



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFEECTO DE LA ADICIÓN DE L-GLUTAMINA EN LA DIETA SOBRE EL SISTEMA INMUNE INTESTINAL DEL LECHÓN DESTETADO PRECOZMENTE

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :

HERNÁNDEZ GONZÁLEZ JUAN CARLOS

ASESORES:

MVZ, M. SC, Ph. D. ARTURO GERMÁN BORBOLLA SOSA
QFB, PH. D. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

2002.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE L-GLUTAMINA EN LA DIETA SOBRE EL
SISTEMA INMUNE INTESTINAL DEL LECHÓN DESTETADO
PRECOZMENTE**

**Tesis presentada ante la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

de la

**Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

por

Hernández González Juan Carlos

Asesores:

**MVZ, M. Sc, Ph. D. Arturo Germán Borbolla Sosa
QFB, Ph. D. Marco Antonio Vega López**

México, D.F.

2002.

DEDICATORIA

A **Dios** que me permitió la dicha de la vida, bajo la cobertura de su amor y la fuerza de su poder. En la angustia, dolor y enfermedad, ha sido mi roca fuerte y me ha dado fuerza cuando no tengo ninguna.

A mis padres: **Carlos Hernández González y Maria Isabel González Hernández.**

Por darme la vida, por su cariño, confianza, fe y apoyo total e incondicional. Por su ejemplo, sacrificio, enseñanza y por continuar con su ayuda. Toda mi admiración y respeto desde hoy y siempre porque a pesar de las limitaciones materiales de nuestra familia, me dieron la oportunidad de tener una carrera universitaria. Eternamente agradecido, iniciaré el vuelo con sus fuerzas y siempre estarán conmigo en mi vida profesional.

A mi hermana: **Nancy Hernández González.**

Por tu apoyo, fuerza y consejo. Escogimos el camino más largo y difícil pero con libertad, amor y dedicación, conociendo que fue la mejor decisión para nosotros y nuestra familia.

A mi amigo **MVZ Arnulfo Bautista Santos**, juntos logramos proponernos y alcanzar nuestras metas a pesar de la adversidad, la cual nos enseñó a ser pacientes y esforzarnos hasta el límite de nuestras fuerzas.

A mi amiga y compañera **MVZ Heidi Berenice Rangel Tovar**, por su bondad, confianza y apoyo. Por creer en mí y permitirme aprender juntos en las actividades de este proyecto y compartir la meta de titularnos.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su presencia en mi vida y permitirme seguir en el camino.

A mi asesor principal:

Dr. Germán Borbolla Sosa, quien me enseñó que el área de las Ciencias se debe conquistar con conocimiento, sabiduría y buenas decisiones. Por enseñarme ha ser paciente, y enfrentar las dificultades con valor y encontrar alternativas. Por su apoyo en la obtención de recursos económicos y las facilidades otorgadas en la realización de este proyecto.

A mi asesor:

Dr. Marco Antonio Vega López, por darme la oportunidad de trabajar con disciplina, por su confianza y extender mis expectativas aún bajo las dificultades que se enfrenta en la investigación. Por las facilidades otorgadas en el manejo y uso de equipo sofisticado de su laboratorio.

A los miembros del jurado:

MVZ. FRANCISCO CASTREJON PINEDA
MVZ. HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA
MVZ. JUAN MONTAÑO HIROSE
MVZ. MARCO A. HERRADORA LOZANO

Por sus comentarios y revisión para mejorar la presente investigación.

A la **MVZ. Roxana Mendoza Galicia**, por su asesoría en las muestras histológicas.

A mis amigos: **Sandra Bajaña Miranda** y **Claudia Solís Rivera** por su amistad y por gratos momentos en el área laboral y fuera de ella; **Gisela Sánchez Oaxaca**, **María Antonieta López López**, **Héctor Herrera Gutiérrez**. A **Heidi Berenice Rangel Tovar**, por permitirme trabajar y aprender a tu lado evitando la rutina y el cansancio.

A la Coordinación de Programas Académicos de la Secretaría General de la UNAM: Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación por el apoyo recibido.

CONTENIDO

	<u>PÁGINA</u>
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Efectos del destete.....	4
Efectos del destete en el intestino delgado.....	5
Ontogenia y desarrollo del sistema digestivo en el cerdo.....	6
Desarrollo del sistema inmune intestinal del cerdo.....	11
Glutamina, sistema digestivo e inmunológico.....	15
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivos	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
Localización.....	22
Animales.....	22
Tratamientos.....	23
Administración de L-glutamina.....	23
Sacrificio y toma de muestras.....	24
Inmunohistoquímica.....	24
Variables de respuesta.....	25
Diseño estadístico.....	26
RESULTADOS	27
Efecto de L-glutamina sobre parámetros productivos en diferentes periodos posdestete.....	27
Cambios en subpoblaciones linfocitarias a diferentes días posdestete.....	28
Efecto de la inclusión de L-glutamina en subpoblaciones linfocitarias (CD2 ⁺ y CD3 ⁺).....	29
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	37

PÁGINA

LITERATURA CITADA.....	38
CUADROS.....	54
FIGURAS.....	59
FOTOGRAFÍAS.....	71

RESUMEN

HERNÁNDEZ GONZÁLEZ JUAN CARLOS. Efecto de la adición de L-glutamina en la dieta sobre el sistema inmune intestinal del lechón destetado precozmente (bajo la dirección de: MVZ, M. Sc., Ph. D. Arturo Germán Borbolla Sosa y QFB, Ph. D. Marco Antonio Vega López).

La inclusión de L-glutamina (Gln) en la dieta de los lechones inmediatamente (2 d) antes del destete (14 d), ha prevenido la atrofia de vellosidades y la hiperplasia de las criptas comúnmente observadas en el periodo inmediato posterior a este.^{1,2} Estudios recientes sugieren que la Gln es la principal fuente energética para linfocitos y macrófagos³ al igual que para las células del epitelio intestinal.^{1,4} El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del aminoácido Gln suplementado en la dieta sobre subpoblaciones linfocitarias (CD2' y CD3') del intestino delgado en el cerdo recién destetado, utilizando 50 cerdos convencionales (Large White X Yorkshire) de 14±2 días de edad. Al inicio del experimento, 5 cerdos lactantes fueron sacrificados y utilizados como grupo testigo, el resto de los animales se dividieron en tres grupos de 15 cerdos, proporcionándoles un alimento preiniciador de tipo comercial (Nupig SEW, México) adicionado con Gln (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Tokio, Japón), a niveles de 0, 1 y 1.5% durante todo el periodo experimental. En los días 3, 7 y 14 postdestete (PD), cinco cerdos por tratamiento fueron sacrificados y se tomaron muestras de duodeno, yeyuno e ileon, las cuales fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos (7 µm) de las muestras para ser teñidas por inmunohistoquímica empleando anticuerpos monoclonales anti-cerdo CD2' (MAC80 Serotec, Inglaterra) y anti-humano CD3' (CD3-12 Serotec, Inglaterra). Dichas muestras fueron estudiadas con un analizador de imágenes asistido por computadora (Image Pro Plus V, Media Cybernetics, Inglaterra), registrando las células teñidas positivamente en el epitelio (EP), lámina propia de vellosidades (LP) y criptas (LP-CR) de 5 vellosidades y 5 regiones de criptas seleccionadas al azar por cada muestra de intestino. Los resultados se expresaron como frecuencia celular (células/mm) en el EP y densidad celular (células/mm²) para LP y LP-CR. El análisis estadístico se realizó empleando un diseño factorial 2x2 para evaluar las diferencias entre los grupos en tratamiento y la edad de los cerdos. Los resultados se analizaron por ANOVA con el procedimiento GLM y prueba de Tukey utilizando el programa SPSS versión 10. El efecto del destete a los tres días demostró un aumento inmediato de subpoblaciones linfocitarias CD2' y CD3', con mayor efecto en los grupos con el nivel más alto de Gln (1.5%) en la mayoría de las veces. En la LP del duodeno se registró un aumento en la densidad de CD2' con el grupo 1.5% durante todo el tiempo que duró el experimento. En este mismo grupo, la densidad de CD3' aumentó en los primeros 3 días PD, en tanto que en el yeyuno este incremento se registró con ambos marcadores en este tiempo. En el EP del yeyuno, el mayor nivel de Gln incluido ocasionó un aumento de CD3' y CD2' a partir del destete al día 7 PD para el primer marcador y hasta el final del experimento para el segundo caso. El efecto contrario se observó en LP-CR del yeyuno, debido a un aumento de células CD2' al día 7 PD y un continuo aumento de CD3' al día 14 PD. En LP-CR del ileon se presentó un importante aumento en la densidad de CD2' con el nivel más alto de Gln durante todo el tiempo del experimento. Lo contrario se observó con el marcador CD3' donde se registró un importante descenso en la densidad celular desde el momento del destete, sin ningún cambio originado por la adición del aminoácido. Los resultados del presente experimento sugieren que la Gln posee un importante papel, promoviendo un cambio numéricamente positivo en subpoblaciones celulares CD2' y CD3' a partir del destete, sustentando con mayor eficacia la estimulación de estas células a los cambios intrínsecos y ambientales que rodean al lechón, en un periodo donde éste es inmunológicamente

inmaduro, coincidiendo con el tiempo en que la suplementación de Gln en la leche materna desaparece.

ABSTRACT

The inclusion of glutamine (Gln) in piglet's diet immediately before weaning (<21 d), has proved to prevent the villi atrophy and crypts hyperplasia commonly observed immediately after weaning^{1,2}. Recent studies also suggest that Gln is the main energy source for lymphocytes and macrophages³. The aim of the present study was to assess the effect of Gln supplemented diets on the small intestinal immune cells from early-weaned pigs. Five unweaned (UW) conventional piglets (Large White X Yorkshire) were slaughtered at 14±2 d of age and used as controls. Forty-five pigs were weaned at this time and randomly allocated into 3 treatment groups. Pigs were fed with a specific prestarter diet (Nupig SEW, Mexico) plus Gln (Kyowa Hakkō Kogyo Co., Ltd. Tokyo, Japan) at 0, 1 and 1.5% per treatment group during the whole experiment. Five piglets from each treatment were slaughtered at 3, 7 and 14 days after weaning (AW). Snap frozen tissue samples of duodenum, jejunum and ileum were taken and histological sections (7 µm) were prepared and stained by immunohistochemistry using a monoclonal rat anti-porcine CD2⁺ antibody (MAC80 SEROTEC, United Kingdom) and anti-human CD3⁺ (CD3-12 Serotec, United Kingdom). The positively stained cells at the epithelium (EP) and the lamina propria (LP) of five randomly chosen villi and crypt's regions (LP-CR) from each sample were counted using a computer assisted image analyzer (Image Pro Plus V, Media Cybernetics). The results are given as frequency (cells/mm) in EP and density (cells/mm²) in LP and LP-CR. A factorial design to evaluate the differences between treatment groups and piglet's age was carried out. ANOVA and Tukey' test were run with the SPSS software version 10.0 using a General Linear Model multifactorial analysis. The postweaning effect at 3 days showed an immediately increase of CD2⁺ and CD3⁺ cells with higher increase in the 1.5% Gln group in most of the times tested. In duodenum LP, CD2⁺ cells density increased in the 1.5% Gln group during whole experiment. In the same group, the CD3⁺ cells density increased in the first three days postweaning, besides in jejunum both subpopulations cells increased at this time. In jejunum EP, CD3⁺ and CD2⁺ cells frequency increased in the 1.5% Gln group from weaning to 7th day postweaning in the first marker and until the end of the experiment in the second case. In jejunum LP-CR, CD2⁺ cells density increased at 7th day postweaning and CD3⁺ cells followed increased since this day until 14 day after weaning. In ileum a high increase of CD2⁺ cells density in 1.5% Gln group during whole experiment could be observed. In the other hand, CD3⁺ lymphocytes showed a continue decrease after weaning without effect of Gln treatment. These data suggest that Gln diet supplementation in the postweaning period (<21 days), could increase the density and frequency of CD2⁺ and CD3⁺ cells in the small intestine. This may contribute to prove its important role in both energy metabolism and replication of immune cells, in a period where the piglet's immune system is still immature and at a time when the supply of maternal Gln disappears.

INTRODUCCIÓN

En América del Norte, la continua intensificación en la producción porcina moderna, ha obligado a optimizar la utilización de los recursos y asegurar la rentabilidad de las granjas.⁵ En este sentido, los principales parámetros que repercuten en la estabilidad económica de estas explotaciones son la fecundidad de las cerdas así como el número de cerdos producidos por hembra al año.^{6,7} Con respecto a este último, desde principios de los 80's la industria altamente tecnificada adoptó el destete antes de los 21 días de edad (destete precoz), ya que se descubrió que en principio esta separación reducía la transmisión de agentes infecciosos de la hembra al lechón.^{8,9,10} Además aumentó el número de cerdos por hembra al año de manera importante,^{11,12} se optimizó el uso de las instalaciones¹³ y se logró un estado sanitario más riguroso en los lechones, lo cual mejoró los parámetros productivos.^{14,15}

El destete precoz, por otra parte como práctica de manejo, fue implementado por su incremento en el potencial genético de crecimiento, ya que aumentaban las tasas de desarrollo respecto a lo observado en los cerdos que permanecían con la cerda por periodos mayores a 21 días.¹⁶ Este menor crecimiento en cerdos con periodos de lactancia prolongados se debe a que la composición de la leche materna está constituida con un bajo contenido de materia seca (18.90%),¹⁷ la cual se divide en un 35% de grasa, 32% de lactosa y 29% de proteína.¹⁸ De esta forma, desde los primeros trabajos de Hodge (1974), se lograron registrar ganancias de peso de 500 g/día en cerdos destetados de 3-4 días de edad en granjas con mínimos agentes patógenos, comparados con aquellos que permanecieron con la cerda y que tuvieron tasas de crecimiento de 200 g/día.¹⁹ En un trabajo más reciente, Dritz (1996) demostró, empleando el método del destete temprano segregado (aislamiento de los cerdos en un lugar alejado de las naves), que cerdos separados de los 7 a 10 días, mantenían un peso promedio de 23.5 kg a los 50 días posdestete, en contraste con cerdos destetados a los 14 a 17 días en los que se registró un peso promedio de 12.5 kg. Además este estudio mostró que en los lechones del primer grupo se evitaba la transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae*, una muy baja incidencia de *Pasteurella multocida*, y en ambos grupos destetados a diferentes días, no se detectó la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En este experimento no se emplearon antibióticos, lo cual confirma que los programas de destete precoz segregado

son eficientes en evitar la transmisión de la gran mayoría de enfermedades bacterianas transmitidas verticalmente.¹⁵

Efectos del destete

En el periodo inmediatamente posterior al destete, el cerdo atraviesa por un estado de estrés, en el que se ven involucrados diversos factores, entre los que se encuentran cambios ambientales adversos (calidad del aire y nivel de temperatura), que afectan el metabolismo y ocasionan un rápido desgaste de tejido de aislamiento térmico,^{20,21} el establecimiento de la organización jerárquica entre camadas provoca peleas entre los animales,^{22, 23, 24} y el cambio abrupto de la leche materna a un alimento sólido, de consistencia y sabor diferente, contribuye a una menor aceptación por parte del lechón,^{25,26} el cual posee un nivel inadecuado de enzimas digestivas y una insuficiente habilidad en la secreción ácida gástrica.²⁷ Además, diversos autores han demostrado que en el cerdo, el estrés posdestete induce importantes reacciones inmunológicas.^{24,28,29,30} En este sentido, Puppe *et al*³¹ han observado que durante esta etapa, la relación neutrófilos/linfocitos en sangre periférica se ve alterada por el aumento en los niveles de cortisol plasmático, presentándose un incremento de neutrófilos y una disminución de linfocitos a partir del día uno posdestete. Similarmente, Watrang *et al*,²⁸ observaron aumento de Interferón- α y polimorfonucleares en suero como respuesta a la infección subclínica viral y bacteriana respectivamente, además de una disminución de Interleucina-2 (IL-2) tanto en animales convencionales como en SPF (libres de patógenos específicos). Blecha *et al*²⁹ y González *et al*,³⁰ utilizando la respuesta intradérmica a la fitohemaglutinina, demostraron que la inmunidad celular disminuye al destete, siendo esto más evidente cuando se reduce la edad de los animales. Vega *et al*³² observaron un drástico incremento de linfocitos CD2⁺, macrófagos y granulocitos en la lámina propia de las vellosidades del intestino delgado, un aumento de linfocitos CD2⁺ en criptas, así como una disminución de IL-2 en la región proximal del intestino delgado en el recién destetado, lo que sugiere una respuesta mediada por citocinas conforme el sistema inmune se ve confrontado a antígenos de origen alimentario o microbiano.^{33,34,35}

Estos elementos en conjunto contribuyen a la baja capacidad inmunológica del cerdo recién destetado y juegan un papel en la reducción del consumo de alimento sólido,^{20,26,28} aumento en el gasto de energía,³¹ la presencia de diarrea^{20,33} y el subsecuente retraso en el crecimiento,^{26,29} observados durante las etapas posteriores a la separación materna.

Efectos del destete en el intestino delgado

En el periodo posdestete, el intestino delgado sufre dramáticas alteraciones en su estructura y función, representadas por la atrofia de vellosidades e hiperplasia de las criptas,^{33,36,37,38} lo que causa una disminución temporal de las funciones de digestión y absorción.^{38,39} Diversos autores han demostrado que estos cambios están influenciados principalmente por factores nutricionales^{27,37,38,40,41} e inmunológicos (procesos de activación celular y estimulación antigénica de origen microbiano o alimenticio),^{36,40} los cuales se encuentran interrelacionados y estimulan respuestas intestinales de tipo inflamatorio que provocan diarreas,^{37,41} con la consecuente pérdida de peso. En este sentido, se ha observado que el cerdo recién destetado pasa por un periodo de hipersensibilidad a constituyentes antigénicos del alimento, hasta desarrollar tolerancia al mismo,^{40,33, 34,37} como es el caso de la glicina o β -conglucimina presente en el endospermo de la soya.^{40,38} En el proceso digestivo, la disminuida habilidad en la secreción de ácido clorhídrico disminuye la acción de pepsinógenos, lo que afecta la digestión de proteínas y favorece la entrada de microorganismos viables al interior del intestino delgado.^{42,43} La disminución en la actividad enzimática digestiva y del número de enterocitos que recubren la mucosa intestinal, exponen a dicho órgano a la invasión por parte de cepas enteropatógenas,^{44,45} rompiendo la actividad inespecífica de la barrera del epitelio intestinal y al mismo tiempo, estimulan la liberación de citocinas (Interleucina 1, 6 y 8, factor de necrosis tumoral α , e Interferones tipo 1 (α/β)) que afectan el apetito y metabolismo,⁴⁶ además de dañar directamente la superficie de los enterocitos.⁴⁷

Ontogenia y desarrollo del sistema digestivo en el cerdo

El cerdo es una de las especies que presentan un sistema digestivo inmaduro al nacimiento, por lo que para adaptarlos a las prácticas modernas de manejo, logrando su bienestar y un rápido crecimiento, se han generado profundas investigaciones para conocer los cambios en el desarrollo del tracto gastrointestinal (TG) durante el periodo crítico prenatal y en el periodo inmediato después del nacimiento.

En la etapa fetal del cerdo es posible detectar actividad en la secreción ácida gástrica,⁴⁸ ésta es mínima y se incrementa hasta unas semanas después del nacimiento.^{49,50} Las proteasas cimógenas son producidas por las células principales de la mucosa fúndica y su activación en el lumen gástrico es estimulado por un medio ambiente ácido (pH 2-4).⁵¹ En cerdos recién nacidos que no han lactado, el fluido gástrico presenta un pH de 2-4, lo cual indica un medio favorable para la activación enzimática de proteasas. En el cerdo neonato la principal proteasa cimógena es la quimiosina (renina), la cual empieza a secretarse, aunque en baja concentración, a partir de las últimas 3 semanas prenatales; después del nacimiento, esta enzima es gradualmente reemplazada por la pepsina y otras enzimas proteolíticas, aunque es posible encontrarla 6-7 semanas después del nacimiento del animal.⁵²

El intestino del cerdo registra un rápido crecimiento en las 3 semanas previas al parto, incrementando su peso en un 70 a 80% comparado con el resto del organismo.⁵² La proliferación celular es lenta en el feto y se ha observado que son necesarios más de 20 días para renovar en su totalidad los enterocitos que recubren a las vellosidades,⁵³ en contraste al corto periodo que tarda en repararse el intestino en el adulto, el cual dura de 2-3 días y de 6 a 7 días en el cerdo recién nacido.⁵⁴ En el lumen del intestino, la hidrólisis de substratos es mínima⁵⁵ y la mayoría de los procesos digestivos son intracelulares en los enterocitos inmaduros (vacuolados);^{56,57} sin embargo, el desarrollo de hidrolasas en el borde de cepillo de las microvellosidades se presenta desde la etapa prenatal. Entre las hidrolasas más importantes se encuentran la lactasa y peptidasa que alcanzan niveles importantes en las semanas previas al parto.^{58,59} La actividad de lactasa en la vida postnatal se incrementa drásticamente desde las primeras 24 horas de vida, preparando al sistema digestivo a cualquier aumento en la ingesta láctea.⁶⁰ La actividad de lactasa en las vesículas de la membrana de cepillo del intestino delgado de

los recién nacidos por ejemplo, es capaz de digerir 1.7 g de lactosa en 1 hora, excediendo los 0.34 g de lactosa en los 10 g de calostro que consume el recién nacido.⁶¹ La detección de maltasa y sacarosa al nacimiento, aunque en baja actividad, sugiere que el cerdo está provisto con una capacidad limitada para procesar fuentes alternativas de carbohidratos.⁶² Esta característica constituye un importante mecanismo de adaptación que permite que los neonatos digieran alimentos diferentes a la leche materna y sean destetados a una edad temprana.⁶³

La capacidad de absorción de nutrientes en el intestino se ha evaluado por el paso de monosacáridos, como la glucosa y aminoácidos, incluyendo la lisina.⁶⁴ La glucosa ha registrado una absorción de forma importante en las últimas semanas de la gestación, en tanto que la absorción de aminoácidos, incluyendo la lisina, permanece sin cambio en este periodo.⁶⁵ En la etapa neonatal se presenta una dramática disminución en la absorción de glucosa y aminoácidos que pueden estar asociados con cambios inducidos por el calostro en la membrana de las microvellosidades.⁶⁰ El paso de macromoléculas al parecer por endocitosis, a través del intestino está presente en útero en las últimas 2 semanas de gestación, pero es marcadamente menor en el feto que en el neonato.⁶⁶ En las primeras 24 horas después del nacimiento, el intestino delgado presenta un aumento en la capacidad de absorción de macromoléculas, con el objetivo principal de permitir que inmunoglobulinas del calostro penetren íntegramente del epitelio de la mucosa hacia el torrente sanguíneo, pasado este tiempo se presenta el fenómeno llamado "cierre intestinal", momento en el que se ve restringido el paso de moléculas mayores a 60 kilodaltones.^{67,68}

En el crecimiento fetal del cerdo, el rápido desarrollo del TG observado desde semanas antes del nacimiento es influenciado por factores hormonales y luminales.^{60,69} Sin embargo, la estimulación luminal es poco importante en el feto y cobra importancia en el neonato. Entre las hormonas reguladoras del desarrollo del TG durante esta etapa, el cortisol juega un papel esencial. La función adrenocortical incrementa al término de la gestación y se presentan niveles altos de glucocorticoides en sangre periférica del feto,^{69,70} que influyen profundamente en el estímulo de la secreción ácida gástrica, la presencia de gastrina en plasma, la concentración de quimiosina y pepsina A en el estómago y amilasa en el páncreas.^{48,50} Después del nacimiento, un nivel elevado de

glucocorticoides tiene poco efecto sobre la estimulación ácida gástrica y de gastrina, lo cual sugiere que las células parietales no responden al cortisol una vez que la secreción ácida ha sido iniciada.⁵⁰ En las primeras cinco semanas de vida postnatal, la secreción de glucocorticoides continúa induciendo pequeños incrementos en la actividad de algunas hidrolasas, aunque estos efectos parecen tener poca importancia fisiológica debido a que su concentración en el torrente sanguíneo normalmente disminuye durante este periodo.⁷¹ Además, al final de la gestación y en los primeros días de vida postnatal se ha observado que el índice de proliferación celular se duplica en el área de las criptas y en el porcentaje de migración de enterocitos a lo largo de la vellosidad. Sin embargo, este incremento en la proliferación celular no indica un mejor crecimiento epitelial debido a que no existe ningún cambio positivo en la altura de las vellosidades o profundidad de las criptas.⁷² En la región proximal del intestino la producción de nuevas vellosidades disminuye significativamente, y como consecuencia, se presenta un aumento en el número total de células por vellosidad. La vellosidad llega a ser más ancha y acomoda más células, pero se presenta una reducción en la densidad por unidad de área de la superficie mucosal.⁷²

El elevado desarrollo en la actividad de la lactasa y aminopeptidasa en la etapa prenatal del cerdo, en parte, parece estar regulada por el cortisol.⁵⁹ La literatura indica que en animales domésticos, el cortisol estimula (más que inhibe), el transporte de macromoléculas a través del intestino delgado, debido a que se ha observado que lechones recién nacidos con elevadas concentraciones de cortisol, por ejemplo cerdos prematuros, o con retraso del crecimiento, poseen una elevada capacidad para absorber macromoléculas, en contraste con cerdos nacidos por cesárea o de talla uniforme.^{66,73}

Entre los factores lumbales importantes en el desarrollo del feto, se ha observado que la ingestión del fluido amniótico permite mantener y estimular el desarrollo mucosal durante el periodo perinatal^{74,75} y estimula la actividad de aminopeptidasa, aunque este efecto sólo se presenta en la región distal del intestino delgado.⁷⁸ La falta de ingestión de líquido amniótico en el feto ocasiona un diámetro intestinal disminuido y en el caso particular del cerdo se presenta retardo en el crecimiento al final de la etapa fetal.^{75,76,77} El calostro se suma a los factores lumbales como otro potente regulador en el desarrollo del TGI del neonato, ya que entre otras funciones permite el aumento en los niveles de

gastrina en plasma,^{79,80} mejora la actividad de pinocitosis de la mucosa intestinal⁶⁸ y promueve la maduración de las células parietales.⁸⁰ Zhang et al, demostraron que en las primeras seis horas de lactancia se incrementaba el crecimiento en todas las regiones del intestino delgado, ya que en el cerdo y en otras especies, el calostro ha demostrado acelerar la proliferación y maduración de los enterocitos.⁸¹ Estudios en fetos y cerdos neonatales indican que el calostro juega un papel más importante en la inducción del "cierre intestinal" para el transporte de moléculas, comparado con factores endocrinos como los glucocorticoides.^{68,82} La naturaleza de los componentes nutricionales o factores reguladores en el calostro que causan los cambios estructurales y funcionales del TGI, están aún en investigación, por sus probables aplicaciones en la medicina. Algunos de estos se describen a continuación.

El calostro lo constituyen inmunoglobulinas, péptidos antimicrobianos y factores de crecimiento.^{83,84} Las proteínas más abundantes en el calostro son la IgG y la β -lactoglobulina, las cuales pasan por endocitosis a través del lumen intestinal.^{85,86} Diversos constituyentes no peptídicos del calostro, cuando son adicionados a las células *in vitro* o cuando son infundidos en modelos animales, han resultado en una proliferación celular incrementada. Estos factores incluyen a la glutamina, poliaminas y nucleótidos.^{83,87} La glutamina ha sido referida frecuentemente como el sustrato preferido por las células del intestino^{1,88,89,90} (para más detalles de este aminoácido, ir a la sección: Glutamina, sistema digestivo e inmunológico). Estos factores juegan un importante papel para mantener la integridad mucosal del TGI y modular el sistema inmune mediante múltiples mecanismos, por ejemplo, alterando la flora intestinal e influyendo de manera importante en la acción de factores de crecimiento.^{87,91} En este sentido, se han logrado identificar concentraciones importantes de hormonas en calostro y leche. Algunas de estas hormonas probablemente influyan por su presencia en plasma sobre la maduración de varios órganos en los neonatos lactantes.^{92,93} Entre ellas se encuentran las que forman parte del sistema hipotalámico hipofisiario (la leche contiene prolactina, somatostatina, oxitocina y hormona liberadora de la hormona luteinizante), de la glándula tiroidea (la leche presenta la hormona estimulante de la tiroidea, tiroxina y calcitonina), glándulas sexuales (debido a que la leche contiene estrógenos y progesterona), así como glándulas adrenales y pancreáticas.^{83,94} Estas hormonas

parecen influir muy poco en el adulto debido a la baja permeabilidad del intestino en esta etapa, lo cual restringe el paso de la mayoría de estos factores.⁸³ Otro componente importante en el calostro y la leche es la presencia de citocinas.⁹⁵

Los factores de crecimiento peptídicos en la leche y el calostro influyen en los procesos establecidos entre la producción, la migración y pérdida celular (incluyendo la apoptosis), estableciéndose un equilibrio en el tejido intestinal.^{96,97} Entre los principales factores se encuentra un grupo de polipéptidos que constituyen un grupo de moléculas que tienen alta afinidad por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (FCE) (también llamado receptor c-erb B1), las cuales incluyen al mismo FCE, factor de necrosis tumoral- α , factor II de crecimiento derivado de la glándula mamaria y factor II de crecimiento identificado en la leche de humanos.⁹⁶ El FCE es un péptido de 53 aminoácidos producido por las glándulas salivales y las glándulas de Brunner del duodeno en el adulto; está presente en el calostro (200 $\mu\text{g/L}$) de los humanos y la leche (30-50 $\mu\text{g/L}$), así como en otras especies, incluyendo al cerdo.⁹⁷ Una vez que el FCE entra al intestino, éste es susceptible a la digestión proteolítica bajo condiciones de ayuno, pero es preservado en la presencia de proteínas ingeridas del alimento.⁹⁸ Al parecer, el FCE estimula al receptor que se encuentra únicamente en la membrana basolateral de los enterocitos y no al de la superficie apical (luminal).⁹⁹ Contrariamente, estudios autoradiográficos han mostrado que el receptor del FCE se encuentra identificado en la porción apical en el intestino del cerdo.¹⁰⁰ La presencia del FCE en la leche y el calostro puede jugar un papel importante para prevenir la traslocación bacteriana y estimular el crecimiento intestinal en neonatos lactantes.¹⁰¹

Otro elemento, el factor de crecimiento transformante- α (FCT- α) es una molécula constituida por 50 aminoácidos y está presente en el calostro y leche en menor concentración (2.2-7.2 $\mu\text{g/L}$) que el FCE.¹⁰² Es producido dentro de la mucosa del TGI.¹⁰³ Su administración sistémica estimula el crecimiento gastrointestinal, inhibe la secreción ácida, restituye la integridad mucosal después de alguna lesión e incrementa la secreción de mucina gástrica.⁹⁶ La mayoría de los estudios sugieren que la función fisiológica principal del FCT- α es actuar como un péptido de integridad mucosal y mantener la función normal epitelial en la mucosa no dañada.¹⁰⁴ El factor de crecimiento transformante- β se encuentra presente en una alta concentración en la leche

(1-2 mg/L) y calostro (20-40 mg/L) del bovino (se desconoce su presencia en otras especies).¹⁰⁵ Es un componente clave para mantener la integridad gastrointestinal en neonatos lactantes, un potente quimiotáctico para neutrófilos y estimula la migración de células epiteliales a sitios lesionados.¹⁰⁶ Las somatomedinas (factores de crecimiento parecidos a la insulina (FCI-I y FCI-II)) promueven la proliferación y diferenciación celular.¹⁰⁷ El hígado es el órgano de mayor síntesis de éstas y su estructura es similar a la proinsulina.¹⁰⁸ En el estómago e intestino delgado del feto humano se ha detectado una alta concentración de somatomedinas, alcanzando una máxima expresión poco después del nacimiento.¹⁰⁹ El FCI-I promueve la síntesis de proteínas, es decir, es un agente anabólico y es particularmente responsable por mediar la actividad de la hormona del crecimiento.¹¹⁰ El FCI-II está presente en la leche y el calostro del bovino en una menor concentración que el FCI-I, pero al igual que éste, posee actividad anabólica y ha mostrado reducir el estado catabólico en animales que sufren de inanición.¹¹¹ Otro componente importante es la lactoferrina, la cual es una glucoproteína unida al hierro.¹¹² Entre sus principales funciones se encuentra el facilitar la absorción de hierro, actuando además como un agente antimicrobiano.^{113,114} Estudios *in vitro* han demostrado que estimula además el crecimiento de varias líneas celulares, incluyendo fibroblastos y células epiteliales intestinales.¹¹⁵ En la actualidad, se realizan pruebas clínicas con el uso de estos factores de crecimiento presentes en el calostro y leche en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.¹¹⁶ Las investigaciones sobre este tema aún se encuentran en etapa experimental, en donde los modelos animales son de vital importancia, especialmente el cerdo, debido a su gran parecido filogenético con el ser humano.

Desarrollo del sistema inmune intestinal del cerdo.

En la etapa fetal del cerdo, como en otras especies de mamíferos, la actividad hematopoyética ocurre en tres fases de diferente localización anatómica. Las células progenitoras pluripotenciales primero colonizan el saco vitelino, posteriormente migran al hígado fetal y finalmente se presentan en la médula ósea.¹¹⁷ En el cerdo la actividad hematopoyética en el saco vitelino inicia el día 16 de gestación, al día 18 de este periodo, aproximadamente 3 millones de células progenitoras y 10 millones de células

eritroides han sido localizadas en este sitio. Alrededor del día 22, las células expresan el antígeno común de leucocitos CD45 y se han detectado macrófagos y granulocitos, reconocidos por el marcador de superficie celular SWC3.^{118,119} Cuando finalmente las células progenitoras se establecen en la médula ósea, una parte de éstas migran al timo, donde ocurre el desarrollo y maduración de linfocitos T. Estas células aparecen en el timo el día 28 de gestación.

En los primeros estados de la vida intrauterina se han detectado células productoras de inmunoglobulinas en el hígado y bazo, responsables de la inmunidad humoral. El día 44 de gestación las primeras células IgM secretora (isotipo dirigido a mucosas en la etapa fetal) se han detectado en el hígado.¹¹⁸ En el suero de cerdos recién nacidos que no han ingerido calostro se ha observado, mediante técnicas de ELISA (prueba inmunoabsorbente unida a enzima), la producción de IgM e IgG en baja cantidad (μg).¹²⁰

Al nacimiento, el cerdo se caracteriza por una ausencia de inmunidad pasiva, debido a que la placentación epiteliocorial no permite el paso de anticuerpos maternos durante la gestación.¹²¹ Durante esta etapa el recién nacido requiere del calostro y la leche materna en tiempo suficiente para desarrollar sus propias defensas.¹²² Después de unos días del nacimiento, las IgG del calostro son transportadas a través del intestino al torrente sanguíneo.¹²⁰ Al final de la formación del calostro y el inicio de la lactancia, la concentración de IgG disminuye rápidamente, presentándose un cambio a IgA como la inmunoglobulina principal en la leche de la cerda.¹²³ Este mecanismo es debido a que el recién nacido deberá enfrentarse a agentes patógenos que comúnmente invadirán las superficies mucosas, lugar donde la IgG es rara vez encontrada y poco eficiente.¹²⁴ Por otra parte, la variedad de anticuerpos maternos del calostro contra diferentes antígenos en el recién nacido se ve restringida a aquellos a los que la cerda ha desarrollado memoria por linfocitos B, es decir, que el lechón sólo estará protegido contra aquellos antígenos a los que la cerda ha desarrollado inmunidad previamente.¹²⁵

En la vida postnatal del neonato, la colonización de la microflora normal en las mucosas es crucial para la síntesis de inmunoglobulinas, la activación local de linfocitos y su migración a sitios distantes del sistema de mucosas.¹¹⁷

El TGI durante la etapa neonatal juega un papel esencial en el desarrollo y activación de la inmunidad celular y humoral a nivel de las mucosas. El epitelio intestinal por su amplia superficie de contacto con el medio ambiente externo, funciona como una barrera mecánica al vasto número de antígenos que pasan continuamente por el tracto digestivo. Anatómicamente, el sistema inmune intestinal presenta compartimentos linfoides organizados y difusos. En el primer caso, el tejido representativo es el Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (GALT, por sus siglas en inglés). El tejido linfoide difuso de la mucosa intestinal está representado en la lámina propia, la cual comprende el área localizada bajo la monocapa del epitelio intestinal, que contiene una numerosa y difusa población de macrófagos, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas, eosinófilos y otros granulocitos, así como fibroblastos fisiológicamente activos (Fig 1).¹²⁶

En contraste con los roedores, todos los compartimentos del intestino delgado en el cerdo contienen células linfoides al nacimiento.¹²¹ En el cerdo recién nacido, aunque se presenta un bajo número de macrófagos en la lámina propia intestinal, éstos llegan a ser el tipo predominante como células presentadoras de antígeno (CPA), distribuyéndose en igual número tanto en las vellosidades como en las criptas. Inmediatamente después del nacimiento, estas células se incrementan acumulándose preferentemente en la lámina propia de las criptas hasta alcanzar una densidad comparada a la del adulto a las 5 semanas de edad.¹²⁸ Además, las células dendríticas y células del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) también se incrementan durante este periodo, sin embargo se concentran en la lámina propia de las vellosidades en mayor proporción que en las criptas. Los granulocitos se encuentran presentes en la lámina propia de las criptas al nacimiento. Después del destete, se incrementan y se presentan en la lámina propia de las vellosidades, donde se ha postulado que están involucradas en la defensa local inespecífica.¹²⁹ Por otra parte, los linfocitos T presentes en la lámina propia del recién nacido carecen de los marcadores CD4⁺ y CD8⁺, que identifican a los linfocitos T cooperadores y citotóxicos respectivamente. Los linfocitos presentes en este momento sólo presentan el fenotipo CD2⁺CD4⁻CD8⁻, con mayor presencia en el epitelio. En la primera semana de vida neonatal ocurre un incremento de linfocitos T CD2⁺ y la

aparición de linfocitos CD4⁺ en la lámina propia, lo cual indica una rápida inducción de la respuesta inmune.¹²⁹

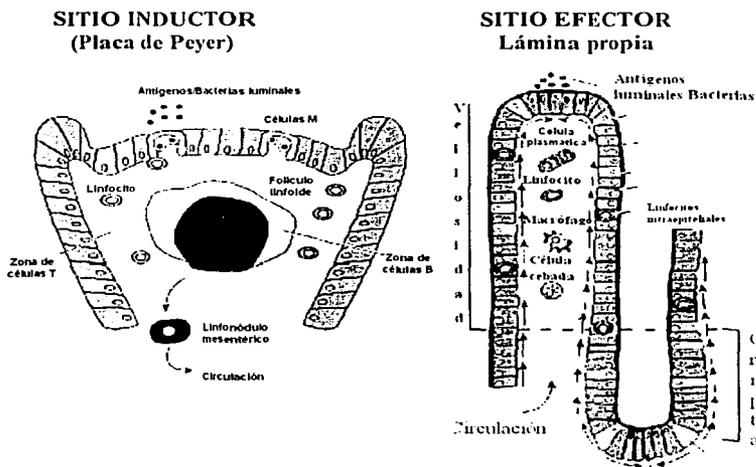


Figura 1. El ecosistema gastrointestinal consiste de una población de células progenitoras epiteliales que se renuevan rápidamente y que se diferencian a múltiples tipos de células epiteliales intestinales (células globo, enteroendócrinas, enterocitos, células Paneth y células M). Estas células epiteliales sirven como una barrera entre el contenido luminal (antígenos del alimento y flora normal) y el complejo del sistema inmune mucosal. Este sistema puede ser dividido funcional y físicamente en un sitio inductor (Placas de Peyer) y un sitio efector (lámina propia). Los antígenos son capturados por las células M localizadas en la lámina externa de las Placas de Peyer, dirigiendo a la activación de linfocitos específicos hacia el antígeno. Estos linfocitos activados subsecuentemente migran a los linfonodos mesentéricos y eventualmente entran a la circulación por el ducto torácico. La migración de células efectoras expresan receptores "homing" específicos de mucosas que promueven que los linfocitos entren a sitios efectoras intestinales como la lámina propia. Tomado de: Cellular Microbiology 2001; 3: 1-11.¹²⁷

Cuando se ha realizado el conteo de células CD2⁺, se ha registrado un cambio importante el día 1 de nacimiento con una densidad de 100 células/mm² a 1500/mm² al día 40, concentrándose en mayor proporción en las vellosidades que en las criptas en el cerdo adulto, lo cual indica una fuerte estimulación antigénica para el desarrollo de subpoblaciones linfocitarias maduras.¹³⁰ El número de linfocitos T con el marcador CD8⁺ son bajos al nacimiento e incrementan moderadamente de la 5^a a la 7^a semana de

edad. En el adulto estas células predominan en la lámina propia, cerca de la membrana basal, así como en el torrente sanguíneo, en tanto que las células $CD4^+$ se localizan en el centro de la lámina propia de la vellosidad.¹³¹

Los linfocitos también se encuentran entre las células epiteliales de las vellosidades.¹³² En humanos y roedores se han identificado como linfocitos T, de los cuales la mayoría son $CD8^+$ en el adulto y expresan la forma α/β del receptor de células T. Sin embargo, recientemente se ha observado que estos linfocitos intraepiteliales (LIEs) también presentan la forma γ/δ del receptor de células T.¹³³ En el cerdo estas células aparecen en la etapa neonatal, siendo en la mayoría de los casos $CD2^+CD4^+CD8^-$ y al parecer sólo se incrementan por la estimulación antigénica.¹³⁰ El día 1 de nacido se ha observado una frecuencia de 2.6 ± 0.36 LIEs/100 enterocitos, la cual se incrementa a 30.0 ± 3.49 a los dos meses.¹³⁴ En este último tiempo se presenta una proporción significativa de LIEs con el marcador $CD8^+$.¹³⁵ La función de los LIEs no ha sido determinada para ninguna especie y el significado de estas células en el epitelio intestinal es desconocido. Existen especulaciones y algunas evidencias que indican que los LIEs contribuyen a la integridad epitelial cuando ésta es afectada por la infección y daño por virus.¹³⁶

Glutamina, sistema digestivo e inmunológico

Estudios realizados en las últimas décadas han demostrado que la Gln es un aminoácido de vital importancia, ya que determina y mantiene diferentes procesos metabólicos en la célula.^{137,138} En los mamíferos adultos se considera como un aminoácido no esencial, debido a que constituye cerca del 25% del total de aminoácidos en el líquido extracelular y más del 60% de aminoácidos libres en el músculo esquelético, sitio de mayor síntesis de Gln.¹³⁹ Sin embargo, se ha observado que la producción en el organismo es insuficiente bajo situaciones de estrés prolongado, estados hipermetabólicos o hipercatabólicos, lo cual ha originado que en la actualidad se considere a la Gln como un aminoácido "condicionalmente esencial".^{140,141,142} Entre las principales funciones de la Gln, está el de participar como precursor en la síntesis de proteínas,¹³⁹ regular el balance ácido-base¹⁴³, y proveer nitrógeno en su metabolismo de degradación, el cual es empleado para la síntesis de purinas (vía glutamina fosforribosil pirofosfato aminotransferasa), pirimidinas (vía fosfato carbonil sintetasa I y II) y

aminoazúcares.¹⁴⁴ Debido a su diversa participación en reacciones de transaminación, la Gln puede ser clasificada como un verdadero regulador de la homeostasis de aminoácidos.¹⁴³

Entre los lugares de mayor demanda del aminoácido, el TGI es el principal sitio de utilización de Gln.^{144,145} Las enzimas involucradas en el metabolismo de Gln en este sitio, tienen diferente distribución. Algunos estudios revelan que en el intestino existe una baja y débil actividad de glutamina-sintetasa, sugiriendo que este órgano emplea Gln previamente formada en otros tejidos y directamente de la dieta, aunque los enterocitos recién formados muestran una marcada actividad de esta enzima.^{139,146} La actividad de glutaminasa, enzima clave en la glutaminólisis, se encuentra cerca del 80% concentrada en la mucosa del TGI, con una alta presencia y actividad en el intestino delgado, con mayor expresión en la región proximal. En contraste, el esófago presenta una actividad mínima debido a que a este nivel se presenta un epitelio escamoso estratificado.^{140,144} En segundo lugar, es la enzima de mayor actividad en células de rápida división, incluyendo a las que forman parte de los mecanismos de resistencia (macrófagos, monocitos y neutrófilos) y de inmunidad (linfocitos).^{144,147} La Gln ha mostrado ser indispensable como fuente energética y como sustrato en la biosíntesis de moléculas importantes en la mucosa intestinal, debido a que la deficiencia del aminoácido inducida por infusión de glutaminasa está asociada con la presencia de diarrea, disentería y necrosis en la mucosa intestinal.^{148,149} En el cerdo, como se ha mencionado anteriormente, es común observar atrofia de vellosidades e hiperplasia de criptas inmediatamente después del destete, que al parecer son influenciados por la disponibilidad de Gln, ya que la leche materna, única fuente del aminoácido en concentración abundante, es abruptamente interrumpida.^{36,150,151} Wu *et al*¹⁵⁰ reportaron que la concentración de Gln en la leche de la cerda (1.9 y 3.4 mmol/L), era la más abundante como aminoácido libre entre el día 22 y el 29 del periodo de lactancia. El papel principal de este aminoácido en el TGI, es el de sustrato energético para los enterocitos, utilizándose en mayor proporción que la glucosa para este fin.¹⁵² Además, como precursor esencial en la síntesis de purinas y pirimidinas, sugiere que este aminoácido participa directamente en la intensa actividad mitótica de los enterocitos y células del sistema inmune en la etapa postdestete.^{153,154,155} Estudios *in vitro* han

demostrado que actúa directamente en la proliferación de células de la mucosa intestinal, al promover el efecto mitógeno del Factor de Crecimiento Epidérmico¹⁵⁶.

Recientemente se ha demostrado que al igual que los enterocitos, los linfocitos,^{3,157} macrófagos^{3,158} y neutrófilos¹⁵⁹ utilizan la glutamina como el principal sustrato energético³. Sin embargo, aunque la actividad de la glutaminasa es alta en estas células, la tasa de oxidación es baja, debido a que el catabolismo incompleto de Gln es un importante mecanismo para proveer moléculas precursoras para soportar otras reacciones claves en estas células. Una gran parte de la glutamina es convertida a glutamato, aspartato (por la vía del ácido tricarbóxico) y lactato, bajo condiciones apropiadas, sólo un 25% de la Gln es oxidada a CO₂.¹⁵⁵

En condiciones normales, concentraciones de Gln extracelular parecen regular la proliferación de linfocitos T, lo cual se demuestra cuando son estimulados *in vitro* con el mitógeno concanavalina A, mostrando una mayor capacidad de replicación conforme se aumenta la concentración de Gln en el medio de cultivo.¹⁶⁰ Además, por este mismo método se mantiene la producción de intermediarios clave, como la producción de IL-2 y el receptor de esta citocina.¹⁶¹ Los macrófagos, por otra parte, son células terminalmente diferenciadas, que pierden su capacidad de replicación, sin embargo poseen un importante papel en la presentación antigénica en asociación con el complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II), secretan citocinas proinflamatorias y radicales libres cuando son estimuladas en la fagocitosis.¹⁵⁵ Murphy y Newsholme,¹⁶² han postulado que una posible explicación del alto índice de utilización de Gln por estas células, sea satisfacer la gran demanda de arginina, debido a que los macrófagos, una vez activados, secretan arginasa reduciendo rápidamente los niveles de Gln extracelular. La arginina una vez formada de la Gln participa como precursor inmediato del óxido nítrico, catalizada por la enzima inducible óxido nítrico sintetasa (iNOS) en el interior del macrófago.

Estudios en humanos y en ratas con soluciones enriquecidas con Gln, han mostrado que el aminoácido reduce la atrofia intestinal asociada con la nutrición enteral y parenteral,^{163,164,165} disminuye la enterocolitis en casos severos inducida por radiación o metotrexato (pacientes con cáncer).¹⁶⁶

La adición de glutamina en la dieta de cerdos destetados a 14 días de edad ha logrado evitar el daño a la mucosa intestinal;^{1,2} sin embargo, no existen investigaciones sobre su participación directa en el sistema inmune de mucosas. En uno de los pocos trabajos realizados con Gln para evaluar su participación en el sistema inmune, Yoo et al,¹⁶⁷ reportaron que en cerdos infectados con *E. coli*, se observaba una proliferación más alta de linfocitos en sangre periférica si los lechones consumían una dieta conteniendo 40 g de Gln/kg comparada con el grupo al que no se le suplementó el aminoácido.

Por lo anterior, la administración de glutamina en la dieta podría proveer beneficios para el lechón recién destetado, momento en que el sistema inmune es comprometido por diversas situaciones de estrés así como durante la fase acelerada de crecimiento o la lactancia.

JUSTIFICACIÓN

La administración de L-glutamina en la dieta de cerdos en el periodo posdestete, ha preservado la estructura y función del intestino delgado. Sin embargo, la suplementación del aminoácido se ha realizado en base a dietas líquidas, como la leche de ovino o suero de leche líquido, por lo que aún no se establecen niveles adecuados en dietas sólidas.

Estudios *in vitro* para evaluar los efectos de la Gln sobre el metabolismo de linfocitos del cerdo, han demostrado una cierta dependencia como sustrato energético y en la replicación dirigida por antígenos, lo que ha conducido a realizar estudios preliminares *in vivo*, donde únicamente se han evaluado subpoblaciones linfocitarias en el torrente sanguíneo.

Considerando lo anterior, se decidió suplementar el aminoácido en una dieta sólida a diferentes porcentajes con el objetivo de establecer un nivel óptimo con efecto de respuesta en la distribución y número de subpoblaciones linfocitarias del intestino delgado.

HIPÓTESIS

La administración de L-glutamina en la dieta de cerdos destetados precozmente, favorecerá el aumento cuantitativo de subpoblaciones linfocitarias CD2⁺ y CD3⁺ en el crítico periodo posdestete, momento en que la única fuente de Gln es suprimida y los antígenos del medio ambiente estimulan la activación del sistema inmune.

OBJETIVOS

Establecer el efecto de la L-glutamina a diferentes porcentajes de inclusión en la dieta, sobre el número y distribución de subpoblaciones linfocitarias (CD2⁺, CD3⁺) del intestino delgado, en sus diferentes regiones (duodeno, yeyuno e íleon) durante el periodo crítico posterior al destete.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización. El experimento se realizó en un edificio de ambiente controlado del Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM, localizada en la Ciudad de México. Este edificio permite el aislamiento de los animales y cuenta con 16 corrales de 2.5 x 2 m, con paredes y pisos de cemento, techo de concreto y lámina de fibra de vidrio. La ventilación se controla por medio de 2 inyectores y 2 extractores de aire de 1 m de diámetro. Dos semanas previas al arribo de los cerdos se procedió a la desinfección de las instalaciones. Cada corral fue acondicionado con una lechonera de madera de 90 x 59 x 57 cm, un comedero plástico con cinco bocas y capacidad de 25 Kg (Kena Baby Pig Feeder, Kane Manufacturing Co. Iowa. EUA), un bebedero de chupón con capacidad de 8 l (Kena Baby Pig Waterer, Kane Manufacturing Co. Iowa. EUA) y como fuentes de calor: focos de 250 watts y tapetes eléctricos (Kena Baby Pig, Kena Manufacturing Co. Iowa. EUA).

Animales. Cincuenta cerdos, producto del cruzamiento de las razas Large White x Yorkshire provenientes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (C.E.I.E.P.P.), de la FMVZ de la UNAM, localizado en el Km 2 de la carretera Jilotepec-Corrales, Jilotepec, Edo. de México, fueron utilizados en el presente estudio. Desde el nacimiento y hasta el momento del destete, los animales fueron sometidos a las medidas rutinarias de manejo (corte y desinfección del cordón umbilical, aplicación de hierro y castración de los machos). A los 14 ±2 días de edad se separaron a los cerdos de la madre y fueron trasladados a las instalaciones de la FMVZ, recorriendo una distancia aproximada de 100 Km. El día del arribo se pesaron los animales, se seleccionaron 5 cerdos de forma aleatoria y se sacrificaron. Los datos obtenidos de este grupo de cerdos lactantes (testigos), se emplearon como referencia para los diferentes grupos en tratamiento y evaluar los cambios celulares provocados por la edad. El resto de los animales se distribuyeron al azar, con el bloqueo previo del factor peso corporal, lo cual permitió homogeneidad de los cerdos en los diferentes tratamientos. Al término del manejo se apagaron las lámparas de luz blanca, y se

dejaron encendidos los focos, tapetes y calefactores, favoreciendo la adaptación de los lechones al nuevo ambiente y reducción del estrés.

Tratamientos. El día del arribo, los cerdos fueron distribuidos aleatoriamente en 3 tratamientos experimentales (n=15 cerdos/tratamiento) y se les ofreció un alimento preiniciador de uso comercial (Nupig-SE; Nutec S.A. de C.V. Querétaro, México) administrado *ad libitum*. Para cada grupo, se suplementó con el alimento L-glutamina (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Tokio, Japón) a los porcentajes: 0, 1 y 1.5% respectivamente, durante todo el periodo que duró el experimento.

Administración de L-glutamina. La administración de Gln se proporcionó individualmente en suspensión por vía oral a cada grupo en tratamiento, de esta forma se aseguró que la cantidad de aminoácido fue ingerida íntegramente por cada lechón en condiciones farmacológicas óptimas. El aminoácido se administró por esta vía debido a que la Gln comúnmente no se produce comercialmente para uso en la nutrición enteral, por lo que fue necesario solicitarla directamente a Tokio, Japón (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) con la especificación de ser empleada para este fin. La calidad del aminoácido reportada por el laboratorio fue de 99% de pureza a un costo de 80 dólares/Kg. La metodología se desarrolló como sigue.

El alimento preiniciador se proporcionó previamente pesado para cada tratamiento, al día siguiente se recuperó y se pesó el que no fue consumido. De esta forma se obtuvo el consumo de alimento por cada grupo en tratamiento. Con este dato se procedió a calcular el porcentaje del aminoácido correspondiente a ese día para cada grupo experimental (0, 1 y 1.5% de Gln). El aminoácido se preparó inmediatamente de ser administrado, debido a que las propiedades farmacológicas de la Gln indican que en solución la máxima estabilidad del aminoácido se obtiene en un rango de pH de 5 a 7.5 y se disocia a proporción de 0.9% por día a temperatura ambiente en soluciones de administración parenteral.¹⁶⁸ Los diferentes porcentajes de Gln para cada tratamiento se disolvieron en 30 ml de agua estéril con un pH final de 6.5, se disolvió homogéneamente a temperatura ambiente y se proporcionó por vía oral individualmente a cada cerdo por grupo en tratamiento. El grupo con 0% de Gln (control) sólo se le

proporcionó agua estéril por la misma vía con el pH ajustado a 6.5 con una solución de ácido cítrico 1 molar. Este método se repitió cada día durante todo el tiempo que duró el experimento.

Sacrificio y toma de muestras. A partir de la administración de L-glutamina se sacrificaron 5 cerdos por cada grupo en tratamiento al día 3, 7 y 14 postdestete. De acuerdo a la reglamentación vigente sobre el trato humanitario a los animales aprobado en la F.M.V.Z.¹⁶⁹, se empleó una sobredosis de pentobarbital sódico (Lab. Aranda S.A. de C.V.) por vía intracardiaca como método de sacrificio. Posteriormente, se procedió con las técnicas de necropsia de rutina descritas por Aluja¹⁷⁰ y se identificaron los segmentos del intestino delgado a ser analizados (duodeno, yeyuno e íleon). El primero se tomó a partir de la terminación del esfínter pilórico hasta unos 10 cm del inicio de éste, para la segunda porción se seleccionó un segmento de 2 cm de longitud a la mitad del intestino delgado y la tercera porción se obtuvo 10 cm antes de llegar al apéndice cecal.¹ Las muestras de cada porción fueron embebidas en un crioprotector (Tissue Freezing Medium, Leica Instruments, Alemania) y se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido (-196°C), posteriormente se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento por técnicas de inmunohistoquímica. Se realizaron cortes histológicos en congelación de 7 µ de grosor por muestra.

Inmunohistoquímica. Las pruebas de inmunohistoquímica se realizaron de acuerdo a la técnica publicada por Vega López et al.³² Las secciones de tejido fueron incubadas con la dilución óptima de anticuerpos primarios monoclonales descritos a continuación: **Anticuerpo monoclonal de rata anti-CD2⁺ de cerdo.** Serotec Oxford, Inglaterra. No. de catálogo MCA1155. Producido por la clona MAC80, obtenido por fluido ascítico y empleado a una dilución de 1:1000. El isotipo al que corresponde es IgG2a.

Anticuerpo monoclonal de rata anti-CD3⁺ de humano. Serotec Oxford, Inglaterra. No. de catálogo MCA1477. Este anticuerpo es producido por la clona CD3-12, obtenido por sobrenadante de cultivo de tejido y se empleó a una dilución de 1:150. El isotipo al que corresponde es IgG1.

Las secciones de tejido fueron incubadas con el anticuerpo primario durante la noche a 4°C, posteriormente se agregó el anticuerpo secundario anti-rata biotinado (Biotin goat-antirat IgG; ZYMED Lab. EUA), empleado a una dilución 1/300, seguido por la adición del complejo estreptavidina-peroxidasa (HRP-Streptavidin conjugate; ZYMED Lab. EUA), y se empleó para esta última una dilución 1:2500. La reacción fue visualizada con 0.05% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Aldrich Chem. Co. EUA) en Tris-HCL 0.05 M, más 0.01% de peróxido de hidrógeno (Fig. 2). Los cortes de tejido fueron contrastados con hematoxilina de Harris (HYCEL de México S.A. de C.V.), deshidratados y montados en resina.

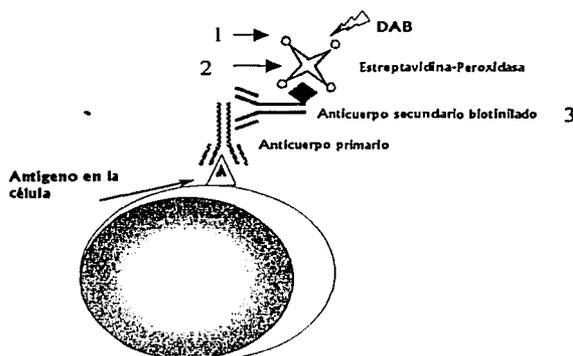


Figura 2. Esquema donde se ilustra las interacciones entre los componentes del sistema usado en la inmunohistoquímica. La peroxidasa (1) se encuentra unida covalentemente a la estreptavidina (2). El anticuerpo primario se une directamente al antígeno a identificar y a éste se une el segundo anticuerpo con la biotina acoplada (3). La interacción entre la peroxidasa y la DAB (diaminobenzidina) produce precipitados de color marrón, lo cual evidencia la reacción.

VARIABLES DE RESPUESTA. Se seleccionaron 5 vellosidades y 5 áreas de criptas al azar con mejor integridad por muestra de tejido, y debido a la distribución particular de las células, las zonas de vellosidades y criptas fueron contadas por separado. Las células teñidas positivamente en epitelio, lámina propia y criptas de cada muestra se contaron empleando un analizador de imagen asistido por computadora (Image Pro Plus V, Media Cybernetics). Los resultados se presentan en el epitelio (células/mm) como

frecuencia y en densidad (células/mm²) a nivel de la lámina propia de vellosidades y criptas.

Diseño estadístico

Se realizó un diseño factorial 2 x 2 completamente al azar, para evaluar el efecto de glutamina en la densidad y frecuencia de células en los diferentes grupos de tratamientos (factor tratamiento: 0, 1 y 1.5% de Gln) y el efecto de la edad a diferentes días postdestete (factor edad: 3, 7 y 14 días postdestete) en cada región del intestino. Se realizó un ANOVA de dos vías y los resultados fueron sometidos a la prueba de Tukey. El conjunto de datos se analizó con el procedimiento GLM del paquete estadístico SPSS versión 10. El modelo estadístico que se siguió fue:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + E(i)j$$

μ = media poblacional

α_i = efecto del i'ésimo nivel de A, $\sum_{i=1}^p \alpha_i = 0$

β_j = efecto del j'ésimo nivel de B, $\sum_{j=1}^q \beta_j = 0$

$E(i)j$ = error experimental.

RESULTADOS

El efecto de la adición de glutamina (Gln) a diferentes días postdestete (PD) sobre subpoblaciones linfocitarias CD2⁺ y CD3⁺ en las diferentes regiones del intestino delgado, se muestran en el cuadro 1 y 2 respectivamente. Al realizar el análisis de ANOVA fue evidente que la Gln tuvo un efecto positivo ($P < 0.05$) en la frecuencia y densidad de estas subpoblaciones celulares en todas las regiones del intestino delgado y en la mayoría de las veces este aumento celular fue superior con el grupo de inclusión más alto del aminoácido (1.5% de Gln). Los resultados se analizaron por la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar su distribución, en todos los casos fue normal. Este primer análisis permitió seleccionar y realizar el ANOVA de dos vías por el procedimiento GLM.¹⁷¹

La identificación en la distribución de células marcadas con el panel de anticuerpos monoclonales empleados (CD2⁺ y CD3⁺) en todas las regiones del intestino delgado fue difícil, debido a la pobre preservación de la morfología del tejido fijado por congelación.

Efecto de L-glutamina sobre parámetros productivos en diferentes periodos postdestete

Al inicio del experimento se decidió bloquear el factor peso en los animales; las diferentes camadas se distribuyeron al azar manteniendo pesos similares en los diferentes grupos en tratamiento. Como se esperaba, esta medida de control indicó que cerdos de similar peso registran un consumo de alimento semejante (Figura 3).

El consumo diario de alimento (CDA) aumentó de forma gradual conforme avanzó la edad de los cerdos, fue similar entre los diferentes grupos en tratamiento (0, 1 y 1.5% de Gln) y aunque el consumo fue ligeramente mayor en los grupos con el aminoácido incluido, los valores no fueron estadísticamente significativos ($P < 0.05$) durante todo el periodo experimental (Cuadro 3 y Figura 3). El primer periodo del día 0-3 postdestete la ganancia diaria de peso (GDP) fue mayor ($P < 0.05$) en los grupos 1 y 1.5% de Gln (18 vs 92, 110 gr/día, respectivamente). El periodo del día 3 al 7 PD, la GDP alcanzó su nivel máximo para los grupos 0 y 1% de Gln en todo el tiempo que duró el experimento, sin embargo no hubo diferencias estadísticas por la inclusión del aminoácido en los

diferentes grupos en tratamiento (300, 250 y 300 gr/día). El último periodo del día 7-14 posdestete, el mayor efecto ($P<0.05$) se presentó con el nivel más alto de aminoácido incluido (1.5% de Gln) (211, 228 vs 578 gr/día, respectivamente) y fue el grupo con la mayor GDP en todo el periodo experimental. La conversión alimenticia (CA) fue muy reducida en el grupo control (0% de Gln) el periodo del día 0 al 3 PD, el balance entre el CDA y GDP fue negativo para este grupo. El efecto del aminoácido en los grupos con los niveles 1 y 1.5% de Gln en este periodo sobre la CA fue significativamente ($P<0.05$) positivo en contraste al grupo control (0,19 vs 0,88, 0,96 respectivamente). El periodo del día 3 al 7 PD la CA se mantuvo cercana a 1 en todos los grupos (0,93, 0,87 y 0,84 respectivamente), lo cual significó una alta eficiencia anabólica transformando el alimento consumido en masa corporal, sin efecto aparente por la administración del aminoácido en este periodo. El último periodo correspondiente del día 7 al 14 PD, la CA registró un importante aumento en el grupo con el nivel más alto del aminoácido incluido (1.5% de Gln), manteniendo la proporción cercana a 1 (0,35, 0,42 vs 0,95 gr/día). En el resto de los grupos la eficiencia anabólica descendió con mayor efecto detrimental en el grupo sin el aminoácido incluido (0,35, 0,42 vs 0,95 respectivamente). Interesantemente, el primer periodo y el último posdestete se presentó una menor GDP y CA en el grupo al que no se le adicionó el aminoácido (Cuadro 3).

Cambios en subpoblaciones linfocitarias a diferentes días posdestete

El grupo de cerdos lactantes y en los destetados a diferentes días, las células $CD2^+$ y $CD3^+$ se concentraron en la lámina propia (LP) de las vellosidades en mayor número de densidad ($P<0.05$) que en la de criptas (LP-CRI) (Figura 4 A-B; Cuadro 4 y 5). En el grupo de cerdos lactantes, la densidad de linfocitos $CD3^+$ en la LP de las vellosidades fue mayor ($P<0.05$) en la región distal del intestino delgado (461, 605 vs 1012 cels/mm², respectivamente), en contraste la subpoblación de células $CD2^+$ presentó la misma densidad celular tanto en LP de vellosidades como en las criptas de las diferentes regiones del intestino delgado (Figura 4 A-B). En el epitelio (EP) y LP de vellosidades de las diferentes regiones del intestino delgado, en todos los grupos se presentó un aumento en la frecuencia y densidad de células $CD2^+$ y $CD3^+$ a partir de los primeros tres días posdestete, incrementándose en los diferentes tratamientos hasta finalizar el

experimento (d 14 postdestete); con excepción del EP del duodeno, donde estos cambios fueron evidentes hasta el día 7 PD (Fig. 5-10 A-B). En la lámina propia de criptas (LP-CR) en duodeno y yeyuno, la densidad de células CD2⁺ y CD3⁺ se mantuvo sin cambios o disminuyó ligeramente en el grupo sin el aminoácido incluido, en contraste con los cerdos lactantes (Figura 11-13 A-B). En lámina propia de criptas del duodeno se presentó una disminución gradual en la densidad de células CD2⁺ conforme avanzó la edad postdestete en todos los grupos tratados (Fig. 11 A). La densidad de CD3⁺ en criptas del ileon, por otro lado, disminuyó drásticamente después del destete, manteniéndose sin cambios durante todo el tiempo que duró el experimento (Fig. 13 B).

Efecto de la inclusión de L-glutamina en subpoblaciones linfocitarias (CD2⁺ y CD3⁺).

El mayor efecto de Gln en el duodeno se concentró a nivel de la LP, en el yeyuno se presentó en el EP, en tanto que en el ileon los mayores cambios se presentaron en la región de LP-CR.

En la lámina propia (LP) del duodeno, se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en la densidad de células CD2⁺ durante todo el tiempo que duró el experimento, en el grupo con el porcentaje de inclusión más alto del aminoácido (1.5% de Gln). Al día 14 postdestete (PD), todos los grupos a los que se les adicionó el aminoácido (1 y 1.5% de Gln) presentaron una mayor densidad de CD2⁺, en contraste con el grupo 0% de Gln (Figura 5-A). La densidad celular en la LP del duodeno con el marcador CD3⁺, específico de linfocitos, aumentó únicamente en los primeros tres días postdestete con el tratamiento 1.5% de Gln (Figura 5-B). En este tiempo, en la LP del yeyuno se registró un incremento en la densidad de ambas subpoblaciones celulares CD2⁺ y CD3⁺, en todos los grupos tratados con Gln (Figura 6-A); en los días 7 y 14 PD no se observaron cambios significativos por el efecto del aminoácido. En la LP del duodeno y yeyuno la densidad celular presentó cambios muy drásticos, la relación CD2⁺:CD3⁺ mostró valores desde 3:1 en el yeyuno, hasta 7:1 en el duodeno el día 7 PD con el grupo 1.5% de Gln.

La LP del ileon fue la parte del intestino menos afectada por la inclusión del aminoácido, aunque la densidad de CD2⁺ y CD3⁺ después de la separación materna,

aumentó de acuerdo a la edad en todos los grupos en forma cuadrática (Figura 7 A-B), la relación entre estas dos subpoblaciones fue más homogénea en contraste a las otras porciones del intestino, presentando un valor 2:1.

En el EP del yeyuno, la Gln presentó un importante efecto debido a un drástico aumento en la frecuencia de $CD3^+$ y $CD2^+$ en el grupo 1.5% de Gln desde el día 3 al día 7 PD para el primer marcador y hasta al final del experimento para el segundo caso (Figura 9 A-B). En el EP del duodeno, la frecuencia de $CD2^+$ disminuyó considerablemente a los primeros 3 días PD en los grupos tratados con Gln con respecto al control, que en este caso presentó un mayor aumento celular; en los siguientes días, la frecuencia de $CD2^+$ aumentó en todos los grupos al parecer, por efecto de la edad sin ninguna influencia por la adición del aminoácido (Figura 8 A). La frecuencia de $CD3^+$ fue ligeramente mayor en los tratamientos a los que se les adicionó glutamina (1 y 1.5%) a partir del día 7 PD, aunque estos valores no tuvieron diferencia estadística significativa (Figura 8 B). En el EP del ileon, el día 3 posdestete fue el único que registró un incremento en la frecuencia de $CD2^+$ y $CD3^+$ con el nivel más alto de Gln (Figura 10 A-B). En el caso particular del marcador $CD2^+$, el aumento celular de acuerdo a la edad presentó un comportamiento cuadrático debido a que posterior al incremento en la frecuencia el día 3 PD, el día 7 se presentó un descenso importante de células con este marcador, aumentando nuevamente el día 14 PD. El efecto de la adición de Gln a diferentes porcentajes fue homogéneo en la frecuencia de linfocitos $CD2^+$ y $CD3^+$ a nivel del EP en todas las regiones del intestino delgado, incluyendo al de cerdos lactantes (día 0 PD), debido a que presentaron una relación $CD2^+:CD3^+$ 1:1, con excepción del día 7 PD, donde sólo el duodeno registró una relación 2:1 en todos los grupos tratados.

En la región de LP-CR del ileon, se presentó un importante aumento en la densidad de $CD2^+$ en el grupo 1.5% de Gln desde los primeros 3 días posdestete hasta el día 7 PD; al final del experimento, el tratamiento 1% de Gln registró el mayor aumento en la densidad de $CD2^+$. El efecto opuesto se observó con el marcador $CD3^+$ donde se registró un drástico descenso de la frecuencia celular desde el momento del destete y que permaneció constante durante todo el tiempo que duró el experimento, sin ningún cambio aparente originado por la adición del aminoácido (Figura 13 A-B). En la LP-CR1 del duodeno, la densidad de $CD2^+$ al día 14 disminuyó significativamente en todos

los grupos con el aminoácido incluido en contraste con el grupo 0% de Gln (Figura 11 A). El día 7 PD, aumentó la densidad de CD3⁺ en el grupo 1% de Gln (Figura 11 B). A partir de este tiempo, en la región de criptas del yeyuno la densidad de CD2⁺ y CD3⁺ aumentó con el grupo 1.5% de Gln en el primer caso y en ambos tratamientos con Gln en el segundo; este comportamiento continuó sólo para el último marcador hasta el día 14 PD en el grupo con nivel más alto del aminoácido incluido (Figura 12 A-B). En LP de las CR de todas las porciones del intestino delgado la proporción entre CD2⁺ y CD3⁺ se mantuvo 2:1.

Al inicio del presente experimento, las muestras de las diferentes regiones del intestino delgado se tomaron por duplicado, de esta forma, una porción se fijó por congelación y otra se fijó de inmediato en paraformaldehído lisina-peryodato (descrita por Gendelman *et al* 1983)¹⁷² para posteriormente ser embebida en parafina. La técnica de inmunohistoquímica se realizó en un inicio procesando cortes de tejido en parafina, debido a que la morfología del mismo se mantiene con mayor integridad por este método. En todos los anticuerpos probados no se obtuvo marcaje positivo, por lo que se decidió realizar ensayos empleando diferentes técnicas de "recuperación antigénica" (tratamiento enzimático, tratamiento con citratos y empleo de kits comerciales). Sin embargo, los anticuerpos no se unieron a los receptores o se presentó unión inespecífica, provocando aumento de fondo cuando se visualizó la reacción con diaminobencidina, lo cual se evidenció al analizar la muestra con el testigo fijado por congelación. Se decidió, por lo tanto, continuar procesando las muestras con esta última técnica de fijación en perjuicio de la morfología, por ser ésta la única forma de identificar los marcadores de superficie con un alto grado de especificidad.

Discusión

El destete en el cerdo es un evento estresante en los animales y es común observar un reducido consumo de alimento en los primeros días de adaptación. La nutrición y las prácticas de manejo han permitido reducir el tiempo en que los animales inician el consumo de alimento sólido desde los primeros días posdestete, mejorando la palatabilidad de los alimentos preiniciadores y proporcionándolo a las camadas desde los primeros tres días de nacimiento.⁷ En este experimento el consumo de alimento fue estimulado en diferentes formas: la granja de procedencia de los animales permite el acceso de alimento desde la primera semana de nacimiento; en las instalaciones de ambiente controlado a las que fueron trasladados los animales, se esparció unos gramos del preiniciador en el interior de las lechonerías inmediatamente al arribo de los animales, y por último el alimento fue administrado *ad libitum* durante todo el periodo experimental. En el primer periodo posdestete (día 0 al 3) el grupo control (0% de Gln) registró un CDA similar a los otros grupos en tratamiento, sin embargo la GDP fue reducida. Estos datos indican que debido al bajo consumo de alimento en los primeros dos días PD, el alimento ingerido en los animales de este grupo, al parecer sólo proporcionó los requerimientos de mantenimiento y el peso de los animales se mantuvo sin cambios hasta el final de este periodo (Figura 3), a pesar de que las condiciones experimentales fueron similares para todos los grupos. Otro factor que probablemente ocasionó este efecto en el grupo control es la respuesta inflamatoria ocasionada por el bajo consumo de alimento que favorece el daño a la mucosa intestinal *per se* y por el desequilibrio positivo en la proliferación de la flora comensal. Estos elementos aumentan el grosor de la mucosa intestinal provocando una reducida digestión y absorción de los nutrientes.^{44,45} En el segundo periodo del día 3 al 7 PD, la eficiencia anabólica mejoró en todos los grupos, el balance entre la GDP y el CDA fue positivo para todos los tratamientos sin excepción del aminoácido incluido. El control en las medidas higiénicas y ambientales durante este tiempo, probablemente evitaron comprometer la homeostasis de los diferentes grupos en tratamiento, evidenciado por la rápida reposición del grupo control al resto de los grupos en los parámetros productivos. En el último periodo sólo el tratamiento con 1.5% de Gln incluido mantuvo un

comportamiento ascendente en la conversión de alimento ingerido a masa corporal, en contraste al resto de los grupos que presentaron una menor GDP y que afectó más evidentemente al grupo de 0% de Gln. Estos datos sugieren que aunque el nivel de consumo de alimento fue ascendente para todos los grupos, la mucosa intestinal puede ser afectada cuando aumenta drásticamente el consumo de alimento después de un periodo en que éste fue muy reducido.

El intestino delgado en el cerdo presenta en todos sus compartimentos (epitelio, lámina propia y Placas de Peyer) células linfoides desde el nacimiento, las cuales aumentan y cambian en su distribución conforme avanza la edad.⁷⁰ Este efecto no se observa en animales obtenidos por cesárea o en cerdos libres de patógenos específicos, porque carecen del estímulo antigénico ambiental.¹²¹ En el presente experimento, el grupo de cerdos lactantes (14 ± 2 días de edad) exhibió una mayor proporción de células CD2⁺ y CD3⁺ en la lámina propia de las vellosidades que en las criptas del intestino delgado (Fig. 4 A-B). Estos resultados indican, de acuerdo a lo reportado por Vega-López *et al*, una rápida adquisición potencial de la respuesta inmune en la lámina propia, debido a que los cerdos al nacimiento presentan células CD2⁺ preferentemente en criptas y cambian su distribución a la lámina propia de las vellosidades desde la primera semana neonatal.¹²⁹ Los cambios observados en este trabajo concuerdan parcialmente con otros anteriores en la histología de subpoblaciones linfocitarias en el intestino delgado, debido a que los animales convencionales empleados pudieron estar expuestos a una mayor carga antigénica ambiental que aquellos utilizados en otros experimentos, donde la crianza fue bajo condiciones de aislamiento y manejo más estrictas (medicación y monitoreo de agentes patógenos).^{129,130,133}

El estrés del destete en el cerdo ha mostrado, en condiciones experimentales, inducir inmunosupresión de la inmunidad celular a nivel sistémico inmediatamente después de la separación materna.^{30,28} Con referencia a la etapa de lactancia en este experimento, el destete (14 ± 2 días) no afectó en la mayoría de los casos, la frecuencia y densidad de subpoblaciones de linfocitos T (CD2⁺ y CD3⁺) en la mucosa intestinal. Este evento, por el contrario estimuló el incremento de estas células con mayor efecto a nivel de la LP y EP del intestino delgado, en los primeros tres días posdestete (Figura 5-13, A-B). Los resultados concuerdan con lo reportado por Vega-López *et al*, el cual observó aumento

de células CD2⁺ en animales inmediatamente destetados a los 21 días.¹²⁹ El efecto contrario se ha observado con la prueba dérmica de fitohemaglutinina³⁰ y conteo de linfocitos en sangre periférica²⁸, donde disminuye la cantidad de linfocitos T a nivel sistémico, demostrando una baja inmunidad celular en la etapa posdestete. Los resultados de este experimento indican que al parecer, la mucosa del sistema inmune intestinal posee actividad independiente del sistema inmune sistémico, aunque permanezca en continua comunicación por el procesamiento antigénico que sucede a este nivel.

El incremento en el número de células en un órgano o un compartimiento puede ser causado por la proliferación local *in situ*, un aumento en la migración, disminución en la muerte o por emigración celular.¹³⁴ En la mucosa del intestino delgado, el aumento de células CD2⁺ y CD3⁺, observado a los 3 días PD con mayor efecto en los grupos con la inclusión de Gln (1% y 1.5% Gln), sugiere que en este tiempo el aminoácido permitió una rápida replicación o una mayor migración de linfocitos T, probablemente originada por la carga antigénica inmediata (ambiental y del alimento) al que tuvieron contacto los cerdos. La mucosa intestinal pudo haber presentado inflamación en los primeros días posdestete. Estudios recientes en enfermedades inflamatorias del intestino delgado sugieren que la flora comensal puede ocasionar esta respuesta por una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ que produce interferón gamma (IFN- γ) originando una respuesta de tipo Th1.¹⁷³ El grupo de cerdos lactantes presentó una menor densidad de estas células, en contraste al resto de los grupos mencionado anteriormente, lo cual manifiesta que las células presentes a los tres días posdestete fueron estimuladas a proliferar o migrar de los sitios inductores (placas de Peyer). En la LP de las vellosidades, los linfocitos CD3⁺ presentaron una menor densidad celular en contraste a las células con el marcador CD2⁺ desde la lactancia y en los diferentes días posdestete en todo el intestino delgado (Cuadros 4 y 3), debido probablemente a que los linfocitos una vez estimulados originan una rápida proliferación por el factor de crecimiento autócrino interleucina-2, secretada por los propios linfocitos T, ya que se ha demostrado la presencia del receptor de esta citosina de forma abundante en la lámina propia de cerdos jóvenes.¹²⁹ El establecimiento de la microflora normal y la presencia de antígenos ubicuos del alimento, pudieron haber contribuido a la continua producción de linfocitos T CD2⁺.

Recientemente se sabe que esta subpoblación de linfocitos cuando tienen contacto con los elementos mencionados anteriormente, se activan, proliferan y desarrollan tolerancia a los mismos, en mayor medida que por la vía del receptor de CD3⁺, que también participa en este mecanismo aunque en menor grado.¹⁷⁴ Por otra parte, otras células como las citocidas naturales (NK del inglés, natural killer), que forman parte de los mecanismos de resistencia, probablemente estuvieron presentes lisando células infectadas por virus, ya que se ha demostrado que también poseen el marcador de superficie CD2⁺ y su función específica es destruir células infectadas.¹⁷⁵

En el grupo sin la adición del aminoácido (0%) y en el tratamiento con 1% de Gln en LP de duodeno e íleon (Figura 5 y 7 A-B), permanecieron sin cambios en la densidad celular de CD2⁺ y CD3⁺ desde la lactancia, lo que sugiere que los niveles del aminoácido probablemente fueron insuficientes y los linfocitos permanecieron en estado quiescente (sin estímulo a proliferar) por la falta de sustrato energético, lo cual concuerda con estudios *in vitro* donde se ha observado que la proliferación linfocitaria es dependiente de la concentración de Gln.¹⁶⁰

En el EP del yeyuno se presentó el mayor incremento de células CD2⁺ y CD3⁺ con el nivel más alto del aminoácido incluido 1.5% de Gln. Estudios recientes *in vitro* han mostrado que después de la estimulación linfocitaria por la vía de linfocitos CD3⁺, los linfocitos intraepiteliales (LIE) producen factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) actuando sobre las mismas y promoviendo su proliferación.¹⁷⁶ La inclusión más alta del aminoácido (1.5% de Gln) probablemente favoreció la activación linfocitaria, aumentando la tasa de proliferación de LIE en el yeyuno, la cual es la región más extensa del intestino delgado y de mayor susceptibilidad a ser invadida por agentes potencialmente patógenos del medio ambiente. Lo anterior sugiere que la Gln participa como sustrato energético aumentando la celularidad de subpoblaciones linfocitarias *in vivo* en la etapa postdestete, que al parecer favorece un adecuado funcionamiento de la inmunidad activa del lechón (Figura 9 A-B).

En LP-CRI se presentó una reducción importante de células CD3⁺ a partir del destete, permaneciendo sin cambios hasta el final del experimento. Estos datos sugieren que probablemente aumentó la migración de linfocitos maduros (que poseen este marcador

de superficie) a la zona de LP de vellosidades, ocasionada por la actividad antigénica proveniente del lumen intestinal (Figura 13 B).

El efecto de la adición de Gln demuestra que las líneas linfocitarias CD2⁺ y CD3⁺, bajo condiciones de estrés, requieren una mayor cantidad del aminoácido como se había demostrado *in vitro* en estudios anteriores, debido a que en los grupos con el mayor porcentaje de inclusión, el incremento celular fue mayor.

El presente experimento evaluó por primera vez el efecto de la adición de L-glutamina en el alimento sólido de cerdos destetados a edad muy temprana (14 días). Las condiciones de experimentos anteriores no habían permitido manejar cerdos de esta edad por lo severo del estrés posdestete y exposición al ambiente.¹²⁹ Sin embargo, el empleo de animales muy jóvenes separándolos drásticamente de la cerda fue un método que permitió validar el efecto del aminoácido y el factor de la edad en condiciones ambientales controladas.

CONCLUSIONES

La adición de L-glutamina en la dieta durante un periodo prolongado (15 días en este experimento), aumenta la eficiencia en la utilización de los nutrientes del alimento, mejorando el rendimiento en masa corporal en cerdos destetados a edad temprana. Efecto que probablemente se deba a que el aminoácido mantiene la morfología gastrointestinal de manera íntegra, evitando la atrofia de vellosidades e hiperplasia de criptas.

Los resultados del presente estudio sugieren que la Gln posee un importante papel sobre el metabolismo energético y la replicación de células del sistema inmune celular del intestino, en un periodo cuando el lechón es inmunológicamente inmaduro, coincidiendo con el tiempo en que la suplementación de Gln en la leche materna desaparece.

REFERENCIAS

1. De La Cruz LA. Efecto del suero de leche líquido y L-glutamina sobre la integridad intestinal de lechones lactantes y precozmente destetados (tesis de licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M, 1999.
2. Pluske JR, Hampson DJ and William IH. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Product Sci* 1997; 51: 215-236.
3. Newsholme P, Curi R, Curi TCP, Murphy CJ, Garcia C and Pires de Melo M. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: Its importance in health and disease. *J Nutr Biochem* 1999; 10: 316-324.
4. Darcy-Vrillon B, Posho L, Morel M-T, Bernard F, Blachier F, Meslin JC and Duée PH. Glucose, galactose and glutamine metabolism in pig isolated enterocytes during development. *Pediatric Research* 1994; 36: 175-181.
5. Harris DL. Policy decisions and opportunities for owners and/or senior management. In: *Multi-site Pig Production*. University Press Ed. Iowa state 2000: 125-136.
6. Kyriaskis SC. New aspects of the prevention and/or treatment of the major stress induced diseases of the early weaned piglet. *Pig News and Inf* 1989; 10: 177-181.
7. Svendsen J and Steen SL. Intensive (commercial) systems for breeding sows and piglets to weaning. *Livestock Product Sci* 1997; 49: 165-179.
8. Kirk CL. SEW: Development, concept, expected performance, rules and problems. *Memorias de Seminario sobre actualidades del "Destete Temprano"*; 1997 julio 25-26; La Piedad-Guad., México. La Piedad Michoacán. LAPISA, 1997: 9-23.
9. Alexander TJJ, Thorton K, Boon G, Lysons RJ and Gush AF. Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. *Vet Rec* 1980; 106:114-119.
10. Dritz SS, Nelssen JL, Goodband RD, Tokach MD and Chengappa MM. Application of Segregated Early Weaning Tecnology in the Commercial Swine Industry. *The Compend Cont Educ* 1994; 16: 677-685.

11. Ortiz RR, Conejo NJ, Ortega GR y Becerril AJ. Productividad de la cerda durante tres partos consecutivos y periodos de lactación de 12 y 21 días. Memorias de XXXIII Congreso Nacional AMVEC; 1998 agosto 12-16; Guanajuato, Gto México. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1998: 146-148.
12. Jurgens HM, Rikabi RA, and Zimmerman D.R. The Effect of Dietary Active Dry Yeast Supplement on Performance of Sows During Gestation-Lactation and Their Pigs. *J Anim Sci* 1997; 75:593-597.
13. Miller M. Early weaning: A way to expand. *Pork* 1994; 14:32-35.
14. Batista L. Evaluación de la Productividad de un sistema de destete temprano a través de la informática. Memorias de Seminario sobre actualidades del "Destete Temprano"; 1997 julio 25-26; La Piedad-Guad., México. La Piedad Michoacán. LAPISA, 1997: 3-7.
15. Dritz SS, Chengappa MM, Nelssen JL, Tokach MD, Goodband R, Dnietfeld JC, et al. Growth and microbial flora of nonmedicated, segregated, early weaned pigs from a commercial swine operation. *JAVMA* 1996; 208: 711-715.
16. Pettigrew JE, Johnston LJ, Shurson GC and Hawton J.D. Feeding nursery pigs. Annual meeting american association of swine practitioners, 1994 march 5-7; Rosemont, Illinois, USA. 1994: 1-28.
17. Revell DK, Williams IH, Mullan BP, Ranford JL and Smits RJ. Body composition at farrowing and nutrition during lactation affect the performance of primiparous sows: II. Milk composition, milk yield, and pig growth. *J Anim Sci* 1998 ; 76:1738-43
18. Klobasa F, Werhahn E and Butler JE. Composition of sow milk during lactation. *J Anim Sci* 1987; 64: 1458-1461.
19. Hodge RW. Efficiency of food conversion and body composition of the preruminant lamb and the young pig. *Brit J Nutr* 1974; 32: 113-115.
20. Madec F, Bridoux N, Bounaix S and Jestin A. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Preventive Veterinary Medicine* 1998; 35: 53-72.

21. Dividich JL, and Herpin P. Effects of climatic conditions on the performance, metabolism and health status of weaned piglets: a review. *Livestock Product Sci* 1994; 38: 79-90.
22. Fraser D. Observations on the behavioural development of suckling in early-weaned piglets during the first six weeks after birth. *Anim Behaviour* 1978; 26: 22-30.
23. Waran NK and Broom DM. The influence of a barrier on the behaviour and growth of early-weaned piglets. *Anim Prod* 1993; 56: 115-119.
24. Worobec EK, Duncan IJH and Widowski TM. The effects of weaning at 7, 14 and 28 days on piglet behaviour. *Appl Anim Behav Sci* 1999: 173-182.
25. Sohn KS, Maxwell CV, Buchanan DS and Southern LL. Improved soybean protein sources for early-weaned pigs: I. Effects on performance and total track amino acid digestibility. *J Anim Sci* 1994; 72: 622-630.
26. Chae BJ, Han KI, Kim HJ, Yang CJ, Hancock JD et al. Effects of dietary protein sources on the ileal digestibility and growth performance for early-weaned pigs. *Livestock Product Sci* 1999; 58: 45-54.
27. Makkink CA, Negulescu GP, Guixin Q and Vertegen WA. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets. *Brit J of N* 1994; 72:353-368.
28. Wattrang E, Wallgren P, Lindberg A and Fossum C. Signs of infections and reduced immune functions at weaning of conventionally reared and specific pathogen free pigs. *J Vet Med B* 1998; 45: 7-17.
29. Blecha F, Pollmann DS. and Nichols DA. Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity. *J Anim Sci* 1983; 56: 396-400.
30. González VD, Cisneros MI, Vega LMA y Morilla GA. Perfil inmunológico de los cerdos durante las primeras diez semanas de edad. *Vet Mex* 1993; 24: 217-221.
31. Puppe B, Tuchscherer M and Tuchscherer A. The effect of housing conditions and social environment immediately after weaning on the agonistic behaviour, neutrophil/lymphocyte ratio, and plasma glucose level in pigs. *Livestock Product Sci* 1997; 48:157-164.

32. Vega LMA, Telemo E, Bailey M, Stevens K and Stokes CR. Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet Immunol and Immunopathol* 1993; 37: 49-60.
33. Miller BG, Newby TJ, Stokes CR and Bourne FJ. Creep feeding and post weaning diarrhoea in piglets. *Vet Rec* 1984; 114: 296-297.
34. Brown PJ, Poulsen SS and Wells M. Serine protease immunohistochemistry and lectin histochemistry in the small intestine of weaned and unweaned pigs. *Res in Vet Science* 1991; 50: 1-5.
35. Thacker PA. Nutritional requirements of early weaned pigs: A review. *Pig News and Information* 1999; 20: 13N-24N.
36. Kenworthy R. Observations on the effects of weaning in the young pig. Clinical and histopathological studies of intestinal function and morphology. *Res in Vet Science* 1976; 21:69-75.
37. Hampson DJ. Attempts to modify changes in the piglet small intestine after weaning. *Res in Vet Science* 1986; 40: 313-317.
38. Kik MJL, Huisman J, Van Der Poel AFB and Mouwen JMVM. Pathologic Changes of the small Intestinal Mucosa of Pigs after Feeding *Phaseolus vulgaris* Beans. *Vet Pathol* 1990; 27: 329-334.
39. Miller BG, James PS, Smith MW and Bourne FJ. Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients. *J agric Sci Camb* 1986; 107: 579-589.
40. Sohn KS, Maxwell CV, Southern LL and Buchanan DS. Improved soybean protein sources for early-weaned pigs: II. Effects on Ileal Amino Acid Digestibility. *J Anim Sci* 1994; 72: 622-630.
41. Kyriakis SC. New aspects of the prevention and/or treatment of the major stress induced diseases of the early weaned piglet. *Pig News and Inf* 1989; 2:177-181.
42. Thacker PA. Nutritional requirements of early weaned pigs: A review. *Pig News and Information* 1999; 20: 13N-24N.
43. Aumaitre A, Peniau J and Madec F. Digestive adaptation after weaning and nutritional consequences in the piglet. *Pig News and Information* 1995; 16: 73-79.

44. Nagy B, Casey TA, Whipp SC and Moon HW. Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Hungary. *J Clin Microbiol* 1992; 28: 651-653.
45. Pluske JR, Hampson DJ and Williams IH. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Product Sci* 1997; 51: 215-236.
46. Fossum C. Cytokines as markers for infections and their effect on growth performance and well-being in the pig. *Domestic Anim Endoc* 1998; 15: 439-444.
47. Ferreira C, Da Forsyth R, Richman LE, Wells PI and et al. Changes in the rate of crypt epithelial cell proliferation and mucosal morphology induced by T-cell mediated response in human small intestine. *Gastroenterology* 1990; 98: 1255-1263.
48. Sangild PT, Hilsted L, Nexø E, Fowden AL and Silver M. Secretion of acid, gastrin and cobalamin-binding proteins by the fetal pig stomach: developmental regulation by cortisol. *Exp. Physiol* 1994; 79: 135-146.
49. Cranwell PD, Douglass RA and Stuart RJ. Development of abomasal secretion in the milk-fed lamb. *Can. J. Anim. Sci* 1984; 64 (Suppl.): 95-96.
50. Sangild PT, Cranwell PD and Hilsted L. Ontogeny of gastric function in the pig: acid secretion and the synthesis and secretion of gastrin. *Biol. Neonate* 1992; 62: 363-372.
51. Foltmann B. Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52 (Suppl. 210): 65-79.
52. Sangild PT, Fowden AL and Trahair JF. How does the foetal gastrointestinal tract develop in preparation for enteral nutrition after birth?. *Livestock Prod Sci* 2000; 66: 141-150.
53. Trahair JF, Perry RA, Silver M and Robinson PM. Enterocyte migration in the foetal sheep small intestine. *Biol Neonate* 1986; 50: 214-220.
54. Trahair JF and Robinson PM. Perinatal development of the small intestine of the sheep. *Rep Nutr Dev* 1986; 26: 1255-1263.

55. Britton JR and Koldovsky O. Development of luminal differendigestion: Implications for biologically active dietary poly-peptides. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; 9: 144-162.
56. Dinsdale D and Healy PJ. Enzymes involved in protein transmission by the intestine of the newborn lamb. *Histochem J* 1982; 14: 811-821.
57. Healy PJ. Lysosomal enzymes in the intestine of the newborn lamb. *Biol Neonate* 1984; 46: 186-191.
58. Sangild PT, Fowden AL and Silver M. Development and glucocorticoid regulation of brushborder hydrolases in the small intestine of the ovine fetus. Proceedings of the Thorburn Symposium, Hamilton Island, abstract.1994.
59. Sangild PT, Sjöström H, Noren O, Fowden A.L and Silver M.. The prenatal development and glucocorticoid control of brush-border hydrolases in the pig small intestine. *Pediatr Res* 1995; 37: 207-212.
60. Zhang H, Malo C and Buddington RK. Suckling induces rapid intestinal growth and changes in brush border digestive functions of newborn pigs. *J Nutr* 1997; 127: 418-426.
61. Widdowson EM. Development of the digestive system: comparative animal studies. *Am J Clin Nutr* 1985; 41: 384-390.
62. Manners MJ and Stevens JA. Changes from birth to maturity of lactase and sucrase activity in the mucosa of the small intestine of pigs. *Br J Nutr* 1972; 28: 113-127.
63. Leibbrandt VD, Ewan RC., Speer RC and Zimmerman DR. Effect of weaning and age at weaning on baby pig performance. *J Anim Sci* 1977; 40: 1077-1080.
64. Buddington RK and Malo C. Intestinal brush-border mem-brane enzyme activities and transport functions during the prenatal development of pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 23: 51-64.
65. Sangild PT, Diernæs L, Christiansen IJ and Skadhauge E. Intestinal transport of sodium, glucose and immunoglobulin in neonatal pigs. Effect of glucocorticoids. *Exp Physiol* 1993; 78: 485-497.
66. Sangild PT, Trahair JF, Loftager MK and Fowden AL. Intestinal macromolecule absorption in the fetal pig after infusion of colostrum in utero. *Pediatr Res* 1999; 45: 595-602.

67. Sangild PT, Holtug K, Diernæs L, Schmidt M and Skadhauge E. Birth and prematurity influence intestinal function in the newborn pig. *Comp Biochem Physiol* 1997; 118A: 359-362.
68. Westrom BR, Ohlsson BG, Svendsen J, Tagesson C and Karlsson BW.. Intestinal transmission of macromolecules (BSA- and FITC-dextran) in the neonatal pig: enhancing effect of colostrum, proteins and proteinase inhibitors. *Biol Neonate* 1985; 47: 359-366.
69. Silver M, Fowden AL.. Pituitary-adrenocortical activity in the fetal pig in the last third of gestation. *Q J Exp Physiol* 1989; 74: 197-206.
70. Liggins GC. Adrenocortical-related maturational events in the fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126: 931-941.
71. Sangild PT, Foltmann B, Cranwell PD. Development of gastric proteases in fetal pigs and pigs from birth to thirty six days of age. The effect of adrenocorticotropin (ACTH). *J Dev Physiol* 1991; 16: 229-238.
72. Trahair JF, Perry RA, Silver M, Robinson PM. Studies on the maturation of the small intestine in the fetal sheep. II. The effects of exogenous cortisol. *Q J Exp Physiol* 1987; 72: 71-79.
73. Svendsen LS, Westrom BR, Svendsen J, Olsson AC, Karlsson BW. Intestinal macromolecular transmission in underprivileged and unaffected newborn pigs: implication for survival of underprivileged pigs. *Res Vet Sci* 1990; 48: 184-189.
74. Trahair JF and Sangild PT. Enteral diet composition alters development of the GIT and other fetal organs. *Gastroenterology* 1999; 116: A582.
75. Trahair JF and Harding R. Restitution of fetal swallowing restores intestinal growth after mid-gestation oesophageal obstruction. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20: 156-161.
76. Trahair JF and Harding R. Ultrastructural anomalies in the fetal small intestine indicate that fetal swallowing is important for normal development: an experimental study. *Virchows Arch [A]* 1992; 420: 305-312.
77. Trahair JF and Sangild PT. Systemic and luminal influences on the perinatal development of the gut. *Equine Vet J* 1997; 24 (Suppl.): 40-50.

78. Sangild PT, Trahair JF, Silver M and Fowden AL. Luminal fluids affect intestinal enzyme activities in prenatal pigs. *Eur Ass Anim Prod* 1997; 88: 194-197.
79. Sangild PT, Hilsted L, Bjørnskov-Bartholdy L, Holst JJ and Trahair JF. Gastrin release in the fetal lamb in response to luminal infusion of amniotic fluid, milk or GRP. *Reg Peptides* 1996; 64: 167.
80. Sangild PT, Hilsted L, Silver M and Fowden AL. Gastrin secretion in response to amniotic fluid or milk in the fetal pig GI tract. *Reg. Peptides* 1996; 64: 167.
81. Zhang H, Malo C, Boyle CR and Buddington RK. Diet influences development of the pig (*Sus scrofa*) intestine during the first 6 hours after birth. *J Nutr* 1998; 128: 1302-1310.
82. Weström BR, Ohlsson BG, Svendsen J, Tagesson C and Karlsson BW. Intestinal transmission of macromolecules (BSA- and FITC-dextran) in the neonatal pig: enhancing effect of colostrum, proteins and proteinase inhibitors. *Biol Neonate* 1985; 47: 359-366.
83. Playford RJ, Macdonald CE and Jhonson WS. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 5-14.
84. Koletzko B, Aggett PJ, Bindels JG, et al. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *Br J Nutr* 1998; 80(suppl): S5-45.
85. Kiriyaama H. Enzyme-linked immunosorbent assay of colostral IgG transported into lymph and plasma in neonatal pigs. *Am J Physiol* 1992; 263: R976-R980.
86. Yvon M, Levieux D, Valluy MC, Pelissier JP and Mirand PR. Colostrum protein digestion in newborn lambs. *J Nutr* 1993; 123: 586-596.
87. Carver JD and Barness LA. Trophic factors for the gastrointestinal tract. *Neonatal Gastroenterology* 1996; 23: 265-85.
88. Windmueller HG. Glutamine utilization by the small intestine. *Adv Enzymol* 1982; 53: 202-237.
89. Ashy AA and Ardawi MSM. Glucose, glutamine and ketone body metabolism in human enterocytes. *Metabolism* 1988; 37: 602-609.
90. Bulus N, Cersosimo E, Ghishan F and Abumrad N. Physiologic importance of glutamine. *Metabolism* 1989; 38(suppl): 1-5.

91. Levy J. Immunonutrition: the pediatric experience. *Nutrition* 1998;14: 641-7.
92. Koldovsky O. Hormones in milk: their possible physiological significance for the neonate. In: Leibel E, ed. *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy*. 2nd ed. New York: Raven Press Ltd, 1989.
93. Koldovsky O. Hormonally active peptides in human milk. *Acta Paediatr* 1994; 402(suppl): 89-93.
94. Baram T, Koch Y, Hazum E and Friedkin M. Gonadotropin-releasing hormone in milk. *Science* 1977; 198: 300-2.
95. Garofalo RP and Goldman AS. Cytokines, chemokines, and colonystimulating factors in human milk: the 1997 update. *Biol Neonate* 1998; 74: 134-42.
96. Barnard JA, Beauchamp RD, Russell WE, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their relevance to gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology* 1995; 108: 564-80.
97. Read LC, Francis GL, Wallace JC and Ballard FJ. Growth factor concentrations and growth-promoting activity in human milk following premature birth. *J Dev Physiol* 1985; 7: 135-45.
98. Playford RJ, Woodman AC, Clark P, et al. Effect of luminal growth factor preservation on intestinal growth. *Lancet* 1993; 341: 843-8.
99. Playford RJ, Hanby A, Gschmeissner S, Peiffer LP, McGarrity T and Wright NA. The epidermal growth factor receptor (EGF-R) is present on the basolateral, but not the apical, surface of enterocytes in the human gastrointestinal tract. *Gut* 1996; 39: 262-6.
100. Kelly D, McFadyen M, King TP, Morgan PJ. Characterization and autoradiographic localization of the epidermal growth factor receptor in the jejunum of neonatal and weaned pigs. *Reprod Fertil Dev* 1992; 4: 183-91.
101. Okuyama H, Urao M, Lee D, Drongowski RA, Coran AG. The effect of epidermal growth factor on bacterial translocation in newborn rabbits. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 225-8.
102. Okada M, Ohmura E, Kamiya Y, et al. Transforming growth factor (TGF)- α in human milk. *Life Sci* 1991;48:1151-6.

103. Carlidge SA and Elder JB. Transforming growth factor α and EGF levels in normal human gastrointestinal mucosa. *Br J Cancer* 1989; 60: 657-60.
104. Playford RJ. Leading article: peptides and gastrointestinal mucosal integrity. *Gut* 1995; 37: 595-7.
105. Marchbank T and Playford RJ. Bovine colostrum or TGF β (a major bioactive constituent of colostrum) are prophylactic against indomethacin induced injury. *Gut* 1998; 42(suppl): A68 (abstr).
106. Dignas AU and Podolsky DK. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor- β . *Gastroenterology* 1993;105:1323-32.
107. Daughaday WH and Rotwein P. Insulin-like growth factors I & II. Peptide messenger RNA-like structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989;10:68-91.
108. Lund PK, Zimmermann EM. Insulin-like growth factors and inflammatory bowel disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1996;10:83-96.
109. Han VKM, D'Ercole AJ, Lund PK. Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* 1987;236:193-7.
110. Lo H-C, Hinton PS, Yang H, et al. Insulin-like growth factor-I but not growth hormone attenuates dexamethasone-induced catabolism in parenterally fed rats. *J Parenter Enteral Nutr* 1996;20:171-7.
111. Gluckman PD, Mellor DJ, inventors. Use of growth factor IGF-II. International patent application 93/25227. 1993.
112. Masson PL, Heremans JF. Lactoferrin in milk from different species. *Comp Biochem Physiol* 1971;39:119-29.
113. Aisen P and Listowsky I. Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem* 1980;49:357-93.
114. Arnold RR, Brewer M and Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of micro-organisms. *Infect Immunol* 1980;28:893-8.

115. Hagiwara T, Shinoda I, Fukuwatari Y, Shimamura S. Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995;59:1875-81.
116. Playford RJ. Recombinant peptides for gastrointestinal ulceration: still early days. *Gut* 1997;40:286-7.
117. Binns RM. In *Hitophysiology of the immune system*. Fossum S and Rolstad B, Eds (Elsaiver, Amsterdam) 1982; 95-146.
118. Kovaru F, Kovaru H and Fisar Z. In 12th Congress of the international pig veterinary society, 17-20 August, 1992, Prague (Hauge Royal Veterinary Association, Hague); 396.
119. Trebichavsky I, Pospisil R and Nyklicek O. The development of B lymphocytes and their reactivity in pig fetuses. *Adv Exp Biol. Med* 1993; 149: 25-30
120. Tlaskalova-Hogenova H, Mandel L, Trebichavsky I, Kovaru F, Barot R et al. Development of immune responses in early pig ontogeny. *Vet Imm and Immunopatho* 1994; 43: 135-142.
121. Pabst R and Rothkötter HJ. Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Vet Immunol and Immunopathol* 1999; 72: 167-173.
122. Holland RE. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin Microb Rev* 1990; 3: 345-375.
123. Bourne FJ, Newby TJ, Evans P and Morgan K. The immune requirements of the newborn pig and calf. *Annales de Recherches Veterinaires* 1978; 9: 239-243.
124. Gaskins HR and Kelley KW. Immunology and neonatal mortality. In: *The neonatal pig. Development and survival*. Ed MA Varley, CAB International. United Kingdom 1995; 39-55.
125. Porter P. Immune system. In: *Disease of Swine*. Ed Leman AD, 6th edn. Iowa State University Press, Ames 1986; 44-57.
126. Kagnoff MF. Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterology* 1993; 105: 1275-1280.

127. McCracken V J and Lorenz R G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology* 2001; 1: 1-11
128. Vega-López MA, Bailey M, Stevens K and Stokes CR. Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1993; 37: 49-60.
129. Vega-López MA, Bailey M, Telemo E and Stokes CR. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet Immunol and Immunopathol* 1995; 44: 319-327.
130. Rothkötter HJ, Ulrich H and Pabst R. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatric Research* 1991; 237-242.
131. Kagnoff MF. Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterology* 1993; 105: 1275-1280.
132. Hass W, Pereira P and Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Ann Rev of Immun* 1993; 11: 637-685.
133. Rothkötter HJ, Kirchhoff T and Pabst R. Lymphoid and non-lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs. *Gut* 1994; 35: 1582-1587.
134. Rothkötter HJ, Möllhoff S and Pabst R. The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs. *Scand J Immunol* 1999; 50:31-33.
135. Stokes CR, Vega-López MA, Bailey M, Telemo E and Miller BG. Immune development in the gastrointestinal tract of the pig. In: Varley MA, Williams PEV and Lawrence TLJ (eds) *Neonatal Survival and Growth. Occasional Publication No. 15. British Society of Animal Production*, Reading: 9-12.
136. Krachenbuhl JP and Neutra MR. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiological Rev* 1992; 72: 853-879.

137. Den Hond E, Hiele M, Peeters M, Ghoos Y and Rutgeerts P. Effect of long-term oral glutamine supplements on small intestinal permeability in patients with Crohn's disease. *J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23: 7-11.
138. Graham TE, Sgro V, Friars D and Gibala MJ. Glutamate ingestion: the plasma and muscle free amino acid pools of resting humans. *Amer J of Phys- Endocrin and Metabolism* 2000; 278: E83-E89.
139. Neu J, Shenoy V and Chakrabarti R. Glutamine nutrition and metabolism: Where do we go from here? *FASEB J* 1996; 10: 829-837.
140. Elia M and Lunn PG. The use of glutamine in the treatment of gastrointestinal disorders in man. *Nutrition* 1997; 13: 743-747.
141. Griffiths RD, Jones Ch and Palmer ATE. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. *Nutrition* 1997; 13: 295-302.
142. Pierzynowski SG and Sjödin A. Perspectives of glutamine and its derivatives as feed additives for farm animals. *J of Anim and Feed Sci* 1998; 7: 79-91.
143. Nissim I. Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes. *Amer J of Phys- Renal Phys* 1999; 277: F493-F497.
144. McCauley R, Kong S-E, Heel K and Hall JC. The role of glutaminase in the small intestine. *IJBCB* 1999; 31: 405-413.
145. Windmueller HG and Spaeth AE. Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate and, aspartate. *J Biol Chem* 1980; 255: 107-112.
146. Pierzynowski SG, Valverde Piedra JL, Hommel-Hansen T and Studzinski T. Glutamine in gut metabolism. In *Gut environment of pigs*. Ed. Nottingham University Press. 2001; 43-62.
147. Sarantos P, Ockert K and Souba WW. Endotoxin stimulates lymphocyte glutaminase expression. *Arch Sur* 1993; 128: 920-924.
148. Baskerville A, Hambleton P and Benbough JE. Pathological features of glutaminase toxicity. *Br J Ex Pathol* 1980; 61: 132-138.

149. Hambleton P, Benbough JE Baskerville A, Harris-Smith PW. Clinical biochemical aspects of glutaminase toxicity in rabbits and Rhesus monkeys. *Br J Ex Pathol* 1980; 61: 208-216.
150. Wu G and Knabe D. Free and protein-bound amino acids in sow's calostrum and milk. *J Nutr* 1994; 124: 415-424.
151. Davis TA, Nguyen HV, Garcia BR, Fiorotto LM, Jackson EM and et al. Amino acid composition of human milk is not unique. *J Nutr* 1994; 124: 1126-1132.
152. Posho L, Darcy-Vrillon B, Blachier F and Duée PH. The contribution of glucose and glutamine to energy metabolism in newborn pig enterocytes. *J Nutr Biochem* 1994; 5: 284-290.
153. Wu G, Meier SA and Knabe DA. Dietary Glutamine Supplementation Prevents Jejunal Atrophy in Weaned Pigs. *J Nutr* 1996; 126: 2578-2584.
154. Blikslager AT, Rhoads JM, Bristol GD, Roberts MC and Argenzio RA. Glutamine and transforming growth factor- α stimulate extracellular regulated kinases and enhance recovery of villous surface area in porcine ischemic-injured intestine. *Surgery* 1999; 125: 186-198.
155. Newsholme P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection?. *J Nutr* 2001; 131: 2515S-2522S.
156. Ko TC, Beauchamp RD, Townsend CM and Thompson JC. Glutamine is essential for epidermal growth factor-stimulated intestinal cell proliferation. *Surgery* 1993; 114: 147-154.
157. Li J, King BK, Janu PG, Renegar KB, and Kudsk KA. Glycyl-L-Glutamine Enriched Total Parenteral Nutrition Maintains Small Intestine Gut-Associated Lymphoid Tissue and Upper Respiratory Tract Immunity. *JPEN* 1998; 22: 31-36.
158. Murphy C and Newsholme P. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. *Clinical Sci* 1998; 95: 397-407.
159. Ogle CK, Ogle JD, Mao JX, Simos J, Noel JG, Li BG et al. Effect of Glutamine on Phagocytosis and Bacterial Killing by Normal and Pediatric Burn Patient Neutrophils. *JPEN* 1994; 18: 128-133.

160. Yaqoob P and Calder PC. Glutamine requirement of proliferating T-lymphocytes. *Nutrition* 1997; 13: 646-651.
161. Yaqoob P and Calder PC. Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: differential sensitivity to glutamine availability. *Citokine* 1998; 10: 790-794.
162. Murphy CJ and Newsholme P. The importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. *Clin Sci (Lond)* 1999; 96: 89-97.
163. O'Dwyer ST, Smith RJ, Hwang TL and Wilmore DW. Maintenance of the small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition. *JPEN* 1989; 13: 579-585.
164. Barber AE, Jones WG, Minci JP, Fahey D, Moldawer LL, *et al.* Glutamine or fiber supplementation of a defined formula diet: impact on bacterial translocation, tissue composition, and response to endotoxin. *JPEN* 1990; 14: 335-343.
165. Wiren M, Magnusson KE and Larsson J. Enteral glutamine increases growth and absorptive capacity of intestinal mucosa in the malnourished rat. *Scand J Gastroenterology* 1995; 30: 146-152.
166. Klimberg VS, Salloum RM, Kasper M, Plumley DA, Dolson JS, *et al.* Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation. *Arch Surg* 1990; 125: 1040-1045.
167. Yoo SS, Field CJ and McBurney MI. Glutamine supplementation maintains intramuscular glutamine concentration and normalizes lymphocytes functions in infected early weaned pigs. *J Nutr* 1997; 127: 2253-2259.
168. Arii K, Kobayashi H, Kai T and Kokuba Y. Degradation kinetics of L-glutamine in aqueous solution. *Eur J of Pharmac Sci* 1999; 9: 75-78.
169. Reglamento para el cuidado de los animales en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 16 de Julio de 1996; 25-80. NOM 033-ZOO-1995.
170. Aluja SA. Necropsia en mamíferos domésticos. 1ª ed. México. Continental. 1985

171. George D and Mallery P. The Kolmogorov-Smirnov one-sample test. In: SPSS for windows step by step a simple guide and reference 10.0 Update. Edit Allyn and Bacon 3^{er} edition. USA 2001; 196-202.
172. Gendelman HE, Moench TR, Narayan O and Griffin DE. Selection of a fixative for identifying T cell subsets, B cells and macrophages in paraffin-embedded mouse spleen. *J Immunol Methods* 1983; 65: 137-145.
173. McDonald TT, Monteleone G and Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51: 2-9.
174. Bianchi AT, Zwart RJ, Jeurissen SH and Moonen-Leusen HW. Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Vet Immunol Immunopathol* 1992; 33: 201-221.
175. Levine AD and Fiocchi C. Regulation of life and death in lamina propria T cells. *Seminars in Immunology*. 13; 2001: 195-199.
176. Rothkötter HJ, Möllhof S and Pabst R. The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs. *Scand J of Immunol* 1999; 50: 31-38.
177. Abbas KA, Lichtman AH and Pober JS. Reconocimiento y activación de linfocito T por el antígeno. En: *Inmunología celular y molecular*. Interamericana McGraw-Hill 3^a Ed. Madrid España 1999: 149-185.

CUADROS

Cuadro 1. Análisis de varianza de dos vías, para evaluar el efecto de L-glutamina sobre linfocitos CD2⁺ en diferentes regiones del intestino delgado en cerdos destetados a los 14 ±2 días de edad.

Fuente de variación	Variable dependiente	Grados de libertad †	Cuadrados		Cuadrados		Cuadrados	
			medios	Significancia	medios	Significancia	medios	Significancia
			Duodeno		Yeyuno		Ileon	
d3 PD*								
Dosis	EP	2	461	0,000	163	0,007	147	0,034
	LP	2	71717408	0,001	34406343	0,001	3540737	0,105
	LP-CRI	2	205893	0,153	99090	0,317	299334	0,002
Error	EP	72	54		31		41	
	LP	72	8964070		4102670		1521379	
	LP-CRI	72	106851		84894		45838	
d7 PD*								
Dosis	EP	2	130	0,620	196	0,001	354	0,000
	LP	2	5332263	0,000	11526865	0,121	3115047	0,263
	LP-CRI	2	56350	0,097	290396	0,016	478695	0,008
Error	EP	72	269		20		31	
	LP	72	5738817		5307434		2291599	
	LP-CRI	72	23344		65752		93476	
d14 PD*								
Dosis	EP	2	68	0,822	203	0,002	65	0,485
	LP	2	35092741	0,001	466437	0,820	1188058	0,388
	LP-CRI	2	348808	0,001	194755	0,136	318708	0,005
Error	EP	72	349		30		90	
	LP	72	4895889		2339908		1239709	
	LP-CRI	72	48416		94911		55121	

* Días posdestete en que se sacrificaron 5 cerdos por tratamiento (0, 1 y 1.5% de Gln).

† Los grados de libertad indican las dosis analizadas (0, 1 y 1.5% de Gln) y para el error se indica el total de observaciones, (25 campos en diferentes regiones del intestino delgado por cerdo) por grupo en tratamiento

EP: epitelio; LP: lamina propia de vellosidad; LP-CRI: lámina propia de criptas.

Cuadro 2. Análisis de varianza de dos vías, para evaluar el efecto de L-glutamina sobre linfocitos CD3⁺ en diferentes regiones del intestino delgado en cerdos destetados a los 14 ±2 días de edad.

Fuente de variación	Variable dependiente	Grados de libertad†	Cuadrados		Cuadrados		Cuadrados	
			medios	Significancia	medios	Significancia	medios	Significancia
			Duodeno		Yeyuno		Ileon	
d3 PD*								
Dosis	EP	2	47	0,143	282	0,000	186	0,010
	LP	2	7281100	0,000	7022694	0,001	1502150	0,142
	LP-CRI	2	231195	0,001	79560	0,150	14219	0,539
Error	EP	72	28		33		747533	
	LP	72	456201		955052		37	
	LP-CRI	72	32252		40879		22822	
d7 PD*								
Dosis	EP	2	43	0,125	484	0,000	26	0,760
	LP	2	278657	0,435	1734842	0,102	807243	0,137
	LP-CRI	2	84893	0,011	502448	0,000	174225	0,027
Error	EP	72	20		53		96	
	LP	72	330964		736622		394352	
	LP-CRI	72	17820		49448		45864	
d14 PD*								
Dosis	EP	2	131	0,427	146	0,094	361	0,135
	LP	2	1111003	0,159	685234	0,396	1228336	0,037
	LP-CRI	2	6952	0,789	569907	0,000	223345	0,244
Error	EP	72	152		59		175	
	LP	72	588699		730746		355616	
	LP-CRI	72	29180		46848		155146	

* Días posdestete en que se sacrificaron 5 cerdos por tratamiento (0, 1 y 1.5% de Gln).

† Los grados de libertad indican las dosis analizadas (0, 1 y 1.5% de Gln) y para el error se indica el total de observaciones, (25 campos en diferentes regiones del intestino delgado por cerdo) por grupo en tratamiento

EP: epitelio; LP: lamina propia de vellosidad; LP-CRI: lámina propia de criptas.

Cuadro 3. Efecto de la inclusión de glutamina a diferentes porcentajes en la dieta sobre parámetros productivos de lechones destetados precozmente (14 ±2 días de edad).[@]

Periodos postdestete (días)	Tratamientos con Gln (%)		
	0%	1%	1.5%
0-3*			
CDA (gr)	98	105	115
GDP (gr)	18 ^a	92 ^b	110 ^b
CA	0,19 ^a	0,88 ^b	0,96 ^b
3-7*			
CDA (gr)	322	289	356
GDP (gr)	300	250	300
CA	0,93	0,87	0,84
7-14*			
CDA (gr)	606	547	606
GDP (gr)	211 ^a	228 ^a	578 ^b
CA	0,35 ^a	0,42 ^a	0,95 ^b

^{a,b} Valores con diferente literal difieren significativamente, P<0.05

[@] Los resultados se reportan como promedio para las variables CDA y GDP.

* El día 3 postdestete (PD), se realizó el registro de los datos con 15 cerdos por tratamiento, el día 7 PD con 10 cerdos y al final del experimento (día 14 PD) con 5 cerdos por grupo debido al sacrificio de 5 animales por tratamiento en cada periodo postdestete.

CDA: Consumo diario de alimento; GDP: Ganancia diaria de peso; CA: Conversión alimenticia.

Cuadro 4. Densidad y frecuencia del marcador CD2* en el intestino delgado a diferentes días postdestete*.

Días postdestete	Tratamientos con Glutamina (%)								
	duodeno			yeyuno			ileon		
Epitelio	0	1	1.5	0	1	1.5	0	1	1.5
0	15±6	-----	-----	9±4	-----	-----	13±6	-----	-----
3	19±10 ^a	12±5 ^b	11±5 ^b	12±6 ^a	15±5 ^{ab}	17±6 ^b	16±5 ^a	18±8 ^{ab}	21±6 ^b
7	24±9	28±22	27±16	12±4 ^a	15±5 ^{ab}	18±4 ^b	21±7 ^a	18±4 ^a	14±6 ^b
14	28±26	25±13	28±14	17±4 ^a	21±6 ^{ab}	23±6 ^b	19±12	20±10	17±5
Lamina propia									
0	3570±1664	-----	-----	3134±1172	-----	-----	2868±1056	-----	-----
3	5301±2264 ^{ab}	3842±1663 ^a	7219±4359 ^b	4551±1621 ^a	6444±2398 ^b	6698±1983 ^b	3105±1161	3517±1247	3856±1288
7	3964±1724 ^a	5159±1816 ^a	6869±3309 ^b	4304±2155	5621±3122	4674±1238	4014±1998	3545±1278	3322±1117
14	3814±1681 ^a	5778±2421 ^b	5943±2449 ^b	4801±1633	4986±1259	4719±1664	4078±1151	4062±1126	3692±1062
Lámina propia de Criptas									
0	1062±381	-----	-----	926±182	-----	-----	970±252	-----	-----
3	956±387	777±229	843±344	927±312	1052±209	995±337	734±192 ^a	776±210 ^a	941±238 ^b
7	863±157	821±140	768±161	1015±167 ^a	1146±312 ^{ab}	1228±268 ^b	755±173 ^a	947±323 ^{ab}	1024±382 ^b
14	934±177 ^a	701±234 ^b	784±243 ^b	950±365	1037±297	1127±251	841±178 ^a	1065±315 ^b	976±186 ^{ab}

*Los resultados se expresan como frecuencia celular (células/mm) en el epitelio y densidad celular (células/mm²) para lámina propia de vellosidades y criptas.

^{a,b,c} Valores con diferente literal difieren significativamente, P<0.05. Los datos se expresan como el promedio del conteo de 25 vellosidades diferentes por grupo de tratamiento ± desviación estándar.

Cuadro 5. Densidad y frecuencia del marcador CD3⁺ en el intestino delgado a diferentes días postdestete*.

Días postdestete	Tratamientos con Glutamina (%)								
	duodeno			yeyuno			ileon		
	0	1	1.5	0	1	1.5	0	1	1.5
Epitelio									
0	13±4	-----	-----	9±4	-----	-----	12±6	-----	-----
3	15±7	13±2	15±4	14±7 ^a	18±5 ^b	20±6 ^b	17±6 ^a	20±8 ^{ab}	22±4 ^b
7	16±4	18±3	18±5	16±5 ^a	19±5 ^a	24±10 ^b	20±5	22±10	22±13
14	22±13	25±12	26±12	20±9	23±6	25±8	26±15	31±15	24±9
Lamina propia									
0	1023±482	-----	-----	956±826	-----	-----	1561±561	-----	-----
3	1229±732 ^a	809±564 ^a	1880±718 ^b	1080±488 ^a	1848±1114 ^b	2096±1178 ^b	1974±1068	2294±777	1812±707
7	1014±626	813±513	968±581	1452±817	1667±836	1976±918	1692±629	1503±611	1862±643
14	1402±1156	994±281	1105±592	2236±952	2341±717	2016±878	1493±678 ^{ab}	1790±601 ^a	1356±495 ^b
Lámina propia de Criptas									
0	461±116	-----	-----	605±152	-----	-----	1012±853	-----	-----
3	599±192 ^a	423±143 ^b	579±198 ^a	636±177	701±255	589±162	371±134	394±114	419±194
7	514±166 ^{ab}	569±122 ^a	452±105 ^b	598±119 ^a	872±334 ^b	798±150 ^b	333±123 ^a	500±304 ^b	416±174 ^{ab}
14	504±133	511±190	479±184	587±183 ^a	595±219 ^a	852±243 ^b	472±282	534±609	348±119

*Los resultados se expresan como frecuencia celular (células/mm) en el epitelio y densidad celular (células/mm²) para lámina propia de vellosidades y criptas.

^{a,b,c} Valores con diferente literal difieren significativamente, P<0.05. Los datos se expresan como el promedio del conteo de 25 vellosidades diferentes por grupo de tratamiento ± desviación estándar.

FIGURAS

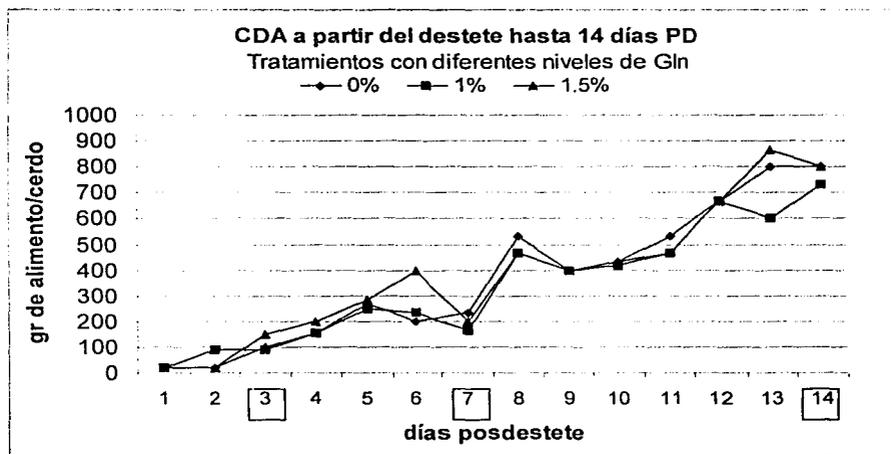


Figura 3. Consumo diario de alimento (CDA) en lechones destetados precozmente (14 ± 2 días de edad), suplementados con diferentes niveles de glutamina. Cada punto representa el valor promedio de 15, 10 y 5 cerdos a los 3, 7 y 14 días postdestete respectivamente por grupo experimental.

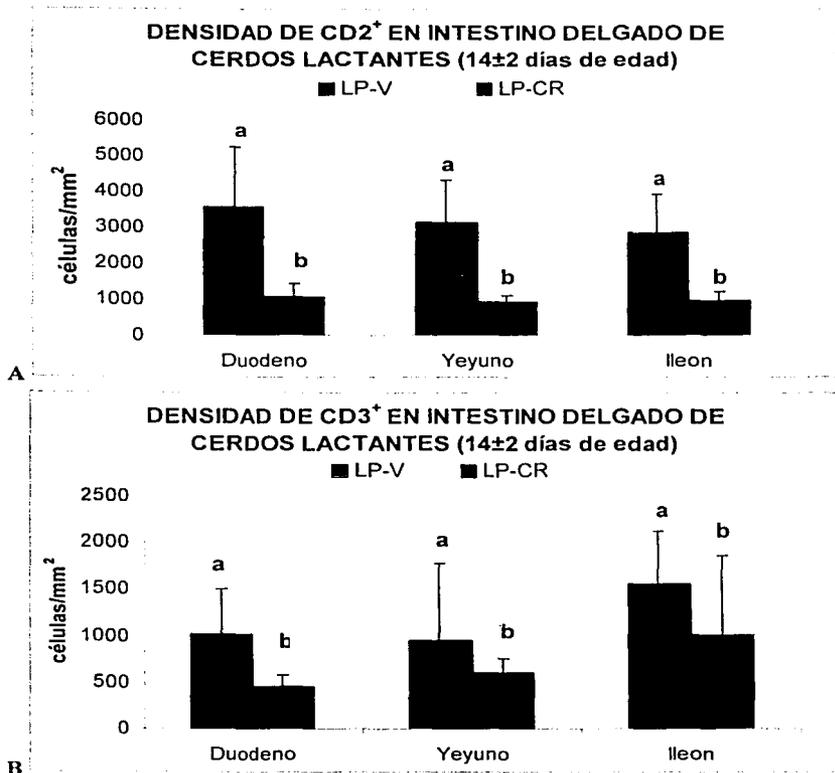


Figura 4. Proporción de CD2⁺ y CD3⁺ (células/mm²) en LP y LP-CR de intestino delgado en cerdos lactantes (14± días de edad). Cada barra representa el valor promedio ± DE del conteo de 25 diferentes vellosidades por grupo en tratamiento; valores con diferente literal difieren significativamente, P<0.05. LP: Lámina propia, LP-CR: Lámina propia de criptas.

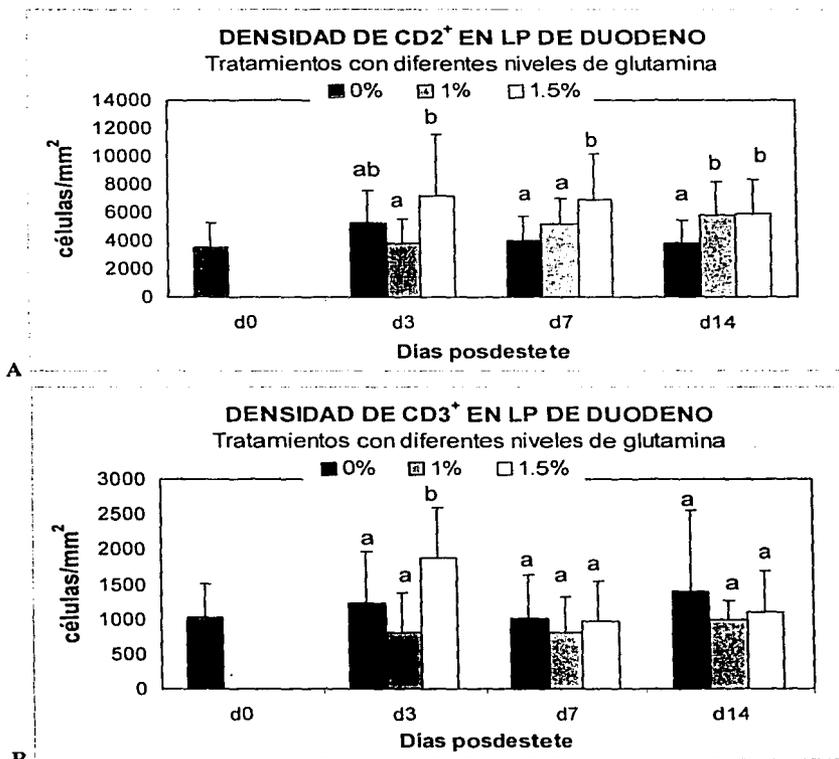
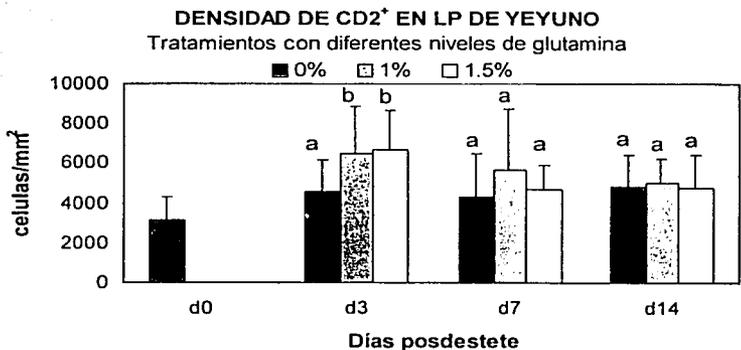
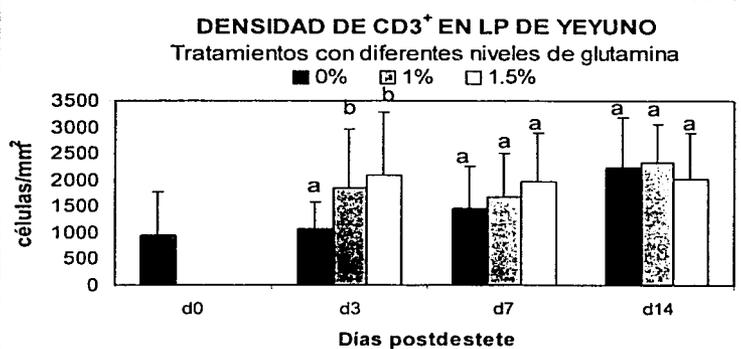


Figura 5. Cambios en la densidad (células/mm²) de CD2⁺ y CD3⁺ en LP de duodeno en cerdos lactantes (14± días de edad) y destetados a diferentes días, suplementados con diferentes niveles de glutamina. Cada barra representa el valor promedio ± DE del conteo de 25 diferentes vellosidades por grupo en tratamiento; valores con diferente literal difieren significativamente, P<0.05. LP: Lámina Propia.

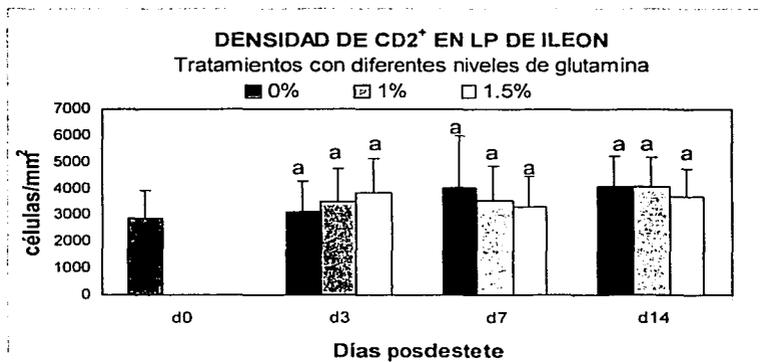


A

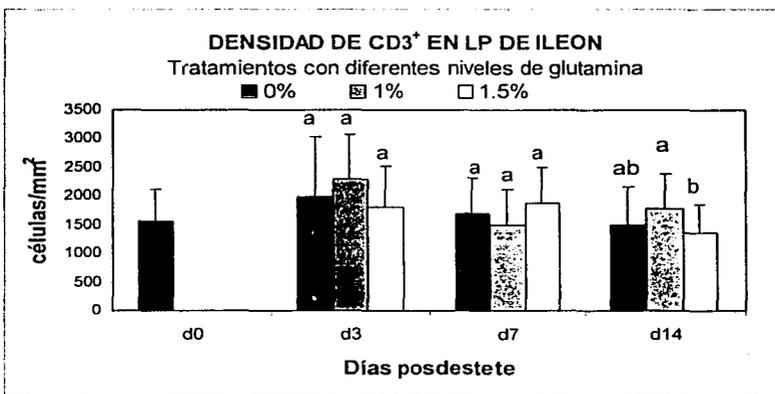


B

Figura 6. Cambios en la densidad (células/mm²) de CD2⁺ y CD3⁺ en LP de yeyuno en cerdos lactantes (14± días de edad) y destetados a diferentes días, suplementados con diferentes niveles de glutamina. Cada barra representa el valor promedio ± DE del conteo de 25 diferentes vellosidades por grupo en tratamiento; valores con diferente literal difieren significativamente, P<0.05. LP: Lámina Propia.

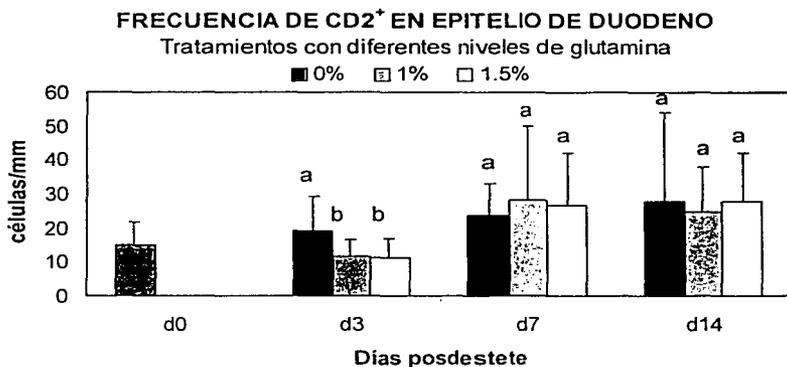


A

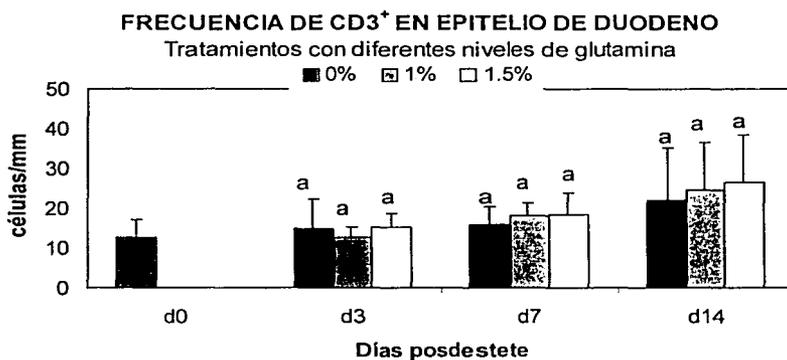


B

Figura 7. Cambios en la densidad (células/mm²) de CD2⁺ y CD3⁺ en LP de ileon en cerdos lactantes (14 ± días de edad) y destetados a diferentes días, suplementados con diferentes niveles de glutamina. Cada barra representa el valor promedio ± DE del conteo de 25 diferentes vellosidades por grupo en tratamiento; valores con diferente literal difieren significativamente, P < 0.05. LP: Lamina Propia.

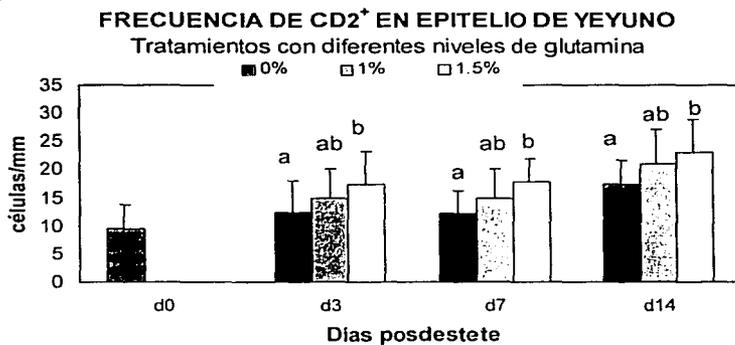


A

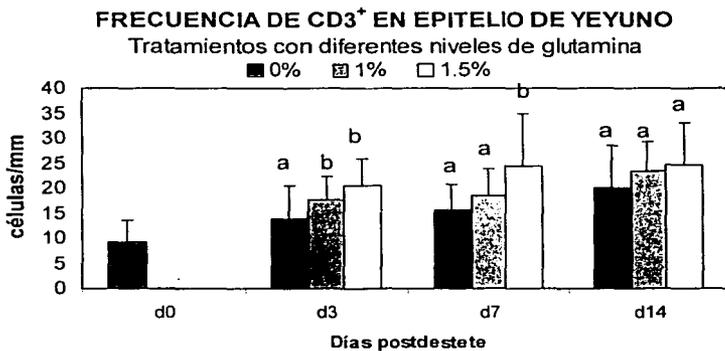


B

Figura 8. Cambios en la frecuencia (células/mm²) de CD2⁺ y CD3⁺ en EP de duodeno en cerdos lactantes (14± días de edad) y destetados a diferentes días, suplementados con diferentes niveles de glutamina. Cada barra representa el valor promedio ± DE del conteo de 25 diferentes vellosidades por grupo en tratamiento; valores con diferente literal difieren significativamente, P<0.05.



A



B

Figura 9. Cambios en la frecuencia (células/mm²) de CD2⁺ y CD3⁺ en EP de yeyuno en cerdos lactantes (14 ± días de edad) y destetados a diferentes días, suplementados con diferentes niveles de glutamina. Cada barra representa el valor promedio ± DE del conteo de 25 diferentes vellosidades por grupo en tratamiento; valores con diferente literal difieren significativamente, P < 0.05.

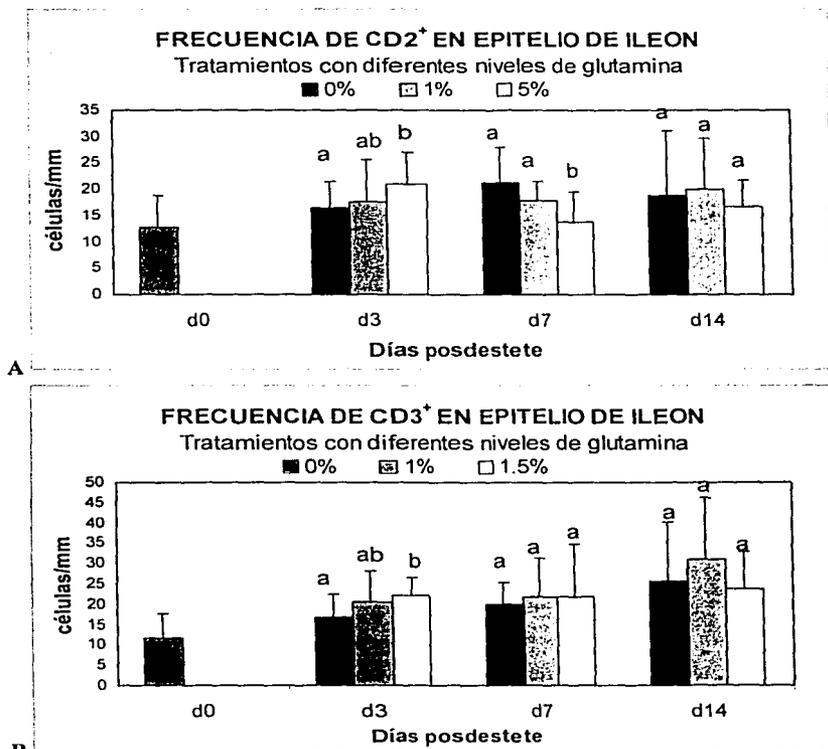


Figura 10. Cambios en la frecuencia (células/mm²) de CD2⁺ y CD3⁺ en EP del ileon en cerdos lactantes (14± días de edad) y destetados a diferentes días, suplementados con diferentes niveles de glutamina. Cada barra representa el valor promedio ± DE del conteo de 25 diferentes vellosidades por grupo en tratamiento; valores con diferente literal difieren significativamente, P<0.05.

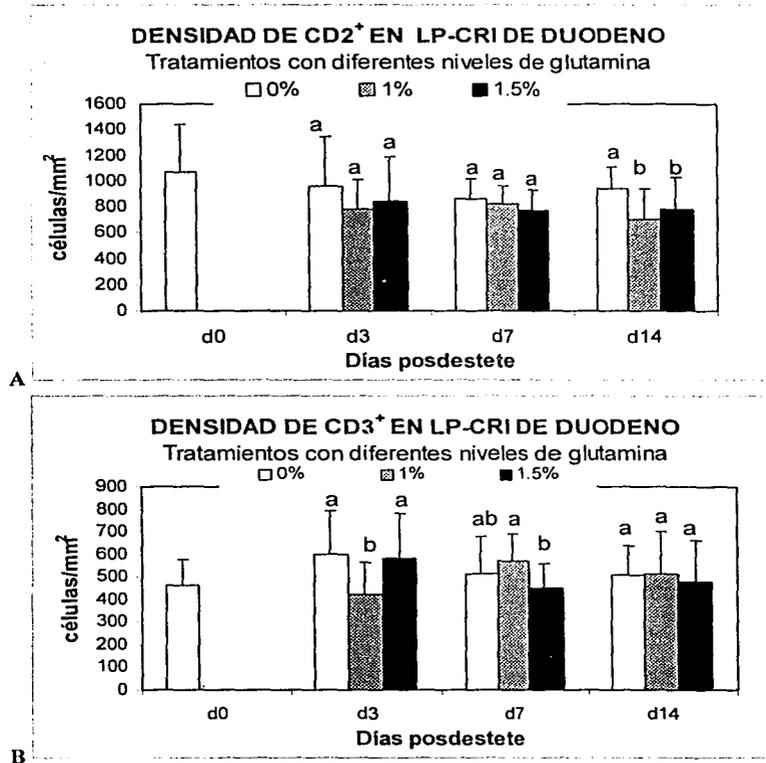
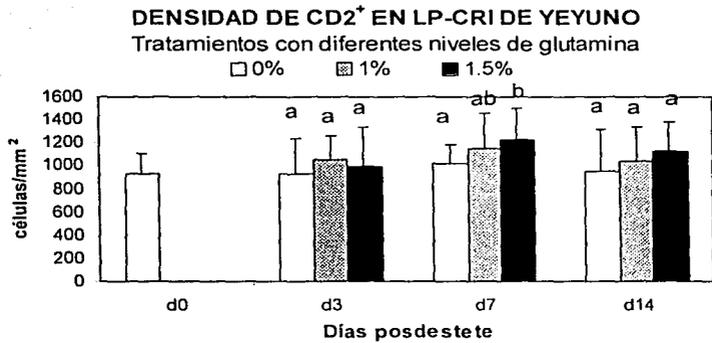
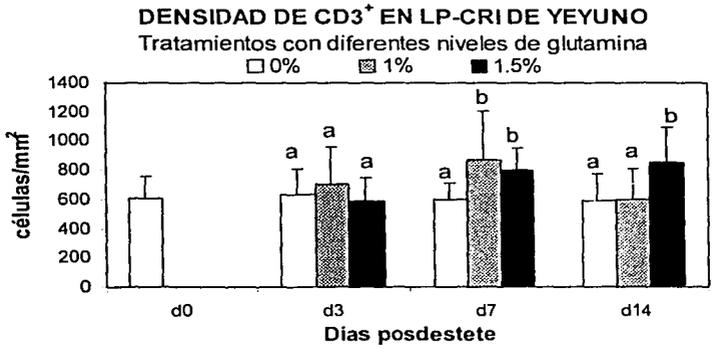


Figura 11. Cambios en la densidad (células/mm³) de CD2⁺ y CD3⁺ en CRI del duodeno en cerdos lactantes (14± días de edad) y destetados a diferentes días, suplementados con diferentes niveles de glutamina. Cada barra representa el valor promedio ± DE del conteo de 25 diferentes vellosidades por grupo en tratamiento; valores con diferente literal difieren significativamente, P<0.05. LP-CRI: Lámina propia de criptas.



A



B

Figura 12. Cambios en la densidad (células/mm²) de CD2⁺ y CD3⁺ en CRI de yeyuno en cerdos lactantes (14± días de edad) y destetados a diferentes días, suplementados con diferentes niveles de glutamina. Cada barra representa el valor promedio ± DE del conteo de 25 diferentes vellosidades por grupo en tratamiento; valores con diferente literal difieren significativamente, P<0.05. LP-CRI: Lámina propia de criptas.

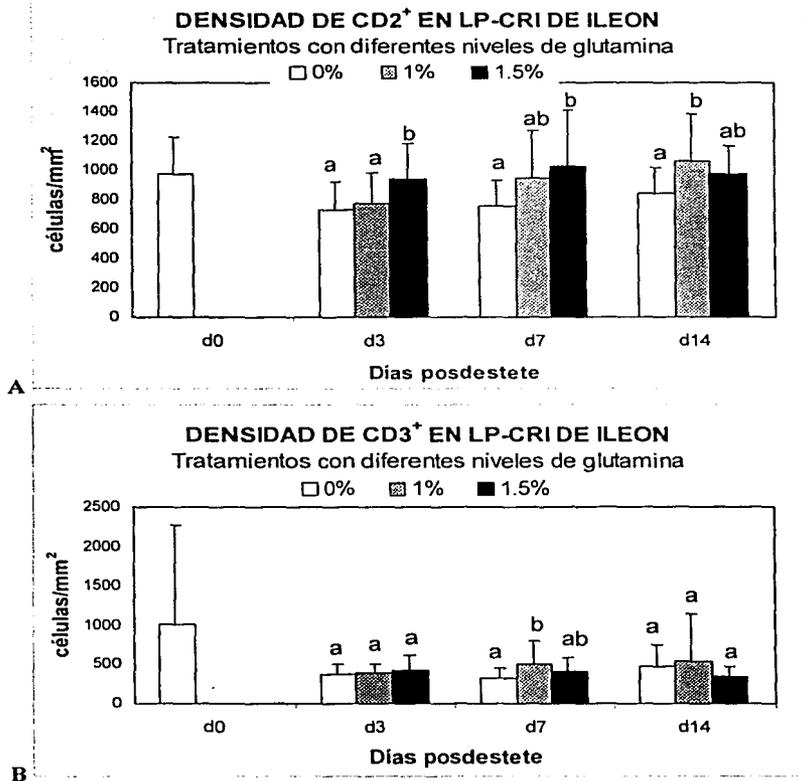
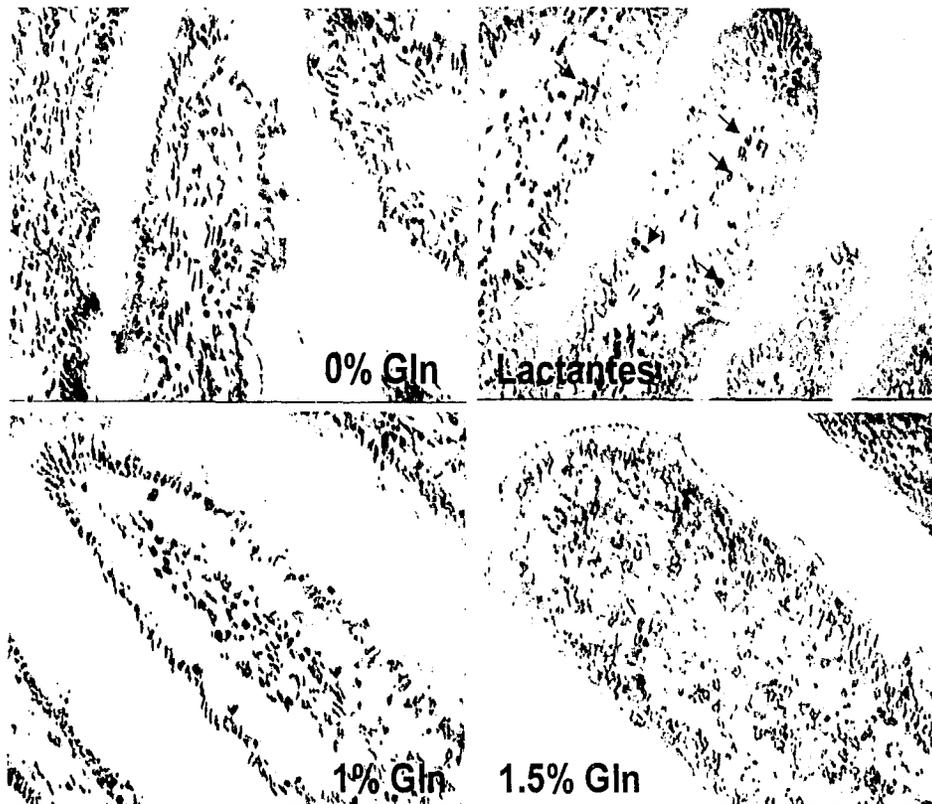
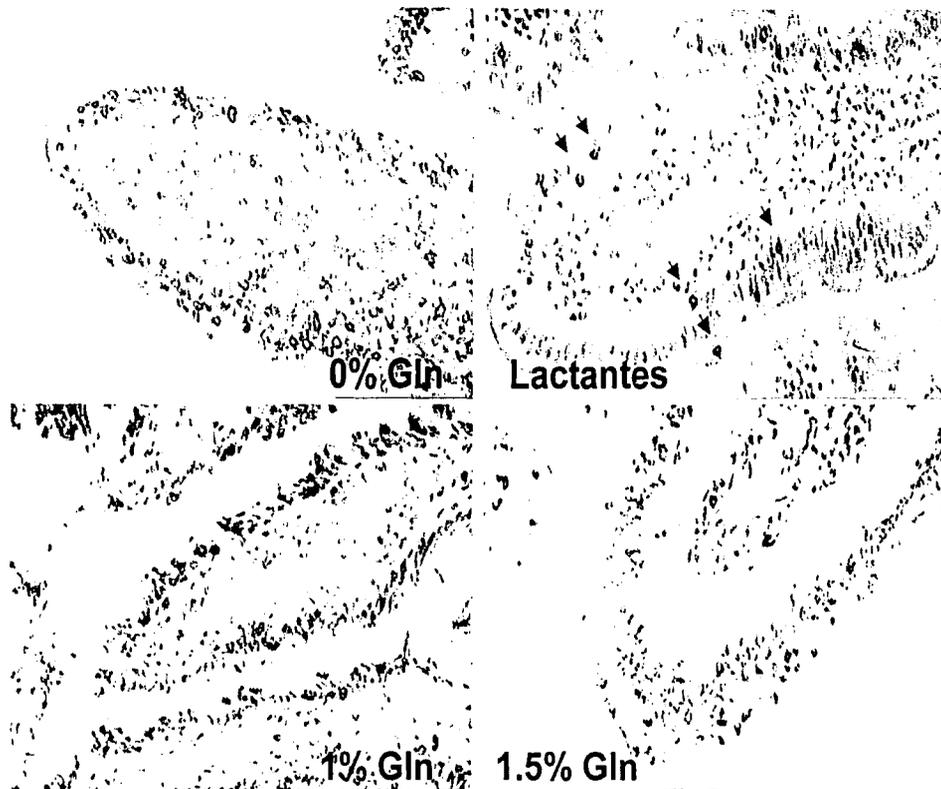


Figura 13. Cambios en la densidad (células/mm²) de CD2⁺ y CD3⁺ en CRI de ileon en cerdos lactantes (14± días de edad) y destetados a diferentes días, suplementados con diferentes niveles de glutamina. Cada barra representa el valor promedio ± DE del conteo de 25 diferentes vellosidades por grupo en tratamiento; valores con diferente literal difieren significativamente, P<0.05. LP-CRI: Lámina propia de criptas.

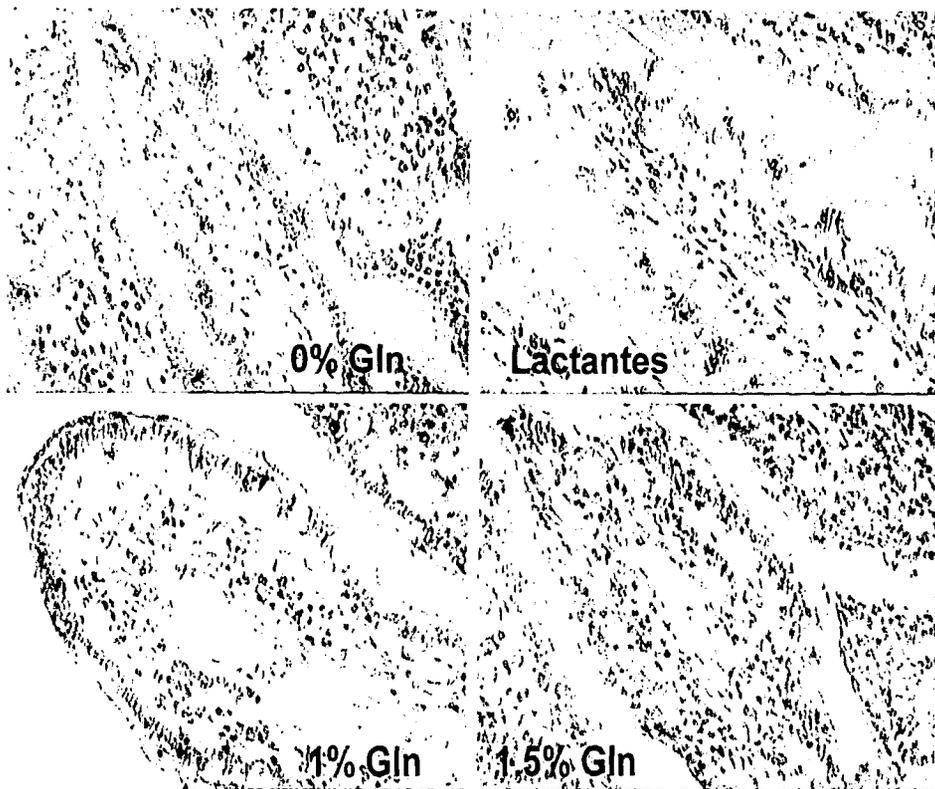
FOTOGRAFÍAS



Cortes en congelado. Efecto de Gln en la dieta sobre el desarrollo de células CD2⁺ en duodeno de cerdos sacrificados al día 3 postdestete. Un gran número de células teñidas se distribuyeron en el epitelio y lámina propia de las vellosidades (flechas). Cortes histológicos teñidos por inmunohistoquímica, contrateñidos con Hematoxilina de Harris. (200X).



cortes en congelado. Efecto de Gln en la dieta sobre el desarrollo de células CD3⁺ en duodeno de cerdos sacrificados al día 3 postdestete. Un gran número de células teñidas se distribuyeron en el epitelio y lámina propia de las vellosidades (flechas). Cortes histológicos teñidos por inmunohistoquímica, contrateñidos con Hematoxilina de Harris. (200X).



Cortes en congelado. Efecto de Gln en la dieta sobre el desarrollo de células CD2⁺ en yeyuno de cerdos sacrificados al día 3 postdestete. Un gran número de células teñidas se distribuyeron en el epitelio y lámina propia de las vellosidades (flechas). Cortes histológicos teñidos por inmunohistoquímica, contrateñidos con Hematoxilina de Harris. (200X).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN