations of the genital system of *Metastrongylus elongatus* in relation to the conditions of postembryonic development. *Parazitol.* 1976; 10: 255-262.
- Koga M, Yamada M, Onishi T, Horie M, Noda S, Noda R. Immunological studies on *Metastrongylus apri* infection. IV. Influence of whole body X-irradiation or anti-guinea pig thymocyte serum injection on acquired immunity in thymectomized guinea pigs. *Jpn. Vet. Sci.* 1976; 38: 611-618.
- Kooyman FKJ, Yatsuda AP, Ploeger HW, Eysker M. Serum immunoglobulin E response in calves infected with the lungworm *Dictyocaulus viviparus* and its correlation with protection. *Parasite Immunol.* 2002; 24: 47-51.

- Kumar V, Geerts S, Mortelmans J. Localization of larvae of *Metastrongylus apri* (Gmelin, 1790) Vostokov, 1905, the lungworm of pigs, in the annelid *Eisenia foetida* (Savigny, 1826). Acta Zool. Pathol. Antverp. 1978; 70: 201-210.
- Kumar V, Meirvenne N, Mortelmans J. Indirect FAT as an aid for serodiagnosis of *Metastrongylus apri* infection of pig. Proceed. III. Int. Congr. Parasit. München. 1974; 2: 712-713.
- Kumar V, Meirvenne N, Mortelmans J. Serodiagnosis of *Metastrongylus apri* infection of pigs by immunofluorescence. Vet. Parasitol. 1978; 4: 175-181.
- Kumar V, Mortelmans J. Immune response of guinea-pigs to chemically abbreviated prepatent *Metastrongylus apri* infection. Parasitol. 1976; 72: 13-18.
- Laguna E. El cerdo ibérico. Ed. Mundi Prensa, 1998, Madrid, España.
- Leignel V, Humbert JF, Elard L. Study by ribosomal DNA ITS 2 sequencing and RAPD analysis on the systematics of four *Metastrongylus* species (Nematoda: Metastrongyloidea). J. Parasitol. 1997; 83: 606-611.
- Leitao A, Cartaxeiro C, Coelho R, Cruz B, Parkhouse ME, Portugal FC, Vigáro JD, Martins C. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. J. Gen. Virol. 2001; 82: 513-523.
- Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B-cells by induction of the bcl-2 protein. J. Clin. Invest. 1994; 93: 424-428.
- Lience ST, Binns RM. Major long-term changes in $\gamma\delta$ T-cell receptor-positive and CD2⁺ T-cell subsets after neonatal thymectomy in the pig: a longitudinal study lasting nearly 2 years. Immunol. 1995; 85: 276-284.
- López-Fuertes L, Doménech N, Álvarez B, Ezquerro A, Domínguez J, Castro JM, Alonso F. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. Vir. Res. 1999; 64: 33-42.
- Lunney JK, Pescovitz MD, Sachs DH. The swine Major Histocompatibility Complex: its structure and function. Swine Biomedical Research, Ed. ME Tumbleson Plenum Press, 1986; 2: 1821-1836, Nueva York, USA.
- Lunney JK, Urban JF, Johnson LA. Protective immunity to *Ascaris suum*: analysis of swine peripheral blood subsets using monoclonal antibodies and flow cytometry. Vet. Parasitol. 1986; 20: 117-131.

- Mackenzie A. Studies on lungworm infections in pigs. I. Observations on natural infection. *Vet. Rec.* 1958; 42: 843-846.
- Mackenzie A. Studies on lungworm infection of pigs. III. The progressive pathology of experimental infections. *Vet. Rec.* 1959; 71: 209-214.
- Mackenzie A. Experimental observations on lungworm infection together with virus pneumonia in pigs. *Vet. Rec.* 1963; 75: 114-116.
- Madden KB, Urban JF, Ziltener HJ, Schrader JW, Finkelmann F, Katona IM. Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth induced intestinal mastocytosis. *J. Immunol.* 1991; 147: 1387-1391.
- Mansfield LS, Gamble HR. Alveolar mastocytosis and eosinophilia in lambs with naturally acquired nematode infections of *Protostrongylus rufescens* and *Haemonchus contortus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995; 49: 251-262.
- Mansfield LS, Gauthier DT, Abner SR, Jones KM, Wilder SR, Urban JF. Enhancement of disease and pathology by synergy of *Trichuris suis* and *Campylobacter jejuni* in the colon of immunologically naive swine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68: 70-80.
- Manuel MF, Santos AV, Lucas S. Prevalences of gastrointestinal helminths affecting backyard piggy farms. *Philippine J. Vet. Anim. Sci.* 1989; 15: 47-53.
- Marchioli CC, Yancey RJ, Timmins JG, Post LE, Young BR, Povendo DA. Protection of mice and swine from pseudorabies virus-induced mortality by administration of pseudorabies virus specific mouse monoclonal antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 1988; 49: 860-864.
- Martin S, Wardley RC. Local humoral and cellular responses in Aujeszky's disease virus infection in pigs. *Res. Vet. Sci.* 1987; 42: 170-174.
- Martínez F, Hernández S, Calero R, Becerra C. Contribución al conocimiento de los zooparásitos en la provincia de Córdoba. III. Nematodos. 1972, Lab. Parasitol. Inst. Zootec. del C.S.I.C., Córdoba, España.
- Meeusen ENT, Brandon MR. The use of antibody-secreting cell probes to reveal tissue-restricted immune responses during infection. *European J. Immunol.* 1994; 24: 469-474.
- McKeand JB, Duncan JL, Urquhart GM, Kennedy MW. Isotype-specific antibody responses to the surface-exposed antigens of adult and larval stages of

- Dictyocaulus viviparus* in infected and vaccinated calves. Vet. Parasitol. 1996; 61: 287-295.
- Mercy AR, Chaneet G, Emms Y. Survey of internal parasites in Western Australian pig herd. 1. Prevalence. Aust. Vet. J. 1989; 66: 4-6.
- Milosev BI. Un caz de trijla infestare a organismului cu paraziti: *Metastrongylus elongatus*, *Taenia saginata* si *Enterobius vermicularis*. Microbiol. Parazit. Epidem. 1963; 8: 227-230.
- Mitchell GF. Co-evolution of parasites and adaptative immune responses. En: Immunoparasitology today, Ed. C. Ash., R.B. Gallagher, pp. A2-A6, 1991, Cambridge, England.
- Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, Torgian V, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Brenner MB. Lymphocytes bearing antigen-specific γ/δ T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. Nature 1989; 338: 544-548.
- Moore KW, O'Garra A, Waal R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. Ann. Rev. Immunol. 1993; 11: 165-190.
- Morgan BB, Hawkins PA. Veterinary Helminthology. Ed. Burgess Minneapolis, 1949, Minnesota, USA.
- Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. Adv. Immunol. 1989; 46: 111-147.
- Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Fajac AE, Millon ID, Elansky E, Ahmed R. Counting antigen –specific CD8 T cells: a re-evaluation during viral infection. Immunol. 1998; 8: 177-187.
- Murraille E, Leo O. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. Scand. J. Immunol. 1998; 47: 1-9.
- Murray PD, Mckenzie DT, Swain SL, Kagnoff M. Interleukine 5 and interleukine 4 produced by Peyer's patch T cells selectivity enhance immunoglobulin A expression. J. Immunol. 1987; 139: 2669-2674.
- Murrell KD. *Trichinella spiralis*: acquired immunity in swine. Exp. Parasitol. 1985; 59: 347-354.
- Nakagawa M, Yoshihara S, Suda H, Ikeda H. Pathological studies on white spots of the liver in fattening pigs. Natl. Inst. Anim. Health. Jpn. 1983; 23: 138-149.

- Nansen P, Roepstorff A. Parasitic helminths of the pig: factors influencing transmission and infection levels. *Int. J. Parasitol.* 1999; 29: 877-891.
- Ober BT, Summerfield A, Mattlinger C, Wiesmuller KH, Jung G, Pfaff E, Saalmüller A, Rziha HJ. Vaccine-induced pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4⁺/CD8⁺ memory T-helper cells in swine. *J. Virol.* 1998; 72: 4866-4873.
- Oldham JN, White EG. Chronic focal interstitial hepatitis in the pig: Its experimental production by feeding *Ascaris* eggs. *J. Comp. Path. Ther.* 1944; 54: 1-15.
- Onishi T. Immunological studies on *Metastrongylus apri* infection. II. Immunizing activity of various oral dosages of larval vaccine and comparison of activity of oral and subcutaneous inoculation. *Jpn. J. Vet. Sci.* 1973; 35: 507-513.
- Onishi T. Infectivity and migratory behavior of *Metastrongylus apri* in the guinea pig. *Jpn. J. Vet. Sci.* 1973; 35: 515-524.
- Onishi T. Immunological studies on *Metastrongylus apri* infection. III. Migratory behavior in the guinea pig of 5x10⁴R X-irradiated *M. apri* larvae used as attenuated larval vaccine. *Jpn. J. Vet. Sci.* 1975; 37: 83-89.
- Olsovska Z, Franek F, Matousek V. Limited enzymatic cleavage of pig immunoglobulin G and of specific antibodies. I. Different resistance of various antibody types to cleavages by pepsine. *Folia Biol. (Prague)*, 1982; 28: 87-97.
- Pabst R, Binns RM. The immune system of the respiratory tract in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994; 43: 151-156.
- Pabst R, Binns RM. Lymphocytes migrate from the bronchoalveolar space to regional bronchial lymph nodes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 151: 495-499.
- Paul WE. Interleukin 4-B cell stimulatory factor 1: one lymphokine, many functions. *Faseb. J.* 1987; 1: 456-461.
- Pauly T, König M, Thiel J, Saalmüller A. Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 1998; 79: 31-40.
- Pauly T, Weiland E, Hirt W. Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes. *Immunol.* 1996; 88: 238-246.
- Pearce EJ. Progress towards a vaccine for schistosomiasis. *Act. Trop.* 2003; 86: 309-313.

- Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A. Down-regulation of th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 1991; 173: 159-166.
- Pérez Martín E. Parasitofauna del cerdo Ibérico en una zona endémica de Trichinellosis. Su influencia en el diagnóstico inmunoenzimático de esta enfermedad. Tesis de Licenciatura. Dpto. de Medicina y Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Cáceres, 1990.
- Permin A, Yelifari L, Bloch P, Steenhard N, Hansen NP, Nansen P. Parasites in cross-bred pigs in the Upper East region of Ghana. *Vet. Parasitol.* 1999; 87: 63-71.
- Pescovitz MD, Aasted B, Canals A. Análisis of monoclonal antibodies reactive with the porcine CD4 antigen. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994; 43: 233-236.
- Pescovitz MD, Lunney JK, Sachs DH. Murine anti-swine T4 y T8 monoclonal antibodies: Distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 1985; 134: 37-44.
- Pescovitz MD, Sakopoulos AG, Gaddy JA, Husmann RJ, Zuckermann FA. Porcine peripheral blood CD4⁺/CD8⁺ dual expressing T-cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994; 43: 53-62.
- Poglayen G, Genchi G, Lamartina F, Giovanini A. Primi rilievi coprologici in animali allevati in Iripinia. *Parasitol.* 1981; 23: 225-226.
- Pond L, Wassom DL, Hayes CE. Evidence for differential induction of helper T cell subsets during *Trichinella spiralis* infection. *J. Immunol.* 1989; 143: 4232-4237.
- Preston KS, Switzer WP. Failure of lungworm-larvae-infected earthworms to transmit mycoplasmal pneumonia to swine. *Vet. Microbiol.* 1976; 1: 15-18.
- Probert AJ. Morphological and histochemical studies on the larval stages of *Metastrongylus* spp. (lungworms of swine) in the earthworm intermediate host, *Eisenia foetida* (Savigny, 1826). *Parasitol.* 1969; 59 (2): 269-277.
- Quiroz Romero H. Metastrongylosis en cerdos. En: Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Ed. Limusa S.A., México DF, pp. 536-541, 1984.
- Ramaswamy K, Sanctis GT, Green F, Befus D. Pathology of pulmonary parasitic migration: morphological and bronchoalveolar cellular responses following *Nippostrongylus brasiliensis* infection in rats. *J. Parasitol.* 1991; 77: 302-312.

- Rapacz J, Hasler-Rapacz J. Immunogenetic studies on polymorphism, postnatal passive acquisition and development of immunoglobulin gamma (IgG) in swine. En: Proc. 2nd World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. 1982; 8: 601-606.
- Reddy J, Borgs P, Wilkie B. Cytokine mRNA expression in leukocytes of efferent lymph from stimulated lymph nodes in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2000; 74: 31-46.
- Respaldiza E. Valoración económica de las parasitosis pecuarias en España. *Vet.* 1967; 2: 149-227.
- Rivero R. La lombricultura y sus fundamentos. Ed. S.A.P.T. Publicaciones Técnicas, s.l., Madrid, 1993.
- Roepstorff A, Jorsal SE. Prevalence of helminth infections in swine in Denmark. *Vet. Parasitol.* 1989; 33: 231-239.
- Roit I, Brostoff J, Male D. *Inmunología* (4^a edición). Ed. Harcourt Brace, Madrid, 1998.
- Romero Rodríguez J. *Metastrongylosis bronco-pulmonares en la ganadería española.* *Rev. Ib. Parasitol.* 1970; 30: 361.
- Roneus O. Studies on the aetiology and pathogenesis of white spots in the liver of pigs. *Act. Vet. Scand.* 1966; 16: 7-112.
- Rooij EMA, Bruin MGM, Visser YE, Middel WGJ, Boersma WJA, Bianchi ATJ. Vaccine-induced T cell-mediated immunity plays a critical role in early protection against pseudorabies virus (suid herpes virus type 1) infection in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; 99: 113-125.
- Rose JH. *Metastrongylus apri*, the pig lungworm. Observations on the free-living embryonated egg and the larva in the intermediate host. *Parasitol.* 1959; 49: 439-447.
- Rose JH. Lungworm of the domestic pig and sheep. *Ad. Parasitol.* 1973; 11: 559-599.
- Rothkötter HJ, Ulbrich H, Pabst R. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation and T and B cell subsets in conventional and germfree pigs. *Pediatr. Res.* 1991; 29: 237-242.
- Rueda L. *Manual de Cerdo Ibérico.* Ed. AECERIBER, 2004, España.
- Rueda L, Montes P. Incidencia y evolución de nematodos en porcino Ibérico en la provincia de Badajoz. VI Congreso Ibérico Parasitología, Cáceres, Abstracts pp.129, 1989.

- Ruíz J. Influencia de la alimentación sobre las características y composición de la grasa subcutánea y hepática del cerdo ibérico. Tesis de Licenciatura, Universidad de Extremadura, 1993.
- Saalmüller A, Hirt W, Reddehase MJ. Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4⁻CD8⁻ and CD4⁺CD8⁺ porcine T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 1989; 19: 2011-2016.
- Saalmüller A, Weiland F, Reddehase MJ. Resting porcine T-lymphocytes expressing class II major histocompatibility antigens. Immunobiol. 1991; 183: 102-114.
- Saalmüller A, Reddehase MJ, Buhring HJ, Jonjic S, Koszionowski UH. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 1987; 17: 1297-1301.
- Saalmüller A, Aasted B, Canals A. Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD5. Vet. Immunol. Immunopathol. 1994; 43: 237-242.
- Saalmüller A, Pauly T, Hohlich BJ, Ptaff E. Characterization of porcine T lymphocytes and their immune response against viral antigens. J. Biotechnol. 1999; 73: 223-233.
- Saif, L J. Mucosal Immunity: An overview and studies of enteric and respiratory coronavirus infectious in a swine modelo f enteric disease. Vet. Immunol. Immunopatol. 1996; 54: 163-169.
- Sakamoto Y. Experimental studies on protective immunity to *Metastrongylus apri* infection. Jpn. J. Vet. Sci. 1978; 27: 244-246.
- Salifu DA, Manga TB, Onyali IO. A survey of gastrointestinal parasites in pigs of the Plateau and Rivers States, Nigeria. Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop. 1990; 43: 193-196.
- Sansom JN, Voermans JJ, Meulenberg JJ, Pol JM, Bianchi AT. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8⁺ cells. J. Gen. Virol. 2000; 81: 497-505.
- Sarradell J, Andrada M, Ramírez AS, Fernández A, Gómez-Villamandos JC, Jover A, Lorenzo H, Herráez P, Rodríguez F. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Pathol. 2003; 40: 395-404.

- Sasaki O, Hyogo Y. eosinophil reaction in the pulmonary tissues of guinea pigs experimentally infected with *Metastrongylus apri*. Bull. Akita Agricul. Coll. 1977; 3: 11-21.
- Sasaki O, Katsuno M. Leukocyte chemotactic factors in adult *Metastrongylus apri* extract. Jpn. J. Vet. Sci. 1982; 44: 787-793.
- Sasaki O, Katsuno M. Leukocyte chemotactic factors in soluble extracts of *Metastrongylus apri* at different stages. Jpn. J. Vet. Sci. 1983; 45: 807-809.
- Sasaki O, Katsuno M. Isolation of the leukocyte chemotactic factors in the extract of adult *Metastrongylus apri*. Jpn. J. Vet. Sci. 1984; 46: 357-361.
- Sasaki O, Katsuno M. Antibody-dependent adherence of guinea pig eosinophils to the third-stage larvae of *Metastrongylus apri*. Jpn. J. Vet. Sci. 1986; 48: 623-627.
- Sasaki O, Katsuno M. Localization of eosinophils chemotactic factors in adult worms and to third-stage larvae of *Metastrongylus apri*. Jpn. J. Vet. Sci. 1987; 49: 161-164.
- Schwartz B, Alicata JE. Life history of lungworms parasitic in swine. Techn. Bull. U.S. Dept. Agric. 1934; 456: 41-49.
- Schwartz B, Porter DA. The localization of swine lungworms larvae in the earthworm *Helodrilus foetidus*. Livro Jubilar du Prof. Lauro Travassos, Rio de Janeiro, 1939; 429-440.
- Schwzt J. Concerning the life history of lungworm of swine. J. Parasitol. 1931; 12: 21.
- Scott CA, McKeand JB, Devaney E. A longitudinal study of local and peripheral isotype/subclass antibodies in *Dictyocaulus viviparus*-infected calves. Vet. Immunol. Immunopathol. 1996; 53: 235-247.
- Seder BA, Hill AV. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. Nature 2000; 406: 793-798.
- Sen HG, Kelley GW, Underdahl NR, Young, GA. Transmission of swine influenza virus by lungworm migration. J. Exp. Med. 1961; 113: 5171-520.
- Serra Freire NM, Siqueira LFG, Consorte LBS. Incidence of species of *Metastrongylus* (Nematoda: Protostrongylidae) in swines from the State of Paraná, Brazil. Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de J. 1982; 5: 111-114.

- Serrano FJ, Pérez-Martín JE, Carrón A, Navarrete, I. Comparison of IgM, IgG1 and IgG2 responses to *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in swine. *Parasite* 2001; 8: 133-135.
- Shender LA, Botzler RGL, George TL. Analysis of serum and whole blood values in relation to helminth and ectoparasite infections of feral pigs in Texas. *J. Wild. Dis.* 2002; 38: 385-394.
- Sher A, Coffman RL. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 1992; 10: 385-409.
- Sher A, Colley DG. Immunoparasitology (2nd edition). En: *Fundamental Immunology*. Ed. W.E. Paul, pp. 957-983, 1989, New York, USA.
- Shope RE. The swine lungworm as a reservoir and intermediate host for swine influenza virus. I. The presence of swine influenza virus in healthy and susceptible pigs. II. The transmission of the swine influenza virus by the swine lungworm. *J. Exp. Med.* 1941; 74: 41-68.
- Shope RE. The swine lungworm as a reservoir and intermediate host for swine influenza virus. III. Factors influencing transmission of the virus and the provocation of influenza. *J. Exp. Med.* 1943; 77: 111-126.
- Shope RE. The swine lungworm as a reservoir and intermediate host for swine influenza virus. V. Provocation of swine influenza by exposure of prepared swine to adverse weather. *J. Exp. Med.* 1955; 102: 567-572.
- Shope RE. The swine lungworm as a reservoir and intermediate host for hog cholera virus. I. The provocation the masked hog cholera virus in lungworm-infected swine by *Ascaris* larvae. *J. Exp. Med.* 1958; 107: 609-622.
- Sotillo JL., Serrano V. Producción animal. *Etnología zootécnica*. Tomos I y II. Ed. Tebar Flores, Madrid, 1985.
- Splinder LA. The incidence of worm parasites in swine in the southern United States. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 1934; 1:40-42.
- Stockdale PHG. Pulmonary pathology associated with *Metastrongyloid* infections. *Br. Vet. J.* 1976; 132: 595-608.
- Stokes CR, Haverson K, Bailey, M. Antigen presenting cells in the porcine gut. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 54: 171-177.

- Summerfield A. Intermediate stage in monocyte-macrophages differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunol.* 1999; 98: 203-212.
- Summerfield A, Rziha HJ, Saalmüller A. Functional characterization of porcine CD4⁺CD8⁺ extrathymic T lymphocytes. *Cell. Immunol.* 1996; 168: 291-296.
- Thacker EL, Thacker BJ, Kuhn M, Hawkins PA, Waters WR. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *Am. J. Vet. Res.* 2000; 61: 1384-1389.
- Thome M, Saalmüller A, Plaff B. Molecular cloning of porcine T cell receptor α , β , γ and δ chains using polymerase chain reaction fragments of the constant regions. *Eur. J. Immunol.* 1994; 23: 1005-1010.
- Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick D. Interleukin-10: A novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J. Exp. Med.* 1991; 173: 507-512.
- Tumbleson M, Schook IB. Advances in swine in biomedical research. En: *Advances in Science in Biomedical Research*. Ed. Plenum Press, Nueva York, 1996.
- Urban JF. The epidemiology and control of swine parasites. Immunity and vaccines. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 1986; 2: 765-778.
- Urban JF, Katona IM, Paul WE, Finkelmann F. Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88: 5513.
- Urban JF, Fayer R, Sullivan C, Goldhill J, Shea-Donohue T, Madden K, Morris SC, Katona I, Gause W, Ruff M, Mansfield LS, Finkelman FD. Local Th1 and Th2 responses to parasitic infection in the intestine: regulation by IFN-gamma and IL-4. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 54: 337-344.
- Van Zaane D, Hulst MM. Monoclonal antibodies against porcine immunoglobulin isotypes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1987; 16:23-36.
- Wallace GW. Swine influenza and lungworms. *J. Infect. Dis.* 1977; 135: 490-492.
- Walker J, Lee R, Mathy N, Doughy S, Conlon J. Restricted B-cell responses to microbial challenge of respiratory tract. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 54: 197-204.
- Wang JS. The endoparasitic status of swine in Central Taiwan. *Dept. Vet. Med., National Chang-Hsing Univ., Taiwan, R.O.C.* 1978; 4: 95-102.

- Weber TB. The complement fixing antibody response of cattle infected or exposed to reinfection with *Dyctiocaulus viviparus*. Am. J. Vet. Res. 1958; 18: 339-344.
- Whittlestone P. Some respiratory diseases of pigs. Vet. Rec. 1957; 7: 1354-1366.
- Yoshihara S, Nakagawa M, Suda H, Kobayashi K. Enhancement of white spot lesions in the liver of pigs repeatedly infected with *Ascaris suum*. J. Tokyo Vet. Anim. Sci. 1987; 35: 64-71.
- Yoshihara S, Nakagawa M, Suda H, Taira N. White spots of the liver in pigs experimentally infected with *Metastrongylus apri*. Jpn. J. Parasitol. 1990; 39: 365-368.
- Yoshihara S. Lesions in the liver of guinea-pigs infected with the swine lungworm, *Matastrongylus apri*. J. Helmithol. 2004; 78: 285-286.
- Zarlenga DS, Dawson H, Kringel H, Solano-Aguilar G, Urban JF. Molecular cloning of swine IL-4 receptor α and IL-13 receptor 1-chains: effects of experimental *Toxoplasma gondii*, *Ascaris suum* and *Trichuris suis* infections. Vet. Immunol. Immunopathol. 2004; 101: 223-234.
- Zocoller MC, Tucci JL, Aparecida W, Dos Santos J. Helminthofauna de suínos procedentes do município de Selvíria, Mato Grosso do Sul, Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 1987; 39: 431-443.
- Zuckermann FA, Husmann RJ. Functional and phenotype analysis of porcine peripheral blood CD4 CD8 double positive T cells. Immunol. 1996; 87: 500-512.
- Zuckermann FA, Gaskins HR. Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. Immunol. 1996; 87: 493-499.

11. AGRADECIMIENTOS



Desde la infancia, nuestros mayores nos enseñaron a dar las gracias por las cosas que nos ofrecen, pues cierto es que de bien nacido es ser agradecido. Por ello, en este apartado pretendemos reconocer de todo corazón a todas aquellas personas que de una manera u otra han participado, aun sin saberlo en la realización de este trabajo.

En primer lugar, y como no podía ser de otra manera, al **Prof. D. Ignacio Navarrete, “mi jefe”**. Quiero mostrarle mi enorme gratitud por haberme concedido la oportunidad de formar parte de la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Y no sólo por pertenecer a su equipo de investigación, sino también a un pedacito de su inmenso corazón.

Este es mi humilde homenaje a ese pequeño gran hombre. Sólo espero que esta Tesis Doctoral esté a la altura de la confianza que depositaste en mí un día. Confianza que me llena de alegría, a la vez que de responsabilidad para contigo y el resto del equipo, promoviendo en mí una superación personal diaria. Te tengo de ejemplo.

La historia de la puesta en marcha y realización de este proyecto fue muy especial. Marcó un antes y un después. Creo que con él, muchos recuperamos la ilusión del trabajo en equipo....del trabajo bien hecho. Ignacio se encargó de los detalles más livianos para que todo saliera bien, bueno no bien, perfecto. Y debo decir con orgullo que trabajé codo con codo con “mi jefe” y que su implicación en este trabajo que se presenta fue total y hasta sus últimos días. Por todo ello y mucho más, quiero que sepa allá donde esté que le respeto y admiro como profesional, pero que de él me quedan muchos más detalles personales. Te añoro tanto....

A mis directores, Dr. David Reina Esojo y Dra. Eva Frontera Carrión. Quiero darles muy especialmente las gracias por su incondicional e incalculable ayuda, ya que he encontrado en ellos un modelo a seguir de trabajo, entrega, constancia, lucha e ilusión. Eva, jamás se me olvidarán esas largas tardes trabajando en la campana de flujo laminar..... ¡Qué momentos!

A quienes les debo tanto, Ángela, Alonso, Javier, Isabelita y Ana. Porque me han enseñado a ser ante todo, compañera y amiga. Puesto que han sido un importante apoyo en los momentos difíciles y los más divertidos en los buenos. Y sobre todo, porque son unas excelentes personas que siempre estarán en mí, aunque la vida nos disponga caminos diferentes.

A todos los profesores integrantes de la Unidad, Dr. Francisco Serrano, Dr. Luis Carlos Gómez-Nieto, Dr. Enrique Pérez Martín y Dr. Miguel Ángel Habela, quienes siempre se han mostrado atentos y dispuestos a prestarme su colaboración. Al técnico-especialista D. Manuel Gómez Blázquez, primeramente por ser como es y en segundo lugar, por su asistencia en las tareas laboratoriales.

Y por supuesto, sin querer olvidar a nadie, a todos mis compañeros de fatiga, especialmente al Dr. José Luis Domínguez-Alpízar por su mexicana forma de trabajar. A Susi, Isa, Toni, Txumari, Guadalupe, Virginia, Isabel, Jesualdo, Javi, Jurgens, Remi, Encarna, Tomás,.... con quienes comparto la mayor parte de las horas del día, así como la mayoría de los días del año. Por esas amenas tertulias a la hora del café, y que decir de las jornadas de trabajo en la granja....hay fotos que lo testifican.

Agradezco enormemente a los Dr. Luis Fernández-Pereira y Dra. Carmen Cámara de la Unidad de Inmunología-Citometría del Hospital San Pedro de Alcántara por su inestimable colaboración e incuestionable disposición en el análisis citométrico de la muestras. Y por supuesto, a Dña. Gema Pereira que sin su paciencia y alegría las horas ante el citómetro hubieran sido interminables.

Al Dr. Antonio Gázquez, por su imprescindible ayuda en la interpretación de los resultados histopatológicos. A Dña. Pilar Parra, por el procesamiento de las muestras histológicas.

Y por ultimo, no quisiera olvidarme de los laborales de las instalaciones de la granja, Andrés y Fulgencio, por todas las facilidades que me brindaron en el cuidado y manejo de los animales.

A mis padres, Fernando y Toni. A mis hermanos, Alma y Fernando. A mi abuelo Juan y a toda la familia, gracias por estar ahí y creer en mí. Sólo espero que todas las ilusiones que habéis puesto en mí, se vean de algún modo materializadas en este trabajo que mercedamente os dedico. Y de una manera muy especial a mis abuelas Marina y Adela y a mi primo Manolito, sé que estáis conmigo.

A Daniel, gracias por TODO.

A todos, gracias, muchas gracias.