

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**INCLUSIÓN DE L-ARGININA EN LA DIETA DEL CERDO JOVEN Y
SU EFECTO SOBRE LA FAGOCITOSIS EN EL APARATO
RESPIRATORIO**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

CARLOS ALBERTO ROLDÁN NÚÑEZ

ASESORES:

**Ph.D., MVZ GERMÁN ARTURO BORBOLLA SOSA
Ph.D., QFB MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ**

MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi abuela Guadalupe Hernández † por su amor y cariño. A la Señora Graciela Bracamontes † por tratarme con cariño y defenderme como a un hijo. A mi hermano Héctor Roldán † al que extraño y desearía poder abrazar y compartir éste mi último paso como universitario. Gracias por ser mi amigo, confidente y mi carnal. La muerte no nos roba los seres amados, al contrario nos los guarda y los inmortaliza en el recuerdo, mientras los amemos nunca morirán.

A mis padres Margarita Núñez y Héctor Roldán por su amor incondicional, su apoyo y sus consejos, sin los cuales no hubiera conseguido mis objetivos personales y académicos. Los quiero mucho.

A mis hermanos Ricardo, Josefina, Paola, Alejandra y Graciela, por creer en mí y alentarme a superar mis miedos y metas, por muy difíciles que estas fueran. Me siento muy afortunado por contar con todos ustedes y los quiero mucho.

A mi novia Lucy por ser el motor que me impulsó durante la carrera y en gran parte de la tesis. Por darme su amor, apoyo y confianza. Pícosa, la felicidad tiene nueve letras, la mía sólo dos: tú.

A mis compadres, Beto, Eduardo y Marco, gracias por su apoyo en las buenas, en las malas y en las peores. A mi bandera, Enrique (médico) y Marco (muñeco) por sus enseñanzas y por la gran camaradería que surgió durante esta tesis, ahora a perseguir la chuleta. A los chiminos, Ariadna, Víctor, Juan, Escocia, Luís, Vanesa por su amistad y por soportarme durante la carrera. Y por supuesto al chimino mayor, Adrián por ser un buen amigo, mentor y colega, del cual voy a extrañar su compañía y sus chimichistes.

Mi éxito como hijo, hermano, novio, amigo y universitario se los debo a ustedes. Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores los doctores Germán Borbolla Sosa y Marco Antonio Vega López por enseñarme a nunca rendirme ante las adversidades y el gusto de trabajar bajo presión.

A mi jurado por leer semejante Biblia y no morir en el intento, además de sus adecuadas observaciones útiles para la realización de esta tesis.

A mi Facultad por brindarme las herramientas necesarias para mi desarrollo profesional.

Al proyecto PAPITT IN227503 que financió la elaboración de esta tesis.

Al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, por facilitarme sus instalaciones y equipo de investigación, sin el cual no hubiera sido posible la realización de esta tesis. Así como el apoyo económico recibido durante mi estancia en esta institución.

Al Departamento de Producción Animal: Cerdos por facilitarme sus instalaciones durante mi etapa como tesista y por la hospitalidad brindada por todo su personal.

A todo el personal del laboratorio 5 por sus consejos, ayuda y las comidas que se organizaban para festejar el éxito de los experimentos.

Al doctor Reyes López Ordaz por su paciencia y disposición al ayudarme a realizar el análisis estadístico y resolver mis dudas.

Al doctor José Ángel Gutiérrez Pabello y al personal del laboratorio de tuberculosis y brucelosis por permitir que siga desarrollando mis conocimientos y aptitudes en el trabajo en laboratorio.

A Berenice Gálvez por ser una buena amiga y guiarme durante toda esta etapa como tesista.

A la familia Favila Humara por su apoyo durante toda la carrera, en especial a Rafael quién se ha caracterizado por ser un buen amigo.

Al Doctor Noé Aguilar por permitirme trabajar en su clínica, y enseñarme la importancia de ser atento con los clientes, actuar con ética, humanidad y responsabilidad con los pacientes y acatar el juramento que rige la profesión de MVZ.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 ARGININA	4
1.2 SÍNTESIS DE ARGININA.....	5
1.3 ARGININA EN EL CERDO	8
1.4 ARGININA Y EL SISTEMA INMUNE	10
1.5 DESTETE.....	13
1.6 EL SISTEMA INMUNE INNATO	16
1.7 FAGOCITOS: NEUTRÓFILOS Y MACRÓFAGOS	18
1.8 FAGOCITOSIS	22
1.9 ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	24
1.10 OXIDO NÍTRICO	26
1.11 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN FAGOCÍTICA.....	30
1.12 INMUNODEFICIENCIA E INMUNOSUPRESIÓN	31
1.13 APARATO RESPIRATORIO.....	34
1.14 CARACTERÍSTICAS DEL APARATO RESPIRATORIO	35
1.15 MECANISMOS DE DEFENSA DEL APARATO RESPIRATORIO	37
1.16 FACTORES PREDISONENTES A LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS	41
1.17 REPERCUSIONES ECONÓMICAS DE LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS	46
2. JUSTIFICACIÓN	48
3. HIPÓTESIS.....	49
4. OBJETIVOS	49
5. MATERIAL Y MÉTODOS	50
5.1 LOCALIZACIÓN.....	50
5.2 ANIMALES	50
5.3 INSTALACIONES	51
5.4 TRATAMIENTOS	51
5.5 MUESTRAS A UTILIZAR PARA EL EXPERIMENTO	52
5.6 VARIABLES.....	52
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
5.8 OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE SANGRE	54
5.9 OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE TONSILA PALATINA, PARÉNQUIMA PULMONAR Y LAVADO BRONQUIAL	55
5.10 TÉCNICA DE FAGOCITOSIS.....	57
5.11 OPSONIZACIÓN DE LEVADURAS PARA LA TÉCNICA DE FAGOCITOSIS.....	58
6. RESULTADOS	63
6.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE FAGOCITOSIS EN LAS CÉLULAS DE SANGRE Y DE MUCOSAS.....	63
6.2 OBTENCIÓN DE IMÁGENES PARA CONTEO CELULAR.....	65
6.3 PRUEBA DE FAGOCITOSIS	67
6.3.1 COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE FAGOCITOSIS ENTRE TEJIDOS DEL GRUPO CONTROL	67
6.3.1.1 ÍNDICE FAGOCÍTICO.....	67
6.3.1.2 CAPACIDAD FAGOCÍTICA	68
6.3.1.3 ÍNDICE REDUCTIVO	69
6.3.2 EFECTO DE LA INCLUSIÓN DEL 1% DE L-ARGININA	70
6.3.2.1 ÍNDICE FAGOCÍTICO.....	70
6.3.2.2 CAPACIDAD FAGOCÍTICA	71
6.3.2.3 ÍNDICE REDUCTIVO	72
7. DISCUSIÓN.....	73

7.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE FAGOCITOSIS EN LAS CÉLULAS DE SANGRE Y DE MUCOSAS.....	74
7.2 COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE FAGOCITOSIS ENTRE TEJIDOS DEL GRUPO CONTROL.....	77
7.2.1 ÍNDICE FAGOCÍTICO	78
7.2.2 CAPACIDAD FAGOCÍTICA.....	80
7.2.3 ÍNDICE REDUCTIVO	82
7.3 EFECTO DE LA INCLUSIÓN DEL 1% DE L-ARGININA.....	84
7.3.1 ÍNDICE FAGOCÍTICO	85
7.3.2 CAPACIDAD FAGOCÍTICA.....	89
7.3.3 ÍNDICE REDUCTIVO	91
8. CONCLUSIONES	94
9. APÉNDICE DE SOLUCIONES UTILIZADAS.....	96
10. GRAMOS DE L-ARGININA ADMINISTRADA ORALMENTE POR ANIMAL.....	98
11. ÍNDICE DE FIGURAS.....	99
12. ÍNDICE DE CUADROS.....	100
13. REFERENCIAS	101

Lista de abreviaturas

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
ACTH: Hormona adrenocorticotrópica hipofisiaria
AMØ: Macrófago alveolar
ARG: Arginina
ARN: Ácido ribonucleico
ASS: Arginosuccinato liasa
ATP: Adenosin trifosfato
BALT: Tejido linfoide asociado a los bronquios
CATs: Transportadores de aminoácidos catiónicos
CPSI: Carbamil fosfato sintetasa I
GDP: Glutaminasa dependiente de fosfato
CPA: Células presentadoras de antígenos
EGC: Enfermedad granulomatosa crónica
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
IFN: Interferón
IL: Interleucina
LAD: Lóbulo apical derecho
LAI: Lóbulo apical izquierdo
LB: Lavado bronquial
LDD: Lóbulo diafragmático derecho
LDI: Lóbulo diafragmático izquierdo
LPS: Lipolisacáridos
MDA: Muramíl dipéptido
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad
MN: Mononucleares
MPO: Mieloperoxidasa
NAGS: N-acetilglutamato sintetasa
NADPH: Nicotiamida-adenina-dinucleotido fosfato reducido
NBT: Nitro azul de tetrazolio
NK: Natural killer
NO: Óxido nítrico

VII

NOS: Óxido nítrico sintetasa
NOSI ó nNOS: Óxido nítrico sintetasa constitutiva neuronal
NOSII ó iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible
NOSIII ó eNOS: Óxido nítrico sintetasa constitutiva endotelial
NO₂: Radical nitrito
NO₃: Radical nitrato
OAT: Ornitina aminotransferasa
OH[·]: Radicales hidroxilo
OHCl: Ácido hipocloroso
ONOO⁻: Peroxinitrito
OTC: Ornitina carbamil transferasa
O₂⁻: Anión superóxido
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS: Solución amortiguadora de fosfatos
PGE₂: Prostaglandina E 2
PMA: Éster forbólico
PMN: Polimorfonucleares
PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones
P5C: Pirrolín 5 carboxilato
P5CS: Pirrolín 5 carboxilato sintetasa
QL: Quimioluminescencia
RNIs: Intermediarios reactivos de nitrógeno
ROIs: Intermediarios reactivos de oxígeno
RPMI: Medio de cultivo celular
SAN: Sangre
SFM: Sistema fagocítico mononuclear
SI: Sistema inmune
SSF: Solución salina fisiológica
TNF: Factor de necrosis tumoral
TGF-β: Factor de crecimiento transformante β
TP: Tonsila palatina
¹O₂: Singlete de oxígeno

Resumen

Roldán Núñez Carlos Alberto. Inclusión de L-arginina en la dieta del cerdo joven y su efecto sobre la fagocitosis en el aparato respiratorio (bajo la dirección de: MVZ Germán Arturo Borbolla Sosa y QFB Marco Antonio Vega López).

Las enfermedades respiratorias son una de las principales causas de mortalidad en los cerdos destetados, lo cual se atribuye a posibles deficiencias en la inmunidad local pulmonar que los hace susceptibles a las infecciones. La modulación del sistema inmune mediante la administración de inmunonutrientes como la arginina (ARG) ha ofrecido resultados satisfactorios. La ARG es un aminoácido esencial en mamíferos jóvenes en crecimiento y condicionalmente esencial en adultos en condiciones de estrés o enfermedad. En el presente estudio se evaluó el efecto de la administración oral de L-arginina cristalina sobre las células fagocíticas pulmonares del cerdo joven. Diez cerdos recién destetados (21 días de edad) fueron divididos aleatoriamente en dos grupos (n= 5 animales/tratamiento). Al grupo experimental (G1%) se le administró por vía oral el 1% de ARG en base al consumo diario de alimento (g/g) usando agua como vehículo, mientras que el grupo control (G0%) sólo recibió un placebo; ambos tratamientos duraron 30 días. Al finalizar este periodo, se sacrificaron los animales y se obtuvieron las células fagocíticas de sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD) e izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD) e izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). Mediante la prueba de fagocitosis *in vitro*, se evaluó el índice fagocítico (IF), la capacidad fagocítica (CF) y el índice reductivo (IR). Los resultados mostraron un aumento en el IF de las células de G1% en SAN, TP (P <0.001) y LDD (P <0.01) y una disminución en LAI (P <0.001). La CF de las células de SAN de G1% aumentó (P <0.001), mientras que, en LAI disminuyó (P <0.001). El IR aumentó en

células de SAN, LDD y LDI ($P < 0.001$) de G1%. Estos resultados sugieren que la inclusión del 1% de ARG oral provocó un aumento en la fagocitosis en las células inmunes sistémicas (SAN) y locales (TP y parénquima pulmonar), por lo cual su administración en el cerdo joven podría ser benéfica al brindar una mayor protección contra las infecciones respiratorias.

Abstract

Respiratory diseases are a major cause of mortality in weaned pigs as a consequence of deficiencies in the local lung immunity, which make them susceptible to infections. The administration of immunonutrients as arginine (ARG) has provided satisfactory results improving immunity. The ARG is an essential amino acid in young growing mammals and is conditionally essential in adults under stress or illness conditions. In the present study, we aimed to evaluate the oral administration effect of crystalline L-arginine on the phagocytic cells of the young pig. Ten newly weaned pigs (21 days old) were randomly divided in two groups (n= 5 animals/treatment). The experimental group (G1%) received 1% of ARG on the basis of the daily food intake (g/g) by oral route using water as vehicle, meanwhile the control group (G0%) received only placebo; both treatments lasted 30 days. At the end of this period, animals were slaughtered and phagocytic blood cells (BC), palatine tonsil (PT), right and left apical lobes (RAL) (LAL), right and left diaphragmatic lobes (RDL) (LDL) as well as bronchial lavage cells (BL) were obtained. Phagocytic index (PI), phagocytic capacity (PC) and reductive index (RI) were evaluated through phagocytosis test *in vitro*. The results showed a PI increase in the G1% group cells from BC, PT (P <0.001) and RDL (P <0.01) and a decrease in LAL (P <0.001). Group G1% BC cells showed increased PC (P <0.001), in contrast LAL showed diminished PC (P <0.001). The RI increased in BC, RDL and LDL cells (P <0.001) from group G1% animals. These results suggest that 1% ARG oral administration improve the systemic (BC) as well as local immunity (TP and pulmonary parenchyma). The administration of arginine to young pigs could be beneficial to improved protection against respiratory infections.

1. Introducción

1.1 Arginina

La arginina (ácido α -amino- δ -guanidín-valérico) es un aminoácido básico, cargado positivamente a pH fisiológico y portador de un grupo guanidino en su cadena lateral ⁽¹⁾. Cuenta con cuatro átomos de nitrógeno por molécula, por lo que es uno de los principales transportadores de nitrógeno en humanos y animales ⁽²⁾. Shulze y Steiger la descubrieron en extractos de semillas de alfalfa en 1886 ^(1,3). Desde entonces, diferentes estudios han revelado su importancia en los mamíferos y aves, ya que además de su papel sobre el crecimiento, es un componente útil del ciclo de la urea, descubierto en los años 30 ⁽¹⁾. Este aminoácido está involucrado en múltiples áreas fisiológicas y metabólicas y entre sus funciones destacan: sustrato de la biosíntesis de proteínas y de péptidos bioactivos, participación en la destoxificación de amonio, liberación de hormonas, biosíntesis de poliaminas, creatina y agmatina, además, se ha incrementado su estudio al descubrir su papel como sustrato precursor del óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) ^(1, 2, 4).

Existe controversia sobre su clasificación, sin embargo, se le ha catalogado como semi-esencial ⁽²⁻⁷⁾ o condicionalmente esencial ⁽¹⁾, al ser intermediario entre los aminoácidos esenciales y los no esenciales. La arginina se considera como semi-esencial para los mamíferos cuando su biosíntesis endógena no es capaz de satisfacer su requerimiento. En adultos, este aminoácido es semi-esencial en condiciones de estrés, enfermedad o trauma ⁽⁷⁻⁹⁾. En el hombre adulto, la biosíntesis endógena parece ser suficiente para satisfacer los requerimientos metabólicos y fisiológicos básicos, pero resulta insuficiente para cubrir la elevada demanda que se produce en periodos críticos como el

crecimiento, estrés, trauma o ciertas condiciones patológicas ⁽¹⁾. Los requerimientos de arginina dependen directamente de factores como: especie, edad, hábitos alimenticios y estado fisiológico ⁽³⁾. La suplementación de arginina en la dieta, es necesaria para el crecimiento óptimo o para mantener el balance de nitrógeno en animales jóvenes como: ratas, pollos, gatos, ratones, cobayos, perros, conejos, cerdos, hurones y visones ⁽³⁾. En ratas se ha demostrado que la ausencia de este aminoácido produce una marcada reducción del crecimiento corporal y renal en los machos, asociada con la pérdida de masa muscular ⁽⁹⁾.

En el ser humano, la arginina ha sido utilizada en muy diversos esquemas de tratamiento preventivo y terapéutico como son: aplicación clínica contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA); en patologías cardiovasculares (angina de pecho, falla congestiva del corazón, aterosclerosis y enfermedad coronaria, hipertensión, claudicación intermitente); en preclampsia (una de las principales causas de mortalidad en mujeres embarazadas en el país) ⁽¹⁰⁾. En quemaduras y traumatismos, cáncer, resistencia de insulina y diabetes, patologías gastrointestinales (gastritis, úlceras, enfermedad del reflujo gastroesofágico), alteraciones genitourinarias (disfunción eréctil, infertilidad en hombres y mujeres, cistitis intersticial) y demencia senil, además de ser considerado como un componente de la nutrición perioperatoria y en trabajo de parto ^(2, 4).

1.2 Síntesis de Arginina

La homeostasis de arginina en el organismo necesita de una ingesta diaria en la dieta, de su síntesis endógena y de la degradación de la misma ⁽⁸⁾. Este aminoácido es sintetizado

por tres órganos: hígado, intestino y riñón. Sin embargo, estudios realizados demuestran que la arginina producida por el hígado, es metabolizada en su mayoría *in situ*, sin liberación al torrente circulatorio ⁽¹⁾. La síntesis endógena implica la cooperación metabólica del intestino y el riñón para la conversión neta del precursor glutamato en arginina ⁽¹⁾. Sin embargo, el intestino es el único órgano que posee todas las enzimas necesarias para la conversión de la glutamina en citrulina: glutaminasa dependiente de fosfato (GDP), pirrolín 5 carboxilato sintetasa (P5Cs), ornitina aminotrasferasa (OAT), carbamil fosfato sintetasa I (CPS I), N-acetilglutamato sintetasa (NAGS) y ornitina carbamil transferasa (OTC) ⁽¹⁾.

La síntesis se inicia con la hidrólisis de la glutamina a glutamato por la GDP; posteriormente, el grupo carboxilo del glutamato sufre una reducción a semialdehído glutámico en una reacción mediada por la P5Cs con consumo de adenosín trifosfato (ATP) y nicotiamida-adenina-dinucleotido-fosfato en su forma reducida (NADPH). El semialdehído glutámico resultante experimenta una ciclación no enzimática para formar el pirrolín 5 carboxilato (P5C); el cual es el primer compuesto implicado en la síntesis de arginina a partir de glutamato. Este puede sufrir una reducción dependiente de NADPH para producir prolina o ser oxidado a glutamato, lo cual lo sitúa como un producto intermediario entre el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el ciclo de la urea. Las reacciones que transforman finalmente a la ornitina en arginina, implican a las enzimas del ciclo de la urea y, en sus etapas finales, a la arginosuccinato sintetasa (ASS) y la arginosuccinato liasa (ASL) (Figura 1). En el hombre y el resto de los mamíferos, la transformación de la citrulina en arginina ocurre en el riñón (principalmente en el túbulo proximal), lo que lo convierte en un órgano clave para el suministro de arginina a otros tejidos. Gran parte de la arginina sintetizada en el túbulo proximal entra en la

circulación y una pequeña cantidad se utiliza y/o metaboliza hasta urea en el propio riñón por la relativamente baja actividad de arginasa de este órgano ⁽¹⁾.

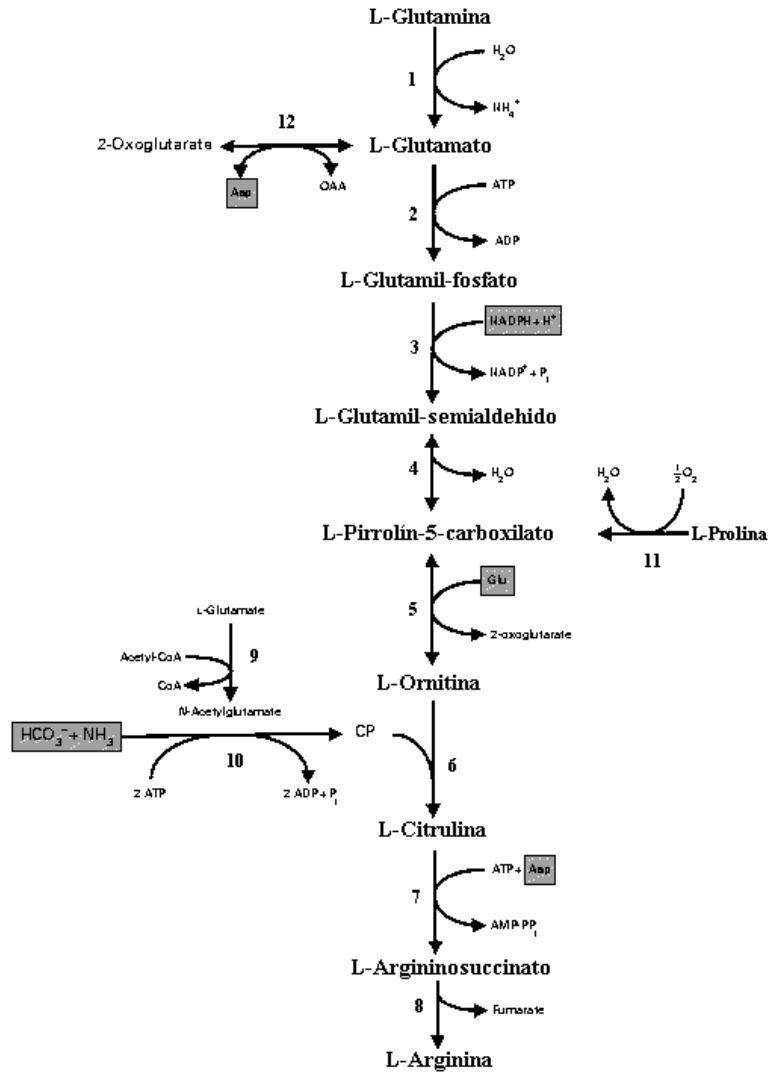


Figura 1. Vía de la síntesis endógena de Arginina. Enzimas que catalizan las reacciones: 1) glutaminasa dependiente de fosfato (GDP); 2 y 3) pirrolín 5 carboxilato sintetasa (P5Cs); 4) espontáneo, no hay reacción enzimática; 5) ornitina aminotrasferasa (OAT); 6) ornitina carbamil transferasa (OTC); 7) argininosuccinato sintetasa (ASS); 8) argininosuccinato liasa (ASL); 9) N-acetilglutamato sintetasa (NAGS); 10) carbamil fosfato sintetasa I (CPSI); 11) prolina oxidasa y 12) aspartato aminotrasferasa. Abreviaturas: OAA (oxaloacetato), CP (carbamil fosfato) ⁽⁷⁾.

Aproximadamente, 28% de la glutamina vertida al torrente circulatorio es captada por el intestino y liberada posteriormente a la circulación como citrulina; de ésta, una mínima cantidad es recogida por el hígado y otros tejidos para una posterior utilización y la

mayor parte (83%), se convierte en arginina en el riñón ⁽¹⁾. En animales adultos, aproximadamente el 60% de la síntesis neta de arginina en mamíferos adultos ocurre en el riñón, siendo este órgano el que mayor aporte de síntesis endógena de arginina ofrece en adultos ⁽⁷⁾.

En la mayoría de las células de los mamíferos, la arginina requiere de canales o transportadores; que le permitan llegar a las células, estos canales son: y^+ , $b^{o,+}$, $B^{o,+}$ o y^+L . El más importante mecanismo con el cual se modula el metabolismo celular de arginina es el y^+ , este canal se puede encontrar en una gran variedad de tipos celulares, pero está ausente en los hepatocitos. Otros aminoácidos catiónicos (lisina, ornitina) y posiblemente análogos cargados, son inhibidores efectivos de la arginina por el canal y^+ ⁽⁷⁾. Esto explicaría el antagonismo en nutrición respecto a lisina y arginina ⁽¹¹⁾.

1.3 Arginina en el cerdo

Actualmente, se considera que para la especie porcina, 10 aminoácidos son esenciales para el crecimiento, la gestación y la lactación (Cuadro 1). Un aminoácido esencial es aquel que no puede ser sintetizado por el organismo o no puede ser producido en las cantidades necesarias, por lo que necesita ser suministrado exógenamente ⁽¹²⁾.

Se ha demostrado que existe un aumento en la síntesis endógena de arginina, principalmente en el periodo neonatal en cerdos, además que la abundancia de este sustrato en la leche es menor que lo que puede generar el organismo (en neonatos representa el 30%, mientras que en adultos solo representa el 5-15%) ⁽⁷⁾. Los altos requerimientos de arginina en el cerdo neonato probablemente están relacionados con la

baja presencia de este aminoácido en la leche de las cerdas ^(7, 8). Se estima que la leche de la cerda provee menos del 40% del requerimiento total diario de arginina en lechones de 7 días de nacidos ⁽¹³⁾.

Cuadro 1. Clasificación de los aminoácidos en el cerdo ⁽¹²⁾.

Aminoácidos esenciales ^a	Aminoácidos no esenciales ^a
Lisina	Glicina
Triptófano	Serina
Metionina	Alanina
Valina	Norleucina
Histidina	Ácido aspártico
Fenilalanina	Ácido glutámico
Leucina	Ácido hidroxiglutámico
Isoleucina	Cisterna ^c
Treonina	Citrulina
Arginina ^b	Prolina
	Hidroxiprolina
	Tirosina ^d

a: indispensable y dispensable puede reemplazar el término esencial y no esencial

b: parcialmente sintetizado

c: puede sustituir 50-70% del requerimiento de metionina

d: puede sustituir 30% del requerimiento de fenilalanina

El intestino delgado de neonatos y cerdos en crecimiento, a diferencia de otras especies, es el encargado de la producción de la arginina y es capaz de liberarla al torrente circulatorio; además la actividad de la oxidasa de prolina es mayor en este órgano que en el hígado y el riñón ⁽⁷⁾. Paradójicamente, la síntesis intestinal de citrulina y arginina proveniente del glutamato, glutamina y prolina (aminoácidos abundantes en la leche de la cerda) tiene un descenso marcado en cerdos de 3 semanas de vida por mecanismos aún desconocidos ⁽¹³⁾. En el caso del cerdo en crecimiento la producción de este aminoácido es limitada. Cunha (1977) publicó que la arginina sintetizada por el organismo solo permite del 60-75% del crecimiento normal, por lo que es preciso un aporte exógeno para cubrir las necesidades diarias ⁽¹²⁾. Similarmente, Wu *et al* ⁽⁸⁾ encontraron que en cerdos de 28 kg de peso, la síntesis endógena de arginina representaba tan solo el 50.2% del total de requerimiento diario, por lo que es necesaria

la administración exógena de este aminoácido. Además, se ha demostrado que el cerdo es enzimáticamente eficiente para producir L-arginina a partir de los 40 kg de peso ⁽¹⁴⁾. Estos datos resaltan la importancia de la suplementación exógena de arginina en cerdos menores a 40 kg, considerando que mientras más ligeros de peso, mayor es la dependencia de la vía exógena para satisfacer su requerimiento.

1.4 Arginina y el sistema inmune

Existen interacciones, sinergismos y antagonismos muy importantes entre nutrición e inmunidad capaces de afectar marcadamente la productividad, ya que la nutrición puede influir en la inmunocompetencia de los animales; provocando una menor resistencia a las enfermedades. Además, la respuesta del sistema inmune a los procesos infecciosos afectan al crecimiento, metabolismo y necesidades de nutrientes, pero también los organismos patógenos pueden reducir la absorción de los mismos. La desnutrición implica un incremento de la incidencia, duración y mortalidad ligada a las enfermedades, las cuales causan anorexia y malnutrición, dando lugar a una mayor probabilidad de infecciones y a una baja productividad ⁽¹⁵⁾.

Durante la respuesta inmune se liberan citocinas, como la interleucina (IL) 1, activando a los componentes celulares (p.e. fagocitos) y humorales (p.e. anticuerpos) ⁽¹⁶⁾ (Cuadro 2), y movilizando grandes cantidades de nutrientes de otros tejidos, especialmente el músculo esquelético, para la síntesis de las proteínas de fase aguda en el hígado, para la gluconeogénesis y para la síntesis de inmunoglobulinas y células T y B del sistema inmune. La síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado (hemopexina, haptoglobina, α -macroglobulina y ceruloplasmina), protege al huésped del impacto potencialmente

dañino de la liberación de sustancias tóxicas (oxidantes, proteasas, lipasas y oxidasas) en una respuesta inmune ⁽¹⁵⁾, y las proteínas restantes se degradan como parte del mecanismo de defensa del animal para luchar contra los antígenos invasores ⁽¹⁶⁾.

Cuadro 2. Papeles superpuestos de citocinas de los leucocitos en la regulación del metabolismo ⁽¹⁵⁾

Respuesta	Citocinas responsables
General	
Descenso del consumo voluntario de alimento	IL-1, TNF
Aumento del metabolismo basal	IL-1, TNF
Aumento de la temperatura corporal	IL-1, IL-6
Metabolismo de la glucosa	
Aumento de la oxidación de la glucosa	IL-1, TNF
Aumento en la síntesis de la glucosa	IL-1
Metabolismo de los lípidos	
Menor actividad lipoproteína lipasa	IL-1, TNF
Aumento de la lipólisis en adipocitos	IL-1, TNF
Mayor síntesis hepática de triglicéridos	TNF
Metabolismo de las proteínas	
Mayor síntesis de proteínas de la fase aguda	IL-1, TNF, IL-6
Aumento de la degradación de la proteína muscular	IL-1
Metabolismo de minerales	
Aumento de la síntesis de metalotionina	IL-6
Aumento de la síntesis hepática de ceruloplasmina	IL-1, IL-6
Liberación de hormonas	
Aumento de la liberación de corticosteroides	IL-1, IL-6
Descenso de la liberación de tiroxina	IL-1
Aumento de la liberación de insulina y glucagón	IL-1, TNF

Abreviaturas: IL-1: interleucina-1; TNF: factor de necrosis tumoral; IL-6: interleucina-6

Cuando los monocitos y macrófagos reconocen a los microorganismos extraños, provocan cambios metabólicos coordinados que causan los signos clásicos de la respuesta de fase aguda: anorexia, letargia, fiebre y dolor de músculos y huesos producido por el factor de necrosis tumoral α (por sus siglas en inglés TNF α). Los signos son comunes para todos los procesos infecciosos que involucran a las células fagocíticas y se denomina estrés inmunológico. Independientemente del inmunógeno, la estimulación del sistema inmune provoca un descenso del consumo de alimento, de la ganancia diaria de peso y de la conversión alimenticia ⁽¹⁵⁾. Los cambios metabólicos representan una respuesta que altera la distribución de los nutrientes de la dieta,

disminuyendo su flujo hacia la síntesis muscular y favoreciendo en cambio los procesos metabólicos que soportan la respuesta inmune y la resistencia a la enfermedad ⁽¹⁵⁾. Estos cambios metabólicos se traducen en una menor velocidad de crecimiento, baja conversión alimenticia, una disminución de los requerimientos en todos los nutrientes y canales potencialmente más grasas ^(15, 16).

Experimentos han determinado la asociación de la arginina con el sistema inmunológico en diversas especies. Varios autores mencionan ^(5, 6), que en ratas sanas a las cuales se les administró 1% de hidrocloreuro de arginina en su dieta normal; se incremento el peso del timo asociado a un aumento en los linfocitos T. En ratas a las que se les extirpó el timo en la etapa adulta, la suplementación del 1% de arginina en la dieta, provocó un incremento de los linfocitos T y disminuyó las respuestas de hipersensibilidad considerablemente, demostrando que los efectos de este aminoácido pueden verse reflejados en los linfocitos periféricos y no sólo en los linfocitos que se encuentran en el timo.

En humanos sanos y pacientes en cuidados intensivos la respuesta mitogénica de los linfocitos de sangre periférica aumentó por la administración de arginina a dosis de 30 g/día ⁽⁵⁾. Esta misma dosis (30 g/día/3días) ha demostrado un incremento en la actividad de las células natural killer (NK, por sus sigla en inglés), la actividad citotóxica de linfocitos activados por citocinas y la reactividad mitogénica de los mismos en pacientes con estados avanzados de cáncer de seno ^(2,4). Además de aumentar la función inmune mediada por células T, la arginina estimula la reparación de heridas y la síntesis de colágeno en animales y seres humanos ⁽⁵⁾. También, se ha utilizado en pacientes hospitalizados dietas enterales con concentraciones elevadas de arginina, ácidos grasos

omega 3 (ω -3), glutamina y ácidos nucleicos, reduciendo considerablemente las infecciones postoperatorias ⁽¹⁷⁾. La finalidad de este compuesto es la de preservar e incrementar la sensibilidad de los componentes celulares del sistema inmune y/o reducir el daño ocasionado por una exagerada respuesta inflamatoria mediante la alteración de mediadores de inflamación (p.e. prostaglandinas), reduciendo el riesgo a las infecciones ⁽⁶⁾.

En las células del sistema inmune innato, principalmente en los macrófagos, la arginina es un potente estimulador, sin embargo, su efecto varía de acuerdo con la disponibilidad del aminoácido, en macrófagos peritoneales incubados con concentraciones bajas de L-arginina en el medio de cultivo (<0.1 mM) se observó un incremento en la activación y la función de la citotoxicidad de estas células contra células tumorales, la producción del anión superóxido (O_2^-) y la fagocitosis ^(5, 18). A concentraciones mayores a 1 mM, en condiciones similares, existió una supresión de la producción de O_2^- , de la citotoxicidad, la fagocitosis y la síntesis de proteínas ⁽⁵⁾. Similarmente, estudios *in vitro* de fagocitosis bacteriana por células polimorfonucleares (PMN) de humanos, demostraron que la incubación con L-arginina a concentraciones de hasta 380 μ M induce e incrementa la fagocitosis de manera dependiente de la concentración, pero la suplementación de concentraciones más altas de L-arginina la reduce progresivamente ⁽⁵⁾.

1.5 Destete

En los mamíferos, el destete es un proceso normal y paulatino, en el cual los animales comienzan a ingerir alimentos sólidos de forma simultánea con la leche materna, aunque en menores concentraciones de esta última, de tal modo que, gradualmente, el

animal joven suprime su dieta líquida ⁽¹⁹⁾. En condiciones naturales los cerdos se destetan de sus madres entre las 15 y 22 semanas de edad ⁽²⁰⁾. Sin embargo, bajo condiciones intensivas de producción, la separación materna se realiza antes del día 21 (promedio 18 a 21 días), lo que permite aumentar la producción de la cerda al destetar entre 25 a 30 cerdos al año ⁽²¹⁾. Además, esta mayor producción permite reducir las enfermedades y el costo de producción del cerdo. En países europeos es común el destete a las 3 ó 4 semanas de vida cuando los cerdos tienen un peso promedio de 6 a 7 kg. En los Estados Unidos de Norteamérica es común el destete a las 3 semanas de vida cuando el cerdo tiene un peso de 5 a 6 kg ⁽²²⁾. El destete a edades tempranas, sin embargo, puede no funcionar adecuadamente debido a varios factores, entre los que se puede mencionar: el uso de dietas y de fases de alimentación incorrectas, la utilización de comederos mal diseñados, un difícil acceso al agua y una pobre calidad de la misma, un ambiente no adecuado, mala calidad del aire, falta de higiene, una inadecuada densidad de animales, entre otras ⁽²¹⁾. El cerdo joven recién destetado de 21 días de edad promedio, es capaz de ganar 100, 200 y 400 g/día en la primera, segunda y tercera semana respectivamente, en ausencia de estrés o enfermedades ⁽²²⁾.

Al destete, el cerdo consume aproximadamente 20 a 30 g de alimento seco, y alcanza un promedio de 100 g/día al inicio de la primera semana ⁽²³⁾, el consumo de agua cae drásticamente, lo que puede deberse a la dificultad de adaptarse al nuevo bebedero y sus reservas corporales disminuyen, reduciendo su grasa corporal del 15 al 7%, para poder mantener los mínimos procesos fisiológicos ⁽²³⁾. Además, de estos cambios corporales, el cerdo experimenta una reducción en la capacidad digestiva y de absorción del intestino delgado, lo que contribuye a un menor consumo y un escaso crecimiento ⁽²⁰⁾. En la mucosa intestinal, la altura de las vellosidades intestinales disminuye y la

profundidad de las criptas aumenta en las primeras 24 horas posdestete ⁽²⁰⁾, además de una reducción de la actividad de las enzimas lactasa y sucrasa ⁽²⁰⁾. En cuanto a la altura de las vellosidades en un cerdo destetado a los 21 días de edad, ésta se reduce de 527 a 183 μm en promedio, mientras que las vellosidades de un cerdo destetado a los 31 días sólo se reducen de 410 a 299 μm ⁽²¹⁾; y se empieza a recuperar hasta los 4 días posteriores al destete ⁽²⁴⁾. Estos cambios afectan la capacidad de absorción hasta por un periodo de 7 a 14 días ⁽²¹⁾. Además, el cerdo joven tiene una limitada capacidad de producir ácido clorhídrico en el estómago, por lo que el pH se incrementa, provocando una digestión ineficiente de la proteína y una posible llegada masiva de patógenos al intestino delgado, al carecer el animal de la barrera ácido protectora ⁽²⁵⁾. Estos patógenos pueden ocasionar una proliferación de bacterias enterotoxigénicas (*E. coli*) en el intestino delgado o la fermentación de alimentos menos digestibles de la dieta en el intestino grueso, lo que puede ocasionar diarreas en los cerdos destetados ⁽²⁰⁾. El sistema digestivo en cerdos de 21 a 28 días de edad tampoco es capaz de producir cantidades apreciables de lipasas, amilasas y otras enzimas que degradan los nutrientes contenidos en materias primas de origen vegetal ⁽²⁵⁾.

Después del destete, el cerdo disminuye su consumo de alimento debido principalmente al intenso estrés que sufre al ser separado de su madre ⁽²³⁾. Los factores que generan estrés, pueden ser de índole nutricional, psicológico y ambiental, las cuales se presentan de manera simultánea. Dentro de los factores nutricionales, el cambio de alimentación es el principal, ya que de recibir un alimento palatable, digestible, caliente, de fácil digestión y el cual es ingerido simultáneamente con sus hermanos de camada en tiempos determinados por la madre y con una frecuencia de 20 a 30 veces al día; al destete el alimento que reciben es seco, frío, duro y de un sabor que desconocen ^{(20, 26,}

²⁷⁾. Además, existen constantes luchas entre los cerdos para establecer jerarquías (orden para comer, lugar de descanso, etc.) durante las primeras 24 horas posteriores a la separación materna; acciones que en conjunto generan el estrés psicológico. El cambio de alojamiento (de la jaula de maternidad a la sala de destete), en donde todo es extraño, genera también lo que se conoce como estrés ambiental ^(20, 26). La presencia de comportamientos anómalos (o vicios) como el tratar de mamar la zona umbilical o prepuccial de otros cerdos, las mordeduras de colas y orejas, la incapacidad de comer alimento sólido son signos evidentes que confirman la falta de adaptación del animal ⁽²⁶⁾ a su nueva etapa posmaterna.

1.6 El sistema inmune innato

La inmunidad innata es la primera línea de defensa de todos los organismos multicelulares (incluidas las plantas y los insectos) frente a los agentes patógenos o apatógenos. Los mecanismos de la inmunidad innata existen y funcionan en todo momento, aún antes de un encuentro con los microorganismos. En este sentido, se ha demostrado que la inhibición o eliminación de este tipo de inmunidad, aumenta considerablemente la susceptibilidad a infecciones, incluso cuando el sistema inmunitario adaptativo está intacto y funcional ⁽²⁸⁾. La inmunidad innata no sólo sirve para la defensa inicial ante la presencia de algún antígeno, sino que también “avisa” cuando ésta se presenta, por lo que el sistema inmunitario adaptativo debe poner en marcha una respuesta inmunitaria contra dicha presencia. Además, la inmunidad innata es capaz de reconocer no solo microorganismos intactos; sino componentes independientes de estos como el ARN bicatenario presente en los virus en proceso de

replicación, o las secuencias de ADN presentes en las bacterias, así como los lipopolisacáridos (LPS), ácidos teicoicos y los oligosacáridos ricos en manosa ⁽²⁸⁾.

El sistema inmune innato consta de barreras epiteliales, células y proteínas circulantes que reconocen microorganismos o sustancias producidas durante los procesos infecciosos e inician respuestas que eliminan dichos agentes ^(28, 29). Los epitelios intactos forman barreras físicas entre los microorganismos del ambiente externo y el tejido del huésped. Las principales interfases entre el ambiente y el huésped son: la piel y las mucosas del aparato digestivo y respiratorio. Las mucosas, además de estar protegidas por un epitelio continuo que evita la entrada de microorganismos, son capaces de producir péptidos que tiene una función antibiótica natural, mejor conocidos como defensinas, péptidos ricos en cisteína, que también se encuentran aunque en un porcentaje menor en los gránulos de los neutrófilos ⁽²⁹⁾. Las barreras epiteliales y las cavidades serosas contienen linfocitos T intraepiteliales y la subpoblación B-1 de linfocitos B. La línea celular del sistema inmune innato comprende a neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas, que son considerados células fagocíticas; así como las células NK, encargadas de la eliminación de células tumorales ⁽²⁹⁾. Los macrófagos y las células dendríticas también pueden funcionar como células presentadoras de antígenos (CPA) ⁽²⁹⁾. Las células fagocíticas y las células NK además, son capaces de liberar mediadores necesarios para activar a más células mediante la secreción de citocinas, y estimular la reacción celular de la respuesta inmune innata ⁽²⁸⁾.

1.7 Fagocitos: neutrófilos y macrófagos

Las células fagocíticas juegan un papel crítico en la inmunidad innata. La ingestión de microorganismos da origen a dos funciones inmunes esenciales: 1. La eliminación de los patógenos mediante la fagocitosis, gracias a enzimas hidrolíticas y complejos reactivos de oxígeno; 2. Las células fagocíticas unen las piezas de los microorganismos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) I y II, las cuales migran a la superficie de las células y son presentadas a los linfocitos, activando la inmunidad adaptativa ⁽²⁹⁾. Los neutrófilos, también denominados leucocitos PMN, son la población más abundante de leucocitos circulantes (en humanos) e intervienen en las primeras fases de la respuesta inflamatoria ⁽²⁸⁾. El citoplasma de los neutrófilos contiene dos tipos principales de lisosomas limitados por membranas: gránulos primarios o azurófilos y secundarios o específicos, los cuales están encargados de la función hidrolítica-digestiva de las células fagocíticas ⁽³⁰⁾. Los gránulos azurófilos contienen sustancias con actividad antibacteriana como son: leucina y BPI (factor que incrementa la permeabilidad de la pared celular de los microorganismos); además, contienen: lisozima, elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, varias glicosidasas ácidas y otras hidrolasas, mientras que los gránulos secundarios contienen lisozima, lactoferrina y colagenasa ⁽³⁰⁾. Después de ser ingerida una partícula y quedar dentro del fagosoma, el neutrófilo se “desgranula”; y algunos lisosomas se fusionan con el fagosoma liberando su contenido y originando el fagolisosoma ^(28, 30, 31). Las enzimas hidrolíticas y los péptidos antibacterianos pueden funcionar bajo condiciones aerobias y anaerobias para intentar destruir a los microorganismos ingeridos. Los péptidos antibacterianos actúan haciendo permeable la membrana bacteriana. Los neutrófilos mueren después de un corto tiempo en los sitios de la

inflamación, liberando enzimas hidrolíticas que contribuyen a la respuesta inflamatoria y destrucción del tejido. En el cerdo, los neutrófilos presentan alta afinidad por la marginación a los capilares del pulmón.⁽³¹⁾

Además de poseer enzimas hidrolíticas y péptidos antibacterianos en sus gránulos, el neutrófilo tiene potentes mecanismos bactericidas que pueden funcionar solo en condiciones de aerobiosis⁽³¹⁾. Estos mecanismos están relacionados con el metabolismo oxidativo de los neutrófilos. Al ser estimulado por una partícula opsonizada, el uso del oxígeno aumenta con rapidez. Esta explosión del metabolismo oxidativo tiene como resultado la producción de algunas moléculas de oxígeno fuertemente reactivas, específicamente: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), O_2^- y radicales hidroxilo (OH^\cdot)^(31, 32). Todos estos componentes pueden dañar organismos microbianos. El H_2O_2 formado después de la fagocitosis también puede reaccionar con iones haluro en una reacción catalizada por una enzima mieloperoxidasa (MPO) que se libera de los gránulos primarios. Esta reacción es uno de los mecanismos bactericidas más potentes y también es potencialmente fungicida y viricida^(31, 32).

El sistema fagocítico mononuclear (SFM) se compone de los macrófagos fijos, macrófagos circulantes (histiocitos) y sus precursores circulantes (monocitos), desempeñando una función esencial en la inmunidad innata y adaptativa. Los monocitos se producen en la médula ósea y se liberan en el torrente sanguíneo en donde pueden permanecer por periodos largos, circulando antes de migrar a los tejidos para transformarse en macrófagos⁽³¹⁾. Los macrófagos residen en el tejido conjuntivo subepitelial, el intersticio de los órganos parenquimatosos, el revestimiento de los sinusoides vasculares del hígado y el bazo y los senos linfáticos de los linfonodos, por

consiguiente, estas células están situadas de forma estratégica en todas las zonas por donde los microorganismos pueden penetrar al huésped ⁽²⁸⁾. Los macrófagos fijos se encuentran tapizando el endotelio capilar (en particular de los pulmones), y los senos de órganos como el bazo, médula ósea y linfonodos. Estos macrófagos fijos son importantes para atrapar y eliminar los antígenos extraños del torrente sanguíneo y linfático ^(31, 33). Los macrófagos derivan de los monocitos de la sangre y se encuentran en todos los tejidos del cuerpo. En ciertas situaciones, se diferencian en tipos especializados de macrófagos, como las células gliales en el sistema nervioso, las de Langerhans en la piel, las células de Kupffer en el hígado y los macrófagos alveolares (AMØ) en pulmón ^(31, 34).

Los macrófagos son considerados como la segunda línea de defensa del organismo, son más lentos para llegar a los sitios de inflamación y no son tan agresivos como los neutrófilos ^(31, 34), sin embargo, los macrófagos son capaces de una actividad mucho más sostenida contra los agentes patógenos ⁽³⁴⁾. Debido a esta actividad, pueden matar ciertos tipos de bacterias que son resistentes a la destrucción por los neutrófilos. Esto es especialmente válido si los macrófagos fueron activados por citocinas secretadas por linfocitos T ⁽³¹⁾.

Los AMØ suelen encontrarse en los alvéolos, donde fagocitan partículas inhaladas, incluyendo los números bajos de bacterias que pueden encontrar. Después de ingerir las partículas, abandonan el alvéolo a través de las vías aéreas, donde ascienden por la acción mucociliar o emigran fuera del alvéolo pasando entre las células del epitelio y son llevados por el drenaje linfático a los linfonodos locales. Allí, presentan los antígenos que han capturado a los linfocitos para comenzar una respuesta inmune ⁽³¹⁾.

Los macrófagos intravasculares pulmonares se encuentran adheridos a las células del endotelio del lecho vascular del pulmón. Son muy abundantes en los cerdos y en algunas otras especies y se cree que son muy importantes para la fagocitosis y la eliminación de los agentes infecciosos de la sangre ^(31, 34). Esta es una buena ubicación para los macrófagos responsables de la eliminación de las bacterias de la sangre, dado que toda la sangre del organismo pasa por los vasos sanguíneos pulmonares en cada paso a través del cuerpo. El macrófago intravascular pulmonar está por consiguiente involucrado sobre todo en la defensa contra la septicemia en lugar de la protección contra la enfermedad respiratoria. Los macrófagos intravasculares pulmonares que se encuentran depurando bacterias activamente a partir del torrente sanguíneo (en especial las bacterias gramnegativas o la endotoxina libre) pueden liberar citocinas y metabolitos del ácido araquidónico, que contribuyen de manera significativa a la inflamación pulmonar ^(31, 34).

Los macrófagos activados son también productores de citocinas, las cuales tienen un efecto en la respuesta inmune local y sistémica ⁽²⁹⁾. Estas citocinas son proteínas que inducen la inflamación y son expresadas rápidamente en caso de daño o infección. Otro tipo de células como las células epiteliales y fibroblastos también son capaces de producir citocinas. La IL-1 (α , β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF, por sus siglas en inglés) son de las primeras citocinas producidas por los fagocitos ⁽³⁵⁾. La IL-1 y el TNF α son citocinas proinflamatorias importantes, asimismo, la IL-1, la IL-6 y el TNF α son inductores de la producción de proteínas de la fase aguda ⁽³⁵⁾. Después se produce IL-6 y junto con IL-1 provocan fiebre, la cual es benéfica para el huésped porque induce la activación metabólica necesaria para luchar contra la infección ⁽²⁹⁾. La formación de quimiocinas es importante ya que actúan como mediadores de la inflamación ^(29, 35). Las

quimiocinas son pequeños polipéptidos que controlan la adhesión, quimiotaxis y la activación de la población de leucocitos. La más importante es la IL-8 (CXCL8) producida por el macrófago, potente atrayente de neutrófilos ^(29, 35).

1.8 Fagocitosis

En 1880, Ellie Metchnikoff, descubrió el proceso de la fagocitosis cuando examinaba larvas de estrella de mar. Demostró que si se introducían espinas de rosa en el celoma de estas larvas, dichas espinas eran atacadas por células móviles. Desde entonces, se ha demostrado que la fagocitosis es un mecanismo de defensa universal en los organismos ⁽³²⁾. La fagocitosis incluye las etapas de migración, el reconocimiento de lo que puede y debe ingerirse, la endocitosis y la destrucción de partículas; cada una de estas etapas es complicada, y cada vez se identifican más componentes moleculares y se establecen más interacciones y rutas metabólicas ^(28, 32, 36, 37). No obstante que existen diferencias específicas entre la función fagocítica de los macrófagos y los neutrófilos, el proceso fagocítico incluye varias etapas secuenciales que son comunes en ambas células ⁽³⁶⁾.

Para que las células fagocíticas acudan a los sitios de lesión, deben salir primero de los vasos sanguíneos. Los cambios fisiológicos observados durante la salida de las células incluyen, primero el cambio en el flujo de los leucocitos en el torrente circulatorio, después su desplazamiento por rodamiento sobre la superficie interna de los vasos sanguíneos, más tarde su marginación, adhesión y expansión sobre el endotelio vascular, y finalmente su salida por diapedesis a través de las uniones entre las células endoteliales ^(28, 32, 36, 38).

Las células fagocíticas emigran a los tejidos, atraídos hacia la fuente de determinadas sustancias (quimiotaxis). La invasión bacteriana y el daño tisular inducen la producción de muchas moléculas quimiotácticas diferentes (C5a, fibrinopéptido B, quimiocinas, leucotrieno B₄), además las bacterias liberan péptidos (grupo metionina formilada) con gran poder quimiotáctico. Los neutrófilos que están en proceso de morir liberan elastasa y colagenasa, funcionando como generadores de factores quimiotácticos para los macrófagos. Sin embargo cuando las células fagocíticas se encuentran con los microorganismos, no pueden adherirse a ellos, ya que tanto las células como los microorganismos suspendidos en los líquidos corporales suelen tener carga negativa y, en consecuencia, se repelen entre sí, por lo tanto es necesario neutralizar esta carga, recubriendo ésta, con una proteína cargada positivamente (opsonización). Los anticuerpos y C3b son ejemplos de estas proteínas. Una vez que disminuye la carga negativa, la cual es mediada por la interacción entre receptores celulares y ligandos en la partícula, permite la unión de las células fagocíticas con los microorganismos, (adhesión) ⁽³²⁻³⁴⁾. Cuando las células fagocíticas encuentran un microorganismo, extienden una proyección de su membrana (pseudópodo) la cual lo rodea ⁽²⁸⁾. La unión de los receptores del pseudópodo con los ligandos del microorganismo permite a un pseudópodo en forma de copa cubrir la partícula (endocitosis). El microorganismo es atraído finalmente al interior de la célula fagocítica y, al ser envuelto por el citoplasma, queda encerrado en una vacuola (fagosoma), al unirse el microorganismo a la membrana de la célula fagocítica, los gránulos primarios (lisosomas) migran a través del citoplasma, se fusionan con el fagosoma y liberan sus enzimas (fagolisosoma). El contenido digerido por la acción del fagolisosoma posteriormente es eliminado de la célula (exocitosis) ^(32, 37).

1.9 Eliminación de microorganismos

Un número considerable de sustancias antimicrobianas y citotóxicas es producido por el macrófago activado, siendo éstas las responsables de la destrucción intracelular de los antígenos fagocitados. Esta destrucción puede ser dividida en dos mecanismos: 1) los mecanismos de destrucción dependientes de oxígeno en donde los fagocitos activados producen intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs, por sus siglas en inglés) e intermediarios reactivos de nitrógeno (RNIs, por sus siglas en inglés), los cuales tienen una actividad antimicrobiana muy potente; y 2) los mecanismos de destrucción independientes de oxígeno en donde, los fagocitos sintetizan lisozima y varias enzimas hidrolíticas en condiciones anaerobias ^(28, 30). Dentro de los cambios oxidativos que acompañan el proceso de la endocitosis se observa un aumento en los siguientes parámetros: a) el consumo de oxígeno, b) el consumo de glucosa, c) la actividad del ciclo de las pentosas o hexosas monofosfato y, d) la producción de H₂O₂ y otros peróxidos; al conjunto de estos cambios se le llama “estallido respiratorio” ⁽³⁰⁾.

El estallido respiratorio descubierto en 1959 por Sbarra y Karnosky, es el resultado de la activación de la enzima NADPH oxidasa u oxidasa del estallido respiratorio ^(30, 34, 39); inactiva en el resto de las células, la cual cataliza la reducción de un electrón del oxígeno con un gasto de NADPH. Al mismo tiempo, la glucosa es metabolizada a través de la hexosa monofosfato la cual es desviada para regenerar el NADPH que fue utilizado para la generación de la enzima NADPH oxidasa, formadora del anión superóxido (O₂⁻), y la detoxificación del sistema dependiente de glutatión de H₂O₂ que se encuentra en el citoplasma del fagocito. La reducción del oxígeno entonces produce O₂⁻, que es un intermediario altamente tóxico para los microorganismos ^(30, 34, 39). El O₂⁻

, genera otros agentes altamente oxidantes, incluidos el radical hidroxilo (OH°) y H_2O_2 . La MPO, uno de los principales constituyentes de los gránulos, puede utilizar el H_2O_2 para oxidar los haluros y convertirlos en compuestos reactivos tóxicos, como el ácido hipocloroso (HOCl°), generado al reaccionar con el anión Cl^- y las cloraminas ^(31, 40) (Cuadro 3). La hiperactividad de la NADPH oxidasa lleva a una exagerada producción de oxidantes, que causan un considerable daño tisular. Este daño incluye: deterioro funcional de los linfocitos T, citotoxicidad frente a las células endoteliales, lesión directa al ADN de células cercanas y metabolismo oxidativo de agentes químicos, que va a generar compuestos citotóxicos, genotóxicos e inmunogénicos ⁽⁴⁰⁾. Dentro de las moléculas biológicas endógenas con capacidad de inhibir la actividad de la NADPH oxidasa se encuentran: el NO, los esteroides, la adrenalina y las IL-10 e IL-4 ⁽⁴¹⁾.

Cuadro 3. Formación de intermediarios reactivos de oxígeno y de nitrógeno ^(41, 42)

Molécula	Reacción química
Anión superóxido (O_2^-)	$2 \text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow 2 \text{O}_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$ (NADPH oxidasa)
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	$\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (SOD)
Radical hidroxilo (OH°)	$\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\circ + \text{OH}^- + \text{O}_2$ (Fe++ o Cu++)
Ácido hipocloroso (HOCl°)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{Cl}^- \rightarrow \text{HOCl}^\circ + \text{HO}^-$ (MPO)
Peroxinitrito (ONOO^-)	$\text{O}_2^- + \text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^-$
Ácido nitroso (HNO_2)	$\text{NO} + \text{OH}^\circ \rightarrow \text{HNO}_2$

(SOD) superóxido dismutasa, MPO (mieloperoxidasa)

Cuando los macrófagos son activados por la pared celular lipolisacárida de las bacterias (LPS), o muramil dipéptido (MDP), o con una citocina producida por una célula T ($\text{IFN-}\gamma$), una gran cantidad de óxido nítrico sintetasa (NOS) es expresada, la cual oxida la L-arginina hacia citrulina y NO, un radical reactivo ^(5, 34, 37). El NO es un potente antimicrobiano que en combinación con el O_2^- aumenta la potencialidad de las sustancias microbicidas producidas por el macrófago activado ^(5, 28, 37).

Los mecanismos de destrucción independientes de oxígeno son producidos también por los macrófagos activados, en los cuales existe una síntesis de lisozima y varias enzimas hidrolíticas en las cuales no interviene el oxígeno. También producen un grupo de péptidos citotóxicos llamados defensinas y de TNF- α ^(30, 33, 37).

1.10 Oxido nítrico

Hasta hace poco, era difícil aceptar la hipótesis de que un gas tóxico ejerciera un importante papel como mediador del metabolismo celular, sin embargo, en la actualidad dicha hipótesis ya es aceptada. En 1992, la revista Science nombró al NO la “molécula del año”, y tan solo en el 2002 se generaron una 9000 publicaciones científicas sobre esta molécula ⁽⁴³⁾. El óxido nítrico (antes llamado Factor Relajante Derivado del Endotelio) se produce a partir del metabolismo de la L-arginina y su producción se regula por efecto de algunas citocinas como el IFN γ ⁽³⁰⁾. El sistema de la L-arginina óxido nítrico fue descubierto por Hibbs y su grupo cuando demostraron que se requería de este aminoácido para que los macrófagos activados pudieran ejercer sus efectos citotóxicos sobre células tumorales ⁽³⁰⁾. Alfieri sin embargo, señala a Furchgott, Ignarro, Murad y Moncada como los descubridores del NO en el año de 1986, descubrimiento que les valió a los tres primeros obtener el premio Nobel en Fisiología y Medicina ⁽⁴³⁾. La síntesis de NO es estrictamente dependiente de L-arginina ya que se ha observado que la D-arginina no sustituye la L-arginina y que la NG-monometil-L-arginina es un potente inhibidor competitivo del aminoácido y del sistema citotóxico ⁽³⁰⁾.

Las funciones del NO dependen de la concentración a la que este presente. A concentraciones bajas sirve como señal de varios procesos fisiológicos como la

regulación sanguínea, la reactividad plaquetaria, como neurotransmisor de la inhibición de los nervios noradrenérgicos y norcolinérgicos y la memoria en el sistema nervioso central, entre otras ^(1, 4, 44). En altas concentraciones tiene una actividad citotóxica y citostática contra tumores o patógenos ^(1, 4, 44). También, durante un proceso inflamatorio, el NO actúa simultáneamente como mediador del componente vasodilatador de la inflamación y jugando un papel relevante en la extravasación de macromoléculas ⁽⁴³⁾.

La síntesis de NO requiere de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) ^(1, 5, 11, 44-46), sin embargo, se han descubierto 3 isoformas de NOS: 1) NOS constitutiva neuronal (NOSI o nNOS); 2) NOS inducible (NOSII o iNOS); y 3) NOS constitutiva endotelial (NOSIII o eNOS) ^(1, 11, 44-46). Las isoformas NOSI y NOSIII requieren para su activación calcio/calmodulina, y generan pequeñas cantidades de NO con acciones fisiológicas múltiples (como señalizador molecular y regulación de la presión sanguínea) ^(1, 42, 43); mientras que, la isoforma NOSII se expresa en células inflamatorias, es calcio independiente y produce cantidades masivas de NO ^(1, 11, 43, 44). La generación de las diferentes isoformas de NOS, es dependiente de glucosa, vitaminas (C, E, ácido fólico, D3 y A) y minerales (zinc, hierro y magnesio) ⁽⁴⁰⁾. *In vitro*, la expresión de las isoformas de NOS puede ser inhibida cuando se excede el requerimiento de sustrato (p.e. para NOSII > 30mM de glucosa) ⁽⁴⁰⁾.

En el pulmón, el NO es de importancia en la modulación de la función respiratoria, así como en la patogénesis de varias enfermedades pulmonares ⁽⁴⁴⁾, siendo expresado por una extensa variedad de células residentes e inflamatorias en las vías aéreas. Las 3 isoformas de NOS se localizan en el aparato respiratorio y mediante su cooperación

regulan el tono del músculo liso de las vías aéreas y la respuesta inflamatoria e inmune⁽⁴⁴⁾. En humanos, NOSIII es expresada en el epitelio bronquial y en células tipo II del epitelio alveolar, en la membrana basal de los microtúbulos ciliares, además, su presencia en el pulmón, se relaciona con el crecimiento del pulmón y la angiogénesis, que ocurren durante el periodo fetal. NOSI se localiza en los nervios de las vías respiratorias de humanos y animales, estas fibras nerviosas están presentes en el músculo liso de las vías respiratorias donde el NO es el mayor mediador de la relajación neural del músculo liso. Mientras que, la presencia de NOSII se ha reportado en células del epitelio alveolar tipo II, fibroblastos del pulmón, células del músculo liso, células endoteliales, neutrófilos y condrocitos⁽⁴⁴⁾.

Los macrófagos aprovechan las propiedades del NO, para controlar las infecciones y eliminar células tumorales⁽⁴⁵⁾. Los macrófagos son células con la capacidad de metabolizar la L-arginina mediante dos vías: 1) la vía de la arginasa (vía alterna), en donde un guanilil nitrógeno es incorporado en la urea produciendo L-ornitina; y 2) la vía de la NOS (vía clásica), la cual es el resultado de la oxidación de un guanilil nitrógeno a NO, produciendo radicales nitrito (NO_2), nitrato (NO_3) y citrulina que son productos más estables (Figura 2)⁽⁵⁾.

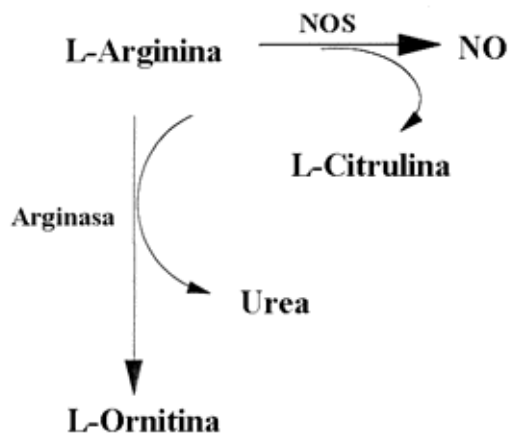


Figura 2. Metabolismo de L-arginina en macrófagos⁽⁵⁾

Los neutrófilos también usan la L-arginina como sustrato para la producción de especies reactivas de nitrógeno, como el NO. Sin embargo, aunque en menor cantidad que los macrófagos estimula los mismos activadores y es procesado en vías separadas e independientes ⁽⁵⁾. Debido al carácter inestable del NO, y al igual que los radicales libres del oxígeno, éste interacciona ávidamente con grupos químicos presentes en muchas moléculas causando en ellas alteraciones estructurales y funcionales, además de rompimientos moleculares ⁽³⁰⁾. La interacción del NO con el O_2^- da origen al peroxinitrito (ONOO), agente que se descompone en radical nitroso y OH, siendo este último más potente ⁽⁴⁰⁾. El NO es altamente lipolítico y tiene la capacidad de atravesar rápidamente las membranas celulares, esta propiedad permite al NO afectar a otras células sin necesidad de receptores en la superficie ⁽⁴³⁾. La vida media del NO es muy corta (1-9 segundos promedio) ya que tiene una alta reactividad con la hemoglobina y con otros componentes biológicos ^(1, 5, 43, 44). Al ser producido por los macrófagos, el NO rápidamente entra en los microorganismos y células tumorales, ejerciendo efectos citostáticos y citotóxicos al incrementar la síntesis de GMP-cíclico e inhibiendo el transporte de electrones mitocondriales y la replicación de ADN ⁽⁵⁾.

La producción de NO en macrófagos contribuye a la actividad bactericida celular de rumiantes y humanos, sin embargo, se ha informado que los macrófagos porcinos no producen grandes cantidades de NO ⁽⁴⁷⁾. Ahora es bien reconocido el hecho de que el NO es el principal agente responsable de la destrucción de microorganismos de vida intracelular (*Leishmania*, *M. tuberculosis*, *Brucella abortus*, etc.) ⁽³⁰⁾.

1.11 Evaluación de la función fagocítica

Las anomalías en la función de las células fagocíticas pueden estar relacionadas con defectos en la adherencia, locomoción, deformabilidad, reconocimiento de partículas, adhesión, ingestión, formación de fagosomas, desgranulación, capacidad para matar microorganismos o eliminación del material ingerido ⁽³⁰⁾. Estas anomalías ocasionan diferentes patologías en humanos como: enfermedad granulomatosa crónica (EGC) ligada al sexo, deficiencia en la glutatión peroxidasa, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o el síndrome de Chediak Higashi ^(30, 33). La determinación de la función de las células fagocíticas se realiza mediante pruebas como la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés) y la emisión de quimioluminiscencia ^(30, 33). Además la función fagocítica puede ser evaluada a través de 3 índices: 1) el índice fagocítico, el cual puede medir el porcentaje de células fagocíticas activas ante una partícula, 2) la capacidad fagocítica, que mide la capacidad de la célula fagocítica para ingerir un antígeno, y 3) la capacidad reductiva u oxidativa ⁽⁴⁸⁾. Este último índice es el fundamento de la prueba de reducción de NBT utilizada en humanos como prueba de confirmación de la EGC ^(30, 40). Durante ésta prueba se observa un incremento en la capacidad de la célula fagocítica para reducir el colorante (NBT), lo cual ocurre cuando, compitiendo con el oxígeno, es reducido por el sistema NADPH-oxidasa hasta su estado formazán, un producto insoluble de color azul ^(30, 40). Esta reducción del NBT también ocurre por el efecto directo del O_2^- ⁽³⁰⁾. En la prueba de NBT, las células se incuban con dicho colorante, se estimulan con éster forbólico (PMA) o con partículas ingeribles y se examinan al microscopio para buscar la presencia de formazán dentro de las células ⁽³⁰⁾. Las células normales son capaces de reducir al NBT, pero las células de pacientes con EGC no son capaces o lo hacen

limitadamente (0-10% de las células) por mecanismos diferentes a la producción de O_2^- (30, 40).

El ensayo de quimioluminiscencia (QL) también es útil para medir la respuesta oxidativa de los fagocitos ante una variedad de estímulos solubles y particulados. En los ensayos de QL se usa un quimioluminómetro o un contador de centelleo con opción para QL (30). Esta técnica se basa en el hecho de que durante la fagocitosis las células producen radicales libres de oxígeno (ROIs) que a su vez reaccionan con sustratos oxidables presentes en los microorganismos incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, produciendo intermediarios inestables que liberan energía lumínica al regresar a su estado basal (30).

1.12 Inmunodeficiencia e inmunosupresión

El estrés, una infección preexistente, tóxicos que afecten el sistema inmune o bien factores nutricionales, provocan en el animal una inmunosupresión, haciendo que los mecanismos de defensa no funcionen de una manera adecuada (31). Además, las respuestas inmunes pueden desarrollarse con lentitud o en forma inadecuada, lo que puede dar como resultado una enfermedad clínica debido a un agente infeccioso que normalmente sería controlado por un sistema inmune no alterado (31).

Existen dos tipos de inmunodeficiencias que pueden aumentar la susceptibilidad de los animales a las infecciones: la inmunodeficiencia primaria y secundaria. La inmunodeficiencia primaria se define como un trastorno del sistema inmune con una base genética comprobada o sospechada (31). En cambio una inmunodeficiencia

secundaria es un trastorno en el que el animal es genéticamente capaz de una función inmune normal, pero algún factor secundario está alterando la resistencia a la enfermedad ⁽³¹⁾. Roth, menciona que en la especie porcina no se tienen datos sobre la presencia de alguna inmunodeficiencia primaria. Una posible explicación para esta aparente inexistencia, es el hecho de que cerdos y verracos que producen camadas poco vigorosas, son eliminados del pie de cría ⁽³¹⁾.

Las células fagocíticas de mamíferos al nacimiento son funcionales, sin embargo, se encuentran en menor número y presentan una baja actividad enzimática y quimiotáctica comparada con las de animales adultos. Además, de tener una habilidad limitada para activar al sistema inmune adaptativo ⁽⁴⁹⁾. En el cerdo existe, al momento del nacimiento, una inmunodeficiencia transitoria, provocada por el tipo de placentación (epitelio corial especializado) que impide el paso de anticuerpos de la madre al lechón ⁽⁵⁰⁾, pudiendo generar una susceptibilidad a los agentes patógenos, lo cual se traduce en un alto índice de morbilidad y mortalidad. Por lo anterior la cantidad y calidad del calostro que se consume en las primeras horas de vida (4 a 36 horas posnacimiento) es importante ⁽⁵⁰⁾. Así también, el cerdo sólo es capaz de montar una respuesta inmune eficaz hasta el día 28-30 de edad ⁽²⁵⁾. Empero, su madurez inmunológica la alcanza hasta la 6^a u 8^a semana de vida ⁽¹⁹⁾, lo cual representa un alto costo energético para el animal, ya que se aumenta el catabolismo proteico, se disminuye o detiene el crecimiento afectando la conversión alimenticia ⁽²⁵⁾.

Zendejas (1987), informó que en cerdos de 8 semanas de edad el porcentaje de células fagocíticas y el índice fagocítico en sangre periférica logran niveles cercanos a los cerdos adultos, mientras que el metabolismo oxidativo lo hace desde la segunda semana

de vida. En cerdos menores de 8 semanas el porcentaje de células aptas para fagocitar y el índice fagocítico son bajos ⁽⁴⁸⁾, sin embargo, en los cerdos mayores de 10 semanas de vida la actividad fagocítica presenta una madurez completa en la sangre ⁽⁴⁸⁾. Pero, no todo el potencial se desarrolla a una edad temprana. Du Manoir, encontró en cerdos, que la habilidad de los neutrófilos en sangre para generar el estallido respiratorio estimulado con PMA (estimulador de la fagocitosis), fue significativamente más bajo en cerdos de 12-38 días que en cerdos de 103-133 días de edad ⁽⁴⁷⁾. En el mismo estudio, los AMØ recolectados mediante un lavado broncoalveolar, estimulados con PMA mostraron una baja actividad en el estallido respiratorio al compararlos con los neutrófilos de sangre ⁽⁴⁷⁾, lo que sugiere que los neutrófilos de cerdos jóvenes tienen la misma capacidad para migrar a los sitios de inflamación y fagocitar agentes bacterianos que los del adulto, sin embargo, los neutrófilos y AMØ son menos efectivos para eliminar las bacterias ingeridas; lo cual podría explicar por qué se presentan en animales jóvenes un mayor número de infecciones respiratorias ⁽⁴⁷⁾.

El calor o frío en exceso, el hacinamiento, el reagrupamiento, el destete, la alimentación, el traslado, los ruidos y la sujeción son factores de estrés que a menudo se asocian con la producción intensiva animal y que influyen en la función inmune en varias especies ⁽³¹⁾. Las alteraciones inducidas por el estrés sobre la función inmune son mediadas por interacciones entre los sistemas neuroendocrino e inmune. El estudio de estas interacciones multisistémicas se dirigió inicialmente a la secreción e influencia de los glucocorticoides, que suprimen diferentes aspectos de la función inmune. Sin embargo, los cerdos son más resistentes a los aspectos inmunosupresores de los glucocorticoides que otras especies ⁽³¹⁾.

Al mismo tiempo, los efectos detrimentales ocasionados por el estrés inmunológico (anorexia, hipertermia, ruptura de proteína muscular y un incremento de síntesis de proteína de fase aguda por el hígado), hacen más susceptible al animal a las enfermedades ⁽³¹⁾. En este sentido, en un estudio se observó un descenso en la concentración de todos los aminoácidos en plasma de cerdos que fueron desafiados con células muertas de *Mycobacterium tuberculosis* presentes en un adyuvante en comparación con sus controles sanos, sugiriendo que la utilización de estos aminoácidos aumenta en casos de inflamación crónica de pulmón de cerdos ⁽⁵¹⁾. Una de las posibles causas de este descenso en las concentraciones de aminoácidos en las enfermedades que cursan con inflamación puede ser el resultado de una baja en el consumo de alimento y su absorción, condiciones que normalmente son observadas durante el estrés inmunológico ⁽⁵¹⁾.

1.13 Aparato respiratorio

El aparato respiratorio es el encargado del intercambio de gases del organismo, en donde el oxígeno puede difundir a través de las paredes de los alvéolos para oxigenar la sangre que circula por los capilares alveolares. Existen dos consecuencias importantes en esta función de intercambio: 1) el pulmón está expuesto a una amplia variedad de antígenos ambientales, y 2) el pulmón debe de servir como conducto, y filtro para todo el volumen sanguíneo circulante ⁽⁵²⁾. Además, el aparato respiratorio debe: a) eliminar un volumen equivalente de dióxido de carbono que entra en los pulmones desde los capilares alveolares; b) mantener la temperatura corporal y la saturación de vapor de agua en el interior de las vías aéreas pulmonares (para mantener la viabilidad y las capacidades funcionales de las células y los líquidos de la superficie); y c) eliminar el

exceso de líquidos y productos de desecho de la superficie, como partículas inhaladas y células fagocíticas y epiteliales senescentes⁽⁵²⁾. Todas estas funciones las debe realizar de manera continua durante toda su vida y hacerlo de manera eficaz en términos de rendimiento y utilización de energía.

La superficie mucosa de las vías aéreas superiores y los pulmones son sitios comunes de infección. Se estimó que en el 2002, las infecciones respiratorias en humanos representaron 50 millones de muertes en el mundo, 3 millones de éstas causadas por *Mycobacterium tuberculosis*⁽⁵³⁾. En la actualidad los trastornos y enfermedades respiratorias son considerados en la industria porcina como los más graves, por las repercusiones económicas que provocan. Un monitoreo realizado en el año 2000, sobre la salud animal en cerdos realizado por USDA-APHIS (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2001), informó que del 2.6% de la mortalidad en la etapa de lactancia; el 28.9% fue originada por enfermedades respiratorias⁽⁴⁷⁾. En las etapas de engorda y finalización; del 2.9% de la mortalidad, el 39.1% fue consecuencia de las enfermedades respiratorias⁽⁴⁷⁾, provocando el uso preventivo de antibióticos en las piaras porcinas en ese país (prohibido por la Unión Europea), práctica que aumenta el costo de producción de la canal porcina a los productores y a los consumidores^(47, 54).

1.14 Características del aparato respiratorio

El tracto respiratorio se desarrolla a partir de la parte anterior del intestino embrionario como un órgano tubular con estructura arbórea⁽⁵⁵⁾. El aparato respiratorio maduro comprende la cavidad nasal, faringe, laringe, tráquea y pulmones con bronquios, bronquiolos y alvéolos; los pulmones se encuentran en el saco pleural^(55, 56). En la mayoría de las razas de la especie porcina (p.e. Yorkshire) la nariz es corta, y en algunas

razas asiáticas es sumamente corta ⁽⁵⁵⁾. La cavidad nasal consta de tres regiones: vestibular, olfatoria y respiratoria, el epitelio de estas regiones sufre modificaciones conforme se aleja de la nariz; así la región vestibular de la cavidad nasal se encuentra tapizada con un epitelio escamoso estratificado, el cual cambia hacia cilíndrico estratificado y pseudoestratificado ciliado con células caliciformes (epitelio respiratorio) el cual está cubierto por moco producido por las células. También la cavidad nasal está dividida longitudinalmente por una pared (tabique nasal), dividida por dos huesos en forma de cornetes fraccionando a la cavidad en tres meatos (dorsal, medio y ventral). ⁽⁵⁵⁾. ⁵⁶⁾. La tráquea es corta y se divide hacia atrás en dos bronquios principales, uno para el pulmón izquierdo y uno para el pulmón derecho. Una derivación especial del bronquio principal surge de la tráquea y conduce al lóbulo apical del pulmón derecho. El bronquio principal derecho envía otra derivación al lóbulo cardíaco derecho y otra al lóbulo accesorio, ramificándose en el lóbulo diafragmático. El bronquio principal izquierdo emite una derivación que se divide en una rama para el lóbulo apical y una para el lóbulo cardíaco. El bronquio principal continúa luego hacia atrás en lóbulo diafragmático. Las ramas más finas del sistema tubular son los bronquiólos dividiéndose cada uno en conductos alveolares y alvéolos ⁽⁵⁵⁾.

La laringe, tráquea y bronquios están, al igual que la porción respiratoria de la faringe, tapizados con un epitelio ciliado pseudoestratificado con células caliciformes. A medida que los bronquiolos se acercan a los alvéolos, el epitelio se vuelve escamoso. Porciones de los bronquios (llamados bronquiolos respiratorios) y las paredes de los alvéolos están tapizadas por una capa única de células epiteliales muy planas (células alveolares tipo I o neumocitos), y por un pequeño porcentaje de células epiteliales cúbicas (células alveolares tipo II). Las células alveolares tipo II son las encargadas de producir

surfactante pulmonar y sirven como células progenitoras para el reemplazo y recambio de las células alveolares tipo I. La pared del alvéolo está íntimamente unida al plexo capilar de la circulación de sangre pulmonar ⁽⁵⁵⁾.

Los pulmones están divididos por fisuras profundas en siete lóbulos: el pulmón derecho comprende los lóbulos apical (craneal), cardíaco (medio), diafragmático (caudal) y accesorio; el pulmón izquierdo comprende los lóbulos apical, cardíaco y diafragmático (Figura 3) ^(55, 56). El lóbulo apical y cardíaco izquierdo no están separados por una fisura, sino por la muesca cardíaca. Los lóbulos están subdivididos en lobulillos por tabiques interlobulillares sólidos ⁽⁵⁵⁾.

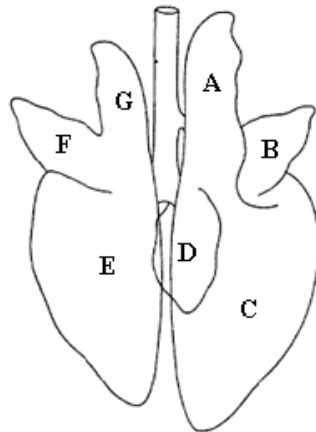


Figura 3. Vista dorsal de los lóbulos pulmonares del cerdo: A) lóbulo apical derecho, B) lóbulo cardíaco derecho, C) lóbulo diafragmático derecho, D) lóbulo accesorio, E) lóbulo diafragmático izquierdo, F) lóbulo cardíaco izquierdo y G) lóbulo apical izquierdo ⁽⁵⁷⁾

1.15 Mecanismos de defensa del aparato respiratorio

El intercambio gaseoso que se realiza en el tracto respiratorio requiere una superficie muy grande, esta es la razón por la cual el tracto respiratorio debe de contar con un sistema de defensa potente y especializado ^(58, 59). La cavidad nasal tiene la capacidad de eliminar las partículas grandes ($> 5 \mu\text{m}$) las cuales hacen contacto con la pared

respiratoria por la inercia del impacto que se genera en los recodos de las vías respiratorias superiores forzando a las partículas a adherirse al moco presente en esta zona ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾. Mientras que partículas pequeñas ($< 5 \mu\text{m}$) son depositadas en el moco mediante la sedimentación influenciada por la fuerza de gravedad ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾. Las células del tracto respiratorio producen moco que contiene moléculas con actividad antimicrobiana ⁽⁶¹⁾, como las defensinas, que forman poros en las membranas bacterianas, evitando así la colonización. En el pulmón, la producción de surfactante A y D (defensinas) evita la colonización del epitelio pulmonar, además de estimular a las células fagocíticas ⁽²⁹⁾. El moco contiene lisozima, interferón, opsoninas, lactoferrina, factores del complemento e inmunoglobulinas de tipo IgA secretoria e IgG principalmente, pero también se puede encontrar IgM (particularmente en el lechón recién nacido) ⁽⁵⁵⁾ e IgE contra vermes pulmonares (*Metastrongylus sp*) y larvas migratorias de áscaris ⁽⁵⁵⁾. Además, las cavidades faríngea, laríngea y traqueal están protegidas por el moco del epitelio ⁽⁵⁵⁾. Solamente aquellas partículas menores a $5 \mu\text{m}$ de diámetro (Cuadro 4), son capaces de llegar hasta el alvéolo ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾. Las partículas atrapadas en el moco del epitelio son manejadas por el mecanismo de depuración mucociliar (Figura 4) ^(31, 55, 62). La alfombra ciliar de los bronquios y bronquíolos origina un flujo continuo de moco (aproximadamente 4-15 mm/minuto) hacia la faringe donde luego se traga ⁽⁵⁵⁾.

Cuadro 4. Tamaño de partícula inhalada y la porción del aparato respiratorio de los animales domésticos en la que se impacta ⁽⁶⁰⁾.

Tamaño de partícula inhalada	Porción del aparato respiratorio
50 - 20 μm	Cavidad nasal
20 - 10 μm	Tráquea, bronquios primarios
10 - 2 μm	Bronquios, bronquíolos
2 - 0.3 μm	Conductos alveolares, alvéolos
< 0.3 μm	Permanecen suspendidos como aerosoles

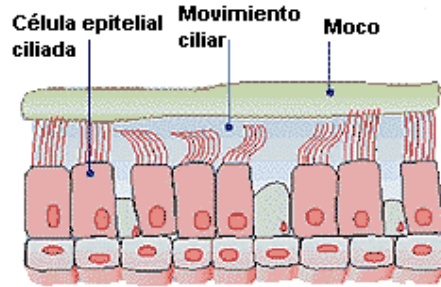


Figura 4. Aparato mucociliar. Se pueden apreciar las células epiteliales ciliadas encargadas de eliminar a las partículas atrapadas en el moco rico en lisozima, interferón, opsoninas, lactoferrina, factores del complemento e inmunoglobulinas ⁽⁶²⁾.

Las células encargadas de neutralizar el material extraño que ha podido escapar al mecanismo de defensa mucociliar, son los AMØ ⁽⁶³⁾. Estas células se localizan en el espacio intersticial de los bronquios y alvéolos y en el espacio alveolar ⁽⁶³⁾, funcionando como centinelas, capturando y eliminando rápidamente a las partículas extrañas ⁽⁵⁸⁾. Después de ingerir las partículas, los AMØ abandonan el alvéolo por la acción del aparato mucociliar donde posteriormente serán deglutidos junto con el moco, o bien, emigran fuera del alveolo pasando entre las células del epitelio alveolar para ser llevados a los tejidos linfoides asociados a los bronquios (BALT, por sus siglas en inglés) ^(31,59). El AMØ por lo tanto es considerado el principal regulador y modulador de la respuesta inmune pulmonar e inflamatoria, a través de la producción de NO (observado en ratones), prostaglandinas (PGE2) o citocinas ^(63, 64). En estado normal pocos PMN pueden observarse en el pulmón, caso contrario en los procesos infecciosos, en donde los PMN se trasladan al espacio alveolar para ayudar a los AMØ en la actividad fagocítica ^(55, 59). En cerdos sanos la proporción normal de elementos celulares en el moco broncoalveolar es 70-80% de AMØ, 11-18% de linfocitos, 8-12% de neutrófilos y hasta 5% de granulocitos eosinofílicos ⁽⁵⁵⁾. Además, el sistema fagocítico celular comprende los macrófagos intravasculares, que en el cerdo son particularmente numerosos en el pulmón ^(34, 55, 65, 66). Posteriormente se activa una respuesta inmune

compleja, con producción de inmunoglobulinas específicas a través de células plasmáticas derivadas de los linfocitos B bajo la dirección de linfocitos T ⁽⁵⁵⁾. Sin embargo, un estudio ha demostrado que los neutrófilos y AMØ de cerdos jóvenes poseen una baja respuesta oxidativa en comparación a las mismas células de animales adultos, lo que explicaría la susceptibilidad que tienen los primeros a las neumonías bacterianas ⁽⁴⁷⁾. En este sentido, se ha observado que los AMØ de 1 día de edad presentan una quimioluminiscencia reducida (una medida de los mecanismos oxidativos de destrucción celular) comparada con la de AMØ de cerdos adultos, sin embargo, a los 7 días de edad estas células alcanzan los niveles de actividad de un adulto ⁽³¹⁾. Además, los cerdos neonatos tienen números bajos de macrófagos intravasculares pulmonares que aumentan 14 veces a los 30 días de edad. Debido a que los fagocitos dependen del complemento y/o anticuerpos para opsonizar muchos agentes infecciosos; la eficacia global de la fagocitosis puede reducirse debido a un nivel inadecuado de estos componentes en cerdos jóvenes ⁽³¹⁾.

En el aparato respiratorio algunas citocinas producidas por los linfocitos juegan un papel activo en la regulación de la respuesta inflamatoria e inmune. Citocinas como IL-4, IL-10 y TGF- β (factor de crecimiento transformante β) son necesarias para evitar un daño al huésped a consecuencia de una excesiva respuesta inmune ^(35, 44). Así, la IL-10 inhibe la producción de citocinas por parte del macrófago, y su deficiencia se asocia con un incremento en el daño tisular en el pulmón, aunque se necesita más investigación al respecto ⁽³⁵⁾. De la misma forma se tiene información sobre la presencia de la NOS en el aparato respiratorio, actuando en diferentes mecanismos fisiológicos (regulando el tono del músculo liso y en las respuestas inflamatorias e inmunológicas). ⁽⁴⁴⁾.

1.16 Factores predisponentes a las infecciones respiratorias

Los pulmones y las superficies mucosas de las vías aéreas son sitios comunes de infección ⁽⁶⁷⁾, pudiendo ser resultado de varios factores (anatómicos, infecciosos, ambientales y de manejo) ⁽⁵⁵⁾. Además, la presencia de algunas patologías es sugerente de que los mecanismos de defensa del pulmón no son tan efectivos en todos los lóbulos ya que es frecuente observar lesiones que sugieren una mayor susceptibilidad en cada uno de los diferentes lóbulos pulmonares ⁽⁵⁵⁾. La enfermedad clínicamente importante rara vez es el resultado de una infección con un sólo patógeno, y casi siempre varios patógenos están implicados ⁽⁵⁵⁾. Uno actúa como el agente clave (virus o micoplasmas), el “que abre la puerta” para los invasores secundarios (generalmente bacterias), disminuyendo los mecanismos de defensa locales y a veces también los sistémicos del hospedador ^(55, 68). El tracto respiratorio cuenta normalmente con gran cantidad de microorganismos considerados como flora comensal, la cual tiene un efecto favorable para el hospedador, ya que supera en cantidad y compite por un lugar con los agentes infecciosos ^(29, 55). Sin embargo, no existe una división entre microorganismos comensales y potencialmente patógenos. Entre los microorganismos que se pueden encontrar en el tracto respiratorio superior y el árbol bronquial en cerdos sanos se encuentran: *Mycoplasma flocculare*, *M. hyorhinis* y *Haemophilus parasuis*. ⁽⁵⁵⁾.

Anatómicamente, los pulmones del cerdo y el bovino tienen particularidades morfológicas y funcionales por las cuales tienden a presentar enfermedades con mayor frecuencia ⁽⁶⁹⁾. En estas especies, los lóbulos pulmonares se subdividen en lóbulos secundarios ó lobulillos por tabiques interlobulillares sólidos (tejido conjuntivo), evitando la ventilación colateral (es decir, el movimiento de aire entre lóbulos

adyacentes), la cual suele producirse de forma generalizada en otras especies ^(55, 59). Estas divisiones provocan la pérdida funcional inmediata de todos los lobulillos que tienen obstruida su salida, lo cual es útil para la limitación de los procesos infecciosos pero tienden a la formación de enfisemas intersticiales y de atelectasis ^(55, 59, 69).

A nivel celular, el neumocito tipo I no cuenta con los mecanismos para hacer frente a una agresión ⁽⁷⁰⁾. Este tipo celular cubre grandes capas de la pared alveolar y actúa en la difusión de oxígeno en el pulmón ^(55, 70), sin embargo, es extremadamente vulnerable a las agresiones y tiene una escasa capacidad reparativa y ninguna regenerativa; caso contrario al neumocito tipo II ⁽⁷⁰⁾. La defensa del alveolo ante las partículas pequeñas, por lo tanto, depende de la fagocitosis realizada por los AMØ, para posteriormente ser inactivadas o secuestradas, en base a su naturaleza física e irritante, moviéndose los AMØ hacia los bronquios y de ahí al aparato mucociliar ^(31, 55, 62, 70). Sin embargo, existe la tendencia de suponer que el comportamiento de los AMØ es el mismo en todas las especies, pero se observó en un estudio que al evaluar la fagocitosis y la eliminación de microorganismos por estas células en humanos, conejos, hámsters y ratas, existen diferencias en la habilidad de reconocimiento, ingestión y eliminación de bacterias, a pesar, de ser un tipo celular específico ⁽⁷¹⁾.

Hasta el momento, se han mencionado dos posibles rutas mediante las cuales los microorganismos penetran al pulmón: 1) a través de los bronquios (ruta bronquial), lo que implica que la mayoría de las partículas infecciosas al ser inhaladas, se quedan en el árbol bronquial, y 2) a través del torrente sanguíneo (ruta hematógica), cuando los patógenos producen una condición temporal de septicemia, lo cual ocurre en algunas infecciones virales o bacterianas ⁽⁶⁸⁾. La distribución craneoventral característica de las

bronconeumonías infecciosas afecta principalmente a los lóbulos apicales, sin conocerse aún todas las causas de esta afectación, sin embargo, se han postulado las siguientes: 1) en esta región existe un mayor depósito de partículas debido a la ramificación más corta y más abrupta de las vías aéreas; 2) el epitelio en esta región no está protegido por la capa mucosa de las vías superiores, ni por el sistema fagocítico alveolar; 3) los materiales celulares (mayoritariamente macrófagos) y no celulares eliminados deben pasar a través de la luz estrecha de su bronquiolo formando un “cuello de botella” fácil de obstruir, especialmente si existe una escasa ventilación pulmonar lo que concentra los materiales expulsados en esta región y 4) mecanismos de defensa inadecuados y una perfusión vascular disminuida. ^(70, 72). La neumonía intersticial se diferencia de la bronconeumonía por la falta de orientación evidente de las lesiones alrededor de las vías aéreas menores. Macroscópicamente las lesiones se distribuyen por todo el pulmón, a menudo con una mayor afectación de las regiones dorsocaudales involucrando a los lóbulos diafragmáticos, sin embargo, no hay información que explique por qué las neumonías intersticiales de origen hematógeno o aerógeno tienden a ser más severas en estas regiones ⁽⁷⁰⁾.

En un estudio realizado por McGorum ⁽⁷³⁾ no encontró diferencias regionales significativas de las células pulmonares obtenidas por lavado bronqueoalveolar de diferentes lóbulos en caballos sanos y con enfermedad obstructiva pulmonar crónica (COPD, por sus siglas en inglés), empero, observó diferencias en el número de células del sistema inmune (neutrófilos, macrófagos, linfocitos, eosinófilos, etc.) entre lóbulos. Contrariamente, Pringle ⁽⁷⁴⁾, encontró diferencias significativas ($P < 0.05$) en células de lavado bronqueoalveolar de los lóbulos apicales y diafragmáticos de becerros Holstein normales de 2 y 4 semanas de vida. El grupo de 4 semanas de edad mostró un bajo

porcentaje de AMØ y un alto número de células epiteliales con respecto al grupo de 2 semanas de vida. Los resultados de la citología hecha en este estudio revelaron diferencias celulares (macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células epiteliales) entre los lóbulos apicales y diafragmáticos de los becerros de 2 y 4 semanas de vida ⁽⁷⁴⁾. Estos resultados pueden indicar una posible heterogeneidad celular existente en el pulmón de los animales, y por lo tanto al existir diferencias entre las células de los lóbulos podría existir una predisposición a las enfermedades. Sin embargo, al momento de escribir esta tesis, no se han encontrado más trabajos sobre las diferencias celulares en el pulmón del cerdo o la evaluación de la inmunidad innata en esta especie.

Mediante la inhalación del aire contaminado con polvo, gotas de espiración y aerosoles los animales pueden infectarse, ya que funcionan como vehículos de difusión para los microorganismos patógenos. El polvo (alimento, excremento, cama y otras partículas) es atrapado en la nariz y la faringe, teniendo un efecto irritante ^(55, 75). Las gotas de espiración son expelidas constantemente de forma normal por la boca y la nariz, o bien, pueden ser proyectadas por el estornudo y la tos, existiendo un contagio de manera directa de nariz a nariz ⁽⁷⁵⁾. Los aerosoles se forman por la deshidratación de las gotas expelidas por estornudos o la tos, pudiendo permanecer suspendidos durante periodos largos de tiempo, además, se desplazan a grandes distancias. Al ser aspirados por el animal, se rehidratan pudiendo llegar directamente hasta el alvéolo del pulmón ^(55, 75).

El clima juega un papel importante en las enfermedades respiratorias. Una alta frecuencia de cambio de aire causa a menudo corrientes localizadas y enfriamiento de los animales. Las corrientes de aire frías y las diferencias de temperatura grandes representan un estrés para los mecanismos inmunes, aumentando la susceptibilidad a las

enfermedades ⁽⁵⁵⁾. La calidad del aire también puede ser un factor predisponente a las enfermedades respiratorias. El amoníaco en concentraciones mayores a 50 ppm, reduce los mecanismos de eliminación mucociliar de bacterias del pulmón ^(55, 75). Además, los trastornos digestivos reducen la resistencia a las neumonías. Christensen ⁽⁵⁵⁾, informa sobre una prevalencia alta de lesiones respiratorias en el momento de la matanza en cerdos con enteritis previa. Exámenes realizados a cerdos de matanza indicaron que la prevalencia de neumonía y pleuritis en machos castrados es 10% más alta que en hembras ⁽⁵⁵⁾. El sexo también puede tener efecto sobre las infecciones pulmonares. En los Países Bajos, las lesiones de los pulmones, pleura y pericardio son más prevalentes en machos castrados que en hembras. Pudiendo ser la castración la responsable de estas diferencias por estrés y cambios hormonales ⁽⁵⁵⁾. Los trastornos respiratorios también pueden ser influenciados por la herencia. Observaciones clínicas en una piara de cerdos puros revelaron un nivel mucho más bajo de enfermedades respiratorias en cerdos Hampshire que en Yorkshire ⁽⁵⁵⁾. Lundeheim y Tafvelin (1986) informaron que las cruas de Hampshire tenían una incidencia significativamente más baja de neumonía y pleuritis que las cruas de Landrace y Yorkshire ⁽⁵⁵⁾.

El estrés en los animales debilita los mecanismos de defensa del pulmón. ⁽⁷⁵⁾. Las señales neuroendócrinas capaces de alterar directamente la función de las células del sistema inmune incluyen: 1) la inervación simpática directa del parénquima de timo, bazo y médula ósea; 2) los glucocorticoides producidos por la corteza suprarrenal por el estímulo de la hormona adrenocorticotropica hipofisiaria (ACTH); 3) las catecolaminas producidas por la médula suprarrenal; 4) los opiáceos endógenos (endorfinas y encefalinas) producidas por la médula hipofisiaria, suprarrenal, terminales simpáticas y linfocitos; 5) el péptido vasoactivo intestinal liberado por las neuronas simpáticas del

intestino y quizás en otros sitios y 6) la sustancia P liberada por las terminaciones de los nervios simpáticos (Breazile 1987; Donn 1988; Kelley 1988) ⁽³¹⁾.

La habilidad del aparato respiratorio para regresar a la normalidad dependerá de la causa, duración y del éxito que haya tenido la respuesta inflamatoria e inmune en el huésped ⁽⁷⁵⁾. Si la respuesta inflamatoria e inmune tuvo éxito al eliminar a los patógenos, los tejidos del pulmón podrán regresar a la normalidad rápidamente, sin embargo si los patógenos no pudieron ser eficazmente eliminados o la respuesta a la inflamación es inapropiada, tal como ocurre en algunos tipos de reacción alérgica, el proceso inflamatorio persiste provocándole un daño al huésped ⁽³⁶⁾

1.17 Repercusiones económicas de las enfermedades respiratorias

Los costos económicos ocasionados por una infección respiratoria se elevan debido a la utilización de fármacos, vacunas, instalaciones especiales para los animales enfermos, servicios veterinarios y diagnóstico de laboratorio ⁽⁵⁵⁾. Además y más importante se reducen los parámetros productivos, aumentando los días en que los animales son enviados al mercado ^(55, 75, 76). Actualmente, se puede determinar mediante el uso de fórmulas las repercusiones económicas de las infecciones respiratorias. En el caso de las neumonías se obtiene la disminución en la ganancia diaria de peso, mediante la observación de las lesiones en el pulmón (Cuadro 5). En el caso de la pleuritis, por cada 1% del grupo de animales afectados se puede sumar 1.2 días más para su salida al mercado ⁽⁷⁵⁾.

Cuadro 5. Relación entre el porcentaje del pulmón afectado y la disminución de la ganancia de peso ⁽⁷⁵⁾.

Porcentaje de pulmón afectado	Disminución de la GDP (%)
0 a 10	0
10 a 20	5
20 a 30	10
> 30	20

Straw y colaboradores (1989) ⁽⁵⁵⁾, concluyeron que la neumonía micoplásmica puede causar una disminución del 17% en la ganancia diaria de peso y un 14% de la reducción en la conversión alimenticia ⁽⁵⁵⁾. Además, mencionan que por cada 10% del pulmón con lesiones neumónicas, la ganancia diaria de peso se reduce aproximadamente 37 g ⁽⁵⁵⁾. Similarmente, Christensen y Mousing (1994) informaron que cerdos con bronconeumonía complicada redujeron su ganancia diaria de peso en 38 g, mientras que cerdos con bronconeumonía no complicada solo la disminuyeron en 6 g ⁽⁵⁵⁾. También, la pleuroneumonía, puede llegar a causar una mengua del 34% en la ganancia diaria de peso y una disminución del 26% en la conversión alimenticia ⁽⁵⁵⁾. En muchas piaras, las pleuritis crónicas fueron responsables de producir un retraso de 7-12 días para que los animales pudieran alcanzar su peso a mercado ⁽⁵⁵⁾.

2. Justificación

En la actualidad hay muchos trabajos sobre la inmunidad en mucosas a nivel intestinal, En contraste, poco se conoce sobre la inmunidad del aparato respiratorio del cerdo, y los mecanismos utilizados por los agentes patógenos para evadir los mecanismos de defensa y colonizar selectivamente diferentes lóbulos pulmonares. Este cuadro es más grave en el cerdo joven, que a diferencia del cerdo adulto, su sistema inmune innato no es tan efectivo al fagocitar o al eliminar a los agentes patógenos. Diversos estudios indican que la administración de arginina puede estimular a las células inmunes de diferentes tejidos. Por lo tanto en este estudio, se evaluó el efecto inmunoestimulador que tiene este aminoácido sobre las células fagocíticas del pulmón en el cerdo joven sano al administrar el 1% de L-arginina en base al consumo diario de alimento por vía oral usando agua como vehículo; lo cual podría incrementar la resistencia e inmunidad del aparato respiratorio, reduciendo las infecciones y la afectación en el crecimiento del cerdo.

3. Hipótesis

La inclusión de L-arginina, en la dieta del cerdo joven, estimulará el índice fagocítico, la capacidad fagocítica y el índice reductivo en las células del sistema inmune pulmonar del cerdo joven.

4. Objetivos

Estandarizar la prueba de fagocitosis en las células inmunes sistémicas (SAN) y locales (TP, parénquima pulmonar y LB) del cerdo joven para la evaluación del índice fagocítico, la capacidad fagocítica y el índice reductivo.

Determinar posibles diferencias en el índice fagocítico, la capacidad fagocítica y el índice reductivo entre las células fagocíticas de la inmunidad sistémica (SAN) y local (TP, parénquima pulmonar y LB) del cerdo joven sano.

Evaluar el efecto de la administración oral del 1% de L-arginina sobre el índice fagocítico, la capacidad fagocítica y el índice reductivo de las células fagocíticas de la inmunidad sistémica (SAN) y local (TP, parénquima pulmonar y LB) del cerdo joven sano.

5. Material y métodos

5.1 Localización

El presente estudio se realizó conjuntamente en las instalaciones del área de nutrición pertenecientes al Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Ubicadas en Ciudad Universitaria, Av. Universidad No 3000. Delegación Coyoacán. C.P. 04510. México, D. F., y en el laboratorio 5 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional. Ubicado en Avenida Politécnico Nacional No 2508. Col. San Pedro Zacatenco. C.P. 07360. México, D. F.

5.2 Animales

Se utilizaron 10 cerdos de 21 ± 2 días de edad, recién destetados, provenientes de una granja especializada en la producción de animales para abasto, ubicada en el municipio de Texcoco, Estado de México. Los animales recibieron el manejo rutinario realizado en la granja de origen, el cual consiste en la castración y descolado, así como la aplicación de hierro dextrán a los 3 días de nacidos. A su arribo a las instalaciones de la FMVZ, los cerdos fueron asignados al azar a uno de dos corrales ($n= 5$ cerdos/corral) en los cuales se alojaron hasta el final del experimento.

5.3 Instalaciones

Previo al arribo de los animales los corrales fueron lavados, desinfectados y acondicionados. Un día antes de su llegada se encendieron las fuentes de calor para mantener una temperatura ambiental de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los corrales en las instalaciones de la FMVZ cuentan con piso y paredes de cemento y una lechonera de madera equipada con un foco de 100 watts; y un tapete térmico como fuente de calor. El alimento fue proporcionado a través de un comedero de plástico tipo tolva (Rotecna, España), con capacidad para 5 bocas. Además, los corrales contaron con dos bebederos, uno de plástico automático con un chupón especial, para cerdos pequeños, y otro fijo a la pared a una altura de 39 cm del piso, lo que permite el libre acceso al agua de animales de diversas tallas. La ventilación fue regulada mediante dos extractores y dos inyectores de aire, localizados hacia la parte superior de las paredes de las instalaciones. La temperatura estuvo monitoreada mediante termómetros de temperaturas de máximas y mínimas ubicados a la altura del lomo de los animales.

5.4 Tratamientos

A la llegada de los animales se les proporcionó 50 g promedio de alimento comercial por animal, y se les ofreció agua *ad libitum*. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de 4 días a las instalaciones y dieta. El tratamiento consistió en la administración del 0% (Grupo control) y 1% (Grupo experimental) de L-arginina cristalina (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd Tokio, Japón). El porcentaje de inclusión fue calculado con base al consumo diario de alimento de los cerdos del corral, (el cual fue calculado, restando el alimento remanente en la mañana, de la cantidad ofrecida el día

anterior), posteriormente, el consumo diario de alimento se dividió entre los 5 animales del corral experimental, obteniendo la cantidad individual de arginina. Dependiendo de la cantidad de arginina se usó como vehículo agua para tratar de diluirla en su totalidad y se administró diariamente por vía oral con la ayuda de una jeringa desde el día 5 de la llegada de los animales a las instalaciones. A los animales del grupo control, se les sometió al mismo manejo que los animales tratados, administrándoles por vía oral la misma cantidad de agua que se le administró al grupo con tratamiento. La duración de la administración del tratamiento fue de 30 días.

5.5 Muestras a utilizar para el experimento

Una vez finalizado el periodo experimental (30 días) se obtuvieron un total de 7 muestras por animal de cada grupo, a las cuales se les realizó la prueba de fagocitosis. Las muestras consistieron en células de sangre, tonsila palatina, parénquima pulmonar de: lóbulo apical derecho, lóbulo apical izquierdo, lóbulo diafragmático derecho, lóbulo diafragmático izquierdo y lavado bronquial.

5.6 Variables

Las variables a medir fueron: 1) El índice fagocítico (número de células que están fagocitando del total de células fagocíticas de la suspensión). 2) La capacidad fagocítica (número de levaduras opsonizadas administradas en la suspensión que están siendo fagocitadas por célula fagocítica), y 3) El efecto reductivo intracelular (número de

levaduras fagocitadas que redujeron el NBT administrado en la suspensión del total de levaduras fagocitadas), de acuerdo a las siguientes formulas:

$$\text{Índice fagocítico} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células fagocíticas}}{\text{N}^\circ \text{ de células totales}} \quad (100)$$

$$\text{Capacidad fagocítica} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de levaduras fagocitadas}}{\text{N}^\circ \text{ de células fagocíticas}}$$

$$\text{Efecto reductivo} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de levaduras con presencia de NBT reducido}}{\text{N}^\circ \text{ de levaduras fagocitadas}}$$

5.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con un modelo de análisis de varianza unilateral (ANOVA) ⁽⁷⁷⁾, mediante la utilización del programa computacional Graph Pad Prism, versión 3.00 (Avid metasync, USA). Primero se realizó una comparación entre las células de los tejidos del grupo control (sangre, tonsila palatina, lóbulos apicales y diafragmáticos derechos e izquierdos y lavado bronquial) en cada uno de los índices a evaluar (índice fagocítico, capacidad fagocítica e índice reductivo); posteriormente se compararon los tratamientos que recibieron los animales (0% y 1% de inclusión de L-arginina), utilizando sólo a su contraparte (p.e. SAN 0%-SAN 1%) para cada uno de los índices antes mencionados. El modelo estadístico empleado para este experimento fue el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + T + E_{ij}$$

Donde:

y= Variable respuesta (índice fagocítico, capacidad fagocítica y efecto reductivo).

μ = Media general.

T= Tejidos (SAN, TP, LAD, LAI, LDD, LDI, LB)

Tratamiento (1% de inclusión de L-arginina y grupo control).

E_{ij} = Error aleatorio $\sim N(0, \sigma^2)$

5.8 Obtención de células de sangre (Figura 5)

La técnica empleada fue modificada de la publicada anteriormente por Vega ⁽⁷⁸⁾. La sangre (15 ml aproximadamente) con anticoagulante (heparina), fue depositada en un tubo de polipropileno de 50 ml y se le agregó el mismo volumen de gelatina al 1% (100 ml PBS + 1g de gelatina de piel de porcino Sigma tipo A), se resuspendió y dejó incubar a 37° C durante 20-30 minutos para sedimentar los eritrocitos. El plasma rico en leucocitos se recuperó y se centrifugó a 900 x g, a 20° C durante 7 minutos. Una vez que se obtuvo la pastilla con las células, se decantó la muestra y fue resuspendida con solución salina fisiológica (SSF) (10-15 ml aproximadamente). Se realizaron dos lavados con SSF y entre cada lavado se centrifugó la muestra a 900 x g, a 20° C durante 7 minutos. Al término del segundo lavado, el sedimento (pastilla), se decantó y se le agregaron 5-10 ml de solución de lisis para eritrocitos (0.8 g NH_4Cl + 1 ml KHCO_3 + 0.1 ml NaEDTA en 100 ml agua bidestilada), dependiendo el tamaño de la pastilla, resuspendiendo y dejándolo actuar durante 5 minutos. Concluido este tiempo se le adicionó 20 ml de SSF y se resuspendió la muestra, la cual fue centrifugada a 700 x g, a 20° C durante 7 minutos. Una vez centrifugada, la muestra fue decantada, se adicionó SSF y se centrifugó nuevamente a 700 x g, a 20° C durante 7 minutos; al finalizar la muestra fue decantada y se le agregó 1 ml de medio de cultivo celular (RPMI) completo (RPMI-1640 medium + glutamina 200 mM+ penicilina/estreptomicina 10 k UI+ piruvato 100mM + HEPES 10mM + 10 % de suero fetal bovino), realizando un conteo

en cámara de Neubauer con líquido de Turk y ajustando el número a 5×10^6 células/ml. Durante todo su procesamiento la muestra permaneció en hielo para evitar la muerte celular.

5.9 Obtención de células de tonsila palatina, parénquima pulmonar y lavado bronquial (Figura 6)

Al finalizar el periodo experimental, y una vez recolectadas las muestras sanguíneas, el cerdo fue sobredosificado con pentobarbital sódico como agente sedante (1 ml/5 kg PV/IV). Una vez insensibilizado el animal, se realizaron incisiones en las venas femorales para su desangrado, para proceder entonces con la extracción de la tonsila palatina, corazón y pulmones, teniendo cuidado de no contaminarlos con sangre. Todos los órganos y tejidos se conservaron en hielo y se trabajaron en el menor tiempo posible para evitar la muerte celular. La tráquea y las venas que se encontraban expuestas se ligaron para evitar la entrada de algún líquido extraño. En el corazón se realizó una incisión en la aurícula izquierda y se retiró el excedente de sangre de la aurícula que pudiera contaminar la muestra con aproximadamente 200 ml de SSF a través de la vena pulmonar hasta que se observó la salida de SSF clara de la aurícula. En el pulmón se realizó un lavado bronquial total, perfundiendo desde la tráquea 40 ml de SSF e introduciendo y retirando el líquido obtenido 2-3 veces. El líquido obtenido de dicho lavado fue depositado en un tubo de plástico (polipropileno) de 50 ml y se mantuvo en hielo para su transportación al laboratorio. Posterior a los lavados, se tomaron los pulmones derecho e izquierdo por separado y se les retiró la mayor cantidad del árbol bronquial, previa separación de los lóbulos apicales y diafragmáticos. Se tomaron 10 gramos de cada tejido (tonsila palatina y parénquima pulmonar) y se cortaron lo más

finamente posible en cajas de Petri para ayudar a la penetración de la enzima colagenasa (Colagenasa tipo IV “Worthington Biochemical Corporation”), para la liberación de las células. Se colocaron los tejidos (tonsila palatina y lóbulos pulmonares) por separado en tubos de 50 ml, los cuales previamente fueron adicionados con 25 ml de medio de cultivo celular (RPMI) incompleto (sin suero fetal bovino), adicionado con 150 unidades/ml de la enzima colagenasa para su posterior incubación a 37° C, durante 60-90 minutos y con agitación constante. La técnica es una modificación hecha en el laboratorio 5 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, del CINVESTAV, de la utilizada por Holt ⁽⁷⁹⁾.

Una vez que las muestras presentaron un aspecto turbio en los tubos, estas fueron retiradas de la incubación. Las muestras fueron filtradas en tela de organza limpia para obtener una suspensión con células en tubos de 50 ml nuevos y el excedente de tejido atrapado en la tela de organza sin digerir se regresó al tubo original con la finalidad de tener disponible una segunda digestión con colagenasa del tejido en el caso de que durante la primera digestión, no se obtuvieran suficientes células. La suspensión obtenida de la primera digestión con colagenasa fue centrifugada a 300 x g durante 10 minutos a 4° C para sedimentar las células y obtener con ello una pastilla. Las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la muerte celular y facilitar su manejo en el laboratorio. La pastilla obtenida de la centrifugación anterior, se lavó con 5 ml de RPMI incompleto para detener la acción de la enzima y se centrifugó a 80 x g durante 10 minutos a 4° C una vez centrifugada, la muestra fue decantada; para posteriormente adicionarle de 5 a 6 ml de solución de lisis para eritrocitos, e incubando durante 5 minutos en hielo para su posterior manejo (el volumen dependió del tamaño de la pastilla de células). Después de los 5 minutos, la pastilla fue resuspendida con 20 ml de

RPMI incompleto y centrifugada a 80 x g, durante 10 minutos a 4° C para sedimentar las células blancas y eliminar el sobrenadante (solución de lisis de eritrocitos). Las células de lavado bronquial se centrifugaron a 80 x g durante 10 minutos a 4° C, para así sedimentar las células; las cuales una vez sedimentadas fueron lavadas con 10 ml RPMI incompleto y resuspendidas para volverlas a centrifugar de manera similar.

Una vez que se obtuvieron las células de tonsila palatina, el parénquima pulmonar y el lavado bronquial, éstas se decantaron cuidadosamente y fueron resuspendidas en 5-10 ml de RPMI completo dependiendo del tamaño de la pastilla y se mantuvieron en hielo para su posterior manejo. El conteo de las células se realizó en una cámara de Neubauer con azul de tripano (para verificar la viabilidad celular) para cada tejido ajustando el número a 5×10^6 células/ml.

5.10 Técnica de fagocitosis (Figura 7)

Para evaluar la fagocitosis de las células obtenidas, se utilizaron laminillas multispot microscope PH-005, con 4 pozos (Hendley-Essex, Reino Unido), manejándolos como 1 pozo control (para comprobar la adherencia de las células a la laminilla), y 3 pozos en donde se realizó la evaluación. En cada pozo se colocaron 100 μ l de células de la laminilla correspondiente a cada tejido, y se dejaron incubar a una temperatura de 37° C durante 30 minutos en cámara húmeda. Una vez terminada la incubación, a todos los pozos (con excepción del pozo control) se les agregó levaduras opsonizadas a razón de 2×10^6 en un volumen de 50 μ l y 50 μ l de NBT, y se dejaron incubar las laminillas 60 minutos a 37° C en cámara húmeda, cada 10 minutos se revisó que el NBT no precipitara, ya que en caso contrario la laminilla fue retirada inmediatamente de la

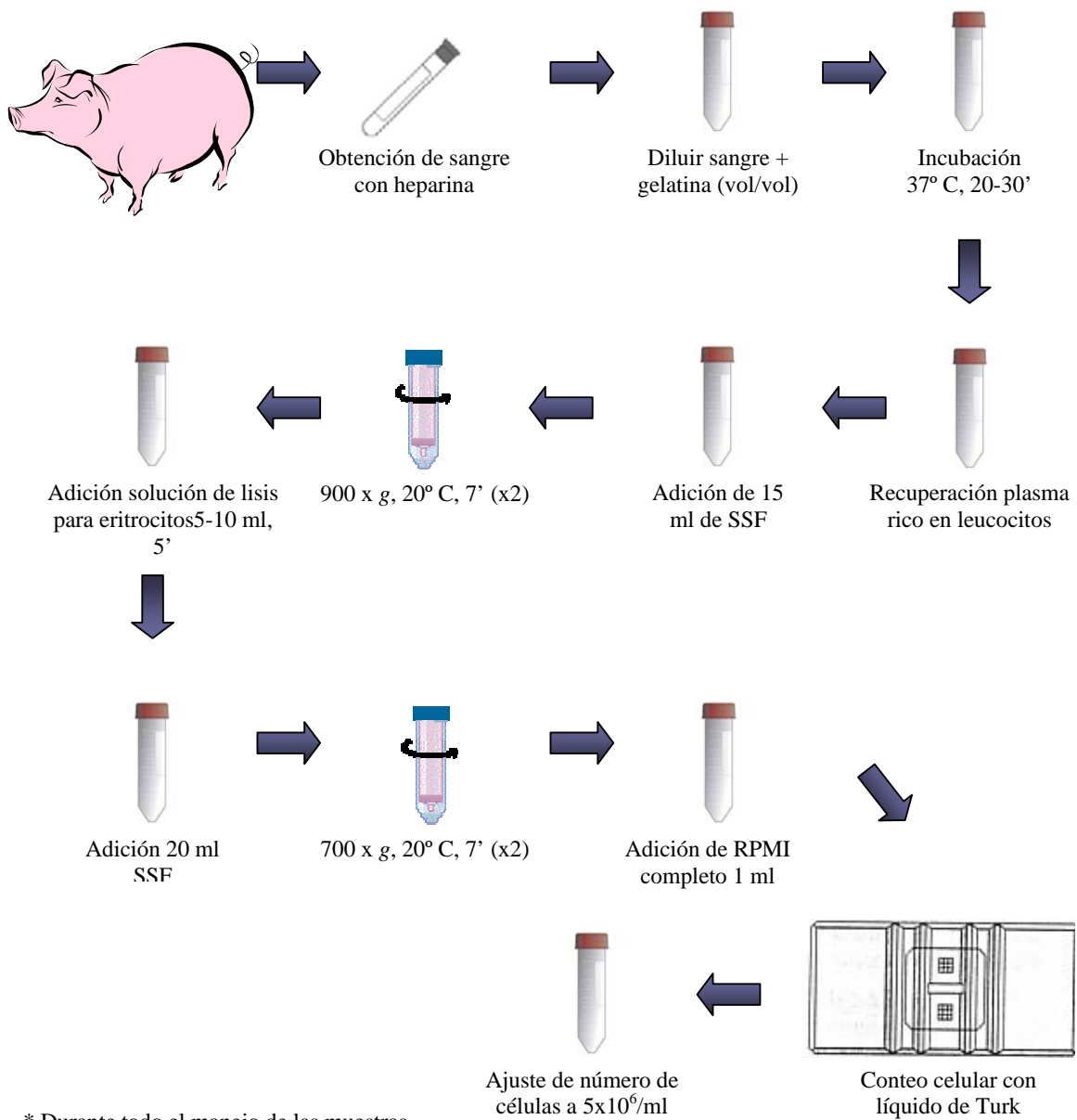
incubación. Una vez terminada la incubación se hicieron 2 lavados con SSF para eliminar las células que no se adhirieron a la laminilla, y se les agregó safranina al 0.5% cuidando de que quedará cubierto todo el pozo y no se secase durante 10 minutos. Una vez que este tiempo se cumplió, se lavaron las laminillas con agua corriente por el lado contrario de los pozos, se dejaron secar y se montaron con resina para su observación al microscopio. La técnica es una modificación hecha en el laboratorio 5 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, del CINVESTAV, de la utilizada por Zendejas⁽⁴⁸⁾ y por García⁽⁸⁰⁾.

Posteriormente, se realizó el conteo de 250 células en los 3 pozos utilizando el programa computacional “Image pro-plus”, versión 4.5.1.22 (Media Cybernetics Inc, USA) para el análisis de las variables mencionadas (índice fagocítico, capacidad fagocítica e índice reductivo).

5.11 Oponización de levaduras para la técnica de fagocitosis

En esta técnica se disgregaron 10 g de levadura de pan en 250 ml de SSF y se centrifugó a 30 x g durante 5 minutos para sedimentar las partículas gruesas, recolectando el sobrenadante rico en levaduras finas. El sobrenadante resultante fue nuevamente centrifugado; en esta ocasión a 200 x g durante 10 minutos, repitiendo esta acción en dos ocasiones más con SSF. El sedimento se resuspendió en 50 ml de SSF, se envasó y esta solución se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos. Finalmente se tomó una alícuota de 0.25 ml la cual se colocó en un tubo de ensayo y se centrifugó a 50 x g durante 3 minutos; desechando el sobrenadante resultante y resuspendiendo nuevamente el sedimento con 0.25 ml de suero fresco de cerdo. Esta

solución fue incubada durante 30 minutos a 37° C, y posteriormente se centrifugó a 50 x g durante 3 minutos. La pastilla que se obtuvo se lavó tres veces con solución salina y se centrifugó después de cada lavado; al final se resuspendió en 1 ml de SSF y se cuantificó la suspensión para ajustar finalmente a 40×10^6 levaduras opsonizadas/ml (2×10^6 levaduras opsonizadas/50 μ l). La técnica es una modificación hecha en el laboratorio 5 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, del CINVESTAV, de la utilizada por Zendejas ⁽⁴⁸⁾.



* Durante todo el manejo de las muestras y obtención de células, se mantuvieron en hielo para evitar la muerte celular

Figura 5. Metodología para la obtención de células de sangre. Abreviaturas: SSF (Solución salina fisiológica), RPMI completo (Medio de cultivo celular con suero fetal bovino)

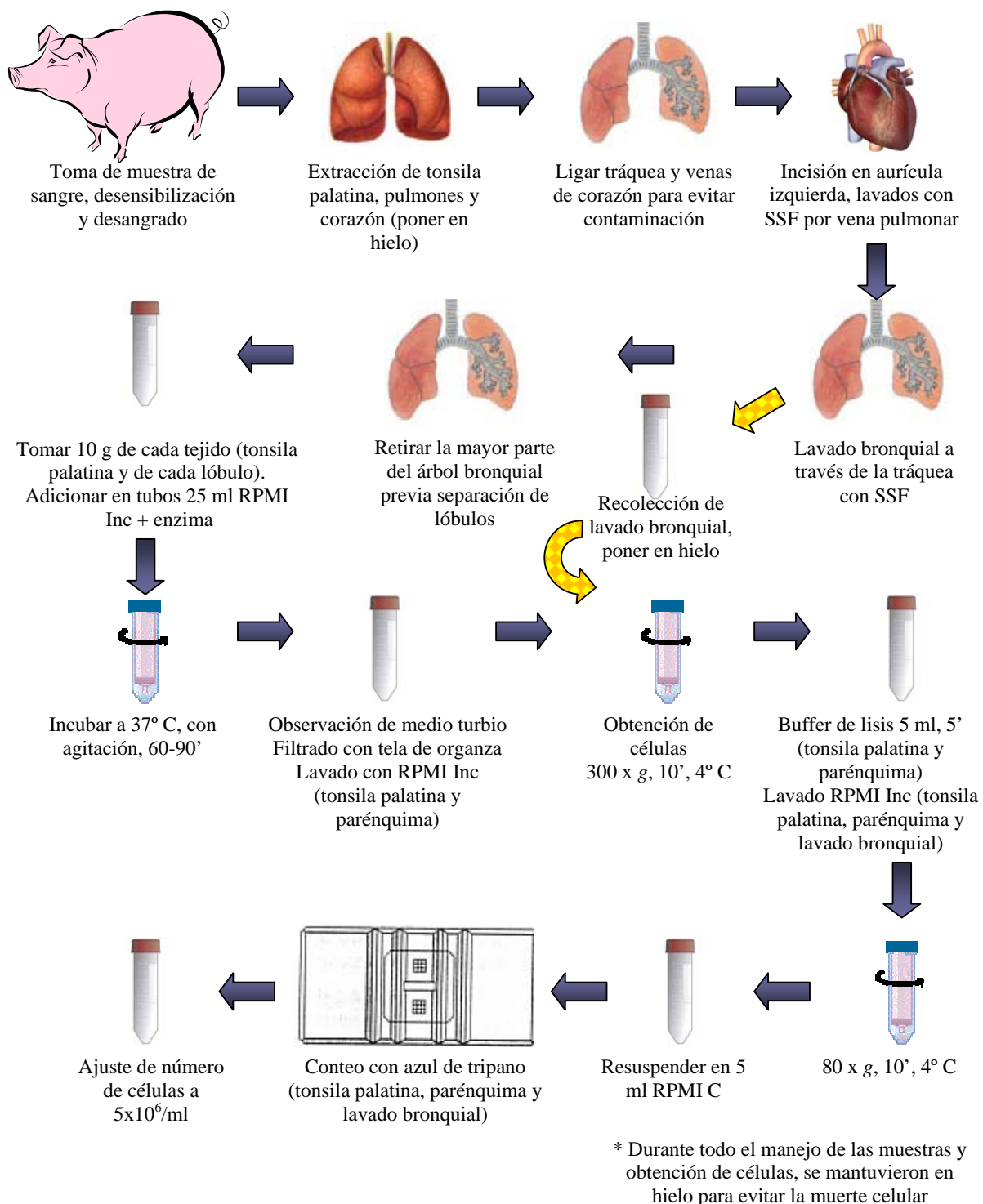


Figura 6. Metodología para la obtención de células de tonsila palatina, parénquima pulmonar y lavado bronquial. Las flechas amarillas representan el manejo que se le dio al lavado bronquial, al no ser sometido a una digestión enzimática. Abreviaturas: SSF (Solución salina fisiológica), RPMI Inc (Medio de cultivo celular incompleto), RPMI C (Medio de cultivo celular completo).

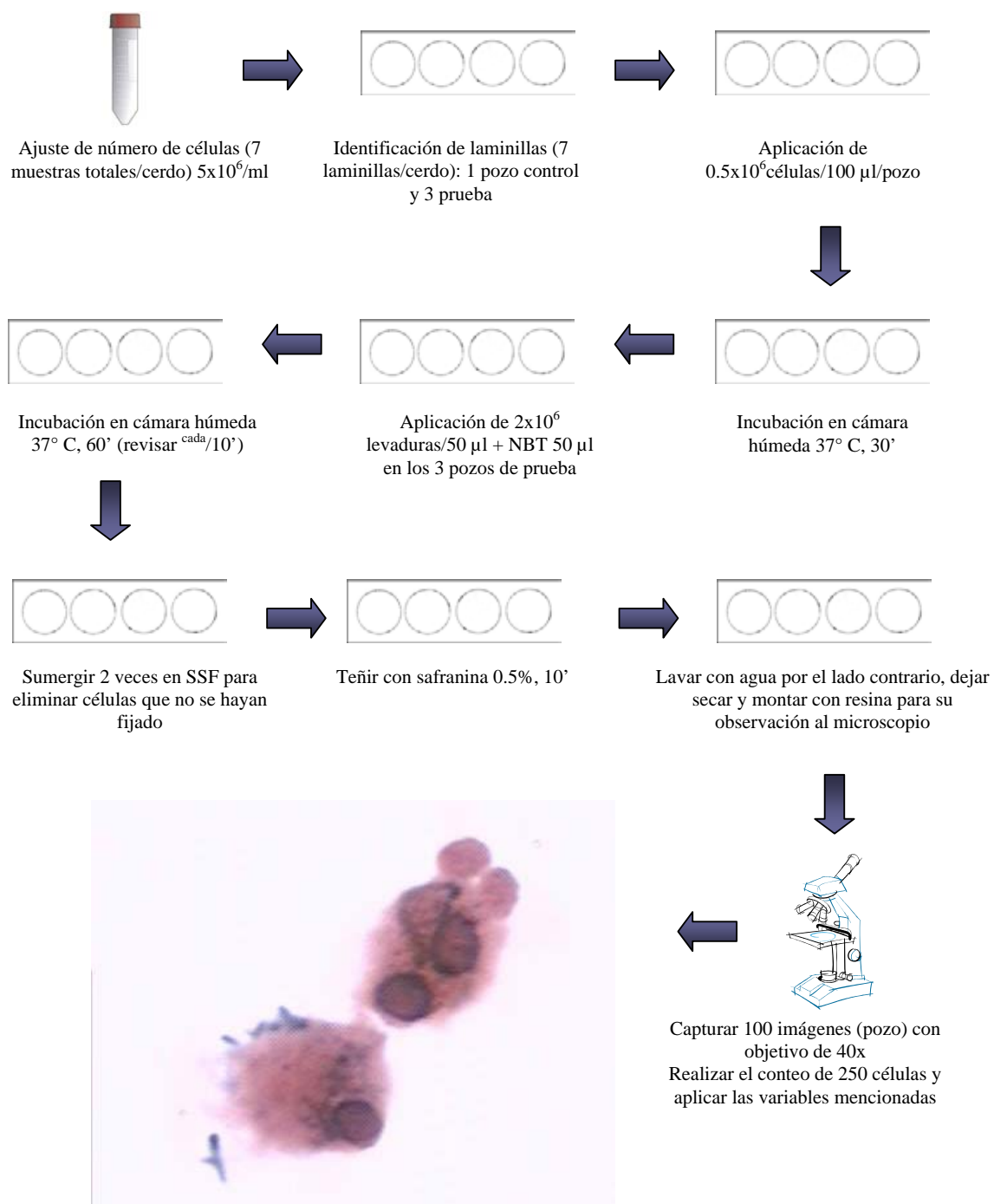


Figura 7. Técnica de fagocitosis en células porcinas. La imagen corresponde a células provenientes de lavado bronquial de un animal del grupo con tratamiento (1% de arginina) de 2 meses de edad, que fueron teñidas con safranina, en donde se puede observar células que fagocitaron levaduras y que redujeron el NBT. Abreviaturas: NBT (Nitro azul de tetrazolio), SSF (Solución salina fisiológica)

6. Resultados

6.1 Estandarización de la prueba de fagocitosis en las células de sangre y de mucosas

En este estudio, se obtuvieron células de sangre (**SAN**), tonsila palatina (**TP**), lóbulo apical derecho (**LAD**), lóbulo apical izquierdo (**LAI**), lóbulo diafragmático derecho (**LDD**), lóbulo diafragmático izquierdo (**LDI**) y lavado bronquial (**LB**).

Para la estandarización de la prueba de fagocitosis en las células inmunes sistémicas y mucosales locales del cerdo joven, fue necesario realizar modificaciones a la técnica empleada por Zendejas ⁽⁴⁸⁾, debido a que en la técnica original solo se emplean células de sangre completa; y para este estudio se utilizaron células sanguíneas con anticoagulante y células en medio de cultivo (TP, parénquima pulmonar y LB). El volumen máximo que aceptaron los pozos de las lamillas utilizadas en este experimento fue de 400 μ l. Por lo cual, sólo se adicionó un volumen total de 200 μ l/pozo (100 μ l de células de los tejidos, 50 μ l de levaduras opsonizadas y 50 μ l de NBT), para facilitar su homogenización y manipulación durante la prueba.

Se realizaron diferentes pruebas (en forma de tablero de ajedrez) para obtener la relación óptima de células inmunes y levaduras opsonizadas (Figura 8). Las células inmunes fueron adicionadas en un número de 0.5, 1 y 2×10^6 células/100 μ l de cada tejido, siendo $0.5 \times 10^6/100$ μ l la cantidad que mostró las mejores condiciones para realizar el conteo celular. En este mismo sentido, las levaduras opsonizadas, fueron añadidas en pozos que contenían $0.5 \times 10^6/100$ μ l de células a concentraciones de 2, 4 y 8×10^6 levaduras/50 μ l, con lo cual se aseguraba que la célula fagocítica tuviera una

cantidad abundante de microorganismos. Siendo 2×10^6 levaduras/50 μ l, un número adecuado para la fagocitosis de las células que se encontraban adheridas a la laminilla, a una razón de 4 levaduras por célula.

Se realizaron también cinéticas para determinar el tiempo adecuado para que las células inmunes de las muestras se fijaran a la laminilla (Figura 8), manejando lapsos de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Observándose una fijación satisfactoria de las células de todos los tejidos a partir de los 30 minutos. También, se realizó una cinética para determinar el tiempo óptimo para que las células pudieran fagocitar a las levaduras y redujeran al NBT en lapsos de 30, 60 y 90 minutos, obteniéndose desde los 30 minutos una buena actividad reductora en la mayoría de las células, siendo 60 minutos el tiempo óptimo para la realización del conteo celular. Se enumeraron 250 células totales por cada tejido con la ayuda del programa computacional “Image pro-plus” (Media Cybernetics Inc., versión 4.5.1.22),

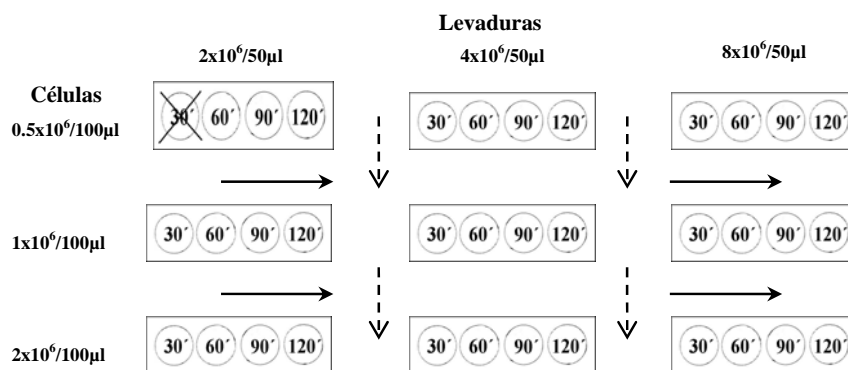


Figura 8. Prueba en forma de tablero de ajedrez. Mediante ésta técnica se determinó el tiempo óptimo de la adherencia celular, así como la cantidad de células y levaduras a depositar en las laminillas. Se colocaron 9 laminillas en 3 filas. Cada laminilla contó con 4 pozos, a los cuales se les asignó un lapso de tiempo (30, 60, 90 y 120 minutos) para determinar el periodo de incubación para fijar a las células a la laminilla, siendo 30 minutos el tiempo ideal para la adherencia de las células (pozo marcado). Se asignó de manera horizontal (flechas continuas) 1 fila de laminillas ($n= 3$ laminillas) para cada una de las cantidades de células (0.5 , 1 y 2×10^6 células/100 μ l) a depositar en cada pozo en los periodos de tiempo previamente mencionados, siendo la más adecuada la fila de 0.5×10^6 células/100 μ l (pozo marcado). Las flechas continuas muestran como fueron asignadas las filas de cada concentración celular. Se asigno de manera vertical 1 columna de laminillas ($n= 3$ laminillas) para cada una de las cantidades de levaduras opsonizadas (2 , 4 y 8×10^6 levaduras/50 μ l) a depositar en cada pozo, siendo la más adecuada la concentración con 2×10^6 levaduras/50 μ l a los 60 minutos de la incubación con NBT.

6.2 Obtención de imágenes para conteo celular

En el presente estudio, se contaron en total 250 células totales de los 3 pozos presentes en la laminilla, en los que se corrió la prueba de fagocitosis de los 7 tejidos (**SAN, TP, LAD, LAI, LDD, LDI y LB**), de cada uno de los cerdos de ambos grupos experimentales. De estas imágenes se obtuvieron los datos para poder analizar las siguientes variables: índice fagocítico, capacidad fagocítica e índice reductivo (Figuras 9-12).

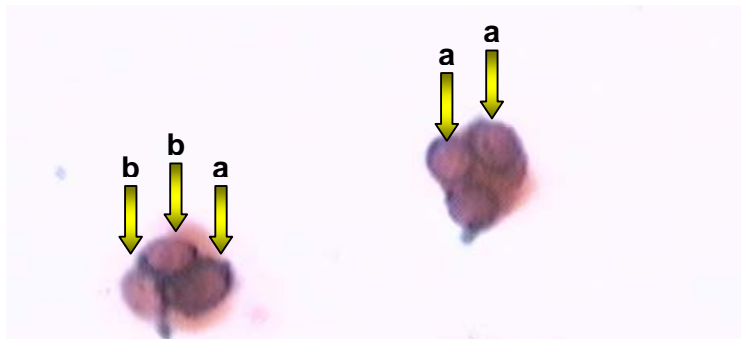


Figura 9. Prueba de fagocitosis en células de sangre. La imagen corresponde a células provenientes de sangre periférica de un animal del grupo con tratamiento (1% de arginina) de 2 meses de edad, que fueron teñidas con safranina, en donde se puede observar células que fagocitaron levaduras y que redujeron el NBT. Las flechas indican: **a**) las levaduras que fueron fagocitadas y que además redujeron al NBT (levaduras moradas) y **b**) las levaduras que no han sido reducidas (levaduras rosas).



Figura 10. Prueba de fagocitosis en células de tonsila palatina. La imagen corresponde a células provenientes de tonsila palatina de un animal del grupo con tratamiento (1% de arginina) de 2 meses de edad, que fueron teñidas con safranina, en donde se puede observar células que fagocitaron levaduras y que redujeron el NBT. Las flechas indican: **a**) las levaduras que fueron fagocitadas y que además redujeron al NBT y **b**) las levaduras que no han sido reducidas.

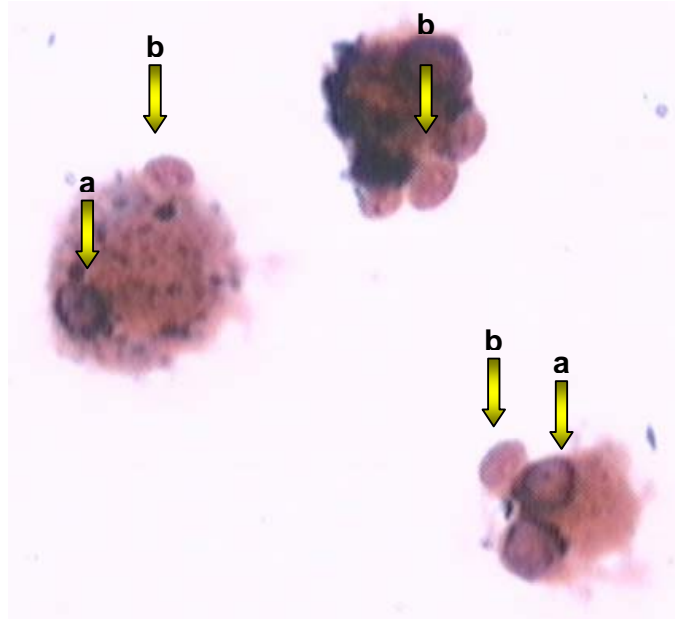


Figura 11. Prueba de fagocitosis en células de parénquima pulmonar. La imagen corresponde a células provenientes del lóbulo apical derecho de un animal del grupo con tratamiento (1% de arginina) de 2 meses de edad, que fueron teñidas con safranina, en donde se puede observar células que fagocitaron levaduras y que redujeron el NBT. Las flechas indican: **a**) las levaduras que fueron fagocitadas y que además redujeron al NBT (levaduras moradas) y **b**) las levaduras que no han sido reducidas (levaduras rosas).



Figura 12. Prueba de fagocitosis en células de lavado bronquial. La imagen corresponde a células provenientes de lavado bronquial de un animal del grupo con tratamiento (1% de arginina) de 2 meses de edad, que fueron teñidas con safranina, en donde se puede observar células que fagocitaron levaduras y que redujeron el NBT. Las flechas indican: **a**) las levaduras que fueron fagocitadas y que además redujeron al NBT (levaduras moradas) y **b**) las levaduras que no han sido reducidas (levaduras rosas).

6.3 Prueba de fagocitosis

6.3.1 Comparación de la prueba de fagocitosis entre tejidos del grupo control

6.3.1.1 Índice fagocítico.

El índice fagocítico es el resultado de la división del número de células que fagocitaron, entre las células totales obtenidas, multiplicado por 100. El índice fagocítico fue menor estadísticamente ($P < 0.001$) en los PMN de **SAN** y MN de **TP** con respecto a los MN de parénquima pulmonar (**LAD**, **LAI**, **LDD**, **LDI**) y **LB** en los cerdos del grupo control (Cuadro 6, Figura 13).

Cuadro 6. Índice fagocítico (grupo control)

Índice fagocítico						
SAN	TP	LAD	LAI	LDD	LDI	LB
x:43.14 a	46.43 a	76.71	81.18	75.68	77.68	81.94
DE:30.40	26.65	18.55	17.11	18.43	16.85	22.13
EE:2.000	1.669	1.722	1.495	1.902	1.501	1.808

a= $P < 0.001$ con respecto a las células de parénquima pulmonar y LB. Tejidos: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). Abreviaturas: promedio (x), desviación estándar (DE), error estándar (EE). n= 5 cerdos de 2 meses de edad.

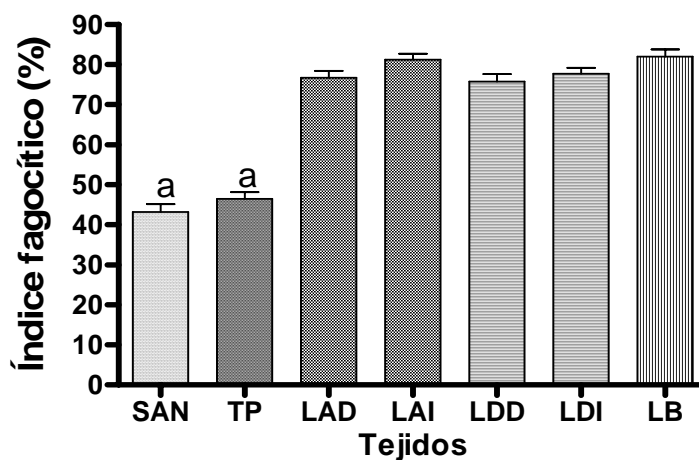


Figura 13. Índice fagocítico (grupo control). Índice fagocítico= número de células que fagocitaron/ número total de células multiplicado por 100. Tejidos: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). La gráfica corresponde solo al grupo control (0% de L-arginina). Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 5 cerdos de dos meses de edad.

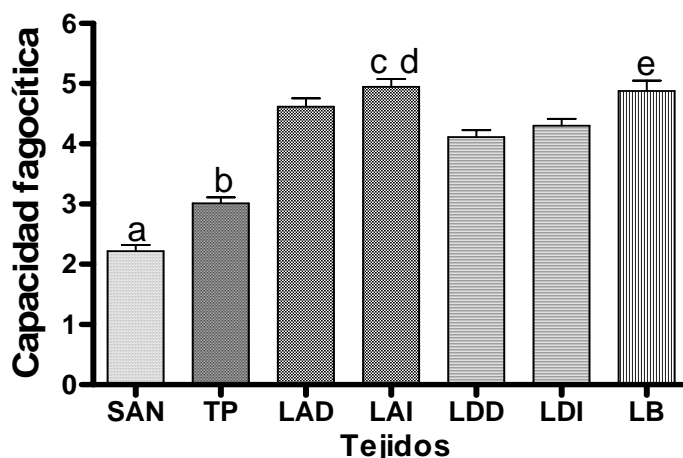
6.3.1.2 Capacidad fagocítica

La capacidad fagocítica es el número de levaduras ingeridas por las células fagocíticas. Los PMN de **SAN** tuvieron una menor capacidad fagocítica ($P < 0.001$) con respecto a los MN de los tejidos restantes. Los MN de **TP** reflejaron una inferior capacidad fagocítica ($P < 0.001$) en comparación con los MN de parénquima pulmonar y **LB**. Se observó una superior capacidad fagocítica en células de **LAI** con respecto a las células de **LDD** ($P < 0.01$) y **LDI** ($P < 0.05$). **LB** presentó una mayor capacidad fagocítica ($P < 0.01$) con relación a **LDD** en cerdos del grupo control (Cuadro 7, Figura 14).

Cuadro 7. Capacidad fagocítica (grupo control)

Capacidad fagocítica						
SAN	TP	LAD	LAI	LDD	LDI	LB
x:2.22 a	3.01 b	4.62	4.94 c d	4.11	4.30	4.88 e
DE:1.61	1.60	1.52	1.52	1.14	1.28	2.12
EE:0.106	0.100	0.142	0.133	0.118	0.115	0.174

a= $P < 0.001$ con respecto a los otros tejidos; b= $P < 0.001$ con respecto a parénquima pulmonar y LB; c= $P < 0.01$ con respecto a LDD; d= $P < 0.05$ con respecto a LDI; e= $P < 0.01$ con respecto a LDD. Tejidos: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). Abreviaturas: promedio (x), desviación estándar (DE), error estándar (EE). n= 5 cerdos de 2 meses de edad.



a= $P < 0.001$ con respecto a los otros tejidos
b= $P < 0.001$ con respecto a parénquima pulmonar y LB
c= $P < 0.01$ con respecto a células de LDD
d= $P < 0.05$ con respecto a células de LDI
e= $P < 0.01$ con respecto a células de LDD

Figura 14. Capacidad fagocítica (grupo control). Capacidad fagocítica= número de levaduras fagocitadas/ número de células que fagocitaron. Tejidos: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). La gráfica corresponde solo al grupo control (0% de L-arginina). Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 5 cerdos de dos meses de edad.

6.3.1.3 Índice reductivo

El índice reductivo es el resultado de la división del número de levaduras con reducción de NBT, entre el número total de levaduras fagocitadas. Los PMN de **SAN** mostraron un índice superior con respecto a células de **TP** ($P < 0.001$), parénquima pulmonar ($P < 0.001$) y de **LB** ($P < 0.05$). Los MN de **TP** demostraron un inferior índice reductivo ($P < 0.001$) con respecto a los otros tejidos. Los MN de **LB** tuvieron un mayor índice al compararlos con los MN de **LAI** ($P < 0.05$), **LDD** ($P < 0.01$) y **LDI** ($P < 0.001$) de los cerdos del grupo control (Cuadro 8, Figura 15).

Cuadro 8. Índice reductivo (grupo control)

Índice reductivo						
SAN	TP	LAD	LAI	LDD	LDI	LB
x:0.39 a b	0.03 c	0.25	0.24	0.22	0.20	0.32 d e f
DE:0.37	0.13	0.12	0.13	0.10	0.13	0.16
EE:0.024	0.008	0.012	0.012	0.011	0.012	0.013

a= $P < 0.001$ con respecto a TP y parénquima pulmonar; b= $P < 0.05$ con respecto a LB; c= $P < 0.001$ con respecto a todos los tejidos; d= $P < 0.001$ con respecto a LDI; e= $P < 0.01$ con respecto a LDD; f= con respecto a LAI Tejidos: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). Abreviaturas: promedio (x), desviación estándar (DE), error estándar (EE). n= 5 cerdos de 2 meses de edad.

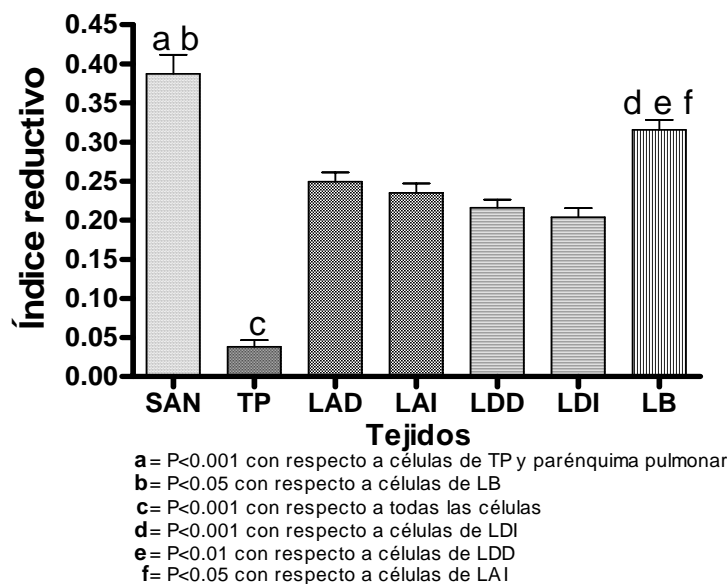


Figura 15. Índice reductivo (grupo control). Índice reductivo= número de levaduras fagocitadas con reducción de NBT/ número total de levaduras fagocitadas. Tejidos: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). La gráfica corresponde solo al grupo control (0% de L-arginina). Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 5 cerdos de dos meses de edad.

6.3.2 Efecto de la inclusión del 1% de L-arginina

6.3.2.1 Índice fagocítico

El índice fagocítico de los PMN de **SAN** y MN de **TP** de cerdos suplementados con L-arginina presentaron un aumento significativo ($P < 0.001$) en este índice. Los MN de **LAI** que recibieron el tratamiento mostraron un índice inferior ($P < 0.001$), respecto al grupo control. Los MN de **LDD** del grupo con tratamiento mostraron un aumento ($P < 0.01$) con respecto a su contraparte no tratada. (Cuadro 9, Figura 16).

Cuadro 9. Índice fagocítico

		Índice Fagocítico					
	SAN	TP	LAD	LAI	LDD	LDI	LB
Control	x:43.14	46.43	76.71	81.18	75.68	77.68	81.94
n= 5	DE:30.40	26.65	18.55	17.11	18.43	16.85	22.13
	EE:2.000	1.669	1.722	1.495	1.902	1.501	1.808
Arginina	x:55.52***	61.19***	76.83	75.50***	82.45**	77.58	P:84.53
n= 5	DE:22.61	24.78	16.15	15.17	13.57	15.13	SD:18.97
	EE:1.720	1.607	1.554	1.541	1.294	1.492	EE:1.587

*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; Tejidos: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). Abreviaturas: promedio (x), desviación estándar (DE), error estándar (EE). n= 5 cerdos de 2 meses de edad en cada grupo.

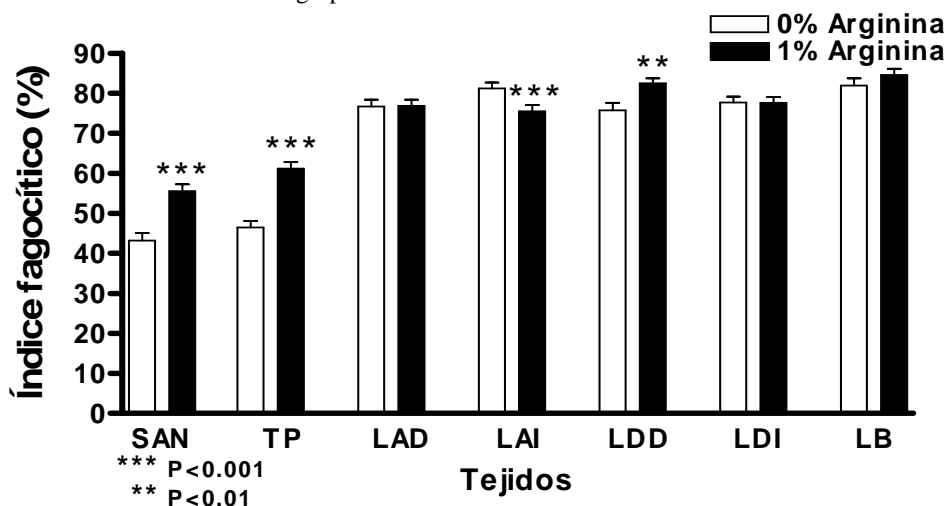


Figura 16. Índice fagocítico. Índice fagocítico= número de células que fagocitaron/número total de células multiplicado por 100. Tejidos de cerdo: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). Las barras blancas corresponden al grupo control (0% de L-arginina, n= 5) y las barras negras corresponden al grupo con tratamiento (1% de L-arginina, n= 5) Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 5 cerdos.

6.3.2.2 Capacidad fagocítica

Los PMN de SAN que recibieron L-arginina mostraron una capacidad superior ($P < 0.001$) con respecto a los PMN de SAN del grupo control. Se observó una capacidad fagocítica inferior ($P < 0.001$) en MN de LAI de los cerdos con inclusión de L-arginina al compararlos con su contraparte que no recibió tratamiento (Cuadro 10, Figura 17).

Cuadro 10. Capacidad fagocítica 1

		Capacidad fagocítica						
	SAN	TP	LAD	LAI	LDD	LDI	LB	
Control	x:2.22	3.01	4.62	4.94	4.11	4.30	4.88	
n=5	DE:1.61	1.60	1.52	1.52	1.14	1.28	2.12	
	EE:0.106	0.100	0.142	0.133	0.118	0.115	0.174	
Arginina	x:2.97***	3.18	4.70	4.01***	4.38	4.30	5.12	
n=5	DE:1.30	1.24	1.11	0.97	1.11	1.130	1.37	
	EE:0.100	0.081	0.108	0.099	0.105	0.111	0.115	

*** $P < 0.001$. Tejidos: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). Abreviaturas: promedio (x), desviación estándar (DE), error estándar (EE). $n = 5$ cerdos de 2 meses de edad.

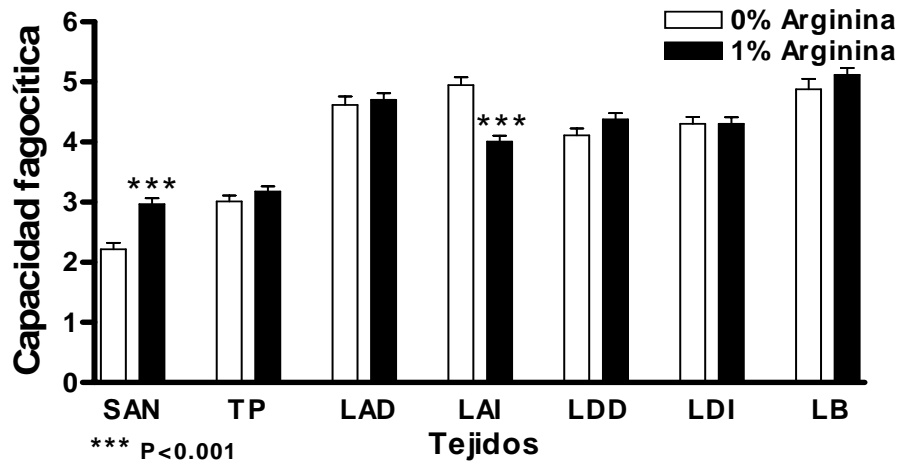


Figura 17. Capacidad fagocítica. Capacidad fagocítica= número de levaduras fagocitadas/número de células que fagocitaron. Tejidos de cerdo: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). Las barras blancas corresponden al grupo control (0% de L-arginina, $n = 5$) y las barras negras corresponden al grupo con tratamiento (1% de L-arginina, $n = 5$). Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 5 cerdos.

6.3.2.3 Índice reductivo

Los PMN de SAN de cerdos con tratamiento mostraron un índice reductivo superior ($P < 0.001$) al compararlos con el grupo control. Los MN de LDD y LDI de cerdos que recibieron L-arginina presentaron un índice superior ($P < 0.001$) al compararse con su contraparte que no recibió este aminoácido (Cuadro 11, Figura 18).

Cuadro 11. Índice reductivo

		Índice reductivo						
		SAN	TP	LAD	LAI	LDD	LDI	LB
Control n=5	x:	0.39	0.03	0.25	0.24	0.22	0.20	0.32
	DE:	0.37	0.13	0.12	0.13	0.10	0.13	0.16
	EE:	0.024	0.008	0.012	0.012	0.011	0.012	0.013
Arginina n=5	x:	0.43***	0.06	0.22	0.25	0.30***	0.28***	0.34
	DE:	0.23	0.16	0.10	0.12	0.12	0.11	0.17
	EE:	0.018	0.010	0.010	0.013	0.012	0.011	0.015

*** $P < 0.001$. Tejidos: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). Abreviaturas: promedio (x), desviación estándar (DE), error estándar (EE). n= 5 cerdos de 2 meses de edad.

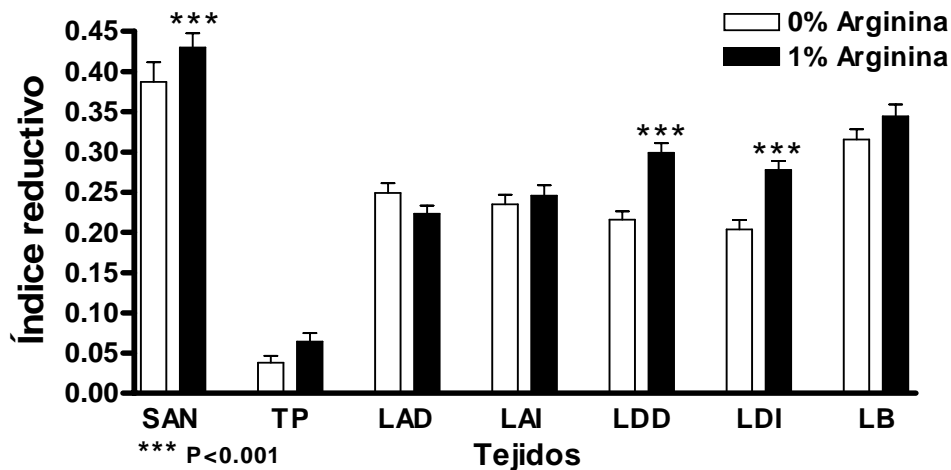


Figura 18. Índice reductivo. Índice reductivo= número de levaduras fagocitadas con reducción de NBT/número total de levaduras fagocitadas. Tejidos de cerdo: sangre (SAN), tonsila palatina (TP), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo diafragmático derecho (LDD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lavado bronquial (LB). Las barras blancas corresponden al grupo control (0% de L-arginina, n= 5) y las barras negras corresponden al grupo con tratamiento (1% de L-arginina, n= 5) Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 5 cerdos.

7. Discusión

La creciente demanda de carne de cerdo con altos estándares de inocuidad, así como la restricción en el uso profiláctico de antibióticos por el riesgo de crear patógenos potencialmente resistentes para el ser humano ⁽⁵⁴⁾, ha motivado la búsqueda de alternativas naturales para la protección de esta especie. En este sentido, recientemente se ha observado que algunos nutrientes son capaces de modular la respuesta inmune en los animales ⁽¹⁵⁾. En varios estudios, la administración de dietas ricas en inmunonutrientes (arginina, glutamina, ácidos grasos ω 3 y nucleótidos), ha mejorado la respuesta inmunológica en diferentes especies ^(4-6, 17, 54, 81-84). En la actualidad, el estudio de la actividad de la arginina como un ingrediente modulador de la respuesta inmune ha despertado gran interés ^(1, 2, 4-7). La arginina es utilizada por los mamíferos jóvenes para el crecimiento ^(1, 5, 7); sin embargo, en el cerdo joven, la producción de arginina puede ser baja, al no contar con la maquinaria enzimática necesaria para su síntesis, lo cual hace necesario un aporte exógeno ^(3, 14). Además, en condiciones de estrés o enfermedad se requiere de una alta demanda de este aminoácido ^(1, 3, 5). A pesar de ser una molécula descubierta en el siglo XIX ⁽¹⁾, aún no se conocen todas sus propiedades en el cerdo, principalmente en la respuesta inmune de esta especie. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto de la arginina sobre la fagocitosis de células de sangre (PMN) y de mucosas (macrófagos de tonsila palatina, parénquima pulmonar y lavado bronquial) en cerdos jóvenes.

El destete en el cerdo, particularmente el realizado a edades tempranas (< 21 días) representa un evento crítico, en donde se presentan cambios drásticos en su alimentación y ambiente, lo que lo hace vulnerable a diversos procesos infecciosos

respiratorios y digestivos. Además, el cerdo puede presentar una inmadurez de las células inmunitarias ocasionando una inmunodeficiencia secundaria ^(31, 47, 48, 85). Las condiciones de hacinamiento, poca ventilación y eventuales deficiencias en el manejo sanitario de las instalaciones, provoca que los pulmones de estos animales estén expuestos a diversas partículas que pueden dañarlo ^(52, 68). La posibilidad de una mayor susceptibilidad a las infecciones en los lóbulos apicales y diafragmáticos de cerdos jóvenes ha sido mencionada ^(31, 55, 59, 68-70, 72, 86). Lo anterior puede relacionarse con las infecciones respiratorias recurrentes observadas posdestete, que ocasionan cuantiosas pérdidas económicas ^(75, 76). Por lo tanto, conocer la actividad de las células fagocíticas entre los diferentes lóbulos pulmonares, permitiría por un lado determinar la existencia de una inmunosupresión en estos lóbulos, y por otro detectar las deficiencias que favorecen la colonización del tejido por los patógenos; lo que finalmente podría ayudar en la evaluación de tratamientos inmunomoduladores en el cerdo joven.

7.1 Estandarización de la prueba de fagocitosis en las células de sangre y de mucosas.

Para la obtención de los PMN de sangre, primero se montó la técnica de obtención de PMN en humanos y posteriormente se ajustó al modelo porcino. Se modificó la técnica empleada por Vega ⁽⁷⁸⁾, usando sangre completa a la cual se le agregó gelatina bacteriológica al 1%, siendo efectiva para la obtención de PMN de cerdos jóvenes.

Se han desarrollado protocolos para la obtención de células de parénquima pulmonar en roedores mediante el uso de colagenasa tipo IV ^(79, 87-91) obteniendo buenos resultados, por lo cual se decidió aplicar al modelo porcino, esta técnica para obtener los fagocitos

de parénquima pulmonar y tonsila palatina. La selección de los lóbulos pulmonares apicales (LAD, LAI) y diafragmáticos (LDD, LDI), fue hecha debido a la frecuente incidencia de lesiones pulmonares que muestran estos lóbulos en el cerdo; lo cual ha llegado a relacionarse con una inmunodeficiencia secundaria que los vuelve susceptibles a las infecciones ⁽⁵⁵⁾. Los lóbulos pulmonares restantes (intermedios y accesorios) no fueron considerados en este estudio, debido a la imposibilidad de procesar un mayor número de muestras en el tiempo requerido. Se utilizó la técnica empleada en el parénquima pulmonar para la obtención de las células de TP, obteniendo células viables para el experimento. La obtención del lavado bronquial mediante la perfusión de SSF fue similar a la empleada en otros estudios ^(47, 65, 73, 74, 92), recuperando células viables para la realización de este experimento.

Para la realización de la prueba de fagocitosis, se realizaron modificaciones a la técnica empleada por Zendejas ⁽⁴⁸⁾, debido a que este autor utiliza células adherentes del coagulo sanguíneo, mientras que, en este trabajo las células adherentes se encontraban en suspensión (medio de cultivo celular) al tratarse de tejidos con características diferentes. La técnica original ⁽⁴⁸⁾ requiere de un rápido procesamiento de las células, lo cual no podía llevarse a cabo debido a la distancia existente entre los corrales donde se tomaron las muestras y el laboratorio donde fueron procesadas.

Se usaron laminillas con pozos, permitiendo un aprovechamiento del espacio de la cámara húmeda y un control de las muestras durante las incubaciones. El tiempo para la adherencia adecuada de las células a las laminillas fue de 30 minutos en los tejidos. Mientras que, para la incubación con las levaduras opsonizadas y el NBT el tiempo

óptimo fue de 60 minutos, observando un buen desempeño de los fagocitos de los tejidos en ensayos previos.

En la realización de este experimento se utilizaron sangre y tonsila palatina como controles para la prueba de fagocitosis. Los PMN de sangre se evaluaron como indicador de la inmunidad sistémica en cerdos sanos ⁽⁴⁸⁾. Mientras que los MN de TP se usaron como un control de los MN de parénquima pulmonar (LAD, LAI, LDD, LDI) y LB; cabe mencionar que el sistema inmunitario de las mucosas tiene una evolución diferente al desarrollarse en un ambiente antigénico distinto a la inmunidad sistémica. Además, su localización anatómica (en el paladar blando de la orofarínge) permitió un fácil acceso y recolección al momento de la necropsia de los cerdos.

Para la evaluación del índice reductivo, se utilizó la prueba de oxidación de nitro azul de tetrazolio (NBT), la cual permite determinar la capacidad de los neutrófilos en sangre para generar radicales potencialmente dañinos para los microorganismos. ^(30, 33, 40, 80). El empleo de esta prueba en otros tejidos (p.e. líquido cefalorraquídeo o sinovial) es controversial, debido al aumento o descenso en la reducción del NBT en las células ⁽⁹³⁻⁹⁶⁾; sin que hasta el momento se hayan aclarado las razones de dicho efecto. De hecho, no se tienen datos similares para el tejido pulmonar. En las muestras de parénquima pulmonar y LB se observó una precipitación del NBT antes de 60 minutos en ensayos previos al experimento, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de los fagocitos para verter sus gránulos al espacio extracelular como ocurre en la fagocitosis frustrada o degranulación extracelular ^(36, 97), cabe recordar que los MN cuentan con un citoplasma rico en gránulos, aunque en menor cantidad que los PMN ^(97, 98). La degranulación de la célula en ocasiones suele ocurrir antes de que la partícula blanco sea

fagocitada por completo; lo anterior pudo ocasionar la oxidación del NBT y provocar su precipitación.

Por último, el laboratorio fabricante del NBT ⁽⁹³⁾ recomienda un conteo mínimo de 100 células totales; en este trabajo, 250 células totales por tejido fueron contadas, debido a que en ensayos previos se determinó que esta cantidad era necesaria para evaluar todos los índices de la prueba de fagocitosis.

7.2 Comparación de la prueba de fagocitosis entre tejidos del grupo control

El sistema inmune de las mucosas representa una barrera importante entre un medio interno generalmente estéril y un medio externo abundante en partículas; además de evolucionar en un ambiente diferente al de su análogo, la respuesta inmune sistémica. Gran parte del conocimiento sobre la inmunidad en las mucosas está basado en estudios hechos en el intestino delgado (placas de Peyer). En comparación, la información referente a la actividad inmunológica que se realiza en la mucosa respiratoria es limitada, a pesar de ser la vía de entrada de varios microorganismos importantes. En los últimos años se ha considerado al LB como representativo de la inmunidad en el pulmón ^(74, 75), sin embargo, existen indicios sobre diferencias en las células inmunes presentes en el parénquima pulmonar y el espacio alveolar ⁽⁹⁹⁾. Lo anterior puede ser un indicador de diferencias no solo entre un mismo grupo celular, sino también en la inmunidad de los diferentes lóbulos pulmonares. Por lo tanto, este estudio comparó la fagocitosis y la capacidad de reducción *in vitro* de las células de los lóbulos pulmonares más representativos (LAD, LAI, LDD, LDI) y el LB de cerdos sanos para poder establecer un parámetro del SFM y las posibles diferencias entre lóbulos que pudieran

ser un antecedente para la explicación de la predilección que muestran los patógenos a diferentes lóbulos pulmonares.

7.2.1 Índice fagocítico

Este índice (Figura 13) establece el número de células que fagocitaron entre el total de las células presentes en la muestra, determinando el porcentaje de células capaces de fijarse *in vitro* a las levaduras opsonizadas. Los resultados revelaron que los fagocitos MN de pulmón (parénquima pulmonar y LB) provenientes de cerdos del grupo control fueron superiores al fijarse a las levaduras opsonizadas, comparados con los PMN de SAN y los MN de TP.

El mayor índice fagocítico observado en los MN de parénquima pulmonar y LB, podría estar asociado a una mayor diferenciación y actividad de estas células provocada por la presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) en este tejido, lo cual puede ser benéfico al estar constantemente expuesto a partículas que podrían dañarlo. El tejido pulmonar es una buena fuente de esta citocina ⁽¹⁰⁰⁾, siendo un factor crucial para el mantenimiento de la población, maduración y actividad del macrófago ⁽¹⁰¹⁻¹⁰⁵⁾. De hecho, la inhibición de esta citocina en AMØ de ratones mostró una disminución en su capacidad de adhesión y expresión de receptores (p.e. Tipo toll), volviéndolos más susceptibles a las infecciones ^(102, 103).

El menor índice fagocítico observado en los MN de TP comparados con los MN de pulmón puede deberse al efecto de citocinas producidas en el tejido por los linfocitos T, pudiendo provocar en el MN un estado de reposo. Existen indicios de la expresión del

factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF, por sus siglas en inglés) en las tonsilas ⁽¹⁰⁶⁾. Este factor a diferencia del GM-CSF, sólo se encarga de estimular la proliferación y diferenciación de los macrófagos ^(104, 107), sin inducir la expresión de receptores útiles para el reconocimiento de partículas. Además, el linfocito cooperador (T_H por sus siglas en inglés) podría estar activando al macrófago por la vía alterna mediante la acción de citocinas (IL-4, IL13) ⁽¹⁰⁸⁾. En este sentido, se alude que el macrófago estimulado por la vía alterna es un buen inductor de tolerancia y tiene una mayor expresión de moléculas MHC II (complejo mayor de histocompatibilidad, por sus siglas en inglés) ⁽¹⁰⁹⁾. El estado en reposo en el MN de TP puede ser un mecanismo mediante el cual la mucosa oral evita la activación de la respuesta inmune (tolerancia alimenticia), debido a la gran cantidad de antígenos benéficos que ingresan por esta vía. Por otra parte, existe la posibilidad de que células con una menor capacidad de ingestión (p.e. células dendríticas o linfocitos B) se pudieran adherir a la laminilla enmascarando el resultado.

El índice fagocítico inferior de los PMN de SAN con respecto a los MN de la mucosa oral y respiratoria, puede deberse a que al provenir de animales clínicamente sanos, las células carecieron de una estimulación (p.e. citocinas) para aumentar su actividad como fagocitos. Los PMN circulan en la sangre como células maduras ⁽³²⁾, y son capaces de eliminar patógenos, empero, su función antimicrobiana aumenta cuando se activan al abandonar el torrente circulatorio ^(28, 32, 38) mediante sustancias quimiotácticas producidas en los sitios de inflamación o lesión ^(28, 31, 32, 38, 110), un ejemplo puede ser la GM-CSF, citocina que es capaz de inducir la fagocitosis y aumentar la longevidad del PMN ^(104, 111). Lo anterior puede explicar la menor proporción de PMN que fagocitaron en este tejido.

7.2.2 Capacidad fagocítica

Con este índice (Figura 14) se obtuvo el número de levaduras fagocitadas *in vitro* en las muestras provenientes de cerdos del grupo control. En los MN del pulmón se observó una capacidad fagocítica superior en comparación con los PMN (neutrófilos) de SAN, lo cual podría deberse a una mayor expresión de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) y los receptores para LPS (scavenger) observados en los macrófagos pulmonares, como ya fue informado por Gordon^(108, 112). Los PRRs (p.e. receptores tipo Toll) detectan patrones exclusivos de los microorganismos como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés)^(58, 97, 110, 113-117); además, de contar con receptores para opsoninas (p.e. receptor para, inmunoglobulinas y complemento)^(28, 34, 110, 117) asegurando el reconocimiento e ingestión de partículas extrañas. Además, los macrófagos tienen la capacidad de volver a producir lisosomas^(97, 110), pudiendo mantenerse en las zonas de inflamación al realizar más procesos fagocíticos^(28, 31, 32). Por su parte, los neutrófilos muestran un déficit de energía, ocasionando que sólo puedan realizar un número limitado de procesos fagocíticos^(32, 110).

La menor actividad fagocítica en los MN de TP con respecto a los MN de parénquima pulmonar y LB, puede deberse a que el macrófago de TP al estar activado por la vía alterna, muestra una acción medida contra las levaduras. Durante la activación alterna, la célula expresa diferentes receptores (p.e. manosa, CD163, CD14, basureros o scavenger)^(28, 118, 119), útiles para la ingestión de los microorganismos, empero su actividad puede ser menor comparada con los receptores de la vía clásica (p.e. RTT y opsoninas)⁽¹¹⁸⁾. Dependiendo de sus necesidades, el organismo, podría activar a los MN en el tejido. En lechones sanos, no se encontraron células mieloides en las criptas

epiteliales y los macrófagos presentes expresaron receptores CD163, mientras que, en tonsilas con diferentes grados de infección, se localizaron fagocitos en las criptas epiteliales y CPA en el área extrafolicular^(120, 121). Por lo cual al provenir las células de animales sanos, su actividad fagocítica se vió afectada.

En este estudio se observaron diferencias en la capacidad fagocítica *in vitro* de los diferentes lóbulos pulmonares. Los MN de LAI mostraron una capacidad superior en la ingestión de levaduras comparado con los MN de LDD y LDI. Esto puede atribuirse a una mayor actividad de estas células en LAI, debido a que este lóbulo presenta una mayor exposición a las partículas inhaladas, o por las características anatómicas que influyen en la mayor susceptibilidad de este lóbulo a las infecciones^(68, 70, 72); provocando su mayor actividad. Debido a la escasa información sobre la inmunidad en el parénquima pulmonar, este estudio puede ser pionero al encontrar diferencias entre los lóbulos pulmonares, lo cual requiere de la confirmación experimental de los resultados mediante la realización de estudios posteriores (p.e. a diferentes edades del cerdo o bien, inoculándolos experimentalmente), para poder entender la actividad de las células fagocíticas en el pulmón.

La población de macrófagos en el pulmón está constituida por dos subpoblaciones: los macrófagos intersticiales⁽¹²²⁾ localizados en el parénquima pulmonar y los macrófagos que recubren al alveolo^(123, 124). Se ha informado en diferentes estudios en roedores que los macrófagos del alveolo muestran una mayor capacidad para fagocitar que los macrófagos del intersticio⁽¹²³⁻¹²⁶⁾, lo cual se podría relacionar con los resultados obtenidos en esta tesis en donde los MN del LB mostraron una capacidad fagocítica superior a la observada en LDD. Asimismo, coinciden con los resultados obtenidos

previamente por Muñoz, quien describe una mayor población de macrófagos con receptores para fagocitosis en el espacio alveolar en comparación con los macrófagos de parénquima pulmonar en cerdos destetados⁽¹⁰⁰⁾. Estos resultados pueden ser indicadores de que el MN del espacio alveolar es el centinela del pulmón atrapando a los antígenos que llegan a este órgano, mientras que, a pesar de que el MN del parénquima pulmonar fagocita puede ser el encargado de movilizar a los antígenos capturados al BALT.

7.2.3 Índice reductivo

El índice reductivo (Figura 15) midió la capacidad *in vitro* de las células fagocíticas de los animales del grupo control para generar capacidad reductora por la acción del sistema NADPH-oxidasa o el O_2^- ^(30, 40, 127). Esta prueba es utilizada en PMN de humanos para la confirmación de EGC^(30, 40, 127); la técnica de reducción de NBT fue adaptada para células MN porcinas con éxito. Se pudo observar en los resultados un índice reductivo superior en los PMN de SAN con respecto a los MN de la mucosa oral (TP) y respiratoria (parénquima pulmonar y LB). Este efecto se asoció con la capacidad de los neutrófilos para eliminar a los microorganismos invasores, mediante mecanismos efectivos, que difieren en puntos específicos a la de los MN. Se ha observado que los neutrófilos cuentan con un mayor número de lisosomas que los MN⁽⁹⁷⁾, permitiéndole al PMN eliminar rápidamente a las partículas ingeridas. También, desarrollan un mayor consumo de oxígeno por el estallido respiratorio (hasta 100 veces)^(31, 32), provocando un aumento en la producción de ROIs, compuestos tóxicos para los microorganismos. Se ha informado además, que los neutrófilos tienen una mayor cantidad de gránulos primarios (p.e. mieloperoxidasa) que los MN^(28, 30-32), los cuales son útiles para la

actividad bactericida del PMN. Lo anterior puede explicar la mayor capacidad de los PMN para eliminar a los microorganismos ingeridos en comparación con los MN.

En los MN de TP se observó una capacidad reductiva inferior al compararla con los MN de pulmón, posiblemente a consecuencia de la activación alterna del MN. Se menciona que, los macrófagos que son activados por esta vía o junto a IL-10 presentan una disminución en los mecanismos de destrucción intracelular (p.e. ROIs y NO) ⁽¹²⁸⁻¹³⁰⁾; debido a lo anterior son utilizados para la reparación y remodelación de los tejidos por la acción de las poliaminas ^(34, 118).

Al comparar la actividad reductora, se observó una actividad superior en los MN de LB con respecto a los MN de parénquima pulmonar, en especial en LAI, LDD y LDI. En varios estudios en roedores, se ha observado que el AMØ tiene una mayor capacidad para generar ROIs (p.e. O₂⁻) y RNIs (p.e. NO) comparado con el macrófago intersticial ^(124, 125). Los macrófagos intersticiales generalmente muestran una limitada producción de radicales tóxicos, lo cual constituye un mecanismo protector de la integridad del tejido pulmonar, en caso contrario se pueden presentar neumonías intersticiales como se ha descrito en roedores ^(123, 124). Otra posible explicación puede derivar de los datos obtenidos por Muñoz, quien menciona la existencia de diferencias en los receptores de los macrófagos de cerdos destetados; de manera que los MN del alvéolo presentan receptores para fagocitosis (SWC3) y los MN de parénquima pulmonar receptores para la presentación de antígenos (MHC II) ⁽¹⁰⁰⁾. Los datos anteriores pueden relacionarse con los resultados obtenidos en esta tesis.

En resumen, en condiciones *in vitro* las células de la inmunidad sistémica (PMN) y mucosal (MN) de cerdos del grupo control presentaron diferencias, las células de SAN mostraron una mayor eficiencia para eliminar a los microorganismos, mientras que las células de la inmunidad local del pulmón fueron eficientes para fijarse e ingerir a las partículas, pudiendo adecuar su respuesta dependiendo del tipo de partícula, lo que podría evitar un daño al tejido por una inadecuada respuesta inmune. Sin embargo, esto puede explicar en parte la mayor susceptibilidad a infecciones mucosales en los cerdos al destete. Cabe recordar que la fagocitosis dentro de la inmunidad innata es el primer mecanismo de defensa celular contra los patógenos, empero, no es el único medio para controlar las infecciones.

7.3 Efecto de la inclusión del 1% de L-arginina

La L-arginina es un aminoácido clasificado como condicionalmente esencial, debido a que en periodos de inmadurez, estrés, enfermedad o traumatismos, su síntesis endógena resulta insuficiente para mantener la homeostasis del organismo ⁽¹³¹⁻¹³³⁾. En los últimos años, se ha incrementado el estudio de la arginina debido a su papel como estimulante o modulador de la respuesta inmune en diferentes especies ^(4, 5, 17, 80, 81). Sin embargo, la interacción de este aminoácido o sus metabolitos con los componentes del sistema inmune aún no está del todo clara. Se ha propuesto que el efecto inmunoestimulador observado tras la suplementación con L-arginina puede deberse a: 1) la producción de NO, 2) un aumento en las citocinas, 3) la producción de poliaminas o 4) un incremento en las hormonas pituitarias ^(1, 134). En este estudio, se pudo comprobar que la administración del 1% de L-arginina estimuló la actividad fagocítica de los PMN sistémicos y de los MN de la mucosa oral y pulmonar, probablemente por alguno de los

mecanismos mencionados anteriormente. Cabe mencionar que la discusión del presente estudio fue hecha únicamente con base a los resultados estadísticamente significativos.

7.3.1 Índice fagocítico

La suplementación de L-arginina en las células del sistema inmune es capaz de inducir diversos efectos: 1) acrecentar el número de linfocitos del timo, 2) aumentar la adhesión de neutrófilos, 3) incrementar la fagocitosis de PMN y MN, y 4) mejorar la actividad citotóxica de las células NK^(1, 4, 5, 7, 81, 131, 133, 135).

Al evaluar *in vitro* el efecto de la inclusión oral de L-arginina (Figura 16) sobre las células del sistema inmune de cerdos jóvenes, se observó un índice fagocítico superior en los PMN de SAN, y los MN de TP y LDD de los animales con tratamiento. Los fagocitos inmaduros procedentes del torrente circulatorio proliferan modestamente en los tejidos⁽¹²⁸⁾, permitiendo mantener constante la población de estas células *in situ*. Cuando la arginina ingresa al macrófago (en estado basal) por el sistema y⁺L e interactúa con algunas citocinas (p.e. M-CSF, GM-CSF)^(136, 137), siendo el macrófago capaz de proliferar y diferenciarse, permitiendo la salida de la arginina no utilizada para ser disponible para otras células (p.e. para la síntesis proteica)^(136, 138).

Cuando el macrófago es estimulado (p.e. mediante citocinas), aumenta su demanda de arginina extracelular, necesitando del aporte exógeno de este aminoácido^(136, 139); expresa enzimas (iNOS y arginasa) capaces de metabolizar a la arginina para la producción de diversos compuestos (p.e. NO, poliaminas) útiles en la eliminación de patógenos y en la sanación de tejidos^(128, 131, 133, 140); y además, modifica el transporte de

la arginina, llevándola mediante el sistema y^+ , a la reserva de arginina (pool 1) en la célula, donde puede ser aprovechada por la iNOS^(136, 138, 141, 142). Al iniciar la activación de los macrófagos existe un cese de la proliferación⁽¹⁴³⁾; efecto que puede estar relacionado con la actividad del NO como ya ha sido observado en otros estudios^(144, 145). Lo anterior podría explicar el efecto observado en esta tesis, ya que, al disponer las células de un aporte extra de arginina, existió un mayor número de células maduras, capaces de activarse eficientemente al añadir levaduras opsonizadas.

En el presente estudio, los PMN de SAN se observó un aumento del índice fagocítico del grupo que recibió arginina. En diversos estudios se ha informado que la L-arginina es capaz de aumentar la función fagocítica de PMN de roedores, aves y humanos gracias a su actividad inmunoestimulante^(5, 81, 132, 134, 135, 146). Lo cual coincide con los resultados de este estudio. Este aumento puede deberse a que la mayor parte de la arginina sintetizada en el organismo es liberada al torrente circulatorio^(1, 7), el cual varía entre especies (humanos 80-120 μM , cerdos de 28 días de edad 159 $\mu\text{mol/L}$, cerdos de 75 días de edad 146 $\mu\text{mol/L}$)^(1, 8), permitiéndole a los PMN de los animales tratados disponer mejor de este aminoácido.

Se observó un incremento de la actividad fagocítica de los MN, lo cual concuerda con múltiples estudios en los que se ha detectado este efecto^(1, 5, 132, 146-150). El mayor índice fagocítico observado en los MN de TP y LDD podría estar relacionado con una mayor disponibilidad de arginina en estos tejidos. Aunque no se cuentan con datos en el cerdo sobre la concentración de arginina en los tejidos, en humanos se sabe que pueden variar ampliamente (de 100 μM a 1000 μM)⁽¹⁾. En el caso del MN de TP, estas células pudieron recibir el aporte de arginina desde la sangre o al entrar en contacto directo el

aminoácido con el tejido. Otros estudios mencionan que las células presentes en el epitelio de las criptas de la TP ^(120, 121, 151, 152), son capaces de pinocitar antígenos pudiendo beneficiar al MN para abastecerse de más arginina, viéndose reflejado en su mayor actividad.

Existe la tendencia de suponer que la circulación pulmonar se comporta de manera idéntica en todos los lóbulos, empero, el flujo sanguíneo en el pulmón es desigual. En humanos los vértices (parte superior) del pulmón muestran un menor flujo sanguíneo ^(153, 154). Estudios realizados en animales mostraron una mejor irrigación en la zona central y en la región dorsocaudal del pulmón ⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁷⁾. En el cerdo joven se observó una mayor irrigación en la región dorsocaudal, la cual disminuye con la edad ⁽¹⁵⁸⁾. Lo anterior puede justificar el aumento de este índice en LDD debido a que este lóbulo pudo recibir un mayor aporte de arginina, permitiéndole al MN desarrollarse de una forma más adecuada.

Adicionalmente, se observó que la administración del 1% de L-arginina en el grupo con tratamiento provocó un índice fagocítico inferior en los MN de LAI en comparación con el grupo control, sin que hasta el momento se hayan determinado las causas de dicho efecto, por lo cual se recomienda poner especial interés en este lóbulo en estudios posteriores. Se formularon diferentes hipótesis para la explicación de la reducción en este índice. 1) La inclusión de L-arginina pudo provocar la llegada de una mayor proporción de células inmaduras en el lóbulo. Se ha informado que la L-arginina es capaz de aumentar la proliferación de linfocitos TCD8+ y macrófagos ^(136, 159), en donde se le ha relacionado como sustrato de síntesis de proteínas o como precursor del NO y poliaminas. Bajo condiciones normales existe un recambio normal de macrófagos en los

tejidos (aproximadamente 1%/día) ⁽⁹⁸⁾. Antes de diferenciarse estas células en los tejidos por la acción de citocinas (p.e. M-CSF, GM-CSF, IL-3) ⁽¹⁴³⁾, muestran un tamaño reducido, un número mínimo de organelos intracelulares y una menor actividad fagocítica ⁽³⁷⁾. 2) Diferencias en la disponibilidad de arginina en el lóbulo. Se ha observado que existe un menor flujo sanguíneo en la zona craneoventral del pulmón en diferentes especies ^(154, 158), pudiendo afectar la disponibilidad de arginina de los MN. Al estimular a los fagocitos mediante la administración de levaduras opsonizadas, pudo existir un déficit de arginina; cabe recordar que la activación en los macrófagos es un mecanismo que demanda una alta proporción de arginina extracelular ^(136, 139), y que este aminoácido es un estimulador de la actividad fagocítica de los macrófagos y de otras funciones ^(132, 136, 139, 140, 149, 160) y 3) Por una mayor actividad de la enzima arginasa. Durante la activación de los macrófagos se produce iNOS y arginasa, la primera regula la actividad del macrófago enfílándolo a una actividad contra los microorganismos ^(34, 118, 128), que es altamente demandante de arginina; la iNOS puede bloquear la actividad de arginasa mediante productos intermediarios del NO (p.e. N⁰-hidroxil-L-arginina o NOHA) ^(5, 140, 149, 161), mientras que la arginasa se encarga de regular al MN disminuyendo la respuesta inmune encargado de la reparación y sanación de los tejidos ^(34, 118, 128), esta enzima reduce la disponibilidad de arginina inhibiendo así la función de iNOS ^(128, 133, 140, 161). Se ha observado que una alta actividad de esta enzima es capaz de afectar la proliferación y función de linfocitos ^(139, 159, 162). Además, se observó que la GM-CSF (citocina presente en el pulmón) ⁽¹¹²⁾ es un buen inductor de la arginasa al no contar con estímulos para la producción de NO (p.e. LPS o INF γ) ⁽¹³⁷⁾. Las hipótesis anteriores podrían explicar el descenso en fagocitosis de los MN de LAI, aunque también este descenso podría estar relacionado con la susceptibilidad a las enfermedades que se observan en el periodo posdestete.

7.3.2 Capacidad fagocítica

Mediante la evaluación de este índice *in vitro* se obtuvo una perspectiva de la actividad de las células fagocíticas para ingerir a las levaduras opsonizadas, pudiéndose observar una capacidad fagocítica superior en los PMN de SAN provenientes de los animales que recibieron el 1% de L-arginina con respecto al grupo control (Figura 17). Se ha observado que cuando las células son activadas (a través de LPS o IFN γ) metabolizan la arginina mediante la iNOS, provocando un aumento en la expresión de receptores (p.e. TLR2, TLR4, para opsoninas) ^(34, 118, 128, 130, 163) útiles para el reconocimiento de los PAMPs. Además, se ha mencionado que al igual que los linfocitos, los PMN presentan bajos niveles de arginasa ⁽¹⁸⁾, lo cual como se verá más adelante puede inhibir las funciones de algunas células inmunes. Lo anterior podría justificar el aumento en la capacidad fagocítica de los PMN del grupo con tratamiento al disponer de un mayor aporte de arginina.

En el caso del MN de LAI del grupo con tratamiento, se observó una disminución del número de levaduras ingeridas al ser comparados con los MN del grupo control; se desconocen las causas de este efecto, empero, se han formulado las siguientes hipótesis: 1) Por la acción de la enzima arginasa. Se tienen indicios de una mayor actividad de esta enzima en el pulmón bajo condiciones normales o en procesos de reparación del tejido ⁽¹⁶⁴⁻¹⁶⁷⁾; mientras que en condiciones inflamatorias existe un aumento en la iNOS ⁽¹⁶⁶⁾. El metabolismo de la L-arginina por la vía de la arginasa en el MN, es capaz de bloquear la actividad de la iNOS ^(5, 46, 81, 132, 140, 149, 168, 169), ocasionando una supresión de las funciones dependientes de arginina en el linfocito T (p.e. proliferación y diferenciación) y en los macrófagos (p.e. producción de NO) ^(140, 170). En el parénquima pulmonar los MN muestran un menor potencial fagocítico comparado con los MN del alvéolo, lo que

puede relacionarse con las células del parénquima pulmonar con un papel modulador de la respuesta inmune en el tejido ⁽¹²⁶⁾, posiblemente asociado con el efecto que ejerce la arginasa sobre esta población ^(34, 118, 128, 129, 140). Al ser este lóbulo uno de los primeros lugares en donde llegan las partículas inhaladas y en ausencia de estímulos inflamatorios (p.e. IL-1 e IL-6) ^(126, 171), el efecto inmunomodulador del MN puede ser benéfico, al evitar una excesiva e inadecuada respuesta inmune que puede dañar al tejido, además cabe recordar que las células utilizadas en este experimento provenían de animales clínicamente sanos y no se observaron lesiones al extraer los tejidos. También, la activación del MN por la vía de la arginasa provoca la expresión de receptores (p.e. manosa, CD163, CD14, basureros o scavenger) ^(28, 118, 119, 128), los cuales pueden ser menos ávidos para detectar a los microorganismos comparados con los que se activan por la vía clásica en el MN. 2) Debido a los receptores para arginina. Puede existir la posibilidad de que al carecer las células de estímulo (p.e LPS o INF γ) no se activara la transferencia de arginina por medio de los transportadores de aminoácidos catiónicos (por sus siglas en inglés CATs) en especial el CAT2B. En condiciones basales, la célula utiliza al sistema y^+L para introducir a la arginina mediante diferentes transportadores (LAT1 y LAT2) ⁽¹³⁷⁾, pero al activarse la célula, utiliza al sistema y^+ introduciendo la arginina mediante CAT2B, siendo necesario para la activación de la arginasa y la iNOS ^(136-139, 141, 142, 172, 173), y existen indicios que muestran que otros transportadores (p.e. CAT1) pueden introducir arginina pero no en la misma cantidad que CAT2B ⁽¹³⁷⁾. Además, se ha observado que el transporte de arginina mediante CAT2B, es saturable ⁽¹⁷⁴⁾ y compite por el sistema y^+ con otros aminoácidos (p.e. lisina y ornitina) ^(7, 81, 136, 138, 141, 172, 175), lo cual pudo contribuir al efecto observado en este lóbulo; por lo cual es necesario realizar estudios en donde se pueda evaluar la concentración de estos

aminoácidos en el pulmón. Sin embargo, se recomienda tomar con mesura estos resultados y si es posible repetir el estudio en este lóbulo.

7.3.3 Índice reductivo

A través de este índice, se evaluó el efecto de la L-arginina sobre la capacidad reductiva de las células fagocíticas del cerdo joven, mediante la observación de la oxidación del NBT. Debido al papel que desempeña la arginina como precursor del NO^(1, 3, 5, 7, 30, 40, 42-46, 81), el interés en el estudio de este aminoácido ha aumentado. A consecuencia del metabolismo de la arginina extracelular las células fagocíticas generan NO^(1, 5, 30, 34, 40, 43, 44, 55, 138, 149, 176, 177), el cual a nivel inmunológico puede: 1) actuar en la defensa del organismo al inhibir la síntesis de DNA^(1, 30), 2) modular la actividad de diferentes células (p.e. dendríticas y linfocitos)^(45, 63, 159, 161), y/o 3) interactuar con otras moléculas (O₂⁻) para la formación de compuestos altamente tóxicos para los microorganismos (p.e. ONOO⁻)^(1, 5, 40, 42, 43, 46).

Se observó un mayor índice reductivo en los PMN de SAN de cerdos que recibieron el 1% de L-arginina en comparación con el grupo control (Figura 18). Diferentes estudios han mostrado la capacidad de la L-arginina para estimular la actividad microbicida de los PMN^(5, 80, 146, 177, 178). Moinard informó⁽⁸⁰⁾ que dietas ricas en arginina y glutamina aumentaron el estallido respiratorio de este tipo celular en ratas. En humanos, la administración de diferentes concentraciones de arginina provocó en células PMN un aumento en la producción de H₂O₂ y mieloperoxidasa a concentraciones de 0.5 y 1mM y disminuyó la producción de O₂⁻ a concentraciones similares⁽¹⁷⁸⁾. Además, el neutrófilo es capaz de producir NO, aunque en menor cantidad que el macrófago^{(5, 146,}

¹⁷⁷⁾, aumentando el potencial fagocítico del PMN y regulando la actividad de la NADPH-oxidasa ^(80, 146), no obstante no se conoce cómo se realiza dicho efecto.

En los lóbulos diafragmáticos (LDD y LDI) de los animales que recibieron el tratamiento se encontró un mayor índice reductivo, lo cual podría estar relacionado con una mayor disponibilidad de arginina extracelular y/o en los transportadores para arginina en estos lóbulos o bien por la acción del NO en el pulmón, el cual está asociado con diversas funciones (p.e. defensa del tejido, limpieza mucociliar, secreción de moco, ventilación, irrigación y neurotransmisión) ^(44, 173, 179, 180) y su producción en exceso puede ser responsable de algunas patologías (p.e. asma, hipertensión pulmonar) ^(1, 179). Para sostener la producción de NO es necesario que el animal cuente con una buena disponibilidad de arginina extracelular ^(131, 168, 181), y como ya fue mencionado existe un mayor flujo sanguíneo en estos lóbulos en diferentes especies ^(154, 156, 158), también, existen indicios que muestran una elevada concentración de NOS en las regiones dorsales del pulmón humano ⁽¹⁸²⁾, lo anterior puede ser muestra de la llegada arginina en una concentración óptima a estos lóbulos. Además, al existir una cantidad adicional de este aminoácido, se pudo inhibir la acción de la arginasa (por la acción de NOHA) ^(5, 140, 149, 161), pudiendo utilizar a los transportadores CAT2B ^(136, 138, 176), fomentando la producción de NO, lo cual se vio reflejado en un índice reductivo superior en estas células. Por otra parte, existe información que vincula a la arginina con un aumento en la producción de O_2^- y NO en macrófagos peritoneales de ratas ^(132, 149, 183, 184), y aunque la producción de NO varía entre las especies (muy importante en roedores, vacas, borregos y conejos) ⁽³⁴⁾ puede relacionarse este efecto de la arginina con los resultados obtenidos en esta tesis. Por último, cabe recordar que la reducción del NBT es una prueba utilizada para la medición de la generación de O_2^- , por lo cual en estudios

posteriores es necesario el empleo de técnicas utilizadas en otros estudios ^(125, 149) que permitan la medición de nitratos o nitritos en los diferentes tejidos del modelo porcino, para establecer el efecto del NO sobre la inmunidad innata.

En resumen, la administración oral del 1% de L-arginina mostró diferentes efectos sobre las células del sistema inmune innato sistémico (SAN) y de la mucosa oral (TP) y respiratoria (parénquima pulmonar y LB). Provocando una actividad fagocítica y reductiva superior en PMN de SAN, una mejor capacidad de adhesión a las levaduras de MN de TP, aumentando la capacidad de adhesión de MN de LDD, y disminuyéndola en LAI, además de brindar una actividad reductiva superior en los lóbulos diafragmáticos. Con los resultados anteriores se puede inferir que la administración del 1% de L-arginina en base al consumo diario de alimento puede inducir el aumento y modulación de la actividad de las células fagocíticas del cerdo joven.

8. Conclusiones

1. La técnica empleada para la obtención de células y la prueba de fagocitosis en esta tesis permitió la evaluación del índice fagocítico, la capacidad fagocítica y el índice reductivo de las células fagocíticas sistémicas (PMN de SAN) y locales (MN de TP, parénquima pulmonar y LB) de cerdos jóvenes.

2. Se detectaron diferencias en esos indicadores entre los tejidos sistémicos y mucosales de la siguiente forma: los MN de parénquima pulmonar y LB tuvieron un índice fagocítico y una capacidad fagocítica superior que los PMN de SAN y MN de TP; mientras que los PMN de SAN mostraron un índice reductivo superior que los MN de TP y parénquima pulmonar. Mostrando en condiciones normales, las células fagocíticas pulmonares tienen una actividad superior para capturar rápida y eficientemente a las partículas que logran llegar al pulmón. Mientras que, los PMN de SAN desarrollan una actividad microbicida más eficiente contra las levaduras ingeridas.

3. Las células fagocíticas de los lóbulos pulmonares y LB mostraron diferencias principalmente en: la capacidad fagocítica de MN de LAI fue superior con respecto a los lóbulos diafragmáticos, como una adaptación de las células medio hostil rico en partículas. Y, el MN de LB fue mayor con respecto al MN de LDD, debido a que el MN de LB presenta una superior actividad fagocítica posiblemente por su mayor expresión de receptores para fagocitosis. También el MN de LB tuvo un índice reductivo superior en comparación con los MN de LAI y los lóbulos diafragmáticos, mostrando que es el encargado de la eliminación de las partículas ingeridas en el espacio alveolar; mientras que los MN de parénquima pulmonar pudieran estar relacionados con la activación de la

inmunidad al migrar a los BALT. Además, se evidenciaron diferencias entre la inmunidad que se desarrolla en el parénquima pulmonar y el LB, por lo cual se debe descartar la idea de utilizar al LB como único índice para evaluar la inmunidad pulmonar.

4. El tratamiento con L-arginina estimuló la actividad de las células fagocíticas como sigue: en PMN de SAN se aumentó el índice fagocítico, la capacidad fagocítica y el índice reductivo. Mejoró el índice fagocítico de las células de TP y LDD posiblemente debido a una mayor disponibilidad de arginina o CAT2B, permitiéndole a la célula una mayor adhesión contra las levaduras. Disminuyó el índice fagocítico y la capacidad fagocítica de LAI, posiblemente por la acción de la arginasa y/o por una menor expresión de receptores para arginina. Aumentó el índice reductivo de los lóbulos diafragmáticos, al existir una mayor disponibilidad de sustrato para la NOS que permitió el aumento en la producción de NO.

5. La inclusión de la L-arginina en la dieta de cerdos jóvenes estimuló a las células fagocíticas sistémicas (PMN) y de mucosas oral y pulmonar (MN) a diferentes niveles, observándose un efecto superior en los lóbulos diafragmáticos.

9. Apéndice de soluciones utilizadas

1) Solución Salina Fisiológica (SSF)

Cloruro de sodio (NaCl).....9 g
 Agua destilada.....c.b.p. 100 ml

2) RPMI incompleto (Medio de cultivo)

RPMI-1640 Medium (con L-glutamina y 20 mM HEPES sin bicarbonato).....1 frasco
 Agua bidestilada.....c.b.p. 1 L
 Homogenizar y añadir las siguientes soluciones:
 Penicilina/estreptomicina (10 k UI).....11 ml
 Glutamina (200 mM).....11 ml
 Piruvato (100 mM).....11 ml
 HEPES (10 mM).....11 ml

Ajustar el pH a 7.2-7.4 con solución de bicarbonato de sodio (7.5% w/v) y esterilizar la solución por filtración en membrana de 0.22. Realizar prueba de esterilidad.

3) RPMI completo (Medio de cultivo)

RPMI-1640 Medium (con L-glutamina y 20 mM HEPES sin bicarbonato).....1 frasco
 Agua bidestilada.....c.b.p. 1 L
 Homogenizar y añadir las siguientes soluciones:
 Penicilina/estreptomicina (10 k UI).....11 ml
 Glutamina (200 mM).....11 ml
 Piruvato (100 mM).....11 ml
 HEPES (10 mM).....11 ml
 Suero fetal bovino.....110 ml

Ajustar el pH a 7.2-7.4 con solución de bicarbonato de sodio (7.5% w/v) y esterilizar la solución por filtración en membrana de 0.22. Realizar prueba de esterilidad.

4) Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2-7.4, 0.1 M

Cloruro de sodio (NaCl).....8 g
 Cloruro de potasio (KCl).....0.2 g
 Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄).....0.2 g
 Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado (Na₂HPO₄ 12H₂O).....1.15 g

Disolver en 500 ml de agua bidestilada y ajustar el pH a 7.3 con HCL 1N ó NaOH 5N

5) Gelatina al 1% para la obtención de leucocitos

Gelatina de piel de porcino Sigma tipo A.....1 g
 PBS.....100 ml

6) Solución de lisis para eritrocitos

Cloruro de amonio.....0.8 g
 Bicarbonato de potasio (0.1 M).....1 ml
 EDTA sal disódica dihidratada (0.1 M).....0.1 ml
 Agua bidestilada.....c.b.p. 100 ml

7) Azul de tripano

Azul de tripano.....0.4 g
 SSF.....c.b.p. 100 ml

8) Líquido de Turk

Ácido acético glacial.....3 ml
 Agua destilada.....c.b.p. 100 ml

Adicionar 1 ó 2 gotas de azul de metileno

9) Nitroazul de tetrazolio (NBT)

Nitro azul de tetrazolio.....2 g
 Agua destilada.....c.b.p. 100 ml

El vial reconstituido es viable por 1 día, mantener en refrigeración.

10) Safranina

Safranina.....10 g
 Etanol 95%.....c.b.p. 95 ml
 Agua bidestilada 5%.....c.b.p. 5 ml

10. Gramos de L-arginina administrada oralmente por animal.

Fecha	Edad cerdo	Semana	CDA/C	CDA/A (g)	% ARG/Animal
08/02/2005	21 días ± 2		40	Periodo de	adaptación
09/02/2005	22 días ± 2		85	Periodo de	adaptación
10/02/2005	23 días ± 2		180	Periodo de	adaptación
11/02/2005	24 días ± 2		278	Periodo de	adaptación
12/02/2005	25 días ± 2		510	102	1.02
13/02/2005	26 días ± 2		417	83	0.83
14/02/2005	27 días ± 2		413	83	0.83
15/02/2005	28 días ± 2	Semana 1	613	123	1.23
16/02/2005	29 días ± 2		727	145	1.45
17/02/2005	30 días ± 2		871	174	1.74
18/02/2005	31 días ± 2		1013	203	2.03
19/02/2005	32 días ± 2		1292	258	2.58
20/02/2005	33 días ± 2		1108	222	2.22
21/02/2005	34 días ± 2		1237	247	2.47
22/02/2005	35 días ± 2	Semana 2	1475	295	2.95
23/02/2005	36 días ± 2		1418	284	2.84
24/02/2005	37 días ± 2		1495	299	2.99
25/02/2005	38 días ± 2		1767	353	3.53
26/02/2005	39 días ± 2		2028	406	4.06
27/02/2005	40 días ± 2		2300	460	4.60
28/02/2005	41 días ± 2		2345	469	4.69
01/03/2005	42 días ± 2	Semana 3	2667	533	5.33
02/03/2005	43 días ± 2		2933	587	5.87
03/03/2005	44 días ± 2		3003	601	6.01
04/03/2005	45 días ± 2		3128	626	6.26
05/03/2005	46 días ± 2		3613	723	7.23
06/03/2005	47 días ± 2		3613	723	7.23
07/03/2005	48 días ± 2		3920	784	7.84
08/03/2005	49 días ± 2	Semana 4	4507	901	9.01
09/03/2005	50 días ± 2		4402	880	8.80
10/03/2005	51 días ± 2		4507	901	9.01
11/03/2005	52 días ± 2		4717	943	9.43
12/03/2005	53 días ± 2		4758	952	9.52
13/03/2005	54 días ± 2	30 días TX	5070	1014	10.14
14/03/2005	55 días ± 2		4940	988	9.88
15/03/2005	56 días ± 2	Semana 5 *	4940	988	9.88

CDA/C: Consumo diario de alimento por corral en gramos; obtenido del alimento ofrecido el día anterior menos el alimento recolectado en la mañana del día siguiente (datos no disponibles). CDA/A: Consumo diario de alimento por animal (n= 5 cerdos) en gramos. ARG: Arginina, la cantidad de arginina (1%) fue calculada en base al CDA y se utilizó agua como vehículo para su administración por vía oral. Los valores en color azul indican el periodo de adaptación (4 días) otorgados a los cerdos. Los valores en color rojo indican el inicio y el final del tratamiento. * Inicio de los sacrificios de los cerdos.

11. Índice de figuras

Figura 1. Vías de la síntesis endógena de Arginina.....	7
Figura 2. Figura 2. Metabolismo de L-arginina en macrófagos.....	28
Figura 3. Vista dorsal de los lóbulos pulmonares del cerdo.....	37
Figura 4. Figura 4. Aparato mucociliar.....	39
Figura 5. Metodología para la obtención de células de sangre.....	60
Figura 6. Metodología para la obtención de células de tonsila palatina, parénquima pulmonar y lavado bronquial.....	61
Figura 7. Técnica de fagocitosis en células porcinas.....	62
Figura 8. Prueba en forma de tablero de ajedrez.....	64
Figura 9. Prueba de fagocitosis en células de sangre.....	65
Figura 10. Prueba de fagocitosis en células de tonsila palatina.....	65
Figura 11. Prueba de fagocitosis en células de parénquima pulmonar.....	66
Figura 12. Prueba de fagocitosis en células de lavado bronquial.....	66
Figura 13. Índice fagocítico (grupo control).....	67
Figura 14. Capacidad fagocítica (grupo control).....	68
Figura 15. Índice reductivo (grupo control).....	69
Figura 16. Índice fagocítico.....	70
Figura 17. Capacidad fagocítica.....	71
Figura 18. Índice reductivo.....	72

12. Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación de los aminoácidos en el cerdo.....	9
Cuadro 2. Papeles superpuestos de citocinas de los leucocitos en la regulación del metabolismo.....	11
Cuadro 3. Formación de intermediarios reactivos de oxígeno y de nitrógeno.....	25
Cuadro 4. Tamaño de partícula inhalada y la porción del aparato respiratorio de los animales domésticos en la que se impacta.....	38
Cuadro 5. Relación entre el porcentaje del pulmón afectado y la disminución de la ganancia de peso.....	47
Cuadro 6. Índice fagocítico (grupo control).....	67
Cuadro 7. Capacidad fagocítica (grupo control).....	68
Cuadro 8. Índice reductivo (grupo control).....	69
Cuadro 9. Índice fagocítico.....	70
Cuadro 10. Capacidad fagocítica.....	71
Cuadro 11. Índice reductivo.....	72

13. Referencias

1. Teixeira DA, Santaolaria MLA, Alonso EI. La arginina en su contexto fisiológico y metabólico. *Acta. Bioquím. Clín. Latinoam.* 2003; 37 (2): 165-179.
2. Appleton J. Arginine: clinical potencial of a semi-essential amino acid. *Altern. Med. Rev.* 2002, 7 (6): 512-522.
3. Milner JA. Arginine: a dietary modifier of ammonia detoxification and pyrimidine biosynthesis. En: Friedman M. Absorption and utilization of amino acids. Volume II. USA: CRC press inc. 1989: 25-40.
4. Yance DR. L-arginine. Disponible en: URL:
<http://www.centrehealing.com/Resources/L-Arginine.pdf>
5. Potenza MA, Nacci C, Mitolo-Chieppa D. Immunoregulatory effects of L-arginine and therapeutical implications. *Curr. Drug. Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 2001; 1 (1): 67-77.
6. Efron DT, Barbul A. Arginine and immunonutrition: a reevaluation. *Nutrition.* 2000; 16 (1): 73-74.
7. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 1998; 336 (Pt1): 1-17.
8. Wu G, Davis PK, Flynn NE, Knabe DA, Davidson JT. Endogenous synthesis of arginine plays an important role in maintaining arginine homeostasis in postweaning growing pigs. *J. Nutr.* 1997; 127 (12): 2342-2349.
9. Cremades A, Ruzafa C, Monserrat F, López-Contreras AJ, Peñafiel R. Influence of dietary arginine on the anabolic effects of androgens. *J. Endocrinol.* 2004; 183 (2): 343-351.
10. Angulo-Vazquez J, Ornelas JA, Rodríguez EAA, Iñigo CAR, Torres LGG. Maternal mortality at the gynecologic obstetric hospital of the western national medical center, México. A 12 year review. *Ginecol. Obstet. Mex.* 1999; 67: 419-424.
11. Wu G, Meininger CJ. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu. Rev. Nutr.* 2002; 22: 61-86.
12. Cunha JT. Protein requirements of the pig. En: Cunha JT. Swine feeding and nutrition. *Animal feeding and nutrition.* USA: Academic Press. 1977: 139-160.

13. Kim SW, McPherson RL, Wu G. Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young pigs. *J. Nutr.* 2004, 134 (3): 625-630.
14. Alcántara PH, Borbolla SG, Haro TM, García SR, Campos PP. Inclusión de L-arginina cristalina en dietas preiniciadoras, su efecto sobre el crecimiento del cerdo lactante y recién destetado. *Memorias de XXXVII Congreso Nacional AMVEC; 2003 Julio 17-20; Guadalajara (Jalisco) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC. 2003: 191-192.*
15. Klasing K, Roura E, Korver D. Interacciones entre nutrición y sistema inmune. *Memoria de XI curso de especialización FEDNA; 1995 noviembre 7-8; Barcelona. España: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 1995: 156-168.*
16. Stahly T. Influencia de la activación del sistema inmunitario sobre la productividad y las características nutricionales de dietas para cerdos. *Memoria de XII curso de especialización FEDNA; 1996 noviembre 7-8; Madrid. España: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 1996: 95-105.*
17. Culebras JMF, Paz RA, Jonquera FP, García AL. Nutrición del paciente quirúrgico: inmunonutrición. *Nutr. Hosp.* 2001; 16: 67-77.
18. Albina JE, Mills CD, Barbul A, Thirkill CE, Henry WL, Mastrofrancesco B, Caldwell MD. Arginine metabolism in wounds. *Am. J. Physiol.* 1988; 254 (4 Pt1): E459-E467.
19. Ribot A. Destete precoz y transición. Capítulo X. En: Buxadé C. *Zootecnia. Bases de producción animal. Tomo VI. Porcinocultura intensiva y extensiva. España: Ediciones Mundi-Prensa, 1996: 169-179.*
20. Pluske JR, Williams IH, Aherne FX. La nutrición del lechón recién nacido. En: Varley YMA. *El lechón recién nacido. España: Acribia, 1995: 193-246.*
21. Campadabal C. Alimentación del lechón al destete. Disponible en: URL: <http://www.ag.uiuc.edu/~asala/espanol/nutricionanimal/publicaciones/Alimentaci%F3n%20del%20lech%F3n%20al%20destete.pdf>
22. Williams IH. Growth of the weaned pig. En: Pluske JR, LeDividich J, Vezstegen MWA. *Weaning the pig. Concepts and consequences. Netherlands: Wageningen academia publishers, 2003: 17-35.*
23. Roppa L. Nutrición de los lechones en la fase del destete. Disponible en: URL: <http://www.vetefarm.com/nota.asp?not=589&sec=8>

24. Alle GL, Touchette KJ. Efectos de la nutrición sobre la salud intestinal y el crecimiento de lechones. Memoria de XV Curso de especialización FEDNA; 1999; Madrid. España: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 1999: 125-144.
25. Medel P, Latorre M, Mateos G. Nutrición y alimentación de cerdos destetados precozmente. Memoria de XV Curso de especialización FEDNA; 1999; Madrid. España: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 1999: 145-196.
26. Haro MET. La etología y bienestar y su relación con la producción porcina. En: Castro IM, editor. Examen general de calidad profesional para Medicina Veterinaria y Zootecnia, material de estudio: área porcinos. México: Jaiser editores. 1999: 15-32.
27. King RH, Pluske JR. Nutricional management of the pig in preparation for weaning. En: Pluske JR, LeDividich J, Vezstegen MWA. Weaning the pig. Concepts and consequences. Netherlands: Wageningen academia publishers, 2003: 37-51.
28. Abbas AK, Lichtman AH. Inmunidad innata. En: Abbas AK, Lichtman AH. Inmunología celular y molecular. 5ª ed. España: Elsevier, 2004: 275-297.
29. Thacker EL. Immunology-The innate immune system. Pig Journal 2003, 52: 111-123.
30. Rojas OE, Arce PP. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Tercera parte. Bioquímica. 2004; 29 (2): 55-67.
31. Roth JA. El sistema inmune. En: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editores. Diseases of swine. 8th ed. USA: State University Press Ames, 1999: 653-669.
32. Tizard IR. Inmunidad innata: captura de materias extrañas. En: Tizard IR. Inmunología veterinaria. 6ª ed. México: McGraw Hill Interamericana, 2002: 19-26.
33. Leijh PCJ, Van Furth R, Van Zwte TL. In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. En: Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, Herzenberg. Handbook of experimental immunology 2. Cellular immunology. Fourth edition. Great Britain: Blacwell Scientific Publications, 1986: 46.1-46.21.

34. Tizard IR. Macrophages and the later stages of inflammation. En: Tizard IR. Veterinary immunology. 7th edition. USA: Saunders; 2004: 35-48.
35. Thacker EL. Lung Inflammatory responses. Vet. Res. 2006; 37 (3): 469-486.
36. Rojas OE, Arce PP. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Primera parte. Bioquímica. 2003; 28 (4): 19-30.
37. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Células y órganos del sistema inmunitario. En: Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Inmunología. 5^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2004: 25-60.
38. Rojas OE. Inmunidad y resistencia no específica. En: Rojas OE. Inmunología de memoria. 2^a edición. México: Editorial Panamericana, 2001: 11-29.
39. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. J. Clin. Invest. 1984, 73 (3): 599-601.
40. Cascales MA. Estallido respiratorio de los fagocitos. Anal. Real. Acad. Nac. Farm. 2005, 71:365-386.
41. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2005; 53 (3): 199-206.
42. Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. J Biomed. Biotechnol. 2004; 4: 227-237.
43. Alfieri AB. Óxido Nítrico: estudios sobre su papel como mediador en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas. Disponible en: <http://caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeDieciseis/Articulos/Farmacologia/ArchivosPDF/articulofarmacologia.pdf>.
44. Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. Physiol. Rev. 2004; 84: 731-765.
45. Marletta MA, Spiering MM. Trace elements and nitric oxide function. J. Nutr. 2003; 133:1431S-1433S.
46. Satriano J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. Amino Acids 2004; 26: 321-329.
47. Du Manoir J, Albright B, Stevenson G, Thompson S, Mitchell G, Clark M, Caswell J. Variability of neutrophil and pulmonary alveolar macrophage function in swine. Vet Immunol Immunopathol 2002; 89: 175-186.

48. Zendejas VMB. Efecto de la edad en los niveles de fagocitosis en cerdos (tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: Facultad de estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 1987.
49. Kelly D, Coutts AGP. Development of digestive and immunological function in neonates: role of early nutrition. *Livestock Production Science* 2000, 66: 161-167.
50. Gaskins HR, Kelley KM. Inmunología y mortalidad neonatal. En: Varley YMA. *El lechón recién nacido*. España: Acribia, 1995: 39-56.
51. Melchior D, Seve B, Le Floc'h N. Chronic lung inflammation affects plasma amino acid concentrations in pigs. *J Anim Sci* 2004, 82: 1091-1099.
52. Zehr BP, Hunninghake GW. Enfermedades respiratorias. En: Stites DP, Terr AI. *Inmunología básica y clínica*. 7ª edición. México: El manual moderno, 1993: 671-679.
53. Foxwell RA, Kyd JM, Cripps AW. Mucosal immunization against respiratory bacterial pathogens. *Expert Rev Vaccines* 2003, 2: 551-560.
54. Torres C, Zaragoza M. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? *Gac Sanit* 2002, 16: 109-112.
55. Christensen G, Sørensen V, Mousing J. Enfermedades del sistema respiratorio. En: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editores. *Enfermedades del cerdo*. 8ª edición. USA: State University Press Ames, 1999: 745-766.
56. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. Aparato respiratorio. En: Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. *Anatomía veterinaria*. 3ª edición. México: El manual moderno, 2007: 167-186.
57. Ford Dodge. Respiratory disease in pigs. Disponible en:
URL: [http:// www2.dpi.qld.gov.au/pigs/7961.html](http://www2.dpi.qld.gov.au/pigs/7961.html)
58. Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 403-411.
59. Robinson EN. Funciones no respiratorias del pulmón. En: Cunningham JG. *Fisiología veterinaria*. 3ª edición. España: Elsevier, 2003: 508-514.
60. Trigo FJT. Aparato respiratorio. En: Trigo FJT. *Patología sistémica veterinaria*, 3ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1998: 33-84.
61. Boyton RJ, Openshaw PJ. Pulmonary defences to acute respiratory infection. *Br Med Bull* 2002; 61: 1-12.

62. Fisher & Paykel. Defence of the lung. Disponible en:
URL: [http:// www.fphcare.com/humidification/neonate2.asp](http://www.fphcare.com/humidification/neonate2.asp)
63. Bingisser RM, Holt PG. Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. *Swiss Med Wkly* 2001; 131: 171-179.
64. Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, Van Rooijen N, Van der Poll T. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 171-179.
65. Chitko-McKown CG, Chapes SK, Brown RE, Phillips RM, McKown RD, Blecha F. Porcine alveolar and pulmonary intravascular macrophages: comparison of immune functions. *J. Leukoc. Biol.* 1991; 50: 364-372.
66. Pabst R. The respiratory immune system of pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 54: 191-195.
67. Kid JM, Foxwell R, Cripps AW. Mucosal immunity in the lung and upper airway. *Vaccine* 2001; 19: 2527-2533.
68. Jones TC, Hunt RD, King NW. The respiratory system. En: Jones TC, Hunt RD, King NW. *veterinary pathology*. Sixth edition. USA: Williams & Wilkins, 1997: 947-973.
69. Stöber M Enfermedades en órganos respiratorios, el diafragma y la pared torácica. En: Dirksen G, Gründer HD, Stöber M. *Medicina interna y cirugía del bovino*. Volumen 1. 4ª edición. Argentina: Inter-americana. 2005: 269-314.
70. Dungwort DL. El sistema respiratorio. En: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. *Patología de los animales domésticos*. Tomo 2. Uruguay: Hemisferio sur. 1990: 472-629.
71. Nguyen BYT, Peterson PK, Verbrugh HA, Quie PG, Oídla JR. Differences in phagocytosis and killing by alveolar macrophages from humans, rabbits, rats and hamsters. *Infect Immun* 1982; 36: 504-509.
72. López A Respiratory system. En: Carlton WW, McGavin MD. *Thomson's special veterinary pathology* second edition. USA: Mosby 1995: 116-174.
73. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell REW, Irving P. Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. *Res Vet Sci* 1993; 55: 57-59.

74. Pringle JK, Viel L, Shewen PE, Willoughby RA, Martin SW, Valli VEO. Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in select normal calves: cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and histological variables. *Can J Vet Res* 1988; 52: 239-248.
75. Morilla AG. Enfermedades infecciosas respiratorias. En: Morilla AG. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. 2ª ed. México: Manual Moderno, 2005: 77-89.
76. García D, Flores R. Enfermedades respiratorias de los cerdos. Disponible en: URL: <http://www.porcicultura.com/articulos/sanidad/articulo.php?tema=san086>
77. Daniels WW. Análisis de variancia. En: Daniels WW. Bioestadística. 4a edición. México: 2002: 295-399.
78. Vega MAL, Rico J, Sánchez H. Purificación de linfocitos de cerdo. En: Morilla AG, Bautista CG. Manual de inmunología. México: Editorial Diana. 1986: 275-293.
79. Holt PG, Degebrot A, O'leary C, Krska K, Plozza T. T cell activation by antigen-presenting cells from lung tissue digest: suppression by endogenous macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 1985; 62: 586-593.
80. García OE, Escobar GA. Determinación de la función fagocítica de leucocitos sanguíneos mediante la reducción de nitroazul de terazolío. En: García OE, Escobar GA. Manual de prácticas de inmunología básica y clínica. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencia Biológicas, Sección de graduados. Departamento de inmunología. 1980: 92-97.
81. Grimble RF. Nutritional modulation of immune function. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 389-397.
82. Moinard C, Caldefie-Chezet F, Walrand S, Vasson MP, Cynober L. Evidence that glutamine modules respiratory burst in stressed rat polymorphonuclear cells through its metabolism into arginine. *Br J Nutr* 2002; 88: 689-695.
83. Stechmiller JK, Childress B, Porter T. Arginine immunonutrition in critically ill patients: a clinical dilemma. *Am. J. Crit. Care.* 2004; 13: 17-23.
84. Suchner U, Kuhn KS, Fürst P. The scientific basis of immunonutrition. *Proc Nutr Soc* 2000; 59 (4): 553-563.
85. González DV, Cisneros IM, Vega MAL, Morilla AG. Perfil inmunológico de los cerdos durante las primeras diez semanas de edad. *Vet Méx* 1993; 24: 217-221.

86. Gurney JW, Schroeder BA. Upper lobe lung disease: physiologic correlates. *Radiology* 1988; 167: 359-366.
87. Eruslanov EB, Majorov KB, Orlova MO, Mischenko VV, Kondratieva AS, Lyadova IV. Lung cells responses to *M tuberculosis* in genetically susceptible and resistant mice following intratracheal challenge. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 135: 19-28.
88. Holt PG, Degebrot A, Venaille T, O'leary C, Krska K, Flexman J, Farrell H, Shellam G, Young P, Penhale J, Robertson T, Papadimitriou JM. Preparation of interstitial lung cells by enzymatic digestion of tissue slices: preliminary characterization by morphology and performance in functional assays. *Immunology.* 1985; 54: 139-147.
89. Lyadova IV, Vordermeier HM, Eruslanov EB, Khaidukov V, Apt AS, Hewinson RG. Intranasal BCG vaccination protects BALB/c mice against virulent *Mycobacterium bovis* and accelerates of IFN- γ in their lungs. *Clin. Exp. Immunol.* 2001; 126: 274-279.
90. Uezu K, Kawakami K, Miyagi K, Kinjo Y, Kinjo T, Ishikawa H, Saito A. accumulation of $\gamma\delta$ T cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 2004; 172: 7626-7634.
91. Von Garnier C, Filguera L, Wikstrom M, Smith M, Thomas JA, Strickland DH, Holt PG, Stumbles PA. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J. Immunol.* 2005; 175: 1609-1618.
92. Gutierrez JP, Grimwood K, Armstrong DS, Carlin JB, Carzino R, Olinsky A, Robertson CF, Phelan PD. Interlobar differences in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2001; 17: 281-286.
93. Sigma-Aldrich. Reducción de nitroblue tetrazolium (NBT). Procedimiento 840. Disponible en: URL: http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general%20information/insert_es_840.pdf.
94. Kömel HW, Egri T. The nitroblue-tetrazolium test in granulocytes of the cerebrospinal fluid-methodological problems. *Infection.* 1979; 7: 10-13.
95. Kömel HW, Egri T. The significance of the nitroblue-tetrazolium test in cerebrospinal fluid granulocytes in bacterial and abacterial meningitis. *Infection.* 1980; 8: 142-146.

96. Gupta RC, Steigerwald JC. Nitroblue tetrazolium test in the diagnosis of pyogenic arthritis. *Ann. Inter. Med.* 1974; 80 (6): 723-726.
97. Parslow TG, Bainton DF. Inmunidad innata. En: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. *Inmunología básica y clínica*. 10a edición. México: Editorial El Manual Moderno; 2002: 23-46.
98. Tizard IR. How inflammation is triggered. En: Tizard IR. *Veterinary immunology*. 7th edition. USA: Saunders; 2004: 10-23.
99. Muñoz MCLM. Distribución de células presentadoras de antígeno en pulmón de cerdo clínicamente sano (tesis de maestría en ciencias de la producción y de la salud animal) Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
100. Paine R 3rd, Morris SB, Jin H, Wilcoxon SE, Phare SM, Moore BB, Coffey MJ, Toews GB. Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Nov; 281(5): L1210-L1218.
101. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(1): 23-35.
102. Shibata Y, Berclaz PY, Chroneos ZC, Yoshida M, Whitsett JA, Trapnell BC. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*. 2001 Oct; 15(4): 557-67.
103. Ballinger MN, Paine R 3rd, Serezani CH, Aronoff DM, Choi ES, Standiford TJ, Toews GB, Moore BB. Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor during gram-negative lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 34(6): 766-774.
104. Tizard IR. Cytokines and the immune system. En: Tizard IR. *Veterinary immunology*. 7th edition. USA: Saunders; 2004: 133-144.
105. Nicola NA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). En: Nicola NA. *Guidebook to cytokines and their receptors*. New York: A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press. 1994: 171-173.
106. Reyes LI, Escobar P, Bono MR, Roseblatt M. Adhesion of B cell lines to endothelial cells from human lymphoid tissue modulates tyrosine phosphorylation and endothelial cell activation. *J Immunol*. 2002; 169(10): 5881-5888.

107. Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1). En: Nicola NA. Guidebook to cytokines and their receptors. New York: A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press. 1994: 164-167.
108. Gordon SB, Raed RC, Macrophage defences against respiratory tract infections. *British Medical Bulletin*. 2002; 61: 45-61.
109. Tizard IR. Regulation of the acquired immune response. En: Tizard IR. *Veterinary immunology*. 7th edition. USA: Saunders; 2004: 209-220.
110. Rojas OE, Arce PP. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Segunda parte. *Bioquímica*. 2004; 29: 18-31.
111. Kobayashi SD, Voyich JM, Whitney AR, DeLeo FR. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J Leukoc Biol*. 2005; 78(6): 1408-1418.
112. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Immunol*. 2005; 5: 953-964.
113. Bautista CRG, Mosqueda JJG. Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su aplicación en la medicina veterinaria. *Vet. Méx*. 2005; 36: 453-468.
114. Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrana, and cytoplasmic space. *Mol. Cells*. 2007; 23: 1-10.
115. Roitt IM, Delves P. Innate immunity. En: Roitt IM, Delves P. *Roitt's Essential immunology*. 10th edition. USA: Blackwell Publishing, 2001: 1-20.
116. Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes. Infect*. 2002; 4: 883-886.
117. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol*. 2002; 20: 825-852.
118. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends immunol*. 2004; 25: 677-686.
119. Wilson SM, Norton P, Haverson K, Leigh J, Bailey M. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and cells of the myeloid lineage in the palatine tonsil of the pig. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007; 117(1-2):116-123.
120. Bernstein JM, Baekkevold ES. Immunobiology of the tonsils and adenoids. En: Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR,

- Mayer L. Mucosal immunology. Volume 2. Third edition. USA: Elseviers Academic Press; 2005: 1548-1572.
121. Nave H, Gubert A, Pabst R. Morphology and immunology of the human palatine tonsil. *Anat Embryol* 2001; 204: 367-373.
 122. Landsman L, Jung S. Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.* 2007; 179: 3488-3494.
 123. Dethloff LA, Lehnert BE. Pulmonary interstitial macrophages: isolation and flow cytometric comparisons with alveolar macrophages and blood monocytes. *J. Leucok. Biol.* 1988; 43: 80-90.
 124. Prokhorova S, Lavnikova N, Laskin DL. Functional characterization of interstitial macrophages and subpopulations of alveolar macrophages from rat lung. *J. Leucok. Biol.* 1994; 55: 141-146.
 125. Franke-Ullmann G, Pförtner C, Walter P, Steinmüller C, Lohmann-Matthes ML, Kobzik L. Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro. *J Immunol.* 1996; 157(7): 3097-3104.
 126. Haitchi HM, Krishna MT, Holloway JH, Dent G, Buckley MG, Holgate ST. Asthma: clinical aspects and mucosal immunology. En: Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, Mayer L. Mucosal immunology. Volume 2. Third edition. USA: Elseviers Academic Press; 2005: 1415-1432.
 127. Lowell C. Métodos de laboratorio clínico de detección de la inmunidad celular. En: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. Inmunología básica y clínica. 10ª edición. México: Editorial Manual Moderno, 2002: 269-287.
 128. Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF, Kontinen YT. Regulation of macrophage activation. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2003; 60: 2334-2346.
 129. Bowdish DME, Loffredo MS, Mukhopadhyay S, Mantovani A, Gordon S. Macrophage receptors implicated in the “adaptative” form of innate immunity. *Microbes Infect.* 2007; 9(14-15):1680-1687.
 130. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Köthe K, Muller-Molinet I, Kannookadan S, Utikal J, Goerdts S. MØ1 and MØ2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signal. *Immunobiology.* 2006; 211: 473-486.

131. Tong BT, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginina. Mini Rev Med Chem. 2004; 4(8): 823-832.
132. Izgüt-Uysal VN, Ozkaya YG, Ozdemir S, Yargicoglu P, Agar A. effect of L-arginine on age-related changes in macrophage phagocytic activity. Immunol. Invest. 2004; 33: 287-293.
133. Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Taschin E, Mantelli B, Bronte V, Zanovello P. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. Immunobiology. 2007; 212(9-10): 795-812.
134. Lee JE, Austic RE, Naqi SA, Golemboski KA, Dietert RR. Dietary arginine intake alters avian leukocyte population distribution during infectious bronchitis challenge. Poult Sci 2002; 81: 793-798.
135. Moriguti JC, Ferriollo E, Donadi EA, Marchini JS. Effects of arginine supplementation on the humoral and innate immune response of older people. Eur J Clin Nutr. 2005; 59(12): 1362-1366.
136. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, McLeod C, Modolell M, Palacín M, Lloberas J, Celada A. Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. Eur J Immunol. 2006; 36: 1516-26.
137. Martín L, Comalada M, Marti L, Closs EI, MacLeod CL, Martín del Río R, Zorzano A, Modolell M, Celada A, Palacín M, Bertran J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases L-arginine transport through the induction of CAT2 in bone marrow-derived macrophages. Am J Physiol Cell Physiol. 2006; 290(5): C1364-1372.
138. Nicholson B, Manners C, Kleeman J, MacLeod CL. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginina transporter CAT2. J. Biol. Chem. 2001; 276: 15881-15885.
139. Li P, Yin YL, Li D, Kim SW, Wu G. Amino acids and immune function. Br J Nutr. 2007; 98(2): 237-252.
140. Popovic PJ, Zeh HJ 3rd, Ochoa JB. J Nutr. Arginine and immunity. 2007; 137(6 Suppl 2): 1681S-1686S.
141. Closs EI, Simon A, Vékony N, Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. J. Nutr. 2004; 134: 2752S-2759S.

142. Closs EI, Scheld JS, Sharafi M, Förstermann U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol Pharmacol.* 2000; 57: 68-74.
143. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Cardó M, Herrero C, Soler C, Lloberas J, Celada A. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology.* 2001; 204(5): 543-550
144. Punjabi CJ, Laskin JD, Hwang SM, MacEachern L, Laskin DL. Enhanced production of nitric oxide by bone marrow cells and increased sensitivity to macrophage colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF after benzene treatment of mice. *Blood.* 1994; 83(11): 3255-3263.
145. Punjabi CJ, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD. Production of nitric oxide by murine bone marrow cells. Inverse correlation with cellular proliferation. *J Immunol.* 1992; 149(6): 2179-2184.
146. Moffat FL, Han T, Li ZM, Peck MD, Jy W, Ahn YS, Chu AJ, Bourguignon LY. Supplemental L-arginine HCL augments bacterial phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell. Physiol.* 1996; 168: 26-33.
147. Albina JE, Caldwell MD, Henry WL, Mills JR, Mills C. Regulation of macrophage functions by L-arginine. *J Exp Med* 1989; 169: 1021-1029.
148. Tayade C, Jaiswal TN, Mishra SC, Koti M. L-arginine stimulates immune response in chickens immunized with intermediate plus strain of infectious bursal disease vaccine. *Vaccine.* 2006; 24: 552-560.
149. Tümer C, Bilgin HM, Obav BD, Diken H, Atmaca M, Kelle M. Effect of nitric oxide on phagocytic activity of lipopolysaccharide-induced macrophages: possible role of exogenous L-arginine. *Cell. Biol. Int.* 2007; 31: 565-569.
150. Zimmermann N, Rothenberg ME. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *EJP.* 2006; 533: 253-262.
151. Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol Today.* 1998; 19(9): 414-421.
152. Scadding GK. Immunology of the tonsil: a review. *Journal of the Royal Society of medicine* 1990; 83: 104-107.
153. Artigas A. La circulación pulmonar. En: Tresguerres JAF, Ariznavarreta C, Cachofiero V, Cardinali D, Escrich F, Gilloyzagap V, Lahera J, Mora FT,

- Romano MP, Tamargo JM. Fisiología humana. 3ª edición. España: Mc Graw-Hill, 2005: 609-617.
154. Beck KC, Rehder K. Differences in regional vascular conductances in isolated dog lungs. *J Appl Physiol*. 1986; 61(2): 530-538.
155. Jarvis KA, Steffey EP, Tyler WS, Willits N, Woliner M. Pulmonary blood flow distribution in anesthetized ponies. *J Appl Physiol*. 1992; 72(3): 1173-1178.
156. Robinson EN. Flujo sanguíneo pulmonar. En: Cunningham JG. Fisiología veterinaria. 3ª edición. España: Elsevier, 2003: 479-485.
157. West JB. Flujo sanguíneo y metabolismo. En: West JB. Fisiología respiratoria. 5ª edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1996: 29-44.
158. Glenny RW, Bernard SL, Luchtel DL, Neradilek B, Polissar NL. The spatial-temporal redistribution of pulmonary blood flow with postnatal growth. *J Appl Physiol*. 2007; 102(3): 1281-8.
159. Ochoa JB, Strange J, Kearney P, Gellin G, Ondean E, Fitzpatrick E. Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2001; 25: 23-29.
160. Wang YY, Shang HF, Lai YN, Yeh SL. Arginine supplementation enhances peritoneal macrophage phagocytic activity in rats with gut-derived sepsis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2003; 27(4): 235-240.
161. Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol*. 2003; 24(6): 302-306.
162. de Jonge WJ, Kwikkers KL, te Velde AA, van Deventer SJ, Nolte MA, Mebius RE, Ruijter JM, Lamers MC, Lamers WH. Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *J Clin Invest*. 2002; 110(10): 1539-1548.
163. Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*. 2006; 211: 487-501.
164. Aminlari M, Shahbazkia HR, Esfandiari A. Distribution of arginase in tissues of cat (*Felis catus*). *J Feline Med Surg*. 2007; 9(2): 133-139.

165. Belik J, Shehnaz D, Pan J, Grasmann H. Developmental changes in arginase expression and activity in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 294(3): L498-L504.
166. Carraway MS, Piantadosi CA, Jenkinson CP, Huang YC. Differential expression of arginase and iNOS in the lung in sepsis. *Exp Lung Res.* 1998; 24(3): 253-268.
167. Hey C, Boucher JL, Vadon-Le Goff S, Ketterer G, Wessler I, Racké K. Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N omega-hydroxy-D, L-indospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.* 1997; 121(3): 395-400.
168. King NE, Rothenberg ME, Zimmermann N. Arginine in asthma and lung inflammation. *J. Nutr.* 2004; 134: 2830S-2836S.
169. Mori M, Gotoh T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J. Nutr.* 2004; 134: 2820S-2825S.
170. Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, Culotta KS, Zabaleta J, Quiceno DG, Ochoa JB, Ochoa AC. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol.* 2003; 171(3): 1232-1239.
171. Murtaugh MP, Baarsch MJ, Zhou Y, Scamurra RW, Lin G. Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 54: 45-55.
172. Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, Bertran J, McLeod C, Palacín M, Modolell M, Lloberas J, Celada A. Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. *J Immunol.* 2006; 176: 5918-5924.
173. Rothenberg ME, Doepker MP, Lewkowich IP, Chiaramonte MG, Stringer KF, Finkelman FD, MacLeod CL, Ellies LG, Zimmermann N. Cationic amino acid transporter 2 regulates inflammatory homeostasis in the lung. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 40: 14895-14900.
174. Schapira RM, Wiessner JH, Morrissey JF, Almagro UA, Nelin LD. L-arginine uptake and metabolism by lung macrophages and neutrophils following intratracheal instillation of silica in vivo. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1998; 19: 308-315.

175. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:641-654.
176. Kakuda DK, Sweet MJ, MacLeod CL, Hume DA, Markovich D. CAT2-mediated L-arginine transport and nitric oxide production in activated macrophages. *Biochem. J.* 1999; 340: 549-553.
177. Nath J, Powledge A. Modulation of human neutrophil inflammatory responses by nitric oxide: studies in unprimed and LPS-primed cells. *J. Leukoc. Biol.* 1997; 62: 805-816.
178. Mühling J, Fuchs M, Fleck C, Sablotzki A, Krüll M, Dehne MG, Gonter J, Weiss S, Engel J, Hempelmann G. Effects of arginine, L-alanyl-L-glutamine or taurine on neutrophil (PMN) free amino acid profiles and immune functions in vitro. *Amino Acids.* 2002; 22: 39-53.
179. Dweik RA. The lung in the balance: arginine, methylated arginines, and nitric oxide. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2007; 292: 1-11.
180. Grasemann H, Grasemann C, Kurtz F, Tietze-Schillings G, Vester U, Ratjen F. Oral L-arginine supplementation in cystic fibrosis patients: a placebo-controlled study. *Eur Respir J* 2005; 25: 62-68.
181. Wu G, Flynn NE, Flynn SP, Jolly CA, Davis PK. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *J Nutr.* 1999; 129: 1347-1354.
182. Rimeika D, Nyrén S, Wiklund NP, Koskela LR, Tørring A, Gustafsson LE, Larsson SA, Jacobsson H, Lindahl SG, Wiklund CU. Regulation of regional lung perfusion by nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170(4): 450-455.
183. Albina JE, Mills CD, Henry WL, Caldwell MD. Regulation of macrophage physiology by L-arginine: role of the oxidative L-arginine diaminase pathway. *J Immunol* 1989; 143: 3641-3646.
184. Bistrian BR. Practical recommendations for immune-enhancing diets. *J. Nutr.* 2004; 134: 2868S-2872S.