

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN EL  
TRANSCURSO DE LA INMUNIZACIÓN DE CABRAS  
SOMETIDAS A UN ANTÍGENO CON LA FINALIDAD DE  
OBTENER SUEROS HIPERINMUNES**

**POR**

**C. MARI DELIA PÉREZ CASTAÑEDA**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA; MÉXICO**

**NOVIEMBRE 2012**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN EL  
TRANSCURSO DE LA INMUNIZACIÓN DE CABRAS  
SOMETIDAS A UN ANTÍGENO CON LA FINALIDAD DE  
OBTENER SUEROS HIPERINMUNES**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**POR**

**C. MARI DELIA PÉREZ CASTAÑEDA**

**ASESOR PRINCIPAL**

**MC. MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS**

**TORREÓN, COAHUILA; MÉXICO**

**NOVIEMBRE 2012**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TESIS

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN EL  
TRANCURSO DE LA INMUNIZACIÓN DE CABRAS  
SOMETIDAS A UN ANTÍGENO CON LA FINALIDAD DE  
OBTENER SUEROS HIPERINMUNES

Tesis Aprobada por el

PRESIDENTE DEL JURADO

MC. MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL  
DE CIENCIA ANIMAL



MVZ. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA; MÉXICO

NOVIEMBRE 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

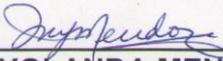
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

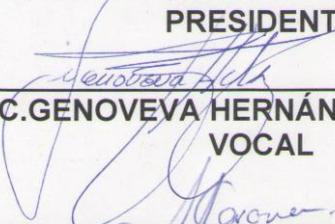


TESIS

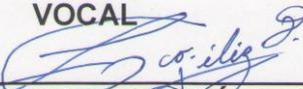
PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN EL  
TRANSCURSO DE LA INMUNIZACIÓN DE CABRAS  
SOMETIDAS A UN ANTÍGENO CON LA FINALIDAD DE  
OBTENER SUEROS HIPERINMUNES

TESIS APROBADA POR EL H. JURADO EXAMINADOR

  
MC. MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS  
PRESIDENTE

  
MC. GENOVEVA HERNÁNDEZ ZAMUDIO  
VOCAL

  
MC. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA  
VOCAL

  
DR. FRANCISCO GERARDO VÉLIZ DERAS  
VOCAL SUPLENTE

TORREÓN, COAHUILA; MÉXICO

NOVIEMBRE 2012

## DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Sra. GREGORIA CASTAÑEDA CASTILLO

“Ninguna lengua es capaz de expresar la fuerza, la belleza y la heroicidad de una madre” Gracias por haberme brindado el apoyo siempre incondicionalmente por tus esfuerzos y apoyo para lograr esta etapa de mi vida ¡gracias!

Sr. Jacobo Pérez García

Un papá es ante todo un hombre con corazón, que sabe señalar el horizonte con optimismo y confianza. Gracias por confiar en mí y por tu esfuerzo siempre brindado, nuevamente Gracias.

Algunas veces los hermanos somos diferentes en muchas cosas como es nuestra forma de pensar, de actuar, de convivir, etc. pero siempre están ahí apoyando, gracias que en todo momento me apoyaron sea cual fuese la situación estuvieron conmigo confiando, esas palabras de entusiasmo y regaños también, Paulina, Eduarda, Dora, Pati, Vicente, Jesús, Olivia, Juancho y marquitos que pocos somos pero así nos divertimos y peleamos mejor, a mis sobrinillos que en cada vacaciones esperaban mi llegada.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios por darme la vida, y permitirme llegar a esta etapa de la vida llena de logros, salud y paciencia para así poder culminar satisfactoriamente mi carrera profesional, por tener a todos mis seres queridos y permitirme estar a su lado**

**A toda mi familia por todo su apoyo siempre incondicionalmente.**

**Especialmente a la MC. Margarita Yolanda Mendoza, a la MC. Genoveva Hernández y al MC. José Luis corona, y por su confianza, apoyo y asesoría durante la realización de este proyecto.**

**Al Dr. Gerardo veliz Deras por el apoyo a la interpretación de los resultados en el proyecto**

**A mi Alma Terra Mater por brindarme y cobijarme durante estos cinco años, una casa que ahora abandonare para seguir construyendo sueños y gracias a ti podre lograrlo, en tus aulas quedan muchos recuerdos pero me llevo aquel aprendizaje.**

**A todos mis profesores por sus sabios consejos, conocimientos y el tiempo dedicado en cada clase porque sin ellos mi escuela solo sería un patio de recreo que sin guía y sin provecho se volvería monótono después de un tiempo, ya sean altos, bajos, delgados o llenitos, enojones y bondadosos siempre están a tu lado apoyándote y dándote un aliento para llegar a ser siempre más alto, gracias por esos días que sus clases eran tan buenas que nos obligaban a buscar información por cuenta propia. ¡Gracias!**

**A mis compañeros Haide Varela, Jorge Alberto Salazar, Betty y Ángel por la ayuda mutua para la realización de este proyecto.**

**Mis amigos que siempre estuvieron conmigo apoyándome sea cual sea la situación especialmente a Verónica Bazaldúa, Elizabeth Téllez, Mario Canizal ya que con ellos viví y compartí estos 5 de mi carrera, a yesi, Jorge, Eduardo, Israel, Francisco, Jesús**

López, Martín, Silvano, Juanito, Adrián, Edgar, Miguel, Omar, Baldomero y sin duda a todo el equipo de Tochito que formaron parte de mi vida me dio alegría conocerlas y saber que existen personas magníficas como ellos siempre apoyándote y animándote y solo quiero mencionar que el honor más grande aun no se nos ha otorgado la carrera más dura aun no ha comenzado ya que no basta con soñarlo hay que echarle manos a la obra luchar hasta conseguir el éxito de nuestro presente nunca es tarde enhorabuena.

## INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIAS .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
INDICE DE CONTENIDO .....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
3. JUSTIFICACION .....	3
4. OBJETIVO .....	3
5. HIPOTESIS.....	3
6. REVISION DE LITERATURA .....	3
6.1 HEMATOLOGÍA.....	3
6.1.1 Sangre.....	4
6.1.2 Plasma .....	5
6.1.3Proteínas Plasmáticas .....	5
6.1.4 Sales.....	6
6.2HEMOGRAMA.....	7
6.3 ELEMENTOS CELULARES DE LA SANGRE .....	7
6.3.1 Eritrocitos.....	8
6.3.3 Leucocitos.....	10

6.3.4 Plaquetas.....	14
6.4 PROCESOS INMUNITARIOS ASOCIADOS A LOS LEUCOCITOS.....	16
6.4.1 Inmunidad inespecífica.....	16
6.4.2 Inmunidad específica (celular y humoral).....	17
6.5 ANTICUERPOS.....	19
6.6 INMUNIZACION ARTIFICIAL.....	22
6.6.1 Preparación del antígeno.....	24
6.6.2 Administración o inyección del antígeno.....	24
6.7 EXTRACCION DE SANGRE.....	26
6.8 SELECCIÓN DE LOS ADYUVANTES INMUNOLOGICOS.....	27
<b>7. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>29</b>
7.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIOS.....	29
7.2 MANEJO DE HATO.....	29
7.3 CONDICIÓN DE MANTENIMIENTO.....	30
7.4 MATERIAL PARA INMUNIZACIÓN.....	30
7.5 MATERIAL PARA REALIZAR SANGRADO.....	30
7.6 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA INMUNIZACIÓN.....	31
7.7 PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN Y TOMA DE MUESTRA SANGUÍNEA PARA DETECTAR LA NORMALIDAD DE LOS PARÁMETROS.....	31
7.8 MATERIAL PARA LA REALIZACIÓN DE BIOMETRÍA HEMÁTICA.....	33
7.9 CONTEO DE ERITROCITOS.....	34
7.9.1 Cálculos Eritrocitarios.....	35
7.10 CONTEO DE LEUCOCITOS.....	36
7.10.1 Cálculos Leucocitarios.....	37
7.11. CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS.....	37

7.11.1 Cálculos diferenciales.....	38
7.12. MATERIAL PARA REALIZAR EL HEMATOCRITO.....	38
7.12.1 Lectura De Hematocrito .....	39
<b>8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>39</b>
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>10. DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>11. CONCLUSION.....</b>	<b>51</b>
<b>12. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Valores Sanguíneos Normales en Ganado Caprino.....	15
Cuadro 2.- Cuenta total de eritrocitos( $10^6/\mu\text{L}$ ) en 3 razas y 4 fechas, comparadas con grupo testigo.....	40
Cuadro 3.- Cuenta total de leucocitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) en 3 razas y 4 fechas en diferentes tiempos y un grupo testigo .....	41
Cuadro 4.- Volumen de paquete celular (%) en 3 razas y 4 fechas comparado con un grupo testigo.....	43
Cuadro 5.- Cuenta total de neutrófilos segmentados (%) en 3 razas y 4 fechas comparado con un grupo testigo. ....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Corte de pesuña.....	30
Figura 2.-Rasurado en línea vertical de la columna para una mejor manipulación al inyectar.....	33
Figura 3.-Se Muestra las inflamaciones en el área que se inyectó el antígeno IgG de Conejo.....	33
Figura 4.- Variación de los promedios totales de eritrocitos en todas las cabras sometidas a tratamiento (Letras diferentes $P<0.05$ ).....	40
Figura 5.- Cuentas de leucocitos entre el tiempo 1-4 en la raza Saanen comparada con un grupo Testigo * $P<0.05$ .....	42
Figura 6.-Totales de leucocitos entre el tiempo 2-4 en la raza Toggenburg comparada con un grupo Testigo * $P<0.05$ .....	42
Figura 7.- Variación de los promedios de neutrófilos en todas las cabras sometidas a tratamiento (Letras diferentes $P<0.05$ ). .....	45
Figura 8.- Variación del total de linfocitos entre el tiempo 3-4 en la raza Saanen comparada con un grupo Testigo (* $P<0.05$ ) .....	45
Figura 9.- Variación del total de linfocitos entre el tiempo 3-4 en Criollas comparada con un grupo Testigo, (Letras diferentes $P<0.05$ ).....	46

Figura 10.- Variación del total de linfocitos entre el tiempo 3-4 en raza Toggenburg comparada con un grupo Testigo, (Letras diferentes  $P < 0.05$ )..... 47

## RESUMEN

Los parámetros hematológicos constituyen una herramienta rutinaria para la orientación del diagnóstico clínico de diversas patologías, los valores hematológicos varían dependiendo de la alimentación, edad, sexo y condición fisiológica, los valores de referencia son usados para describir la dispersión de variables en individuos saludables. La sangre es la consta de estos elementos formes (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) actuando respectivamente en el transporte de oxígeno, la defensa inmunitaria y coagulación de la sangre, los linfocitos son el segundo grupo más numeroso de los leucocitos, así estos deriva cantidades más pequeñas de células plasmáticas que son las que producen y segregan grandes cantidades de anticuerpos (gammaglobulinas), en respuesta a la exposición a estructuras extrañas conocidas como antígenos, los anticuerpos son los principales mediadores de la inmunidad humoral frente a todo tipo de microbios. El objetivo del presente estudio es determinar los parámetros hematológicos en cabras sometidas a un antígeno con diferentes fechas para obtener sueros hiperinmunes, para determinar los valores hematológicos se hicieron biometrías hemáticas de las cabras antes de la inmunización y posteriormente cada vez que eran sangradas para obtener el suero hiperinmune. Se utilizaron cabras de la raza Saanen, Toggenburg, y Criollas ( $n = 15$ ), se utilizó un antígeno Ig G de conejo para la inmunización; Para obtener resultados los datos fueron sometidos a un análisis estadístico

Mystat N° 12 U.S.A; Los resultados obtenidos nos muestran que el único parámetro que mostró variación fue la cuenta de leucocitos y esta variación muestra una elevación continua con respecto al tiempo del experimento, lo cual se explica por el proceso inmunológico que realiza el animal inmunizado, en el cual se observa predominantemente una respuesta inflamatoria (confirmada con el aumento en neutrófilos). Los eritrocitos también se muestran con una variación pero no en relación al experimento, el aumento fue por factores externos

## 1. INTRODUCCION

El hemograma es un análisis de sangre en el que se mide en global y en porcentajes los tres tipos básicos de células que contiene la sangre, denominadas series celulares sanguíneas cada una con funciones diferentes entre sí pero que tienen en común que las produce la medula ósea(Gaona, 2003), serie eritrocitaria o serie roja, serie leucocitaria o serie blanca y serie plaquetaria(Engelhardt y Breves, 2002; Tanke *et al.*, 1983)

La primera inmunización efectiva, aunque todavía empírica, fue llevada a cabo por el Médico Ingles Edward Jenner (1749-1823) quien observo que las personas que se curaban después de alguna infección con la viral de la vaca (vaccinia) quedaban protegidas contra la viruela del hombre(Ochoa, 2008), la inmunización de animales de laboratorio siempre implican un riesgo de peligro afectando varios factores, incluyendo la naturaleza del antígeno, la posible aplicación de un adyuvante y el método de inmunización (frecuencia, vía y lugar, volumen); la inmunización consta de la aplicación de algún inmunogeno a un animal por vía subcutánea dependiendo del peso corporal, con ciertos tiempos de aplicación, dando resultado la producción de anticuerpos dirigidos contra el agente o sus productos tóxicos, también puede iniciar las respuestas celulares mediadas por linfocitos y macrófagos (Ochoa, 2008); Los esquemas de inmunización con largos periodos de tiempo y con esfuerzos repetidos incrementan el desarrollo de anticuerpos afines al antígeno inoculado, aunque también pueden inducir la producción de anticuerpos específicos contra otras moléculas presentes en la solución diluyente del antígeno (García *et al.*, 2005),

unantígeno es cualquier sustancia que puede unirse específicamente a una molécula de anticuerpo o aun receptor de linfocito T,(Abbas *et al.*, 2002)después de la exposición a un antígeno gran parte de la respuesta inicial de anticuerpos se produce en los tejidos linfáticos , las formas secretadas de anticuerpos se encuentran en el plasma (porción líquida de la sangre) cuando la sangre o el plasma forma un coagulo, los anticuerpos permanecen en el líquido residual denominado suero, conteniendo un número detectable de moléculas de anticuerpos que se unen a un antígeno concreto, siendo eficaces en la protección de los animales frente a diversos microorganismos. (Tizard, 2009).

**Palabras clave. Hematología, antígeno, inmunización, suero hiperinmune, biometría.**

## **2. ANTECEDENTES**

Leenaars(1999), realizo un estudio sobre la producción de anticuerpos polyconales efectuando diversas inmunizaciones, Linares(1999) realizo un trabajo con el objetivo de preparar un conjugado anti IgG de ratón-peroxidasa en cabra para su empleo como segundo anticuerpo en aquellas técnicas en las que se emplean anticuerpos monoclonales de ratón como primer anticuerpo, Rodríguez (2004), generó un trabajo sobre la producción de anticuerpos específicos en conejos, González(2007), evaluó dos esquemas de inmunización para la producción de sueros hiperinmunescontra leptospirainterrogans, así como también Health en el 2007,escribio códigos de práctica para la inmunización de animales, Montilla(2207), realizo un estudio sobre hiperinmunización de ovinos contra veneno de

*Bothrops*, Azze(2008) optimizo bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas.

### **3. JUSTIFICACION**

El presente trabajo se realizo con la finalidad de obtener los valores hematológicos en cabras sometidas a inmunizaciones, y la variabilidad si existen cambios ya que no hay estudios realizados sobre el tema.

### **4. OBJETIVO**

1.- Determinar la variación de los parámetros hematológicos en cabras sometidas a inmunizaciones repetidas.

### **5. HIPOTESIS**

Dado que en el proceso de inmunidad participan leucocitos de todos los tipos, predominando la respuesta de tipo inflamatorio, es probable que se tenga variación en los parámetros hematológicos de los animales inmunizados.

### **6. REVISION DE LITERATURA**

#### **6.1 HEMATOLOGÍA**

La hematología se refiere al estudio de las características y variaciones de los componentes figurados de la sangre. El examen completo de la sangre,

conocido como hemograma, se realiza como un análisis de rutina o en otras oportunidades, para confirmar afecciones de diversa índole cuando los signos clínicos no son evidentes, para corroborar un diagnóstico, para emitir un pronóstico o para seguir la evolución de una enfermedad(Ceballos y Andaur, 1998).

### **6.1.1 Sangre**

La sangre es un tejido que reúne características especiales, una de ellas es encontrarse suspendido en una fase líquida denominada plasma; el hecho de permanecer en este estado, le permite circular por todo el organismo la sangre transporta los sustratos metabólicos necesarios para el funcionamiento de cada célula del organismo incluyendo el oxígeno, glucosa, aminoácidos, ácidos grasos y varios lípidos , también transporta los productos metabólicos de deshecho que recoge de cada célula entre los cuales es el dióxido de carbono, ácido láctico, desechos nitrogenados procedentes del metabolismo proteico(Bradley y Cunningham 2009; Mayes y Schute, 2007)también consta de elementos formes suspendidos y transportados por un líquido denominado plasma, los elementos formes son los eritrocitos, leucocitos y plaquetas actuando respectivamente en el transporte de oxígeno, defensa inmunitaria y la coagulación de la sangre, el plasma contiene diferentes tipos de proteínas y muchas moléculas hidrosolubles (Fox, 2008).

En los animales el volumen sanguíneo es aproximadamente el 8% del peso corporal (2.4 litros en una cabra de 30 kg) del que corresponde al plasma un 55 % (Lamb *et al.*, 1988)la sangre que abandona el corazón se denomina sangre arterial teniendo un color rojo brillante debido a la concentración elevada de

oxihemoglobina (combinación de oxígeno y hemoglobina) existente en los glóbulos rojos, la sangre venosa de los pulmones que contiene menos oxígeno y por lo tanto tiene un color más oscuro que la sangre arterial rica en oxígeno(Fox, 2008)

### **6.1.2 Plasma**

El plasma es un líquido de color pajizo(Fox, 2008; Lamb *et al.*, 1988)excepto después de una comida grasa, en la cual le confiere un aspecto lechoso debido a la suspensión de glóbulos grasos(Lamb *et al.*, 1988)que consta de agua y solutos disueltos, el soluto principal del plasma en términos de concentración es el Sodio (Na<sup>+</sup>)así como otras moléculas orgánicas como metanolitos, hormonas, enzimas, anticuerpos y otras proteínas (Fox, 2008)constituyendo aproximadamente el 55 % del volumen de sangre.(Mayes y Schute, 2007)

La sangre y la hemolinfaestán compuestos principalmente de agua que contienen iones y solutos orgánicos y son por lo tanto de composición similar al líquido intersticial , sin embargo los líquidos circulantes también contiene glóbulos sanguíneos y concentraciones relativamente altas de proteínas, en muchos animales (Mayes y Schute, 2007).

### **6.1.3Proteínas Plasmáticas**

Constituyen del 7-9 % del plasma, los tres tipos de proteínas son albumina, globulinas y fibrinógeno (Fox, 2008; Lamb *et al.*, 1988)las dos primeras por precipitación salina y el último debido a que puede ser rápidamente identificado en el mecanismo de coagulación (Lamb *et al.*, 1988)las albuminas suponen la

mayor parte de las proteínas plasmáticas (60-80%) y son las de menor tamaño, producidas por el hígado y en el cual proporcionan la presión osmótica necesaria para atraer agua del líquido tisular circundante hacia el interior de los capilares, esta acción es necesaria para mantener el volumen y la presión sanguínea (Fox, 2008), funciones específicas afectan al mecanismo de coagulación de la sangre, al mecanismo de transporte de otras sustancias lo que proporciona por ejemplo un reservorio de hormonas en la sangre evitando su pérdida a través del riñón, el transporte de anticuerpos a los tejidos, aproximadamente el 10% de la albumina del plasma se renueva diariamente (Lamb *et al.*, 1988) las globulinas se agrupan en tres tipos: **alfaglobulinas**, **betaglobulinas** y **gammaglobulinas**, las alfa- y beta-globulinas son producidas por el hígado y actúan en el transporte de lípidos y de las vitaminas liposolubles, las gammaglobulinas son anticuerpos producidos por linfocitos (uno de los elementos formes que se encuentran en la sangre y en los tejidos linfoides) e intervienen en la inmunidad, el fibrinógeno que supone tan solo el 4% del total de las proteínas plasmáticas, es un importante factor de la coagulación producido por el hígado, durante el proceso de formación del coágulo el fibrinógeno se convierte en filamentos insolubles de fibrina; por lo tanto el líquido en la sangre coagulada, denominada Suero no contiene fibrinógeno (Fox, 2008).

#### **6.1.4 Sales**

La sal más importante del plasma es el Cloruro Sódico (NaCl) estas Sales actúan como disolventes de las proteínas, permitiendo que las proteínas del plasma sean transportadas en solución, la concentración de cloruro sódico y de

otras sales en el plasma está regulada dentro de estrechos límites por los mecanismos de ingestión y de excreción(Lamb *et al.*, 1988).

## 6.2HEMOGRAMA

El hemograma completo se define como la evaluación numérica y descriptiva de los elementos celulares de la sangre: glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, proteínas y fibrinógeno. Constituye una de las pruebas más solicitadas en el laboratorio clínico, ya que acompaña casi todos los protocolos de diagnóstico, y es, tal vez, con el avance tecnológico, la prueba de rutina que más ha evolucionado, no solo en el número de parámetros sino en precisión, exactitud y rapidez (Berrío M, 2003) ya que esta no se puede diagnosticar en el examen clínico (Ceballos y Andaur, 1998).

## 6.3 ELEMENTOS CELULARES DE LA SANGRE

Los elementos formes de la sangre comprenden dos tipos de células sanguíneas: los eritrocitos o glóbulos rojos, los leucocitos o glóbulos blancos y trombocitos (plaquetas que en realidad son trozos de célula) los eritrocitos son con diferencia los más numerosos. Un milímetro cúbico de sangre contiene entre 8-17 (x100) células eritrocíticas en cabras y en el mismo volumen de sangre contiene tan solo de 6000-16000 leucocitos sin embargo estas células sanguíneas no se originan en la sangre si no en otros lugares (Fox, 2008; Maxime, 1991; Voigt, 2000)del organismo y emplea la sangre únicamente como vía para realizar sus funciones o para desplazarse de un área a otra(Lamb *et al.*, 1988)

La opinión actual es que estos tres tipos de células derivan de un precursor común (célula madre) que se origina en la médula ósea, órgano difuso que ocupa (en adultos) el interior de los huesos planos del cráneo, las costillas, el esternón, parte de las caderas, y cuyo volumen total es similar al del hígado(Lamb *et al.*, 1988; Mayes y Schute, 2007)

### **6.3.1 Eritrocitos**

Son células anucleadas, responsables del transporte de la hemoglobina y a su vez del oxígeno desde los alvéolos pulmonares hasta las células de todos los tejidos, además contribuyen con el volumen sanguíneo y, por lo tanto, participan en la dinámica de la circulación sanguínea(Berrío M, 2003), son discos bicóncavos aplanados de unos 7  $\mu\text{m}$  de diámetro y 2.2  $\mu\text{m}$  de espesor, el diámetro del eritrocito de la cabra es aproximadamente, la mitad que la del perro y a menudo presenta formas inusuales (poiquilocitosis)(Voigt, 2000), su forma singular está relacionada con la función de almacenamiento y transporte de oxígeno(Fox, 2008; Mayes y Schute, 2007), aporta una mayor superficie a través de la cual se puede producir la difusión del gas, los eritrocitos carecen de núcleos y de mitocondrias (obtienen su energía a través de la respiración anaerobia(Fox, 2008), la vida media es de 120 días(Lamb *et al.*, 1988), la membrana celular del eritrocito es flexible permitiendo a la célula alterar su morfología al atravesar pequeños capilares, pero no es muy elástica teniendo poca capacidad para estirarse, en soluciones hipertónicas los eritrocitos perderán fluidos internos y se contraerán (cremación) pero en soluciones hipotónicas se agrandan ligeramente antes de romperse la membrana celular (hemolisis)(Voigt, 2000); los eritrocitos más viejos son retirados de la

circulación por células fagocitarias presentes en el hígado, bazo y la medula ósea ya que esta se vuelve más pequeña y densa por que disminuye la concentración de enzimas glucolíticas(Maxime, 1991), cada eritrocito contiene aproximadamente 280 millones de moléculas de hemoglobina, el cual corresponde de un 30-35 % confiriendo el color rojizo a la sangre, y 60-65 % de agua (Fox, 2008).

La producción de eritrocitos (eritropoyesis) tiene lugar en la medula ósea comenzando con la célula madre y progresando a través de varios estados intermedios a partir de reticulocito hasta que madura a eritrocito, el desarrollo normal consume de 7-10 días , la velocidad de producción de eritrocitos en la medula ósea está controlada por un mecanismo de retroalimentación que aparece depender del nivel de suministro de oxígeno al riñón, cuando el nivel de oxígeno desciende ya sea por anemia o por hipoxia se producen más eritrocitos, cuando se eleva la tensión de oxígeno se producen menos eritrocitos (Lamb *et al.*, 1988)

Debido a la estimulación por la eritropoyetina, la producción diaria de nuevos glóbulos rojos compensa la destrucción diaria de los viejos, evitando que disminuya el contenido de oxígeno de la sangre, la eritropoyetina actúa uniéndose a receptores de la membrana de las células que se convirtieran en eritroplastos, las células estimuladas por la eritropoyetina experimentan división y diferenciación celular lo que lleva a la producción de eritroblastos transformándose en normoblastos perdiendo núcleos y convertirse en reticulocitos transformándose en eritrocitos maduros, este proceso dura 3 días (Fox, 2008).

Existen determinadas células llamadas antígenos eritrocitarios son de gran importancia clínica porque sus tipos tienen que ser compatibles entre los donantes y los receptores de transfusiones sanguíneas, existiendo varios grupos de antígenos eritrocitarios, el más importantes es conocido como el sistema ABO; en términos de los antígenos presentes en la superficie de un glóbulo rojo una persona puede ser de tipo A (solo con antígenos A) tipo B (solo con antígenos B), tipo AB (con antígenos AB) o tipo O (carecen de antígeno).

#### 6.3.1.1 Hematocrito

Se define como la fracción de volumen que los eritrocitos ocupan en un volumen de sangre. Se obtiene al centrifugar la sangre venosa o capilar, no coagulada, determinando las cantidades relativas de eritrocitos empacados y de plasma. El procedimiento ha resultado efectivo para estimar el grado de anemia (Berrío M, 2003).

#### 6.3.3 Leucocitos

El organismo al igual que una ciudad necesita de un sistema de limpieza que se ocupe de las partículas de desecho procedente del propio organismo, células desgastadas (eritrocitos principalmente) y complejos macromoleculares o de invasiones procedentes del exterior polvo y bacterias, el sistema de limpieza funciona en conjunto con células fagocitarias que ingieren las partículas y las mantienen localizadas o las desintegran, si el material de desecho está formado por proteínas extrañas el organismo produce anticuerpos específicos para cada proteína los cuales reaccionan con ellas y el complejo así constituido precipita y es fagocitado casi todas las células del

sistema inmune proceden de precursores formados en la medula ósea, que circulan con la sangre y penetran en los tejidos cuando así lo requieran las circunstancias (Lamb *et al.*, 1988)

Los leucocitos o glóbulos blancos (incolores) son nucleados y carecen de hemoglobina(Lamb *et al.*, 1988; Swenson y Reece, 2007), contienen mitocondrias y poseen movimiento ameboide, debido a esta capacidad de movimiento los leucocitos se pueden meter a través de los poros de las paredes de los capilares y desplazarse a un lugar de infección este tipo de movimiento se denomina diapédesis o migración, mientras que los eritrocitos suelen permanecer confinados en el interior de los vasos sanguíneos. (Fox, 2008; Swenson y Reece, 2007) el numero de leucocitos de la sangre varía mucho más que el de eritrocitos y oscila entre 4000 y 10000/ mm<sup>3</sup> (Lamb *et al.*, 1988)

#### Efectos de los leucocitos

El sistema de complemento representa una gran parte del sistema inmune natural implicado en la activación secuencial y en el ensamblaje de unidades que provocan tres efectos: (1) descarga de péptidos activos en la inflamación; (2) formación de zonas de atracción ( C3b, una opsonina; es decir una sustancia que hace “apetitosos” los materiales para la fagocitosis) (3) lesión de las membranas lo que facilita la lisis celular , este sistema esta activado por diversos polisacáridos y varios componentes de los anticuerpos.

#### Clasificación de leucocitos

Los leucocitos son casi invisibles al microscopio si no están teñidos, por lo tanto se clasifican en función de sus propiedades de teñido

- Aquellos leucocitos que poseen gránulos en el citoplasma se denominan granulocitos que incluye a los neutrofilos, eosinofilos y basofilos
- Los que carecen de gránulos claramente visibles se denominan leucocitos agranulares o no granulares incluyen a los linfocitos y monocitos (Fox, 2008; Swenson y Reece, 2007; Tortora y Derrickson, 2006).

Los monocitos y granulocitos se desarrollan desde una célula madre y los linfocitos de una célula madre linfoide (Tortora y Derrickson, 2006).

### 6.3.3.1 Granulocitos

Cada uno de los tres tipos de granulocitos exponen llamativos gránulos de distintas coloración que pueden ser reconocidas al microscopio, los gránulos grandes y uniformes de los **eosinofilos** presentan eosinofilia (afinidad por la eosina) es decir que se tiñen de un color rojo-anaranjado con colorantes ácidos, los gránulos normalmente no cubren u ocultan el núcleo el cual se muestran dos lóbulos conectados por una hebra de cromatina (Engelhardt y Breves, 2002; Tortora y Derrickson, 2006) estos pueden realizar fagocitosis pero su función principal es la de actuar como vehículos de transmisión para las sustancias químicas citotóxicas (destrucción de células), estos pueden ser escasos en los sistemas circulatorios de los vertebrados (aproximadamente el 3 % de todos los leucocitos ) pero su número puede aumentar en gran medida como respuesta a estímulos tales como una infección grave por gusanos parasitarios (Swenson y Reece, 2007)

Los gránulos redondeados y de variable tamaño de los **basofilos** presentan basofilia es decir una afinidad por los colores básicos y se tiñen de azul-violáceo con estos (Fox, 2008; Tortora y Derrickson, 2006) abandonan el sistema circulatorio y se acumulan en el líquido intersticial en el lugar de una infección u otra inflamación, liberando sustancias químicas tóxicas que matan los microorganismos invasores y otros parásitos, además liberan factores paracrinos, incluida la histamina y prostaglandinas que aumentan la corriente sanguínea en el lugar de la infección, por liberar estas sustancias químicas inflamatorias desempeñan un papel importante en las reacciones alérgicas tales como la fiebre del heno (Swenson y Reece, 2007)

Los neutrofilos son los leucocitos más comunes en la sangre de los vertebrados, estas células inmunológicas engullen las células dañadas, microorganismos y otros patógenos extraños mediante la fagocitosis (Swenson y Reece, 2007), tienen gránulos con escasa afinidad por los dos colorantes, siendo el tipo de células más abundantes de leucocitos y se supone entre el 50 y el 70 % de los leucocitos sanguíneos, los neutrofilos inmaduros poseen núcleos en forma de salchicha y se denominan *cayados*, cuando los *cayados* maduran sus núcleos se vuelven ovalados con dos o cinco lóbulos conectados por filamentos finos, en esta fase los neutrofilos se conocen también como leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Fox, 2008).

### **6.3.3.2 Leucocitos agranulares**

Existen dos tipos: linfocitos y monocitos, los **linfocitos** suelen ser el segundo grupo más numeroso de leucocitos, se trata de células pequeñas de 7 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro con núcleos redondos y escaso citoplasma, que se tiñe

intensamente y de modo uniforme con hematoxilina (Fox, 2008; Tizard, 2009)son las células de la inmunidad adaptiva .

En los cuales presentan características únicas como: (1) un numero restringido de receptores que permiten a cada célula responder a un antígeno individual (esta es la base de especificidad); (2)la capacidad de producir una población de células a partir de una sola (un clon) y un largo periodo de vida (esta es la base de memoria); (3) la células recirculan de los tejidos a la corriente sanguínea (Lamb *et al.*, 1988)cada uno de los linfocitos cumple con funciones diferentes en el sistema inmunológico, los linfocitos B (células B dependientes de la Bursa o de la medula ósea ) producen anticuerpos, los linfocitos T (dependientes del timo) se encargan de reclutar macrófagos y neutrofilosen el lugar de la infección liberando agentes citotoxicos para matar células extrañas o moribundas y ayudando a las células B en la producción de anticuerpos (Lamb *et al.*, 1988; Swenson y Reece, 2007)

#### Fuentes de linfocitos

En estadios fetales tempranos, las células madres linfoides se producen en el saco vitalino, omento e hígado, mientras que en estadios fetales tardíos así como en el adulto estas células se encuentran en la medula ósea(Tizard, 2009).

#### **6.3.4 Plaquetas**

Las plaquetas o trombocitos son los elementos formes más pequeños, miden  $3\mu\text{mm}$  de diámetro en promedio (Lamb *et al.*, 1988; Swenson y Reece,

2007) que en realidad se trata de fragmentos de células de mayor tamaño denominadas *megacariocitos* que se encuentran en la medula ósea(Fox, 2008) el numero de plaquetas circulantes en la sangre está regulada por la hormona trombopoyetina, siendo estas ricas en enzimas conteniendo grandes

cantidades de ATP y con una vida media de unos 10 días (Engelhardt y Breves, 2002; Lamb *et al.*, 1988), estos elementos penetran en la circulación careciendo de núcleo, pero al igual que los leucocitos son capaces de realizar un movimiento ameboidea (Fox, 2008), las plaquetas desempeñan un importante papel en la coagulación sanguínea (Fox, 2008; Swenson y Reece, 2007), constituyendo la mayor parte de la masa del coagulo y los fosfolípidos presentes en sus membranas celulares activando el factor de coagulación del plasma que forman filamentos de fibrina que refuerzan el tapón plaquetario (Fox, 2008) al unirse entre sí en un coagulo sanguíneo liberan *serotonina*, una sustancia química que estimula la constricción de los vasos sanguíneos reduciendo así el flujo de sangre a la zona lesionada, segregando también factores de crecimiento (reguladores autocrinos) (Swenson y Reece, 2007)

**Cuadro 1.- Valores Sanguíneos Normales en Ganado Caprino**

Eritrocitos	Hb	VPC	Leucocitos	Neutrofilos Segmentados	Neutrofilos Banda	en Linfocitos	Monocitos	Eosinofilos	Basofilos
10 <sup>6</sup>	g/dl	(%)	10 <sup>3</sup>	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
12-20	8-14	24-48	6-16	30-48	0-2	50-70	1-4	3-8	0-2

(Maxime, 1991)

## 6.4 PROCESOS INMUNITARIOS ASOCIADOS A LOS LEUCOCITOS

### 6.4.1 Inmunidad inespecífica

La inmunidad innata es la respuesta inicial a los microorganismos que impide la infección del huésped y en muchos casos, es capaz de eliminar el microorganismo, estimula las respuestas inmunitarias adaptativas y puede influir en la naturaleza de estas respuestas para optimizar su eficacia contra los diferentes tipos de microorganismos, en el cual no solo tiene funciones de defensa esencial en las primeras fases tras la infección sino que además proporciona el aviso de que existe una infección contra la cual debe organizarse una respuesta inmunitaria adaptativa que se desarrolla (Abbas *et al.*, 2002), se dice que este tipo de inmunidad comprende de 4 barreras de defensa: anatómica, fisiológica, fagocítica e inflamatoria (Male *et al.*, 2007)

El sistema retículo endotelial o sistema fagocítico mononuclear consiste con una línea de células de macrófagos con capacidad de obtener una capacidad fagocítica repetitiva, secreción de moléculas que amplifican la respuesta inmunitaria específica. Controlando la inflamación y contribuye a la reparación del daño tisular mediante la eliminación del tejido muerto o dañado y asistiendo en el proceso de restauración y lo más importante procesan antígenos en preparación para la respuesta inmunitaria específica (Abbas *et al.*, 2002; Tizard, 2009).

#### **6.4.2 Inmunidad específica (celular y humoral)**

La inmunidad adaptativa o específica tiene la capacidad de reconocer una gran cantidad de sustancias microbianas y no microbianas y de reacciones frente a ellas, también posee unos dotes para distinguir entre los distintos microorganismo y moléculas incluso los muy afines entre sí (Abbas *et al.*, 2002; Tizard, 2009), las respuestas inmunitarias adaptativas están mediadas por un grupo especializado de leucocitos, los linfocitos que se dividen en T y B; La especificidad de la respuesta permite que se genere la memoria inmunológica “recordar” un agente patógeno, estas características subyacen al fenómeno de inmunidad específica (Tizard, 2009)

Las células B: son responsables de la parte humoral del sistema inmunitario adaptativo y actúa contra patógenos extracelulares.

Las células T: son responsables de la parte celular mediada del sistema adaptativo y principalmente se relacionan con las respuestas inmunitarias celulares frente a los patógenos intracelulares como los virus y además regulan la respuesta de las células B (Male *et al.*, 2007)

La inmunidad humoral: cuenta con unas moléculas presentes en la sangre y en las secreciones mucosas que reciben el nombre de anticuerpos (Male *et al.*, 2007) producidas por unas células denominadas linfocitos B que expresan su receptor del antígeno (moléculas de inmunoglobulinas), los anticuerpos reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la infecciosidad de los microorganismos y los marcan como una diana para su eliminación por sus diferentes factores, este tipo de inmunidad es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extracelulares y sus toxinas debido a que los

anticuerpos segregados pueden unirse a ellos y contribuir a su destrucción (Abbas *et al.*, 2002) hay algunas clases que favorecen la ingestión de los microorganismo por las células del huésped (fagocitosis) mientras que otras se fijan a ellos y se desencadenan la liberación celular de los mediadores de la inflamación (Tizard, 2009).

La inmunidad Celular: queda a cargo de los linfocitos T, ya que los microbios intracelulares como los virus y algunas bacterias que sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y de otras células del huésped donde los anticuerpos circulantes no los tiene a su alcance, es donde comienza el trabajo de la inmunidad celular que fomenta la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o la desaparición de las células infectadas para suprimir los reservorios de la infección (Abbas *et al.*, 2002), las células T reconocen a los antígenos a través de los receptores de la superficie celular y tiene un rango amplio de funciones biológicas, algunas se relacionan con el control del desarrollo de las células B y los anticuerpos, al igual que interactúan con las células fagocíticas para ayudar a destruir los patógenos que han sido captados (Tizard, 2009).

Las moléculas de histocompatibilidad

Para inducir una reacción inmunitaria, el procesamiento del antígeno requiere no solo de la fragmentación de sus moléculas en el interior de las células, sino también en la unión de estos fragmentos con una molécula presentadora de antígeno apropiada (Tizard, 2009) el MHC puede considerarse un conglomerado organizado de genes que regulan el procesamiento y la presentación de los antígenos, representa el principal componente genético de

la resistencia o susceptibilidad de enfermedades infecciosas o autoinmunitarias(Tizard, 2009).

Cada MHC contiene tres clases de Loci (plural de locus) génicos, los loci de clase I codifican moléculas de MHC que se hallan en la superficie de la mayor parte de las células nucleadas(y en eritrocitos en algunas especies), los loci clase II codifican moléculas MHC polimórficas que se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B), los loci de clase III codifican muchas proteínas diferentes con una amplia variedad de funciones, muchas de las cuales no están directamente relacionadas con la presentación de antígenos(Abbas *et al.*, 2002)

Las moléculas de MHC pueden mostrar un amplio rango de péptidos derivados de las proteínas intracelulares en la superficie celular alertando así el sistema inmunitario de la presencia de invasores intracelulares, cuando una célula T sensibilizada que tiene un TCR adecuado(capaz de reconocer un péptido vírico en particular) entra en contacto con una célula infectada, puede destruir rápidamente esta célula y por lo tanto delimitar la infección vírica (Male *et al.*, 2007)

## 6.5 ANTICUERPOS

Los anticuerpos son glucoproteínas solubles que reconocen y se unen a antígenos y (Abbas *et al.*, 2002; Male *et al.*, 2007; Tizard, 2009) y son los principales mediadores de la inmunidad humoral frente a todo tipo de microbios (bacterias, virus o parásitos), una de las primeras demostraciones experimentales de la inmunidad adaptativa fue el hallazgo por Von

Behring y Kitasato en 1890 descubrieron que las toxinas inactivadas por proceso químico podían inducir inmunidad protectora cuando se inyectaba a animales de experimento y que la protección se podría transferir a otros animales susceptibles inyectándoles el suero de sus homólogos inmunizados (Abbas *et al.*, 2002)

Los anticuerpos pueden aparecer en dos formas: anticuerpos unidos a la membrana sobre la superficie de los linfocitos B actúan como receptores para los antígenos y los anticuerpos secretados que residen en la circulación, los tejidos y las localizaciones mucosas se unen a los antígenos, neutralizan las toxinas e impiden la entrada y la propagación de los patógenos (Abbas *et al.*, 2002; Male *et al.*, 2007).

Hay cinco diferentes clases (isotipos) de inmunoglobulinas que difieren en el uso de las cadenas pesadas como son Ig G, siendo la segunda más abundante en el suero, IgM es la segunda más abundante en el suero de los mamíferos, sin embargo la IgA es la que predomina en las secreciones como saliva, leche, y líquido intestinal, la IgD es un BCR (*B-cell antigen receptor*) raro en los líquidos corporales y no existe en todos los mamíferos y la Ig E es medidora de las reacciones alérgicas (Male *et al.*, 2007; Tizard, 2009) estas también se diferencian por: el tamaño, la carga, la secuencia de aminoácidos y el contenido de hidratos de carbono (Male *et al.*, 2007) todos los isotipos de las inmunoglobulinas excepto Ig D son bifuncionales es decir que reconocen y se unen al antígeno al igual que favorecen la destrucción y/o eliminación de inmunocomplejo formado a través de la activación de mecanismos efectoros una parte de la molécula del anticuerpo determina su especificidad de antígeno

y la otra determina que funciones efectoras se activan (Abbas *et al.*, 2002; Male *et al.*, 2007).

La clase y subclase de las inmunoglobulinas dependen de la estructura de la cadena pesada, la estructura de todas las moléculas consta de: (1) dos cadenas polipeptídicas ligeras y (2) dos cadenas polipeptídicas pesadas cada una con 110 aminoácidos de longitud (Abbas *et al.*, 2002; Male *et al.*, 2007; Tizard, 2009).

Tanto las cadenas pesadas como las ligeras constan de regiones amino terminales (V) que participan en el reconocimiento del antígeno y regiones constantes carboxi terminales C; las regiones C de las cadenas pesadas son las que median las funciones efectoras, en las cadenas pesadas, la región V se compone de un dominio Ig y la región C de tres o cuatro dominios Ig, cada cadena ligera está compuesta por un dominio Ig en la región V y un dominio Ig en la región C, las regiones variables se denominan así por que contienen zonas de variabilidad en la secuencia de aminoácidos que distinguen a los anticuerpos elaborados por un clon de linfocitos B de los fabricados de otros clones (Abbas *et al.*, 2002).

Los dominios N-terminal de las cadenas pesadas y ligeras forman las regiones V de las moléculas de anticuerpos, que difieren entre anticuerpos de distinta especificidad, las regiones V de las cadenas ligeras y pesadas contienen cada una de tres regiones hipervariables separadas, de unos 10 aminoácidos que están acoplados especialmente para la formar el lugar de combinación con el antígeno de la molécula de anticuerpo (Abbas *et al.*, 2002; Male *et al.*, 2007). La mayoría de las funciones efectoras de los anticuerpos está mediada por las

regiones C de las cadenas pesadas, pero estas funciones están desencadenadas por la unión del antígeno al lugar de fijación que se encuentra distantes de la región V. (Tizard, 2009).

Los antígenos son sustancias que se unen de forma específica a anticuerpos o receptores del antígeno de los linfocitos T, los antígenos que se fijan a anticuerpos constituyen una amplia variedad de las moléculas biológicas, tales como azúcares, lípidos, hidratos de carbono, proteínas y ácidos nucleicos. Esto contrasta con los receptores del antígeno de los linfocitos T que reconocen únicamente a antígenos peptídicos; la unión del anticuerpo al antígeno puede ser sumamente específica, con la capacidad para distinguir pequeñas diferencias en las estructuras químicas, pero se pueden producir reacciones cruzadas en las que dos o más antígenos pueden ser ligados por el mismo anticuerpo (Abbas *et al.*, 2002; Male *et al.*, 2007; Tizard, 2009).

## 6.6 INMUNIZACION ARTIFICIAL

La inmunización es un procedimiento realizado en todo el mundo, con el uso de animales de laboratorio, siendo los conejos y ratones la especie más frecuente en su utilización con la finalidad de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales, también se utilizan los caballos debido a su fácil manejo, gran volumen sanguíneo y plasmaferesis así como sus ventajas también existe factores a considerar como: el costo de adquisición, mantenimiento e inmunorespuesta local exacerbada resultando la formación de grandes abscesos, fistulas y fibrosis en el lugar de la inoculación, además muchos pacientes a los que se les administra el antisuero de origen equino manifiestan sensibilidad a sus proteínas debido a una exposición previa y pueden

desarrollar una reacción anafiláctica tipo I, por eso es que se ha inducido al desarrollo de nuevas técnicas y la utilización de animales alternativos tales como Caprinos, Bovinos, Gallinas, Perros y Ovejas los cuales han demostrado buenos resultados a nivel experimental (Montilla *et al.*, 2007) la calidad de los procedimientos de la inmunización puede ser optimizada por el establecimiento de instalaciones centrales o unidades con científicos responsables ( por ejemplo un veterinario), hay dos métodos básicos por los que cualquier animal puede ser inmunizado frente a una enfermedad infecciosa: inmunización pasiva y activa (Health, 2007; Tizard, 2009).

La inmunización pasiva requiere que los anticuerpos sean producidos en un animal donante mediante inmunización activa y que esos anticuerpos se administren a los animales susceptibles para conferirles una protección inmediata,(Tizard, 2009) ya que los niveles de anticuerpos suben y se convierten en una fuente importante de sueros hiperinmunes específicos; un ejemplo de una inmunidad pasiva lo ofrece el paso de los anticuerpos maternos al feto, que permite a los recién nacidos combatir las infecciones antes de adquirir la capacidad para su producción por sí mismo (Abbas *et al.*, 2002; Male *et al.*, 2007; Tizard, 2009).

Para la inmunización activa se deben seguir una serie de pasos en el proceso de la inmunización:

- Preparación del antígeno desde su fase inicial de purificación para su mezcla eventual con adyuvante
- Inyección del antígeno
- El sangrado del animal

- Procesamiento de antisueros

Se recomienda que en particular se debe prestar mayor atención a la calidad de la preparación de antígeno (por ejemplo eliminación de la endotoxina, formaldehído) el almacenamiento de los reactivos y la esterilidad de los instrumentos utilizados para inyección y sangrado así como la selección del adyuvante (Leenaars *et al.*, 1999).

### **6.6.1 Preparación del antígeno**

La especificidad de la respuesta inmunitaria obtenida depende de la pureza del antígeno aplicado ya que las impurezas (1%) pueden llegar a ser inmunodominante (por ejemplo, con muchos antígenos bacterianos) y puede resultar en los anticuerpos tener una mayor actividad contra la impureza que contra el antígeno de interés, se debe considerar la toxicidad de la preparación de antígeno debido a la contaminación con endotoxinas, tales como lipopolisacárido o químicos utilizados para inactivar los residuos del microorganismo, o un nivel de pH extremo, los diluyentes debe ser endotoxina libre, y el pH debe ser ajustado dentro de los límites fisiológicos, la administración de estos factores son importantes porque puede tener un efecto negativo sobre el bienestar de los animales, así como en los resultados inmunológicos (Leenaars y Hendriksen, 2005).

Para preparar un antígeno se necesita de un previo adyuvante, y todos los pasos deben ser asépticamente (Arce *et al.*, 2007).

### **6.6.2 Administración o inyección del antígeno**

La inyección por vía intramuscular fue un punto importante de discusión ya que algunos opinan que puede utilizar sin problemas, mientras que otros consideran esta vía no aceptable ni necesaria para inyecciones con adyuvante, especialmente de pequeños roedores como ratones ya que una mala colocación de la inyección de mezcla puede establecer contacto con manojos de nervios o causar procesos inflamatorios graves(Leenaars *et al.*, 1999).

La inyección intraperitoneal de mezclas de adyuvante no es recomendable, ya que se sabe que inducen la inflamación (macroscópicamente evidente), peritonitis (con el riesgo de formación de ascitis), y cambios de comportamiento (Por ejemplo, disminución de la actividad y pérdida de peso)(Abbas *et al.*, 2002; Leenaars *et al.*, 1999).

Las vías subcutánea e intradérmica, son las más potentes en la cual está sujeta a cuatro condiciones 1) El volumen de inyección no podrá exceder de 0.05 ml por punto de inyección, 2) Las inyecciones se deben administrar en más de un lugar con espacio suficiente entre los puntos de inyección, 3) El número de sitios de inyección debe ser restringido hasta un máximo de 4, 4) Las inyecciones deben ser administradas en el lomo del animal para reducir el mínimo riesgo de ulceración(Health, 2007; Leenaars y Hendriksen, 2005); Por el contrario, la vía oral es la ruta de ingreso al organismo en la que hay una menor respuesta a las moléculas extrañas, lo que podría atribuirse, principalmente, a la actividad que realizan los linfocitos TH3 ubicados en el aparato digestivo. Estas células secretan TGF beta, citocina que además de ejercer un efecto antiinflamatorio, induce tolerancia y estimula la producción de Ig A. (Robledo, 2009)En general, los sitios de inyección de refuerzo debe estar lejos de los sitios de inyección previos(Leenaars *et al.*, 1999).Cuando un

antígeno se mezcla y se inyecta en un animal se forma un granuloma rico en macrófagos en los tejidos, el antígeno contenido en este granuloma se filtra lentamente en el organismo proporcionando un estímulo antigénico prolongado de manera que los antígenos que normalmente solo persisten unos pocos días, mediante esta técnica pueden ser retenidos en el organismo durante varias semanas(Leenaars *et al.*, 1999).

## 6.7EXTRACCION DE SANGRE

Las muestras de sangre deben tomarse con un mínimo de estrés para el animal provocando los menores ruidos repentinos durante la extracción y su rutina de vivienda, los animales que sean inmunizados deben ser condicionados a tener confianza con el personal de cuidado de los animales; esto no sólo es importante para el bienestar animal, si no que asegura que los animales no exhiben estrés mediada por vasoconstricción, que haría difícil tomar muestras de sangre, el sitio de la extracción de sangre mas recomendada en caso de cabras y grandes especies es en la vena yugular ya que se obtienen mayores cantidades de sangre y con mayor facilidad, las venas se localizan más fácilmente cuando se fricciona el sitio de la punción con alcohol,(Maxime, 1991) en el cual antes de realizarse la punción se debe afeitar y desinfectar el lugar en el que vaya a realizarse la punción, para minimizar cualquier punto de contaminación(Voigt, 2000), la aguja utilizada debe corresponder de igual diámetro de donde se realice la extracción para mejor facilidad lo mas recomendado es que sea de calibre 22, esta debe estar estéril, seca y afilada, la toma de sangre se debe aspirar despacio para prevenir la hemolisis y el deterioro de los leucocitos, los recipientes que se deben utilizar

se recomiendan que sean de vidrio y con tapones de hule o de polietileno como son los *vacutainers*: tubos al vacío que se usan con un soporte especial y aguja, de diferentes tamaños y ya sea solo o con anticoagulante; en caso de la introducción de la sangre a un segundo recipiente a través de una aguja, se debe extraer la aguja y el tapón para verter la sangre cuidadosamente en el recipiente (Maxime, 1991; Voigt, 2000), el volumen a extraer no debe exceder el 15 % de volumen total de sangre ni con rapidez ya que puede entrar en un choque hipovolémico de corta duración y largo plazo sufrir anemia en el cual también no debe ser removido más de una vez en 15 días (Leenaars *et al.*, 1999; Voigt, 2000).

El mantenimiento de la muestra no debe dejarse durante mucho tiempo a temperatura ambiente ya que las células llegan a un estado de autólisis, y se recomienda después de una hora de la extracción de la sangre mantenerse en refrigeración (Voigt, 2000).

## 6.8 SELECCIÓN DE LOS ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS

Los adyuvantes inmunológicos son cualquier agente que actúa para reforzar, amplificar, acelerar, modificar, o prolongar las respuestas inmunes específicas a los antígenos de las vacunas (Miranda *et al.*, 2006). Estos se utilizan para mejorar la respuesta a la inmunidad, un adyuvante ideal puede ser caracterizado como una sustancia que estimula los altos títulos de anticuerpos sostenibles (incluso con cantidades pequeñas de antígenos) con facilidad de mezclar así como baja toxicidad para el inmunizado; existiendo más de 100 adyuvantes se elige según la necesidad debido al costo o dificultad de la preparación; El hidróxido de aluminio es muy utilizado por ejemplo asociado a

toxoides de la difteria y del tétanos, en la actualidad se ha tratado de desarrollar mejores adyuvantes a la luz de los nuevos conocimientos acerca de los procesos de estimulación linfocitaria y generación de memoria sobre todo a las respuestas mediadas por células T (Leenaars *et al.*, 1999); Se recomienda que para una inmunización se debe participar en un protocolo de inmunización con respecto al bienestar animal, la mezcla de un antígeno /adyuvante en la inoculación debe ser preparado asépticamente para minimizar el riesgo de una posible contaminación así como para comprobar si el antígeno puede ser utilizado, un adyuvante también puede ser necesario cuando sólo hay una cantidad muy limitada de antígeno disponible.

Los adyuvantes concentran el antígeno en los lugares adecuados o inducen la formación de citocinas debido a dos mecanismos:

- La concentración del antígeno en los lugares en que se produce la exposición de los linfocitos al mismo tiempo (efecto “depot”)
- La inducción de citocinas reguladoras del funcionamiento linfocitario (Abbas *et al.*, 2002; Tizard, 2009).

Los adyuvantes aumentan la respuesta a antígenos por: la formación de depósitos del mismo en el sitio de inoculación; estimulación de la activación de macrófagos y la proliferación de linfocitos por una amplificación no específica de señales por las Células Presentadoras de Antígeno y células Th (citocinas); la provisión de un vehículo para el transporte del antígeno emulsionado ayuda que llegue al sistema linfático hasta lugares distantes, tales como nodos linfáticos y el bazo, donde se establecen nuevos focos de formación de anticuerpos. La emulsión adyuvante a su vez puede diseminar en varios

órganos, dependiendo de la ruta de inoculación, con el desarrollo de focos granulomatosos en lugares distales (Miranda *et al.*, 2006).

Algunos adyuvantes simplemente retrasan la eliminación de los antígenos permitiendo que la respuesta inmune dure más tiempo, el sistema inmune al depender del antígeno responde a la presencia del mismo y termina una vez que este es eliminado (Male *et al.*, 2007).

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIOS**

El estudio se llevo a cabo en la UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO en una posta caprina, localizada en el periférico Raúl López Sánchez y carretera Santa Fe, Torreón, Coahuila, México. La ciudad tiene altitud de 1137 metros sobre el nivel del mar y su precipitación pluvial media anual es de 144 mm. Latitud: 21° 31' 11" longitud W: 103° 25'52". Clima es cálido de tipo semidesértico. En verano la temperatura puede rebasar los 40 °C y en invierno puede alcanzar un mínimo de - 2 °C.

### **7.2 MANEJO DE HATO**

Se utilizaron 15 cabras de tres razas diferentes para las inmunizaciones siendo 5 saanen, 5 togenburg y 5 criollas, nunca antes inoculados con algún tipo de antígeno dichas de condiciones clínicas normales y negativas a *Brucella*, con un peso promedio de 33.4 kg.

### 7.3 CONDICIÓN DE MANTENIMIENTO

La condición de explotación era intensiva, se les proporcionaba el alimento a base de forraje, concentrado y agua; antes de la primera inmunización se dejaron un periodo de dos semanas de adaptación con una alimentación a base de forraje (alfalfa), agua, concentrado y minerales proporcionados a sus necesidades nutricionales así mismo se realizó su desparasitación a base de ivermectina dosificada en base a su peso, corte de cuernos, corte de pesuña



**Figura 1.- Corte de pesuña**

### 7.4 MATERIAL PARA INMUNIZACIÓN

- Adyuvante Freund completo
- Antígeno IgG de conejo purificado 1000 ug/ml
- Jeringas de 5ml
- Adaptador para jeringas

### 7.5 MATERIAL PARA REALIZAR SANGRADO

- Tubos de vacutainer al vacío y con anticoagulante EDTA

- Aguja de vacutainer
- Canastilla para el transporte de las muestras
- Torundas de alcohol para la asepsia del área a tomar la muestra
- Porta-agujas

## 7.6 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA INMUNIZACIÓN

Recoger en partes iguales el antígeno en una jeringa y adyuvante en una segunda jeringa, se elimina el aire de las dos jeringas y con el adaptador se conectan ambas jeringas mezclando bien las dos sustancias hasta formar una emulsión estable, esta emulsión esta lista cuando las jeringas se vuelven difíciles de mover, enseguida se coloca en refrigeración por cinco minutos y queda listo para la inyección.

## 7.7 PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN Y TOMA DE MUESTRA SANGUÍNEA PARA DETECTAR LA NORMALIDAD DE LOS PARÁMETROS

Antes de la inyección se debe rasurar en la línea vertical en el centro de la columna vertebral de la cabra para una mejor manipulación de la administración del antígeno IgG de conejo con la finalidad de obtener antisuero anti-Ig G de conejo. La inmunización y sangrado se realizó bajo el siguiente esquema:

- 10 de junio se realizo un pre- sangrado afeitándose en la parte lateral del cuello para facilitar la ubicación de la vena yugular, extrayendo 25 ml de sangre sin anticoagulante, de dejo coagular, se separo el suero y

- centrifugo para aclarar, a la par se tomo una muestra de sangre en el tubo con anticoagulante para realizar biometría hemática.
- 08 de julio se realizo la primera inmunización, se inyecto por vía intradérmica a cada cabra 2ml de Ag + 2 ml de adyuvante mezclados
  - 02 de agosto, se realizo la segunda inmunización se inyecto vía intradérmica a cada cabra 1 ml de Ag + 1 ml de adyuvante mezclados
  - 16 de agosto se realizo el primer sangrado se tomo 250 ml de sangre sin anticoagulante en tubos de vacutainer se dejo a 37°C para permitir la coagulación y retracción del coagulo, se separo el suero y centrifugo hasta que se aclaró, se tomo una muestra de sangre en el tubo con anticoagulante para realizar biometría hemática
  - 29 de agosto, tercera inmunización se inyecto vía subcutánea a cada cabra 1ml de Ag + 1ml de adyuvante mezclados
  - 05 de septiembre se realizo el segundo sangrado se tomaron 250 ml de sangre sin anticoagulante en tubos de vacutainer, se dejo a 37°C para permitir la coagulación y retracción del coagulo, se separo el suero y centrifugo hasta que se aclaró, se tomo una muestra de sangre en el tubo con anticoagulante para realizar biometría hemática
  - 18 de septiembre se realizo el tercer sangrado tomando 250 ml de sangre en tubos de vacutainer sin anticoagulante, se dejo a 37°C para permitir la coagulación y retracción del coagulo, se separo el suero y centrifugo hasta que se aclaró, se tomo una muestra de sangre en el tubo con anticoagulante para realizar biometría hemática.
  - 20 de agosto se cambio la alimentación aumentando el 50 %



**Figura 2.-**Rasurado en línea vertical de la columna para una mejor manipulación al inyectar



**Figura 3.-**Se Muestra las inflamaciones en el área que se inyectó el antígeno IgG de Conejo.

## 7.8 MATERIAL PARA LA REALIZACIÓN DE BIOMETRÍA HEMÁTICA

- Muestra biológica (sangre) en tubo de ensayo de tapón lila con EDTA.
- Cámara de Neubauer.
- Pipeta de Thoma (para glóbulos blancos y glóbulos rojos)

- Boquillas (para glóbulos blancos y glóbulos rojos)
- Manguera de caucho
- Solución salina
- Líquido de turk
- Portaobjetos
- Alcohol metílico
- Microscopio óptico
- Laminillas de vidrio
- Kit de tinción sanguínea
- microscopio

## 7.9 CONTEO DE ERITROCITOS

- Extraer la sangre por punción venosa y coleccionar en un tubo con anticoagulante, agitando suavemente para homogeneizar.
- Llevar la sangre hasta la marca de 0.5 o 1, según la dilución que se desee emplear en una pipeta de toma para glóbulos rojos preferentemente limpios y secos.
- Aforar con líquido de dilución hasta llegar a la marca 101
- Pasar la pipeta al agitador
- Colocar la cámara cuenta células sobre una superficie horizontal y poner el cubreobjetos sobre las mesetas
- Tirar la primeras 2 a 3 gotas de la pipeta

- Co la cuarta gota cargar la cámara depositándola entre la meseta y el cubreobjetos y dejarla difundir por capilaridad, evitando que se formen burbujas o se caiga el líquido de los surcos
- Dejar en reposo durante 2 minutos de preferencia en ambiente húmedo
- Bajar el condensador del microscopio y proceder a la localización de la cuadrícula a seco débil
- Contar los glóbulos rojos que se encuentren en la cuadrícula central, anotando los que estén presentes en los cuadros de las esquinas y uno del centro. Considerar los eritrocitos que se encuentren sobre la línea limitante de cada uno de los ángulos externos del cuadro y eliminar los que se encuentren en los ángulos opuestos
- De hacer autoaglutinización de los eritrocitos es aconsejable usar una solución de NaCl al 0.85% al efectuar la dilución

### **7.9.1 Cálculos Eritrocitarios**

El cuadro central mide 1mm por lado y está dividido en 25 cuadros los que a su vez van a estar divididos (cada uno de ellos) en 16 cuadrillos, de tal manera que el número total de estos últimos será de 400; como el recuento se lleva a cabo en 5 de los 25 cuadros el número de cuadrillos pequeños será de 80.

Sangre hasta la marca 0.5 más líquido de dilución hasta la marca 101 nos da una dilución 1:200

Sangre hasta la marca 1 más líquido de dilución hasta la marca 101 nos da una dilución 1:100

La altura de la superficie de la meseta al cubreobjetos es de 0.1mm

*Formula*

$N^{\circ}$  de células contadas  $\times$  dilución  $\times$  10  $\times$  400 = GR/mm<sup>3</sup>

80

## 7.10 CONTEO DE LEUCOCITOS

- Extraer la sangre por punción venosa y colectar en un tubo con anticoagulante, agitando suavemente para homogeneizar.
- Llevar la sangre hasta la marca de 0.5 o 1, según la dilución que se desee emplear en una pipeta de toma para glóbulos rojos preferentemente limpios y secos.
- Aforar con liquido de dilución hasta llegar a la marca 11
- Pasar la pipeta al agitador
- Colocar la cámara cuenta células sobre una superficie horizontal y poner el cubreobjetos sobre las mesetas
- Tirar la primeras 2 a 3 gotas de la pipeta
- Co la cuarta gota cargar la cámara depositándola entre la meseta y el cubreobjetos y dejarla difundir por capilaridad, evitando que se formen burbujas o se caiga el liquido de los surcos
- Dejar en reposos durante 2 minutos de preferencia en ambiente húmedo
- Bajar el condensador del microscopio y proceder a la localización de la cuadrícula a seco débil
- Contar los glóbulos rojos que se encuentren en la cuadrícula central, anotando los que estén presentes en los cuadros de las esquinas y uno

del centro. Considerar los eritrocitos que se encuentren sobre la línea limitante de cada uno de los ángulos externos del cuadro y eliminar los que se encuentren en los ángulos opuestos

- De hacer autoaglutinización de los eritrocitos es aconsejable usar una solución de NaCl al 0.85% al efectuar la dilución

### 7.10.1 Cálculos Leucocitarios

- Para hacer el recuento se utilizan los cuadros de  $1\text{mm}^2$  que están colocados en las esquinas, cada uno de ellos está dividido en 16 cuadros
- Sangre hasta llegar a la marca 0.5 mas liquido de dilución hasta la marca 11 nos da una dilución 1:20
- Sangre hasta la marca 1 mas liquido de dilución hasta la marca 11 nos da una dilución 1:10
- La altura de la superficie de la meseta al cubreobjetos es de 0.1 mm.
- *Formula*

$$\underline{N^{\circ} \text{ de células contadas} \times \text{dilución} \times 10 = \text{leucocitos}/\text{mm}^3}$$

4

### 7.11. CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS

- Extraer la sangre por punción venosa o capilar
- Colocar una pequeña gota en portaobjetos

- Hacer Frotis delgado
- Secar al aire, colocar la laminilla en el puente de coloración
- Cubrir el Frotis con colorante de Wright, dejándolo 5 minutos
- Agregar buffer, sin tirar el colorante, con una pipeta soplar sobre la mezcla para homogeneizar, dejar 7 minutos
- Eliminar la mezcla agregando agua corriente (por flotación), y lavar durante 1 minuto
- Observar a inmersión

#### **7.11.1 Cálculos diferenciales**

- Se recorre el Frotis y se van anotando los diferentes leucocitos, agrupando cada tipo por separado hasta completar un total de 100 células como mínimo.

#### **7.12. MATERIAL PARA REALIZAR EL HEMATOCRITO**

- Muestra biológica (sangre) en tubo de ensayo de tapón lila con EDTA.
- Tubos capilares para microhematocrito
- Centrifuga para microhematocrito
- Sellador ( en esta caso de utilizo plastilina)
- Lector micro hematocrito

### **7.12.1 Lectura De Hematocrito**

- Se llena el tubo capilar con sangre venosa anticoagulada o la obtenida por punción capilar hasta 2/3 partes y se sella por el extremo distante de la sangre.
- Se centrifuga a 12,000 rpm durante 5 minutos.
- Se toma la lectura directamente sobre la escala del aparato o secando el porcentaje por regla de tres simple.

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos fueron procesados con el paquete estadístico Mynstat N° 12 U.S. usando tres pruebas para determinar el efecto que las variables clasificatorias tiempo (fechas) y grupos (razas); la primera prueba fue con ANOVA el cual determinamos 2 factores que fueron Tiempo x Grupo, la segunda prueba fue una T Apareada para ver el efecto sobre el tiempo y la tercera prueba fue a T-student para determinar el efecto entre un grupo y otro.

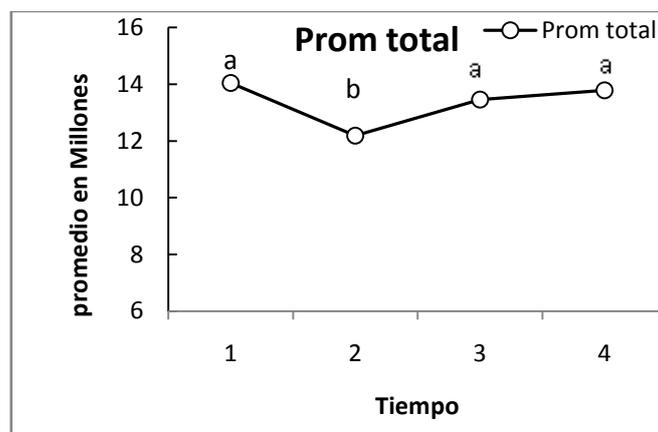
## **9. RESULTADOS**

En el cuadro 2 se reportan los números totales de eritrocitos que se obtuvieron en las cabras de cada raza en los distintos muestreos. Estos datos se estudiaron estadísticamente con análisis Mynstat, el cual nos arrojó que el tratamiento no provocó ninguna variación en la cantidad de eritrocitos (figura 4

**Cuadro 2.-** Cuenta total de eritrocitos( $10^6/\mu\text{L}$ )en 3 razas y 4 fechas,comparadas con grupo testigo

Raza	fecha 1	fecha 2	fecha 3	fecha 4
<b>Saanen</b>				
S1	11.0	10.7	12.0	14.9
S2	10.1	17.4	17.4	15.2
S3	13.5	10.5	15.0	13.7
S4	14.8	16.8	15.8	16.8
P	12.4a	13.8a	15.0a	15.2a
DE	2.1	3.7	2.2	1.2
<b>Criolla</b>				
C1	30.6	11.1	14.8	11.0
C2	7.8	12.1	12.0	12.0
C3	12.7	11.4	14.1	14.2
C4	15.1	12.1	10.6	14.6
P	16.5a	11.7a	12.8a	13.0a
DE	9.8	.4	1.9	1.7
<b>Toggenburg</b>				
T1	12.9	9.9	10.2	18.9
T2	16.9	13.8	13.8	15.6
T3	17.4	10.0	11.3	13.3
T4	12.2	11.4	10.3	10.6
P	14.8a	11.3a	11.4a	14.6a
DE	2.6	1.8	1.6	3.5
<b>Testigo</b>				
S5	13.9	10.5	14.3	15.9
C5	13.0	14.7	18.8	11.6
T5	9.7	10.2	10.0	9.1
P	12.2a	11.8a	14.4a	12.2a
DE	2.2	2.5	4.3	3.4
P. total	14.0	12.1	13.4	13.7

(DE: desviación estándar, P: promedio, S1: saanen1, C1: criolla1, T1: toggenburg1, Letras diferentes en columnas  $P < 0.05$ )



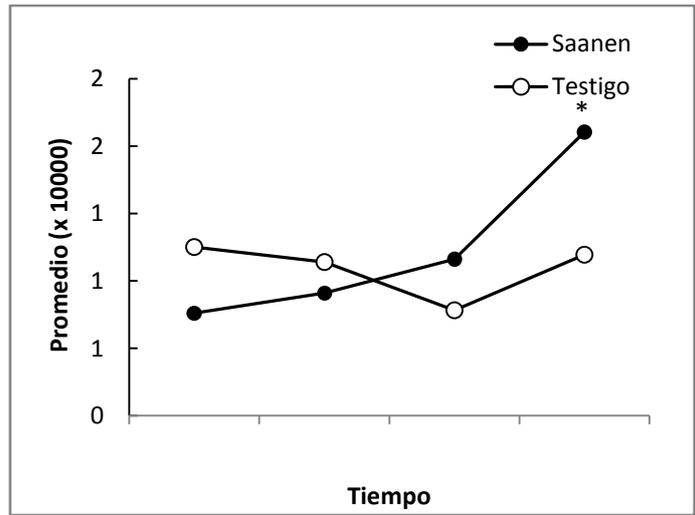
**Figura 4.-**Variación de los promedios totales de eritrocitos en todas las cabras sometidas a tratamiento(Letras diferentes  $P < 0.05$ )

El cuadro 3 muestra los totales de leucocitos en las diferentes razas en los tiempos de muestreo. El análisis estadístico (Mystat) nos demuestra que el número total de leucocitos si tiene una variación a causa del tratamiento en las cabras de las razas Saanen y Toggenburg como se puede ver en la figura 5 y 6.

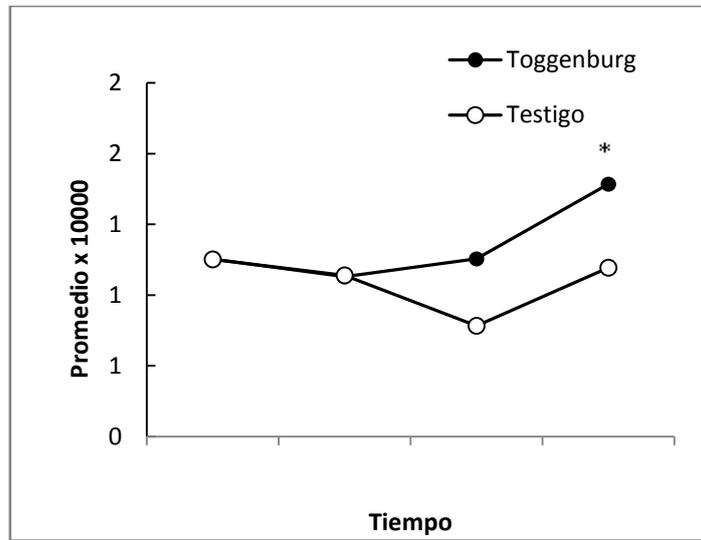
**Cuadro 3.-Cuenta total de leucocitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) en 3 razas y 4 fechas en diferentes tiempos y un grupo testigo**

<b>Cuenta total de leucocitos</b>				
<b>Raza</b>	<b>fecha 1</b>	<b>fecha 2</b>	<b>fecha 3</b>	<b>fecha 4</b>
<b>Saanen</b>				
<b>S1</b>	8.6	12.0	12.1	16.1
<b>S2</b>	11.0	10.1	12.4	14.7
<b>S3</b>	7.0	13.8	12.4	24.4
<b>S4</b>	5.8	1.2	8.1	20.0
<b>P</b>	8.1a	9.2a	11.2a	18.8a
<b>DE</b>	2.2	5.5	2.0	4.3
<b>Criolla</b>				
<b>C1</b>	11.2	12.7	7.9	12.8
<b>C2</b>	10.6	10.2	5.7	8.7
<b>C3</b>	6.4	10.7	8.3	14.1
<b>C4</b>	11.0	9.5	5.6	8.3
<b>P</b>	9.8a,b	10.8a	6.9b	10.9b
<b>DE</b>	2.2	1.3	1.4	2.9
<b>Toggenburg</b>				
<b>T1</b>	12.6	14.2	10.3	23.4
<b>T2</b>	5.7	11.9	10.7	14.0
<b>T3</b>	18.1	10.2	16.2	13.7
<b>T4</b>	11.7	7.7	11.0	13.9
<b>P</b>	12.0	11.0a	12.0a,b	16.2a,b
<b>DE</b>	5.0a,b	2.7	2.8	4.7
<b>Testigo</b>				
<b>S5</b>	12.3	10.9	7.0	15.4
<b>C5</b>	11.2	9.7	12.4	8.3
<b>T5</b>	12.4	12.7	5.3	10.9
<b>P</b>	12.0b	11.1a	8.2a,b	11.5b
<b>DE</b>	.6	1.5	3.7	3.6

(DE: desviación estándar, P: promedio, S1: saanen1, C1: criolla1, T1: toggenburg1, Letras diferentes en columnas  $P < 0.05$ )



**Figura 5.-**Cuentas de leucocitos entre el tiempo 1-4 en la raza Saanen comparada con un grupo Testigo \*P<0.05



**Figura 6.-**Totales de leucocitos entre el tiempo 2-4 en la raza Toggenburg comparada con un grupo Testigo \*P<0.05

En cuadro 4 se aprecian los valores de VPC en las diferentes razas en tiempos de muestreo donde se demuestra que no hubo diferencia significativa entre grupo y tiempo, comportándose relativamente iguales a comparación de un grupo testigo sin inmunización

**Cuadro 4.-** Volumen de paquete celular (%) en 3 razas y 4 fechas comparado con un grupo testigo.

VPC				
Raza	fecha 1	fecha 2	fecha 3	fecha 4
<b>Saanen</b>				
S1	29	29	30	29
S2	33	31	36	30
S3	33	35	34	35
S4	38	28	33	31
P	33,2a	30,7a	33,2a	31,2 a
DE	3,6	3,09	2,5	2,6
<b>Criolla</b>				
C1	30	31	30	36
C2	22	31	30	30
C3	30	37	38	40
C4	34	33	26	30
P	29 a	33a	31a	34a
DE	5,3	2,8	5,0	4,8
<b>Toggenburg</b>				
T1	33	29	31	30
T2	35	39	30	34
T3	35	30	34	38
T4	27	30	26	30
P	32,5a	32a	30,2a	33 a
DE	3,7	4,6	3,3	3,8
<b>Testigo</b>				
S5	30	28	30	38
C5	30	38	40	40
T5	28	32	32	20
P	29,3a	32,6a	34a	32,6a
DE	1,1	5,0	5,2	11,0

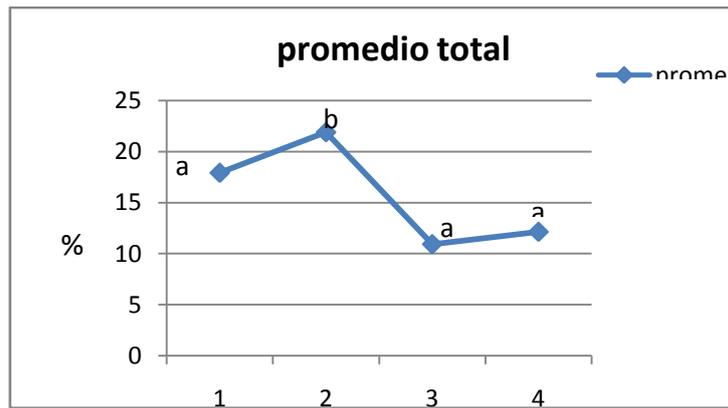
(DE: desviación estándar, P: promedio, S1: saanen1, C1: criolla1, T1: toggenburg1, Letras diferentes en columnas P<0.05)

El cuadro 5 muestra los totales de neutrófilos segmentados en las diferentes razas en los tiempos de muestreo. El análisis estadístico (Mystat) nos demuestra que el número total de neutrófilos tiene una variación elevada con prioridad en el tiempo 2 a causa del tratamiento en las cabras se observa en la figura 7.

**Cuadro 5.-** Cuentatotal de neutrófilos segmentados(%) en 3 razas y 4 fechas comparado con un grupo testigo.

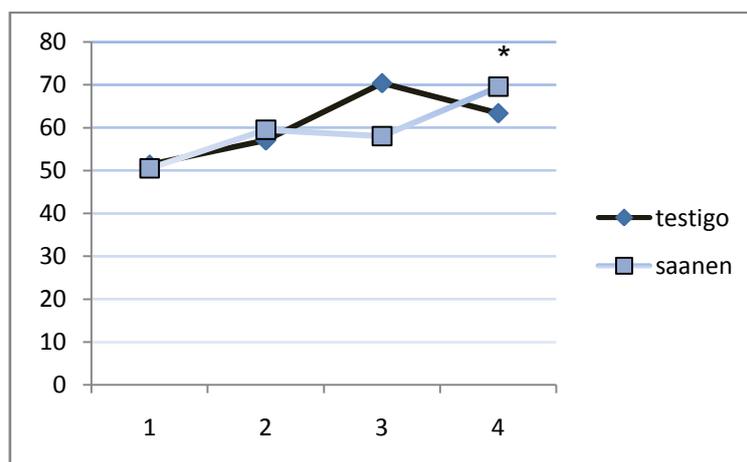
Raza	fecha 1	fecha 2	fecha 3	fecha 4
<b>Saanen</b>				
S1	43	41	33	19
S2	39	33	38	23
S3	41	35	28	29
S4	34	35	30	31
P	39.2a	36a	32,2a	25,5a
DE	3.8	3,4	4,3	5,5
<b>Criolla</b>				
C1	41	58	21	36
C2	52	48	27	37
C3	28	41	26	49
C4	46	55	41	35
P	41,7 a	50,5a	28,7a	39,2a
DE	10,2	7,5	8,5	6,5
<b>Toggenburg</b>				
T1	47	60	35	23
T2	21	40	33	41
T3	37	45	25	27
T4	55	57	38	43
P	40a	50,5a	32,7a	33,5a
DE	14,6	9,5	5,5	9,9
<b>Testigo</b>				
S5	37	24	16	21
C5	37	29	20	30
T5	51	59	30	32
P	41,6a	37,3a	22a	27,6 a
DE	8,0	18,9	7,2	5,8

(DE: desviación estándar, P: promedio, S1: saanen1, C1: criolla1, T1: toggenburg1, Letras diferentes en columnas P<0.05)



**Figura 7.-** Variación de los promedios de neutrófilos en todas las cabras sometidas a tratamiento (Letras diferentes  $P < 0.05$ ).

En el cuadro 6 se reportan los números totales de linfocitos que se obtuvieron en las cabras de cada raza en los distintos muestreos. Estos datos se estudiaron estadísticamente con análisis Mypstat, el cual nos arrojó que el tratamiento tuvo variación en la raza Saanen mientras que en la Toggenburg y Criollas se mantuvieron con niveles más bajos observándose en las figuras 8, 9 y 10.

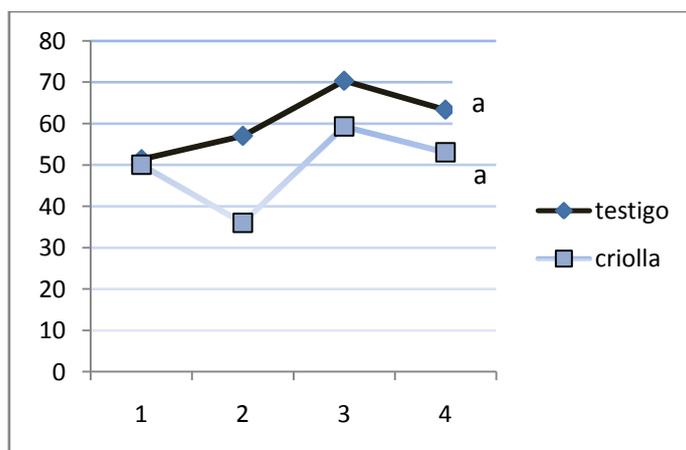


**Figura 8.-** Variación del total de linfocitos entre el tiempo 3-4 en la raza Saanen comparada con un grupo Testigo (\*  $P < 0.05$ )

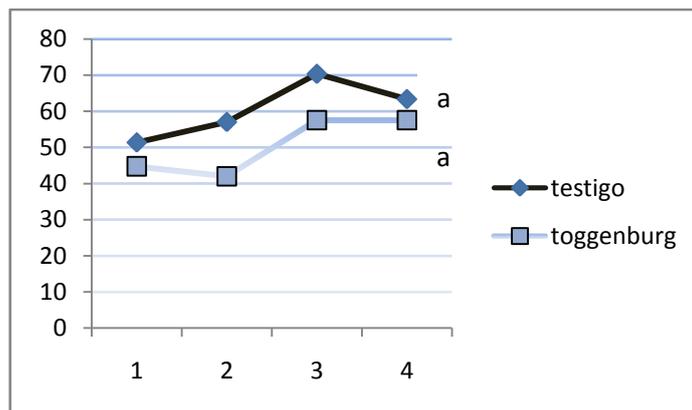
**Cuadro 6-** Cuenta total de linfocitos (%), en 3 razas y 4 fechas comparado con un grupo testigo.

Raza	fecha 1	fecha 2	fecha 3	fecha 4
<b>Saanen</b>				
S1	48	62	61	74
S2	51	60	48	70
S3	51	62	67	69
S4	52	54	56	65
P	50,5a	59,5a	58a	69,5a
DE	1,7	3,7	8,0	3,6
<b>Criolla</b>				
C1	53	34	73	60
C2	41	34	54	55
C3	63	50	67	42
C4	43	26	43	55
P	50a	36a	59,2a	53a
DE	10,1	10,06	13,4	7,7
<b>Toggenburg</b>				
T1	43	37	60	70
T2	43	50	55	47
T3	54	48	66	67
T4	39	33	49	46
P	44,7a	42a	57,5a	57,5a
DE	6,4	8,2	7,2	12,7
<b>Testigo</b>				
S5	51	72	74	71
C5	58	65	76	61
T5	45	34	61	58
P	51,3a	57a	70,3a	63,3a
DE	6,5	20,2	8,1	6,8

(DE: desviación estándar, P: promedio, S1: saanen1, C1: criolla1, T1: toggenburg1, Letras diferentes en columnas P<0.05)



**Figura 9.-**Variación del total de linfocitos entre el tiempo 3-4 en Criollas comparada con un grupo Testigo, (Letras diferentes P<0.05)



**Figura 10.-** Variación del total de linfocitos entre el tiempo 3-4 en raza Toggenburg comparada con un grupo Testigo, (Letras diferentes P<0.05)

## 10. DISCUSIÓN

La diferencia que se aprecia en el cuadro 2, figura 4 en el número total de eritrocitos en la fecha 2 es probable que se deba a un factor externo más que a causa del tratamiento.

A diferencia de lo anterior, en el número total de leucocitos si apreciamos un aumento como consecuencia del tratamiento (cuadro 3, figura 5,6) esto debido a la causa y mantenimiento de la inflamación provocada por el adyuvante en la inmunización, y el daño tisular inducido por la propia respuesta inmune, (Tizard, 2009) la cual puede derivar hacia soluciones no deseadas, como la infiltración tisular por agregados de linfocitos y leucocitos (granulomas); Cualquiera que sea la agresión local a un organismo este desencadena respuestas en tres niveles de la organización: celular, tisular y orgánico, en la respuesta tisular se acontece señales mejoradas desde el foco inflamatorio donde se reclutan leucocitos en el lugar de la lesión, en el proceso inflamatorio actúan las quimioquinas el cual juegan un papel fundamental en la inflamación por atraer y activar clases específicas de leucocitos, donde estas participan en tres de las cinco etapas de la cadena de adherencia leucocítica, en primer lugar favorece

al rodamiento lento y adherencia de los leucocitos, Segundo, son potentes quimioattractores que guían a los leucocitos hacia el foco inflamatorio; y por último, activan las funciones efectoras de los leucocitos; en la cascada de adhesión se concluye con la extravasación de los leucocitos; ello con la finalidad de que tales células ejerzan sus efectos en el foco inflamatorio, dicha cascada está compuesta por cinco etapas que son: captura, rodamiento lento, anclaje y migración cada una necesaria para el reclutamiento de los leucocitos donde como primer paso hay un marginación de leucocitos abandonando el eje de flujo donde existe una interacción con los eritrocitos ya que fluyen en el mismo vaso de tal manera que los eritrocitos empujan y desplazan a los leucocitos a una posición marginal y así comenzando el rodamiento hasta llegar al foco infamatorio y se adhieren.

En la cuenta total de leucocitos diferenciales las células que tienden a elevarse son los neutrofilos en el segundo tiempo y los linfocitos hasta el cuarto tiempo esto se explica durante el proceso inflamatorio donde la proteína HMGB1 (high mobility group box 1) cuando abandona su ubicación normal y alcanza el medio extracelular, bien pasivamente por ruptura celular o secretada por células inflamatorias activadas por citoquinas, actúa como un potente mediador inflamatorio con características citoquímicas y quimioquímicas, se localiza en los endotelios y los miocitos vasculares y en los fagocitos, entre otras células. Su actuación sobre estas células potencia el proceso inflamatorio: provoca disrupción de la pared vascular favoreciendo la extravasación de líquidos y de células intravasculares, los fagocitos profesionales, neutrofilos polimorfonucleares y células mononucleadas es aquí donde comienza su papel clave en la defensa del huésped contra un agente

extraño, las tripatasas derivadas del mastocito activan un receptor que pertenece a la clase GPCR (G protein-coupled receptor) que está presente en los mastocitos, terminaciones nerviosas libres sensitivas y neutrófilos, ello potencia la estimulación de los mastocitos y hace al endotelio adherente para los leucocitos, permeable al fluido intravascular y procoagulante e incita a los leucocitos a producir un factor activador plaquetario.

Los leucocitos neutrófilos, que han contactado con los endotelios a través del sistema de selectinas, son activados inicialmente por el TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) y los leucotrienos producidos por los mastocitos y por otros neutrófilos, lo que conduce a la liberación de pequeñas cantidades de elastasa desprendiendo la cubierta antiadhesiva de leucosialina (CD43) que recubre los neutrófilos, lo que permite que sus integrinas se expongan y completen la adhesión y extravasación leucocitaria al formar puentes estables con las proteínas de la matriz extracelular, el TNF (factor de necrosis tumoral) y las quimioquinas liberadas por los macrófagos y monocitos atraen y activan a los neutrófilos.

La cadena de señales comienza con la activación de mastocitos y neutrófilos y su activación mantenida condicional la activación de APC (células presentadoras de antígenos,) células T y células B en el proceso de transición durante el que la respuesta inflamatoria innata evoluciona a respuesta inmunológica adaptativa, lo cual la combinación de daño celular e infección mantiene la respuesta inflamatoria que provoca la aparición en escena de la inmunidad adaptativa, poco después de iniciarse los ciclos proinflamatorios se acciona una serie de frenos en las lipoxigenasas, el araquidonato liberado de los

neutrofilos sirve de sustrato para generar el proinflamatorioleucotrieno B4 y así actuar(Garcia, 2008) .

El aumento de los linfocitos alude a que existe un proceso de inflamación crónica con persistencia de semanas, con supuración y cubierto de tejido conectivo inmaduro conteniendo fibras colagenas y vasos sanguíneos de neoformacion, produciéndose fenómenos proliferativos y fibroblasticos con carácter más lento y alteraciones menos hemodinámicas, las células predominantes en este proceso son los linfocitos y macrófagos, se presentan después de que los neutrofilos ya no pueden eliminarlos.Linfocitos T y B. Potenciados por el macrófago inician la respuesta específica, las células B procedentes de los tejidos linfoides asociados a tejidos o mucosas sintetizan IgE, que unidas al mastocito o basófilo pueden potenciar la inflamación; por otra parte, las células T comienzan a producir linfoquinas que prolongan la inflamación en una respuesta inmune más elaborada, debe destacar el papel de las citocinas especialmente la IL-1 $\beta$  y la TNF $\alpha$  capaces de activar numerosas cascadas humorales de mediadores que perpetúan la activación del sistema,(Garcia, 2008)Los linfocitos T responden a los antígenos que leson presentados por las células de la serie monocito/macrófago (y otras células presentadoras de antígenos) en conjunción con los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (antígenos HLA), la especificidad de la respuesta se inicia en el receptor para el antígeno (TcR), y las moléculas sintetizadas, linfocinas o mediadores linfocitarios, por los linfocitos CD4-colaboradores, inducen la activación y diferenciación de otros linfocitos, especialmente las células citotóxicas (CD8), las células natural killer (NK) y los linfocitos B.

## 11. CONCLUSION

Los parámetros hematológicos en el transcurso de la inmunización de cabras sometidas a un antígeno con la finalidad de obtener sueros hiperinmunes si presentaron variaciones en las células blancas con prioridad de los neutrofilos y los linfocitos debido al proceso de inflamación natural durante la inmunización, por lo que respecta a las células rojas se obtuvo una variación pero no causada por el tratamiento si no ocasionada por factores externos; la complementación de este trabajo será la determinación de la cantidad de anticuerpos producidos durante el proceso.

## 12. LITERATURA CITADA

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, y J. S. Pober. 2002. Inmunología celular y molecular. 6a. ed. McGraw - Hill Interamericana
- Arce, M. A., T. A. G. Rosas, y T. L. E. Rodriguez. 2007. Practicas de inmunología general aplicada y veterinaria 1a ed. El Manuel Moderon.
- Berrio M, C. M., Jiménez ME. 2003. El hemograma: Análisis e interpretación con las tres generaciones. Medellín: Universidad de Antioquia: 138.
- Bradley, G. K., y J. G. Cunningham 2009. Fisiología veterinaria 4a ed. Elsevier
- Ceballos, A., y M. Andaur. 1998. Manual de procedimientos en patología clínica. Unidad de patología clínica. Escuela de Ciencias Veterinarias, : 24-36.
- Engelhardt, W. V., y G. Breves. 2002. Fisiología veterinaria 1a ed.
- Fox, S. I. 2008. Fisiología humana. 10 ed. Mac Graw Hill
- Gaona, C. A. 2003. Interpretación clínica de la biometría hemática Medicina Universitaria Nuevo Leon 5: 35.
- García, B. P. 2008. Inflamacion. Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Na 102: 91-159.
- García, D. A., R. S. Nicholls, A. Arévalo, O. Torres, y S. Duque. 2005. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales igr desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de giardia duodenalis. Biomédica: 451-463.
- Health, I. f. H. P. a. V. P. 2007. Code of practice for the immunisation of laboratory animals. 16.
- Lamb, J. F., C. G. Ingram, y I. A. Johnston. 1988. Fundamentos de fisiología 2a ed. ACRIBIA S.A, Zaragoza.
- Leenaars, M., y C. F. M. Hendriksen. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: Evaluation and recommendations. Ilar Journal 46: 269.

- Leenaars, P., C. F. M. Hendriksen, W. A. De Leeuw, F. Carat, P. Delahaut, R. Fischer, M. Halder, W. C. Hanly, J. Hartinger, y J. Hau. 1999. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. ATLA-NOTTINGHAM- 27: 79-102.
- Male, D., J. Brostoff, D. Roth, y I. Roitt. 2007. Inmunología 7a ed. Elsevier Mosby.
- Maxime, M. B. 1991. Manual de patología veterinaria 1a ed. Limusa Noriega
- Mayes, D. C., y M. P. Schute. 2007. Principios de fisiología animal 1a ed. Pearson Addison Wesley
- Miranda, C. A. R., A. R. Sánchez, A. W. Góngora, y P. O. Mulet. 2006. Obtención de sueros hiperinmunes de origen equino antitoxina tetánica, utilizando adyuvante oleoso. Centro de Inmunología y Biopreparados. Holguín.
- Montilla, F. J. R., M. V. Álvarez de M, E. E. Díaz, H. Saulo, y V. Urdaneta. 2007. Hiperinmunización de ovinos contra veneno de bothrops asper del estado de zulía, venezuela Revista Científica, FCV-LUZ Vol. XVII: 9.
- Ochoa, A. R. F. 2008. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Finlay 89.
- Robledo, G. B. V. 2009. Antígenos e inmunógenos. Rev Fac Med UNAM 52.
- Swenson, M. J., y W. O. Reece. 2007. Fisiología de los animales domésticos de duques 2a ed. Limusa
- Tanke, H. J., P. H. Rothbarth, J. Vossen, G. Koper, y J. S. Ploem. 1983. Flow cytometry of reticulocytes applied to clinical hematology. Blood 61: 1091-1097.
- Tizard, I. R. 2009. Introducción a la inmunología veterinaria 8ed.
- Tortora, G. J., y B. Derrickson. 2006. Principios de anatomía y fisiología 11a ed. Medica Panamericana
- Voigt, G. L. 2000. Conceptos y técnicas hematológicas para técnicos veterinarios Acribia S.A.