



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE L-ARGININA SOBRE ALGUNOS
PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y CÉLULAS PULMONARES DEL
SISTEMA INMUNE EN CERDOS RECIÉN DESTETADOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ENRIQUE AGUILAR MEJIA



ASESORES:

Ph.D., MVZ GERMÁN ARTURO BORBOLLA SOSA
Ph.D., QFB MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ
MÉXICO, D. F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi Hermano Santiago Aguilar Mejia † al que extraño y desearía estuviera aquí para poder abrazarlo y compartir éste mi último tiempo como universitario. Gracias por haber acompañado mi vida, donde lo más importante fue ser mi carnal.

A ti Chago: ¿Cómo llenar el vacío de esta noche? No con lágrimas, puesto que sí con pena, que no cabe en mí pecho. ¿Es, acaso, extraño una noche oscura? De loco es añorar la luz ahora y sin embargo me salgo de mí y necesito tu presencia redentora. Tiemblan mis labios en tus labios ausentes, huyes como una sombra que no logro atrapar. Queda mi grito en la garganta y tu pecho cotidiano de las manos se escapa, tus ojos, ya cerrados, no me hablan. En este silencio sin ti me pregunto: ¿Cómo llenar el vacío de esta noche?

A mi Madre Guadalupe Mejia Rodríguez por sus enseñanzas, paciencia, apoyo y su amor incondicional, sin los cuales no hubiera llegado a culminar esta etapa de mi vida.

A ti Má:

Es por ti por quien se escriben mis versos, es por ti que en silencio me das luz, es por ti que has cargado con mi cruz, es por ti por quien nunca caigo al suelo.

Es por ti por quien debo tantos besos, es por ti por quien tengo un apellido, es por ti por quien yo más necesito despertar pues la vida es solo un sueño.

Es por ti por quien puedo enamorarme, es por ti por quien plantó su semilla la flor que da la Vida por Amor.

Es por ti por quien nunca se me olvida que aunque el mundo se empeñe en asfixiarme siempre estás para darme el corazón.

A mis hermanos Federico, Maria Isabel y Maria De La Luz: El tenerlos como hermanos es un orgullo, a pesar de las dificultades que se tendrán, siempre la unión nos llevará al puerto de la felicidad.

A mis sobrinos: Marlene, karla, Danaé, Abigail, Oscar, Omar, Itzam, Maya, Nicté y Gié Bele han entrado en mi vida como la luz que ilumina y llena el cielo, donde ustedes son lo más hermoso al obsérvalo, los quiero con todo mi corazón.

A mis Amigos: Zalatiel (Negro) y Katy, Eduardo (Lalin), Efraín (Enano), Leo, Carlos (Médico) Marco (Muñe), Erika, Luz Maria (Lechuza), Cecilia, Didina, Citlalli, Seyri. El vivir momentos de risa, alegría, ternura, tristeza, llanto, enojo, soledad, pena, lágrimas, silencio, felicidad y sobre todo su amistad los hace más que mis amigos les doy las gracias por ser parte en sus vidas.

A los tuinkys: Raúl, Edgar, Sr. Sánchez y Eduardo (kaliman) por su amistad, por enseñarme que no nada más se debe de trabajar sin parar si no de disfrutar la vida en las buenas, en las malas y el tiempo que me han soportado, muchísimas gracias.

Espero no haber omitido a alguien y si es así les ofrezco una disculpa de corazón.

A todos los que han y serán parte en mi formación de profesional y de ser humano les doy las gracias.

AGRADECIMIENTOS

Universidad Nacional Autónoma de México

A mis asesores los Doctores Germán Borbolla Sosa y Marco Antonio Vega López. Gracias por darme la oportunidad de entrar al mundo de la investigación.

Dr. German: El trabajar bajo su presión es llevarnos al límite y saber a donde podemos llegar como estudiantes y cuando creemos llegar nos damos cuenta de que falta aún más para poder ser los mejores como profesionales e investigadores. Por todo lo que me ha enseñado Gracias.

Dr. Marco: El aprendizaje y desarrollo como estudiante en la tesis a través de su enseñanza me ha proporcionado ser un mejor ser humano para dar paso a un próximo investigador en el área de nutrición o inmunología a la cual decida encaminar mi entrega esta dará frutos. Por todo lo que me ha enseñado Gracias.

A mi jurado por no claudicar en la lectura de este tratado y por sus apropiadas observaciones para la realización de esta tesis.

A mí Querida Facultad por brindarme las herramientas para mi desarrollo profesional y humano.

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.

Al personal del laboratorio 5 de Inmunobiología de las Mucosas, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, por sus consejos, ayuda y disposición en el trabajo de laboratorio así como las comidas que se organizaban para festejar el éxito de los experimentos.

Bióloga: María del Carmen Ramírez Estudillo.

Técnico: Gloria Lazo Vázquez

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

A Héctor, Homero, Gaby y Jaime por ser buenos amigos y guiarme durante parte de la carrera y etapa como tesista.

CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Arginina

1.2 Óxido nítrico

1.3 Poliaminas

1.4 Sistema inmune

1.5 Destete temprano del lechón

1.6 Ventajas del destete Intensivo

1.7 Desventajas del destete precoz

1.8 Factores predisponentes a enfermedades respiratorias en el destete

2. GENERALIDADES DEL SISTEMA RESPIRATORIO

2.1 Anatomía

2.2 Función

2.3 Mecanismos de defensa del sistema respiratorio

2.4 Enfermedades respiratorias comunes en cerdos destetados

3. SISTEMA INMUNE DEL CERDO

3.1 Sistémico

3.2 Mucosal en intestino y pulmón

3.3 Desarrollo y maduración en intestino y pulmón

3.4 Efecto del destete en intestino y pulmón

3.5 Estimulación inmune

4. CITOMETRIA DE FLUJO

5. JUSTIFICACIÓN

6. HIPÓTESIS

7. OBJETIVOS

8. MATERIAL Y METODOS

8.1 Localización

8.2 Instalaciones

8.3 Animales

8.4 Tratamientos

9. TOMA DE DATOS Y VARIABLES A ANALIZAR

9.1 Parámetros productivos

9.2 Ensayos inmunológicos

10. TOMA DE MUESTRAS PARA CITOMETRÍA

10.1 Técnica para la obtención de leucocitos en sangre para tinción de citometría de flujo

10.2 Técnica para la obtención de células en lavado bronquioalveolar

10.3 Técnica para la obtención de células en parénquima pulmonar

10.4 Técnica para la obtención de células en tonsilas

11. CONTEO CELULAR

12. ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES

13. PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO
14. OBTENCIÓN DE LOS VALORES ABSOLUTOS A PARTIR DE LOS VALORES RELATIVOS
15. DISEÑO EXPERIMENTAL NUTRICIONAL
16. DISEÑO EXPERIMENTAL INMUNOLÓGICO
17. RESULTADOS
 - 17.1 Nutricional
 - 17.1.1 Peso
 - 17.1.2 Ganancia de peso
 - 17.1.3 Consumo de alimento
 - 17.1.4 Conversión alimenticia
 - 17.2 Inmunológico
 - 17.2.1 Rendimiento de células de cada tejido
 - 17.2.2 Sangre
 - 17.2.3 Tonsila
 - 17.2.4 Lavado bronquioalveolar (BAL)
 - 17.2.5 Parénquima del lóbulo apical derecho (PLAD)
 - 17.2.6 Parénquima del lóbulo apical izquierdo (PLAI)
 - 17.2.7 Parénquima del lóbulo diafragmático derecho (PLDD)
 - 17.2.8 Parénquima del lóbulo diafragmático izquierdo (PLDI)
18. Cuadros y análisis estadístico de los valores relativos y absolutos
 - 18.1 Sangre
 - 18.2 Tonsila
 - 18.3 Lavado bronquioalveolar (BAL)
 - 18.4 Parénquima del lóbulo apical derecho (PLAD)
 - 18.5 Parénquima del lóbulo apical izquierdo (PLAI)
 - 18.6 Parénquima del lóbulo diafragmático derecho (PLDD)
 - 18.7 Parénquima del lóbulo diafragmático izquierdo (PLDI)
19. Gráficas y análisis estadístico de los valores relativos y absolutos
 - 19.1 Sangre
 - 19.2 Lavado bronquioalveolar (BAL)
 - 19.3 Tonsila
 - 19.4 Parénquima del lóbulo apical derecho (PLAD)
 - 19.5 Parénquima del lóbulo apical izquierdo (PLAI)
 - 19.6 Parénquima del lóbulo diafragmático derecho (PLDD)
 - 19.7 Parénquima del lóbulo diafragmático izquierdo (PLDI)
20. DISCUSIÓN
21. CONCLUSIONES
22. ANEXO 1 SOLUCIONES UTILIZADAS
23. ANEXO 2 CUADROS DE RENDIMIENTO CELULAR Y DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE CADA TEJIDO DE VALORES RELATIVOS Y ABSOLUTOS
24. BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la administración de L-arginina cristalina (L-arg) sobre los parámetros productivos de cerdos destetados a los 21 días de edad. Sesenta cerdos (5.3 ± 1.38 kg) fueron distribuidos de forma aleatoria en 16 corrales de acuerdo a su peso y sexo ($n = 3$ ó 4 cerdos por corral, 4 corrales/tratamiento). Los tratamientos fueron 0, 1.0, 1.5, y 2.0% de arginina cristalina administrada por vía oral, con base al consumo de alimento registrado el día anterior. El periodo experimental duró 30 días y las variables analizadas fueron: el consumo diario de alimento (CDA), la conversión alimenticia (CA), ganancia diaria de peso (GDP) y el peso (P) por semana. Los cerdos que recibieron 1% de arginina mostraron las mejores GDP y P ($P < 0.05$), respecto a sus contrapartes pero no distinto al control. El CDA y la CA no fueron estadísticamente significativos entre tratamientos. Los cerdos que recibieron 2% de arginina mostraron los peores parámetros a partir de la segunda semana y hasta el final del periodo experimental. La inclusión de arginina cristalina durante la fase posdestete incrementó el peso vivo en el grupo del 1% con respecto a sus contrapartes pero sin ser distinto al control, en el tiempo experimental.

Diez cerdos recién destetados (21 d), fueron aleatoriamente distribuidos en dos grupos ($n=5$). El grupo control recibió solución salina fisiológica (SSF) y el grupo tratado arginina sintética (1% de la dieta) oralmente por 30 días. Al final del periodo experimental se tomaron muestras de sangre, tonsila palatina, lóbulos pulmonares apicales y diafragmáticos derecho e izquierdo y lavado bronquioalveolar. El diseño experimental fue completamente aleatorizado y se utilizó la prueba no paramétrica U-Mann de Whitney para la comparación de los tratamientos. No se encontraron diferencias estadísticas significativas en los

valores relativos entre el grupo control y el tratado de las diferentes muestras analizadas. Se encontró diferencia significativa en valores absolutos en pulmones: Lóbulo apical derecho en CD3, CD4, CD8, $\gamma\delta$ ($P < 0.05$ y 0.01), IgM y CD19 ($P < 0.01$) y SWC-3, MHC-II, CD14 ($P < 0.05$ y 0.01); en el lóbulo diafragmático derecho en CD4 ($P < 0.01$), CD19 ($P < 0.05$), MHC-II y CD14 ($P < 0.05$). Estos resultados permiten sugerir que la suplementación de L-arg incrementa el número de células del sistema inmune pulmonar de cerdos jóvenes, lo que podría fortalecer la fagocitosis, la presentación de antígenos y la producción de anticuerpos para responder mejor a los desafíos antigénicos.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of oral administration of crystalline L-arginine on the productive performance of pigs weaned at 21 days. Sixty pigs (5.3 ± 1.38 Kg) were randomly allotted into 16 pens by weight and sex. Treatments consisted in oral administration of 0, 1.0, 1.5 and 2.0% of arginine. The amino acid amount was based on the amount of feed eaten the previous day. The experimental period lasted 30 days and the variables evaluated were ADF, F:G, ADG and weight per week. Pigs receiving 1% of arginine showed the best ADG and weight ($P < 0.05$), of all treatments. ADFI and F:G were also better ($P < 0.05$) with this treatment. Pigs supplemented with 2% of arginine showed the worst performance after the second week, and until the end of the study. Arginine supplementation after weaning can improve the productive performance of the pig. On the other hand the proportion of T, B and macrophages cells in the lung of healthy weaned pigs remains unknown. This data might provide some understanding on the defense system of the lung during the weaning period process and its prognosis. Ten weaned pigs (21 d old) were divided into two groups ($n=5$), one receiving oral saline (control) and the other 1% of synthetic L-arg (Kyowa Hakko Kogyo, Co., Japan) daily during 30 days. The pigs were fed on a commercial diet. At the end of the experimental period, pigs were humanly sacrificed and the left and right apical and diaphragmatic pulmonary lobes were removed. The experimental design was a complete randomized study using the nonparametric U Mann-Whitney test for mean separation. When compared to control pigs, Arg supplementation increased the number of immune cells of the lung. In the apical right lobe the number of CD3 and CD14 cells per gram increased ($P < 0.05$); and also for CD4, CD8, $\gamma\delta$, IgM, CD19 and SWC3 ($P < 0.01$), with no difference for MHC-II. In the diaphragmatic

right lobe, the number of cells was larger for CD19, MHC-II and CD14 ($P < 0.05$) and CD4 ($P < 0.01$). In the diaphragmatic left lobe, only the number of CD4 increased ($P < 0.05$), when compared with control pigs. No difference ($P > 0.05$) was observed in any cell population in the apical left lobe. Arg diet supplementation at weaning increased the number of immune cells in the lung, speeding up immune maturation, which may improve protection against antigenic challenges at that period of life.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Pesos relativos de los lóbulos pulmonares como porcentaje del peso pulmonar total.

Cuadro 2. Componentes del sistema de defensa respiratorio

Cuadro 3. Agentes primarios y secundarios que afectan al cerdo.

Cuadro 4 Efectos del nivel de activación del sistema inmune sobre la velocidad, eficacia y composición del crecimiento en cerdos de 6 a 27 Kg. de peso vivo.

Cuadro 5. Anticuerpos monoclonales y policlonales utilizados en el análisis fenotípico por citometría de flujo de sangre, tonsila palatina, parénquima pulmonar y lavado traqueobronquial (BAL) porcino.

Cuadro 6. Resultados totales de células adquiridas (eventos), los valores numéricos de cada marcador (1 y 2) en porcentaje, se tomó el valor de M1 (control resaltado en negritas. Fig. 6).

Cuadro 7. Resultados totales, de células adquiridas (eventos), valores numéricos de cada marcador (1 y 2), se tomo el valor de M1 (resaltado en negritas) que se restó a la muestra control.

Cuadro 8. Efecto de la adición de L-arginina sobre la ganancia diaria de peso y peso de lechones destetados a los 21 días hasta los 52 días de edad.

Cuadro 9. Efecto de la adición de L-arginina sobre el Consumo diario de alimento y conversión alimenticia de lechones destetados a los 21 días hasta los 52 días de edad.

Cuadro 10. Rendimiento de células mononucleares de sangre de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 11. Rendimiento de células de tonsila de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 12. Rendimiento de células de lavado bronquioalveolar de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 13. Rendimiento de células de parénquima del lóbulo apical derecho de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 14. Rendimiento de células de parénquima del lóbulo apical izquierdo de cerdos de 51 días, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 15 Rendimiento de células de parénquima del lóbulo diafragmático derecho de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 16 Rendimiento de células de parénquima del lóbulo diafragmático izquierdo de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 17. Valores del rendimiento celular promedio general por tejido.

Cuadro 18 Valores relativos de células positivas mononucleares de sangre periférica de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 19 Valores relativos de células positivas mononucleares de tonsila palatina de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 20. Valores relativos individuales de células de lavado bronquioalveolar, de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 21. Valores relativos de células del lóbulo apical derecho, de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 22. Valores relativos de células del lóbulo apical izquierdo, de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 23. Valores relativos de células del lóbulo diafragmático derecho, de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 24. Valores relativos de células del lóbulo diafragmático izquierdo, de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 25. Valores absolutos de células positivas mononucleares de sangre periférica de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 26. Valores absolutos de células positivas de tonsila periférica de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 27. Valores absolutos de células positivas de lavado bronquioalveolar de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 28. Valores absolutos de células positivas de lóbulo apical derecho de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 29. Valores absolutos de células positivas de lóbulo apical izquierdo de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 30. Valores absolutos de células positivas de lóbulo diafragmático derecho de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Cuadro 31. Valores absolutos de células positivas de lóbulo diafragmático izquierdo de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la arginina.

Figura 2. Síntesis y funciones del óxido nítrico.

Figura 3. Corte transversal del hocico de cerdo, se puede apreciar la anatomía de los cornetes de la cavidad nasal, el septo en posición simétrica y derecho.

Figura 4. Diagrama esquemático de los lóbulos pulmonares del cerdo, vista dorsal. El pulmón derecho comprende los lóbulos apical, cardíaco, diafragmático y accesorio; el pulmón izquierdo comprende los lóbulos apical, cardíaco y diafragmático

Figura 5. Sistema óptico del FACS. El láser incide en la célula y esta dispersa la luz de manera lateral y frontal al tiempo que emite fluorescencia. La luz y la fluorescencia son detectadas por separado (Beckton Dickinson immunocytometry system: 1995. <http://www.fcnet.uk/axp/facs/davies/flor.html>).

Figura 6. Aislamiento de linfocitos, sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque (Current Biology Ltd. 1997).

Figura 7. Histograma de células mononucleares sanguíneas (control) de un cerdo de 51 días de edad.

Figura 8. Histograma de células mononucleares sanguíneas (contorno negro representa el control) de un cerdo de 51 días de edad.

Figura 9. Valores relativos de superficie de linfocitos T, B y macrófagos, de sangre periférica

Figura 10. Valores relativos de superficie de linfocitos T, B y macrófagos, de tonsila palatina.

Figura 11. Valores relativos de linfocitos T, B y macrófagos, de células de lavado bronquioalveolar.

Figura 12. Valores relativos de linfocitos T, B y macrófagos, de lóbulo apical derecho

Figura 13. Valores relativos de linfocitos T, B y macrófagos, de células de lóbulo apical izquierdo.

Figura 14. Valores relativos de linfocitos T, B y macrófagos de lóbulo diafragmático derecho.

Figura 15. Valores relativos la distribución de linfocitos T, B y macrófagos, de lóbulo diafragmático izquierdo.

Figura 17. Valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos, de sangre periférica.

Figura 18. Valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos, de tonsila palatina.

Figura 19. Muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos, de lavado bronquioalveolar.

Figura 20. Muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos, de lóbulo apical derecho.

Figura 21. Muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos, de lóbulo apical izquierdo.

Figura 22. Muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos, de lóbulo diafragmático derecho.

Figura 23. Muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos, de lóbulo diafragmático izquierdo.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo
APC, antigen presenting cells: Células presentadoras de antígenos
ARG: Arginina
BAL: Lavado bronquioalveolar
Cc: Centímetros cúbicos
CD, Cluster differentiation: Marcadores de diferenciación
CD3: Marcador molecular para linfocitos T
CD4: Marcador molecular para linfocitos T cooperadores
CD8: Marcador molecular para linfocitos T citotóxicos
CD14: Marcador molecular para macrófagos
CD19: Marcador molecular para linfocitos B
DC, dendritic cells: Células dendríticas
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético disódico
FACS: Clasificador de células activadas por fluorescencia
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
FSC: Luz difractada en ángulos pequeños entre 1° y 10°
 $\gamma\delta$: Marcador molecular para linfocitos T
° C: Grados centígrados
Ig's: Inmunoglobulinas
IgA: Inmunoglobulina de cadena α
IgM: Inmunoglobulina de cadena γ
IgG: Inmunoglobulina de cadena μ
IgM: Marcador molecular para linfocitos B
IL: Interleucina
IFN: Interferón
 μ m: Micrómetro
MHC-II: Molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad
NK: Natural killer
NO: Óxido nítrico
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
PBS: Solución de fosfatos buferada
PE: Ficoeritrina
PRRS: Síndrome reproductivo y respiratorio porcino
RPMI: Medio de cultivo celular
SFB: Suero fetal bovino
SH: Sulfuro de hidrógeno
SI: Sistema inmune
SSC: Luz reflejada en ángulos mayores
SSF: Solución salina fisiológica
SWC-3 (Swine workshop cluster type 3): Marcador molecular para macrófagos
TNF: Factor de necrosis tumoral
TGF- β : Factor de crecimiento transformante β
TCR, T cell receptor: Receptores de linfocitos T
 μ l: Microlitro

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la producción porcina ha evolucionado de una actividad familiar y de autoconsumo, a una industria altamente integrada e intensiva ⁽¹⁾ este cambio ha sido consecuencia de un intenso programa de selección genética, así como una mejora en los sistemas de manejo y alimentación enfocados principalmente a lograr el máximo rendimiento magro en los cerdos de abasto y la máxima longevidad y productividad de la cerda reproductora ^(2, 3, 4). En la actualidad, los sistemas de manejo y alimentación permiten lograr, en las primeras semanas después del destete a los 21 días ^(5; 6), ganancias de peso similares a las obtenidas durante la lactancia (220-250 g/día), lo cual es muy superior a lo obtenido hace dos décadas y que oscilaba entre los 80-100 g/día. Sin embargo, el potencial genético de crecimiento para el cerdo actual es de unos 500 g/día después del destete a 21 días ^(7; 8; 9) lo que indica un área de oportunidad para eficientizar la producción de esta especie. En el cerdo lactante, al comparar el potencial de crecimiento con la ganancia de peso, se concluye que la leche materna empieza a ser deficiente para satisfacer los requerimientos de los cerdos punteros a partir de los 7 días de edad y de 10 días de edad para el resto de la camada ^(10; 11). La separación de la madre a edades tempranas (destete precoz), en teoría, debería subsanar rápidamente esta deficiencia nutricional de la leche materna, ya que posterior al destete los cerdos son alimentados con dietas que contienen una elevada concentración de nutrientes (alimentos preiniciadores). Sin embargo, durante los primeros 4 días posteriores a la separación materna, la velocidad de crecimiento, en el mejor de los casos, apenas iguala la obtenida a través de la leche materna y en la mayoría de las veces se observan únicamente ganancias de alrededor de 80 a 100 g/día ^(12, 9). La

diferencia entre el crecimiento real y el potencial durante el periodo del destete no puede ser recuperado por los cerdos, ya que en esta especie no se observa evidencia de crecimiento compensatorio como se observa en los rumiantes ^(13; 14), y el cerdo, tan solo para recuperar su peso anterior al destete, tarda entre 7 y 10 días ⁽¹⁵⁾. El bajo rendimiento posdestete del cerdo parece ser, entre otros factores, resultado de su bajo consumo de alimento y muy posiblemente de una baja capacidad digestiva que le imposibilita digerir las proteínas de origen vegetal o animal con estructura terciaria y cuaternaria ^(16; 17), las cuales son muy abundantes en las dietas maíz-sorgo. Esta incapacidad le impide al cerdo recién destetado, la asimilación de aminoácidos esenciales como la lisina, metionina, treonina y triptófano ⁽¹⁸⁾, además de que la lisina y arginina compiten por los mismos receptores que los transportan al asimilarse ⁽¹⁹⁾ por lo que su crecimiento se limita. Por otra parte, se ha determinado que en cerdos menores a 70 días de edad ^(20; 21), la L-arginina (arginina) es un aminoácido esencial para el desarrollo óptimo del cerdo menor a los 25 kg de edad. Anteriormente, la arginina era considerada un aminoácido no esencial, sin embargo, en un estudio más detallado ⁽²²⁾, se observó que la inclusión de arginina en las dietas de mamíferos domésticos en crecimiento, incrementaba la retención de nitrógeno, indicador consistente con crecimiento corporal.

Durante la lactancia, la ineficiencia de la leche materna para generar tasas óptimas de crecimiento en el lechón, parece deberse a la baja concentración de varios aminoácidos, entre los cuales se encuentra la arginina en relación a la cantidad requerida por el lechón. El contenido de arginina en la leche de la cerda es de 1.37% de la materia seca, con una digestibilidad que oscila entre el 90 y 92% ⁽²³⁾ sin embargo, cuando la concentración de aminoácidos digestibles en la

leche de la cerda se expresa en proporción de lisina digerible, el aporte de este aminoácido es menor al 40% del requerimiento diario apartir del séptimo día de edad, sugiriendo que desde este momento y hasta el final de la lactancia, la arginina es el principal aminoácido limitante en la leche de la cerda ⁽²¹⁾. De manera similar la glutamina puede ser considerada como un aminoácido esencial ^(24, 25) en las primeras etapas del desarrollo prenatal y posnatal en el cerdo. La glutamina además es esencial en animales de cualquier edad, durante periodos de intenso estrés (destete) ⁽²⁶⁾.

Estudios previos ^(27, 28; 29) que evaluaron la relación de la arginina y la respuesta inmune reportaron que en humanos, la administración de arginina estimula la fagocitosis, la actividad citotóxica de los macrófagos alveolares, la regulación de la activación, proliferación y maduración de células T, producción de anticuerpos, citocinas y otras sustancias citotóxicas ^(30; 31). Los datos de alteraciones en células del tracto respiratorio y células del sistema inmune en el parénquima pulmonar del sistema inmune son poco conocidas en esta especie, siendo de importancia el efecto que tiene sobre la producción y estado inmunitario frente al desafío de antígenos. El destete hace más susceptible al cerdo a enfermedades respiratorias en esta etapa, los lóbulos pulmonares son más propensos a ser infectados por virus o bacterias aunque no se ha podido establecer cuál o cuáles son los factores (genético, nutricional, psicológico, ambiental, manejo, etc) que determinan la susceptibilidad en los lóbulos pulmonares. Estos aspectos del pulmón del cerdo son de gran interés en la inmunología veterinaria para investigar el posible efecto de la L-arginina sobre las células en los diferentes lóbulos pulmonares.

Arginina

La L-arginina (ácido 2-amino-5-guanidino pentanoico) es un aminoácido básico y portador de un grupo guanidino en su cadena lateral (Fig. 1). Schulze y Steiger en 1886 fueron los primeros en referir su existencia en extractos de semillas de alfalfa. Hedin, en 1895, la identificó como un producto de la hidrólisis de las proteínas. Su estructura química la estableció Sorensen en 1910 (citado por Deusdelia, 2003). La arginina se clasifica como un aminoácido no esencial (prescindible), porque los mamíferos adultos pueden sintetizarla, sin embargo, en el cerdo neonato, lactante y destetado hasta los 25 kg, la arginina no es sintetizada en las cantidades suficientes para cubrir sus requerimientos básicos. Wu ^(20; 21) reportó que en el cerdo joven la maquinaria enzimática para su producción no está completamente desarrollada. La arginina se convierte en un aminoácido esencial en periodos de máximo crecimiento, enfermedad y estrés severo en mamíferos jóvenes ⁽²¹⁾. En este sentido, la biosíntesis de arginina implica la cooperación metabólica de tres órganos: hígado, intestino delgado y riñón para la conversión de glutamato, el precursor de la arginina, en estos tres órganos. El principal sitio de síntesis es el intestino delgado ⁽³²⁾.

La arginina es un aminoácido con numerosos papeles en el metabolismo celular ⁽³³⁾; entre los más importantes se encuentran: su participación, como intermediario en el ciclo de la urea, como precursor para la síntesis de proteínas, poliaminas, creatina y, en el sistema inmune, la biosíntesis de óxido nítrico (NO), el cual es la sustancia más oxidativa que se produce en el organismo ^(34; 35; 36), y que es utilizada por las células del sistema inmune. Además influye en la síntesis de óxido nítrico a partir de la arginina, el óxido nítrico es un efector multifuncional implicado en la vasodilatación, neurotransmisión del sistema nervioso y

actividades antimicrobianas y antitumorales ^(34; 37; 38). Por otro lado, la arginina promueve la cicatrización de heridas, estimula la liberación de la hormona del crecimiento, prolactina, glucagón, insulina, catecolaminas, corticosterona y somatostanina ^(39; 40). En el sistema inmune la arginina tiene un papel inmunomodulador de la actividad de los linfocitos T ⁽⁴¹⁾, B y NK y en los niveles de citocinas proinflamatorias.

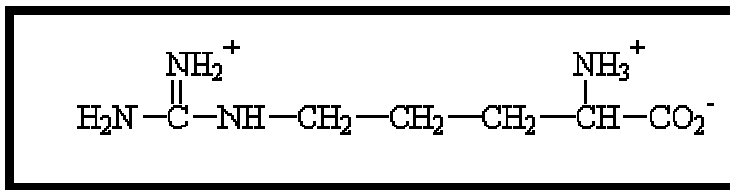


Figura. 1 Estructura química de la arginina

Óxido Nítrico

El interés por la arginina y su metabolismo se ha incrementado al descubrirse que es el sustrato fisiológico para la síntesis del óxido nítrico ^(42; 43). Esta molécula ha sido evaluada desde el punto de vista bioquímico, inmunológico, fisiopatológico y obviamente desde el punto de vista nutricional, tanto en humanos como en animales ^(44, 37). El óxido nítrico es producido por todos los tejidos del organismo y, como se mencionó anteriormente, juega un papel muy importante en el sistema cardiovascular, inmune y nervioso ⁽³⁸⁾. Además, modula los efectos de neurotransmisores como el glutamato y participa en la formación de la memoria; media la vasodilatación ⁽⁴⁵⁾ neurogénica que regula las funciones del tránsito digestivo, respiratorio ⁽⁴⁶⁾ y genito-urinario ⁽⁴⁷⁾; inhibe la agregación plaquetaria ⁽⁴⁸⁾; regula la contractilidad cardíaca y la presión arterial; inhibe la proliferación del músculo liso vascular y desempeña un importante papel en la inmunidad específica y no específica ^(49; 50; 26). El óxido nítrico es un radical libre con una alta reactividad química ⁽⁵¹⁾. Posee una vida corta (6-10 segundos) y una alta afinidad

por la hemoglobina, la cual lo inactiva e inhibe sus efectos ⁽⁵²⁾. En cuanto a su síntesis, se han aislado y caracterizado varias isoformas de óxido nítrico sintetasa (NOSs), que se distribuyen en dos categorías: constitutivas e inducibles. En la constitutiva se encuentran la neuronal (nNOS o NOS I) y la endotelial (eNOS o NOS III), que generan pequeñas cantidades de óxido nítrico con acciones fisiológicas múltiples. La inducible (iNOS o NOS II) se expresa en células inflamatorias y tras su estimulación, produce cantidades masivas de óxido nítrico capaces de dañar células, tejidos y sistemas ^(53; 54). En la figura 2 se describen las numerosas acciones del óxido nítrico sobre diversos sistemas y reacciones, así como los pasos para su síntesis.

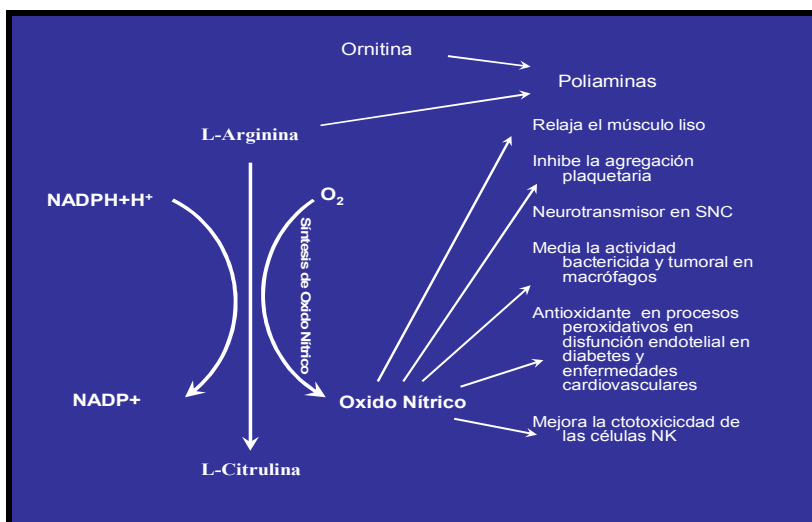


Figura. 2. Síntesis y funciones del Oxido Nítrico
Adaptado de: Champe P. Harvey R. Revisión Ilustrada. Bioquímica, Lippincott. 2da Ed. Filadelfia. 1994

Poliaminas

Las poliaminas representan otra de las moléculas derivadas de la arginina y se caracterizan por presentar grupos múltiples de NH_2 , siendo las más representativas: putresina, espermidina y espermina ⁽⁵⁵⁾. La síntesis de poliaminas requiere de ornitina (Fig.2), la cual es su precursor inmediato. Las poliaminas son esenciales para la proliferación ⁽⁵⁶⁾, diferenciación y reparación de las células

epiteliales de la mucosa intestinal en donde mantienen la arquitectura de la vellosidad y de la cripta intestinal ^(29; 57), intervienen además en el crecimiento, diferenciación y la multiplicación celular ^(58; 59; 60; 61; 62), y el transporte de glucosa ^(63; 64). Las poliaminas tienen además una importancia en la estabilización de ácidos nucleicos, estimulación de hormonas, regulación de procesos relacionados con el calcio, respuesta al estrés oxidativo, mediación de los efectos de muchas hormonas y factores de crecimiento, ^(65; 66; 67).

Sistema inmune

La suplementación de arginina en la dieta, ha sido empleada como un mecanismo para estimular el sistema inmune celular en linfocitos T ^(68; 28; 30) y potencializar la actividad inmune en general ⁽⁶⁹⁾. En células mieloides la arginina es metabolizada principalmente para inducir producción o actividad de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) o arginasa I, por linfocitos T cooperadores o citocinas. La activación de iNOS, arginasa o ambas dependerá del tipo de respuesta inflamatoria en un proceso específico de enfermedad ⁽⁷⁰⁾. Tachibana y colaboradores (1985) demostraron que al suministrar arginina, se aumenta la fagocitosis y la actividad citotóxica de los macrófagos alveolares en ratas ⁽⁷¹⁾. La arginina es metabolizada en macrófagos, células endoteliales, hepatocitos y células del riñón por medio de tres enzimas, iNOS, arginasa I y arginasa II. En macrófagos, la arginina es metabolizada por iNOS para producir citrulina y óxido nítrico que es uno de los principales mecanismos citotóxicos de estas células ⁽⁵⁶⁾. En humanos sanos la administración de 30 gramos por tres días ^(72; 73) aumentó la actividad de las células NK, la activación y proliferación de células T ^(74; 56), así como la maduración de células B ⁽⁷⁵⁾. En conejos con quemaduras severas, Peng y

colaboradores (2005), reportaron que la arginina tuvo influencia sobre la función del sistema inmune, el balance ácido-base, la tasa de transformación de linfocitos, la concentración de CD4/CD8, la tasa de fagocitosis y el índice quimiotáctico de células blancas en los 7 días posteriores al día de las quemaduras ⁽⁷⁶⁾.

La influencia de los componentes de la dieta sobre la integridad del sistema inmune ha sido estudiada por décadas y un papel único para la arginina, en el mantenimiento de la homeostasis inmune, ha sido propuesto, particularmente con respecto a la función de células T y macrófagos. La disponibilidad de arginina en plasma de camadas de ratones transgénicos, con respecto a la enzima arginasa I, demostró ser menor en un 30-40% con respecto a camadas control, teniendo un efecto adverso sobre el desarrollo linfoide en el periodo neonatal. El efecto en el desarrollo linfoide fue más caracterizado por la reducción en el tamaño y número de placas de Peyer en el tejido linfoide asociado al intestino. Esta disminución se vio reflejada en la transición de células progenitoras B (pro B a pre B) en médula ósea, donde fue particularmente perceptible en la reducción de la disponibilidad de arginina. Este bloqueo en el desarrollo refleja una falla en la diferenciación y/o un fracaso en la sobrevivencia de estas células. La arginasa I en ratones también tuvo una disminución cuantitativa en el número de células B en bazo, nodos linfáticos y placas de Peyer. Una deficiencia de arginina daña la maduración temprana de las células B ^(75; 77; 78).

Destete temprano del lechón

Al nacer y antes de ser destetado, el lechón posee un sistema enzimático adaptado a la digestión de los nutrientes contenidos en la leche; por lo que la digestión de las proteínas lácteas, lactosa y lípidos de cadena corta es casi

completa ⁽⁷⁹⁾. Sin embargo, al ser destetado su aparato digestivo es aún inmaduro para procesar nutrientes de origen animal o vegetal ⁽⁸⁰⁾ con un perfil diferente al de la leche materna ⁽⁸¹⁾. Esta inmadurez digestiva está ocasionada por la baja o nula producción de las enzimas encargadas de digerir carbohidratos, proteínas y lípidos diferentes a las encontradas en la leche materna ^(82, 83; 84). En este sentido, el cerdo joven recién destetado no produce cantidades apreciables de lipasa, amilasa y otras enzimas que degraden los vegetales y los cuales empiezan a producirse en niveles apreciables hasta los 21-28 días de edad ⁽⁸⁵⁾. En granjas bajo un sistema intensivo de producción, los lechones y cerdos recién destetados son alimentados con dietas llamadas preiniciadores, las cuales tienen como característica una alta digestibilidad ya que contienen importantes cantidades ($\geq 20\%$) de sustitutos lácteos o lactasa ^(86; 87). Sin embargo, durante los primeros días posteriores al destete, el consumo de alimento es marcadamente reducido ⁽⁸⁸⁾, con cambios rápidos en la estructura y función de la mucosa intestinal ^(87; 89), y una importante reducción en la tasa de crecimiento del animal ⁽⁹⁰⁾. Los cambios son resultado principalmente del bajo consumo de alimento ⁽⁹⁰⁾ y la alteración de la dieta ^(87; 89), y progresan hasta que el intestino se adapta a la nueva fuente de nutrientes. En el cerdo salvaje (*Sus scrofa*) estas variaciones ocurren paulativamente haciendo una transición gradual de una dieta completamente láctea, a una dieta carente de leche y fundamentalmente omnívora ⁽⁹¹⁾. Los cerdos silvestres alcanzan la independencia nutricional de la cerda, entre las 8 y las 12 semanas de edad ^(92; 91; 93). Bajo condiciones actuales de producción intensivas, el destete es una transición abrupta y representa un fuerte desafío alimenticio ya que existe un cambio nutricional al pasar de una dieta líquida a una dieta sólida. Las alteraciones en la mucosa intestinal, atrofia de las vellosidades e incremento

en la profundidad de la cripta, normalmente se mantienen hasta por 2 semanas después del destete ^(94; 87; 89). Cuando el consumo de leche cesa (destete), la estructura y función de la mucosa intestinal empieza a tener cambios, ya que en pocas horas la altura de la vellosidad disminuye y se incrementa la profundidad de las criptas; lo que reduce la capacidad de digestión y absorción de nutrientes ⁽⁸⁷⁾. En condiciones de baja sanidad se relaciona con diarreas (*E. coli*) ^(95; 96).

En conjunto, el cambio de la dieta y las alteraciones en la mucosa intestinal induce un periodo de ayuno durante los primeros días y en algunos cerdos provoca anorexia ^(97; 98; 99), teniendo un impacto negativo en el crecimiento que llevando a la movilización de proteína muscular ⁽¹⁰⁰⁾. El cerdo joven, criado bajo condiciones intensivas posee un potencial de crecimiento muy alto (>400-500 g/día) después del destete, varios factores limitan el alcance de dicho potencial. Entre los principales factores se encuentran: calidad de la dieta, medio ambiente (temperatura, subpoblación), estado sanitario del animal y del nuevo lugar donde vivira, enfermedades, etc. Sin embargo, previo al destete, el cerdo lactante también es incapaz de alcanzar su potencial de crecimiento debido a la baja concentración de materia seca de la leche materna, la cual promueve una unidad de crecimiento por cada 4 unidades de consumo en promedio (eficiencia del casi 0.25) ⁽¹⁰¹⁾, por lo que la separación temprana del cerdo (destete temprano), podría subsanar dicha ineficiencia ⁽¹⁰²⁾ siempre y cuando el cerdo pudiera adaptarse inmediatamente, ya que una dieta posdestete adecuadamente formulada proporciona una ganancia de unidad por unidad de consumo ⁽¹⁰³⁾ ya adaptado.

Ventajas del destete Intensivo

Los principales beneficios que trae consigo el destete a los 21 días de edad son:

- a) Disminución en la transmisión de enfermedades de la madre hacia el lechón ⁽¹⁰⁴⁾.
- b) Incremento en la productividad de la cerda al aumentar su número de partos por año, produciendo así un número mayor de cerdos finalizados ⁽¹⁰⁴⁾.
- c) Un menor desgaste de la cerda, por efecto de un corto periodo de lactancia ^(3; 4).
- d) El uso de las instalaciones se hace más eficiente al aumentar en un tercio, la capacidad instalada por cada semana que se reduzca la edad al destete ⁽¹⁰⁵⁾.

El destetar a los cerdos a temprana edad, donde se proporcionan dietas altamente complejas en nutrimentos permite que tengan una transición paulatina al nuevo alimento en el destete que se ve reflejado en el aumento en el consumo de materia seca.

Una mayor tasa de crecimiento significa un menor número de días necesarios para que el cerdo alcance su peso de meta. Sin embargo, mientras menor sea la edad de destete del cerdo lactante, mayor será el número de dietas y la digestibilidad de estas materias primas altamente procesadas ^(106; 107; 108) y por lo tanto de un costo elevado ^(88; 9).

Desventajas del destete precoz

- a) Cambio de instalación y la completa separación de la madre, ya sea en sistemas de ciclo completo o destete segregado; en esta última el estrés se incrementa por la transportación de los animales a varios metros o kilómetros de su sitio de nacimiento ⁽¹⁰⁹⁾.
- b) Reagrupamiento de camadas, resultando en peleas con el fin de establecer una nueva jerarquía en el corral, siendo más severa cuando existen 2 grupos ⁽¹⁰⁹⁾, o un inadecuado agrupamiento de animales, en donde cerdos más pesados son reclutados en un mismo corral.
- c) Cambio radical en la dieta, de un alimento líquido, de sabor y temperatura agradable, administrado en horarios precisos; a dietas sólidas; de sabor desconocido, frío y suministrado de manera discontinua ⁽¹⁰⁹⁾.
- d) El cerdo destetado tiene que distinguir entre sed y hambre, satisfaciendo dichas necesidades; en un comedero y bebedero por separado, estos equipos pueden no favorecer el consumo durante las primeras horas/día después del destete.
- e) Durante esta etapa, la susceptibilidad a contraer enfermedades de tipo respiratorio (PRRS, Micoplasmosis, Enfermedad de Glasser, Salmonelosis, Pasteurelisis, etc) se incrementa marcadamente.
- f) El estrés generado, se manifiesta en los cerdos recién destetados mediante conducta o vicios como mamar el ombligo y/o pene de otros lechones, un aumento en el comportamiento de escape, menor tiempo empleado para beber y alimentarse etc. Estas conductas son más evidentes en aquellos cerdos que son separados a edades de 7 días, respecto a aquellos en donde el destete se realiza a los 28 días ⁽¹¹⁰⁾.

Factores predisponentes a enfermedades respiratorias en el destete

Varios aspectos del desarrollo del sistema inmune del cerdo contribuyen a la baja inmunocompetencia y mayor susceptibilidad al destete, por ejemplo; la placentación de tipo epiteliochorial la cual no permite el paso de inmunoglobulinas (Ig) maternas al feto, ocasionando en el lechón ausencia de protección inmune pasiva ⁽¹¹¹⁾; así como una incapacidad para sintetizar sus propios anticuerpos ⁽¹¹²⁾. El sistema inmune del lechón va madurando paulatinamente, lo que ocurre alrededor de la cuarta semana sin embargo, el estrés ocasionado por el destete a través de la intensa secreción de corticosteroides deprime la respuesta inmune ⁽¹¹³⁾, siendo más evidente cuando se realiza antes de las 4 semanas de edad ⁽¹¹³⁾. El estrés ó síndrome generalizado de adaptación, es un factor difícil de definir y de cuantificar, pero cuya repercusión en el sistema inmune es indiscutible ^(114; 113). La sobrepoblación es, tal vez, el factor estresante más habitual que provoca una inmunosupresión, la concentración de amonio es de suma importancia en ambientes cerrados, la ventilación forzada es necesaria para prevenir la contaminación aérea masiva y mantener una humedad relativa aceptable, la elevación de la temperatura corporal o ambiental, modifica los mecanismos de defensa de tipo físico, químico o biológico del cerdo, permitiendo que la flora normal, pueda invadir los pulmones y provocar neumonías ⁽¹¹⁵⁾ o relacionarse con una bacteria o un virus provocando un cuadro de complejo respiratorio ⁽¹¹⁶⁾. También el espacio vital reducido permite la predisposición y la aparición de infecciones agudas o enfermedades crónicas debilitantes, pero la mayor parte de las veces son crónicas e insidiosas ^(117; 118) y se observan efectos negativos en el consumo de alimento y en la tasa de crecimiento ^(119; 120). La suma de estos

factores y su importancia son tan grandes que se convierten en determinantes al realizar el diseño de la instalación ya que, el control directo de todos los factores descritos puede acentuar o minimizar la repercusión de los riesgos epidemiológicos ⁽¹¹⁸⁾.

Las interacciones de los factores predisponentes entre el lechón y su entorno provocan el desarrollo de patologías las cuales afectan directamente sobre la anatomía, función y defensa del sistema respiratorio ⁽¹¹⁵⁾ por la inmunosupresión local y/o sistémica, por una deficiencia en la respuesta inmune a través de anticuerpos y/o de un menor número de células en la mucosa respiratoria debida a la deficiencia nutricional de arginina, la cual tiene un efecto estimulador, de maduración y replicación celular ^(32; 11).

Generalidades del sistema respiratorio

Anatomía

El tracto respiratorio es un órgano tubular con estructura arbórea, que comprende la cavidad nasal, faringe, laringe, tráquea y pulmones con bronquios, bronquiólos y alvéolos.

Sistema del tracto tubular

Cavidad nasal: En el cerdo, la cavidad nasal, puede ser larga, estrecha, corta, ancha dependiendo de la raza. Está dividida longitudinalmente por una pared (septum o tabique nasal). Dos huesos en forma de cornetes dividen cada una de ambas mitades de la cavidad en tres meatos: dorsal, medio y ventral (fig.3).

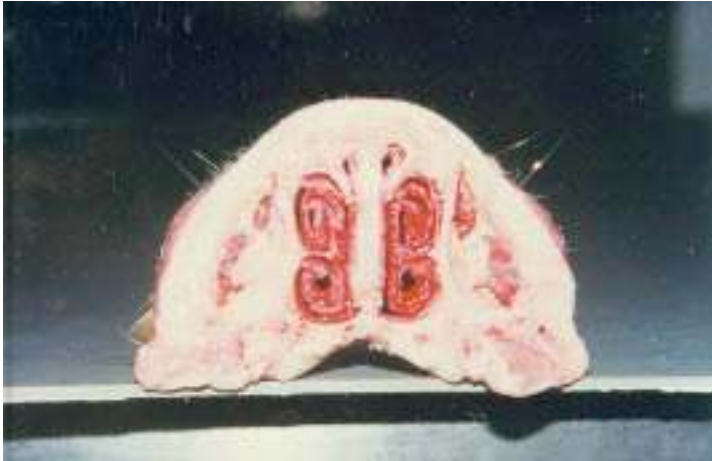


Fig. 3. Corte transversal del hocico de cerdo, se puede apreciar la anatomía de los cornetes de la cavidad nasal, el septo en posición simétrica y derecho.

Tráquea, bronquios, bronquiólos y alvéolos

La tráquea es corta y se divide hacia atrás en dos bronquios principales (izquierdo y derecho). Una derivación especial del bronquio principal conduce al lóbulo apical del pulmón derecho. El bronquio principal derecho envía otra derivación al lóbulo cardiaco derecho y otro al lóbulo intermedio y luego continúa hasta 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 cardiaco. El bronquio principal continúa luego hacia el lóbulo diafragmático. Las ramas más finas del sistema tubular son los bronquiólos, dividiéndose cada uno en conductos alveolares y alvéolos.

La laringe, tráquea y bronquios están tapizados con epitelio ciliado pseudoestratificado y con células caliciformes. Los bronquiólos, al acercarse a los alvéolos, están tapizados de epitelio escamoso. Porciones de los bronquiólos (llamados bronquiólos respiratorios) y las paredes de los alvéolos están tapizadas por una capa única de células epiteliales muy planas (células alveolares tipo I) y de células epiteliales cúbicas (células alveolares tipo II). Las células alveolares

tipo II producen surfactante pulmonar y sirven como células progenitoras para el reemplazo y recambio de células alveolares tipo I.

Aspecto macroscópico del pulmón

En el cerdo, los pulmones están divididos en siete lóbulos; el pulmón derecho comprende los lóbulos apical, cardiaco, accesorio y diafragmático; el pulmón izquierdo comprende los lóbulos apical, cardiaco y diafragmático (Fig. 4). Los lóbulos están subdivididos en lobulillos por tabiques interlobulillares sólidos. Los procesos patológicos a menudo quedan confinados dentro de las estructuras lobulillares, observados en bronconeumonía catarral con límites demarcados entre el tejido normal y el afectado ⁽¹²¹⁾

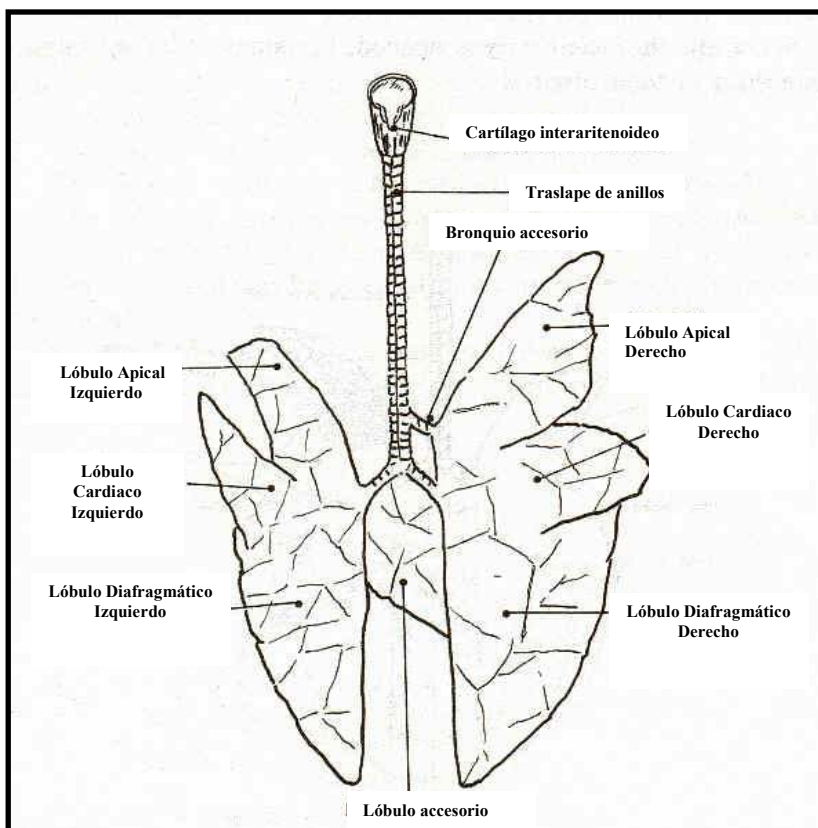


Fig. 4. Diagrama esquemático de los lóbulos pulmonares del cerdo, vista ventral. El pulmón derecho comprende los lóbulos apical, cardiaco, diafragmático y accesorio; el pulmón izquierdo comprende los lóbulos apical, cardiaco y diafragmático

El cuadro 1 muestra los pesos de los lóbulos pulmonares como porcentajes del peso pulmonar total, el lado derecho contribuye con más de la mitad del peso total (121).

Cuadro 1. Pesos relativos de los lóbulos pulmonares como porcentajes del peso pulmonar total.

Estudio	N	Lóbulos del pulmón izquierdo			Lóbulos del pulmón derecho			
		Apical	Cardíaco	Diafrag.	Apical	Cardíaco	Diafrag.	Acc.
A	11	7	7	32	12	8	30	5
B	20	5	7	32	6	9	36	5
C	13	5	6	29	11	10	34	5

Referencia: A= (122); B= (123); C= G. Christensen datos sin publicar. El redondeo de las cifras puede hacer que la suma de porcentajes sea superior a 100.

N = número de cerdos examinados en cada estudio. 180-200 días de edad

Función

El intercambio gaseoso vital entre el aire inhalado y la sangre venosa de la arteria pulmonar tiene lugar a nivel alveolar. Sólo una mínima parte del volumen total de aire alveolar se renueva en cada respiración. En el cerdo en reposo se intercambia el 10-15% del aire alveolar por inspiración. La frecuencia respiratoria normal (respiraciones/minuto) varía de acuerdo a la edad del animal (lechones y cerdos en crecimiento, 25-40; cerdos con peso a mercado, 25-35; cerdas en gestación, 15-20).

Mecanismos de defensa del sistema respiratorio

La superficie mucosa del tracto respiratorio proporciona una interfase crítica entre el cerdo y su ambiente, mientras la piel está adaptada para prevenir la invasión de agentes potencialmente patógenos, la superficie epitelial del tracto respiratorio sirve principalmente como una membrana de difusión. El intercambio gaseoso requiere una superficie de 60-80 m² en humanos (124). Por lo que es comprensible que el tracto respiratorio deba estar equipado con un aparato de defensa eficiente

y especializado. Los componentes más importantes de la defensa respiratoria se enumeran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Componentes del sistema de defensa respiratorio

Factores físicos y químicos

- ✓ Vellos en orificios nasales
- ✓ Estructura de la cavidad nasal
- ✓ Estructura de la mucosa
- ✓ Propiedades del moco físicas y químicas; por ejemplo: adhesividad, lisozima, interferones, opsoninas, lactoferrinas, factores del complemento, inmunoglobulinas específicas
- ✓ Microflora
- ✓ Componentes humorales (contenidos del moco y múltiples tipos de moduladores inmunes, por ejemplo citocinas)

Factores celulares

- ✓ Fagocitos (macrófagos alveolares y vasculares, histiocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos)
 - ✓ Linfocitos B derivados de la médula ósea (células plasmáticas)
 - ✓ Linfocitos T derivados del timo, citotóxicos (células asesinas naturales)
-

Enfermedades del cerdo Capítulo. II. Ed. Inter-Médica. 2000. pp.747 ⁽¹²¹⁾

La cavidad nasal está diseñada para eliminar las partículas grandes atrapadas por los pelos de los orificios nasales y depositados en el moco del epitelio de la cavidad nasal, faríngea, laríngea y traqueal.

Casi todas las partículas con un diámetro superior de 10 μm quedan atrapadas en el moco, solo las partículas de un diámetro aerodinámico menor de 5 μm ⁽¹¹⁵⁾ pueden llegar a depositarse en el nivel alveolar.

Defensa mucociliar

Las partículas atrapadas en el moco del epitelio son manejadas por el mecanismo de depuración mucociliar. La alfombra ciliar de los bronquios y bronquíolos origina un flujo continuo de moco hacia la faringe. El movimiento rítmico de las cilias da como resultado un flujo de moco de aproximadamente 4-15 mm/minuto ⁽¹²⁵⁾. El moco de la cavidad nasal, se vuelca en la cavidad faríngea y luego se traga.

Fagocitos

Los macrófagos alveolares neutralizan el material extraño que escapa al mecanismo de defensa mucociliar. Las partículas no patógenas son manejadas por simple actividad fagocítica y se eliminan en el flujo de moco. Los microorganismos patógenos son neutralizados con la ayuda de secreciones como lisozima, interferones, opsoninas, lactoferrinas, factores de complemento e inmunoglobulinas específicas presentes en el moco. Si los agentes no son neutralizados por los macrófagos alveolares, se producirá inflamación. Los neutrófilos de la sangre invaden luego al alvéolo y ayudan a los macrófagos en la actividad fagocítica. En cerdos sanos la proporción normal de elementos celulares en el moco broncoalveolar es de 70-80% de macrófagos, 11-18% de linfocitos, 8-12% de neutrófilos y hasta de 5% de granulocitos eosinófilos ⁽¹²⁶⁾.

Inmunoglobulinas

La producción de inmunoglobulinas específicas es de importancia crucial para la defensa inmune respiratoria. Su función biológica consiste en la neutralización de los antígenos, generando complejos antígeno-anticuerpo no patógenos. Las inmunoglobulinas predominantes en el moco son del tipo IgA. Las globulinas IgM son proteínas producidas al inicio de la respuesta inmune, particularmente en el cerdo recién nacido. Las globulinas IgG, originadas del suero sanguíneo, constituyen la mayor parte de las inmunoglobulinas en el moco del tracto respiratorio inferior, cerca de los alvéolos. Las inmunoglobulinas del tapiz mucoso actúan principalmente previniendo el establecimiento inicial y penetración de los patógenos ⁽¹²⁷⁾. Las globulinas IgE se generan en la respuesta inmune contra parásitos, por ejemplo, parásitos pulmonares y larvas migratorias de áscaris.

Respuesta inmune mediada por células

Generalmente la inmunidad mediada por células es muy importante y se identifica por: células citotóxicas ⁽¹²⁷⁾, células asesinas naturales, macrófagos activados. La respuesta mediada por células es de importancia en las infecciones respiratorias víricas, como la influenza y la enfermedad de Aujeszky.

Enfermedades respiratorias comunes en cerdos destetados

Las enfermedades que afectan a los cerdos son de importancia desde el punto de vista nutricional debido a que tienen un impacto negativo sobre los parámetros de producción, lo cual hace que se alargue el ciclo de engorda y desde el punto de vista inmunológico debido a la inmunosupresión del sistema inmune que defiende al huésped de agentes patógenos, tomando en cuenta estos dos aspectos solo se mencionarán brevemente las enfermedades que afectan a los cerdos en el destete.

En cuanto a factores etiológicos de naturaleza infecciosa, ambiental y epidemiológicos se tienen:

- Factores medio ambientales: mencionados anteriormente en la sección de factores predisponentes a enfermedades en el destete.
- Factores de etiología infecciosa: se clasifican en primarios y secundarios. Los agentes primarios son capaces de producir enfermedad por sí mismos y además propician las patologías desencadenadas por los agentes secundarios (cuadro 3). Esta labor facilitadora se basa en la capacidad inmunosupresora y/o inmunocomprometedora, a nivel local o general. Algunos autores han cuestionado estas afirmaciones y han planteado que

los virus también son agentes secundarios en el caso de la infección por *M. hyopneumoniae* ⁽¹²⁸⁾.

Cuadro 3. Agentes primarios y secundarios que afectan al cerdo ⁽¹²⁸⁾

Agentes Infecciosos	
Agentes Primarios	Agentes Secundarios
<u>*<i>M. hyopneumoniae</i></u>	<u>*<i>H. parasuis</i></u>
PRRS	<u>*<i>P. multocida</i></u>
Aujeszky	<u>*<i>A. pleuropneumoniae</i></u>
Influenza	Circovirus

**Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*

1.- PRRS: El síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino es una enfermedad severamente destructiva de macrófagos alveolares. Se transmite por contacto directo, aerosol, semen y transmisión vertical ⁽¹²⁹⁾. Los síntomas varían de agudo a crónico ⁽¹²¹⁾. El cuadro clínico incluye: anorexia, letargo, disnea (respiración abdominal), polipnea, hiperemia, pelo hirsuto, disminución en el aumento de peso diario y de la eficiencia de alimentación, que produce una gran variación de tamaño en cerdos de edades similares ^(130; 131; 132; 133; 134). En esta etapa de la vida del cerdo (destete), PRRS se manifiesta principalmente a nivel respiratorio ⁽¹³⁵⁾. El contagio por el virus se basa en la infección y replicación, dentro de las células monocito/macrófago ^(136; 137; 138; 139; 140; 141) el virus tiene preferencia por la replicación en macrófagos inmaduros ^(142; 143).

2.- Micoplasmosis: La infección coloniza las superficies de las mucosas traqueal y bronquial. Las vías aéreas infectadas evidencian daño ciliar y de las células epiteliales además, micoplasma ataca células linfoides en sangre y linfonodo bronquial, donde induce un alto índice de estimulación y secreción de Ig, por lo

que los cerdos que están infectados muestran inmunosupresión ^(144; 145), lo que lleva a alteraciones en la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares ⁽¹⁴⁶⁾. Su importancia radica en que ocasiona ineficiencia productiva y pérdidas económicas, reduciendo 15.9% el índice de crecimiento y del 12-16% la eficacia alimenticia. Los principales signos clínicos corresponden a una tos crónica no productiva, con retraso en el crecimiento y un consumo de alimento usualmente normal; sin embargo, cuando el agente se asocia con otras bacterias, suele presentarse fiebre, disnea, polipnea, anorexia y muerte.

3. Salmonelosis: Ocasionada por *S. choleraesuis* y se presenta particularmente en cerdos jóvenes. Se caracteriza por presentar baja morbilidad (10%) y alta mortalidad. Los cerdos afectados por *S. choleraesuis* presentan: fiebre, anorexia, depresión, ictericia, cianosis, tos productiva, secreción nasal y disnea.

4. Pasteurelosis neumónica: Enfermedad causada por *Pasteurella multocida* tipo D y responsable de una rinitis progresiva, también crece en células epiteliales, inhibe la fagocitosis de los macrófagos alveolares. Los signos clínicos cursan con marcada disnea, respiración abdominal, tos ligera, descarga nasal, fiebre y cianosis en extremidades. Hay una clara disminución de la ganancia diaria de peso, eficacia alimenticia así como el índice de crecimiento, lo cual es una enfermedad de tipo crónico.

Se ha planteado que las enfermedades respiratorias de curso benigno y de baja morbilidad tienen una influencia marcada en el ciclo de producción. Estas enfermedades son las más extendidas y las que más pérdidas económicas ocasionan, por un desarrollo desigual, mal aprovechamiento del alimento, disminución de la ganancia diaria de peso y aumento en la conversión alimenticia.

Todos estos factores se traducen en un mayor número de días a mercado y un encarecimiento en la producción ⁽¹²⁸⁾.

SISTEMA INMUNE DEL CERDO

Sistémico

La inmunidad sistémica en el cerdo tiene como finalidad la eliminación activa del antígeno absorbido, la que depende tanto de su resistencia natural o inmunidad innata como de la inmunidad adquirida. Los componentes de la inmunidad innata o no específica incluyen factores genéticos, raciales, hormonales, celulares y humorales, además de otros factores como la edad y las barreras de protección mecánica. Por su parte la inmunidad específica puede adquirirse en forma activa por infección natural o de manera artificial por vacunación y en forma pasiva por tratamiento con antisueros o sueros inmunes mediante la inmunidad materno-fetal, donde los anticuerpos producidos por la madre se adquieren por calostro.

Mucosal

Intestino

El tejido linfoide asociado a intestino (del GALT: *Gut associated lymphoid tissue*), representa el 25% de la mucosa intestinal, siendo el intestino el órgano con mayor densidad de células inmunes del organismo ^(147; 148). La inducción de la respuesta inmune requiere del procesamiento y presentación de los antígenos a los linfocitos T cooperadores (CD4+) por las células presentadoras de antígenos (APC) que expresan en su superficie moléculas del complejo principal de

histocompatibilidad (MHC). Una vez que el antígeno es presentado a las células T, estas se activan expresando receptores en su superficie para interleucina 2 ⁽¹²⁷⁾. La relación entre las CPA, los linfocitos T y las células activadas, ocurre en los sitios de contacto del sistema inmune con el antígeno ⁽¹⁴⁷⁾. Las superficies mucosas de los aparatos gastrointestinal, respiratorio y reproductivo, junto con la glándula mamaria, son las principales fronteras entre el organismo y su medio circundante.

El GALT tiene como principal función: reconocer y suprimir cualquier respuesta inmune sistémica contra antígenos de la dieta y es a la vez, capaz de identificar y reaccionar eficazmente para evitar la adhesión y penetración de virus, bacterias, hongos y parásitos ^(149; 150).

El sistema inmunitario de las mucosas está dotado de mecanismos defensivos específicos por los que los microorganismos patógenos pueden ser expulsados o eliminados, pero de igual importancia son los mecanismos defensivos inespecíficos ^(148; 151), que actúan de forma independiente o sinérgica con la respuesta inmune adquirida e incorporados al sistema inmune local.

Los mecanismos inespecíficos en el intestino integran una gama de barreras físicas (fluidos, motilidad, epitelio, moco), químicas (secreciones, enzimas, pH, ácidos grasos) y biológicas (microflora) ⁽¹⁴⁷⁾. Estos mecanismos están integrados por las barreras humoral, celular y mecánica disminuyendo la absorción de antígenos (Ags) no digeridos, pero aun así, cantidades inmunológicamente significativas de baja antigenicidad se absorben a través del epitelio y de las células M de las placas de Peyer ^(148; 152). Las inmunoglobulinas secretadas en la mucosa reducen la penetración de Ag al bloquear su unión al enterocito. La IgA tiene una alta importancia debido a que es la predominante en la mucosa ⁽¹⁵³⁾. Los

otros isotipos (IgM, IgG o IgE) son producidos en cantidades relativamente pequeñas (10%)⁽¹⁵⁴⁾.

Pulmón

Aunque los mamíferos poseen una amplia variedad de mecanismos de defensa en el interior de los tejidos. Es en las superficies corporales donde los microorganismos invasores se detectan inicialmente y donde son, en su mayor parte, repelidos o destruidos. A diferencia del intestino, que está expuesto a grandes cantidades de material extraño todos los días, las vías respiratorias se exponen a cantidades muy pequeñas de materias extrañas, casi siempre en forma de aerosoles o partículas inhaladas⁽¹¹⁵⁾. El aire que se introduce al respirar y que se retira tiene un promedio de 500 centímetros cúbicos (cc), por lo que representa un volumen de 6 litros por minuto, si tomamos en cuenta la actividad del cerdo de 24 horas tenemos un volumen de 4000-5000 litros aproximadamente. Las partículas grandes (más de 10 μm) por lo general quedan atrapadas en las vías respiratorias superiores, y sólo las más pequeñas (inferiores a 2 μm) penetran en el pulmón⁽¹¹⁵⁾. Los pulmones son estériles en condiciones normales. Las vías respiratorias tienen nódulos linfoides en las paredes de los bronquios, así como linfocitos que se distribuyen de manera difusa en el pulmón y en las paredes de las vías respiratorias⁽¹²¹⁾. Suele haber células M asociadas a estos nódulos linfoides. La inmunoglobulina que se sintetiza en estos tejidos es principalmente IgA secretora, en especial en las vías anteriores⁽¹⁵³⁾, sin embargo, las secreciones de bronquios y alvéolos contienen una gran proporción de IgG, proveniente principalmente del suero de cerdo así como en la mucosa⁽¹⁵³⁾. En la superficie luminal de los alvéolos pueden encontrarse células, principalmente

macrófagos alveolares, los cuales además de poder fagocitar, también producen un factor quimiotáctico con una actividad preferente sobre los leucocitos polimorfonucleares ⁽¹²⁷⁾.

En humanos se conoce la composición celular del lavado bronquioalveolar la que es de linfocitos T: (CD3+), cooperadores (CD4+), citotóxicas supresores (CD8 +), CD68 de linfocitos B y macrófagos ^(155; 156). Sin embargo, en el cerdo se tienen pocos datos de sus poblaciones celulares, en el lavado broquioalveolar se conoce que el 10% de células nucleadas son linfocitos ⁽¹⁵⁵⁾. A través del análisis del lavado traqueobronquial (BAL) y de sangre periférica ^(157, 158) se puede conocer sus poblaciones e interpretar un aumento ó disminución de su fenotipo ^(159, 160), distribución, proporción, o establecer una cinética celular para así estudiar su perfil ⁽¹⁶¹⁾ en individuos donde su estado inmune está comprometido, por ejemplo en enfermos con SIDA ⁽¹⁶²⁾ o con problemas agudos o crónicos de pulmón ⁽¹⁶³⁾. En la actualidad no hay estudios inmunológicos sobre las poblaciones celulares del pulmón (parénquima) del cerdo, mucho menos la cuantificación, proporción, distribución en pulmón motivo de este trabajo.

Desarrollo y maduración

Intestino

El lechón es considerado esencialmente inmunoincompetente al nacimiento, pero el bajo número de células MHC de clase II y de células CD4⁺ y CD8⁺ en el intestino que son necesarias para la inducción de la respuesta inmune activa podrían afectar la eficiencia del sistema ^(164; 165; 166; 167, 168). Las células T (que expresan en su superficie CD2 y son por lo tanto clasificados como células CD2⁺) están presentes en el intestino, pero estas células no expresan ninguno de los

dos antígenos de superficie CD4 o CD8 y son, por lo tanto, predominantemente dobles negativas CD2⁺CD4⁻CD8⁻ ^(169; 170; 167, 168) La presencia de esta población en cerdos ha sido reportada por otros autores ^(171; 172) como células T doble negativas (CD2⁺CD4⁻CD8⁻) ^(173; 174; 175). Las células T intraepiteliales en el duodeno e íleon están presentes al nacimiento y, a las 7 semanas representan un 38% del total de las células intestinales y también son predominantemente doble negativas ^(176; 168). Un número pequeño de linfocitos B están presentes al nacimiento ⁽¹⁷⁷⁾.

Durante el periodo postnatal, el intestino experimenta un cambio extenso, donde es expuesto a una serie de antígenos ambientales, de naturaleza tanto inocua como perjudicial para la salud. Después del nacimiento, la presencia de macrófagos se incrementa, más en la cripta que en la región de la lámina propia de la vellosidad y alcanza niveles de adulto a las 5 semanas de edad ⁽¹⁶⁷⁾. Las células dendríticas se incrementan después del nacimiento, más en la vellosidad que en la región de las criptas ⁽¹⁷⁸⁾. Esto se ha confirmado por el desarrollo de las células MHC II, que son el doble en la vellosidad comparado con la lámina propia de la cripta, a la primera semana de edad ⁽¹⁶⁷⁾.

El perfil de los linfocitos de la mucosa intestinal se altera drásticamente después del nacimiento, siendo el doble de linfocitos en la lámina propia en las primeras cuatro semanas ^(169; 178); proceso que es impulsado por la exposición a los antígenos microbianos ^(169; 179; 166; 180). Los linfocitos T de la lámina propia inmadura empiezan a diferenciarse en CD4⁺ y CD8⁺ por el día 50 de edad ⁽¹⁷⁹⁾.

Así mismo, las células CD4⁺ y CD8⁺ muestran un patrón de desarrollo diferente, pues las células T CD4⁺ se incrementan rápidamente después del nacimiento, mientras que el número de células T CD8⁺ aumenta de una manera comparativamente lenta en las primeras 5-7 semanas de vida ^(169; 177; 178; 167; 168). A

los 6 meses de edad, las células T CD4⁺ y CD8⁺ muestran un patrón distinto en la localización dentro de la lámina propia, donde la concentración es mayor en la vellosidad que en la cripta ⁽¹⁷²⁾.

El aumento significativo de los linfocitos intraepiteliales después del nacimiento, debido a la exposición a los antígenos, representa el 50% del total de estas células en el intestino, a la 5^a semana de vida ^(170; 166; 168). Los linfocitos en el epitelio, en la vida temprana, son predominantemente CD2⁺, con un número significativo de células CD8⁺ detectables más tarde en la vida ^(167; 168).

El poco número de células intraepiteliales durante las primeras 5 semanas de vida y, la escasez de células T CD8⁺, puede predisponer al cerdo joven a infecciones digestivas ⁽¹⁶⁸⁾. Los linfocitos B en la lámina propia responden a la estimulación antigénica durante el periodo posnatal. La IgA en plasma se incrementa desde el día 6 al 28 de edad ^(181; 182). La presencia de IgM en plasma también es significativa, las IgA son superiores cerca de la 4^a semana de vida y conforme pasa el tiempo esta se vuelve predominante ^(169; 165; 166; 180), por lo que la concentración de células B es mayor en la cripta que en la lámina propia de la vellosidad ^(169; 166; 180).

Las placas de peyer (PP) experimentan un crecimiento en el periodo posnatal, incrementando su longitud alrededor de tres veces en los primeros 38 días después del nacimiento ⁽¹⁶⁴⁾, en comparación con cerdos libres de gérmenes los cuales muestran un pequeño incremento de estas estructuras en el mismo periodo ⁽¹⁶⁴⁾.

La acelerada e ilimitada acumulación de células MHC II y de CD4⁺ y CD8⁺ en la lámina propia del intestino durante el periodo posnatal indican que el lechón desarrolla rápidamente el potencial para el reconocimiento de antígenos e

inducción de la respuesta inmune activa. De cualquier manera, los componentes del sistema inmune intestinal no se asemejan al del cerdo adulto en las tres primeras semanas de edad, que es cuando usualmente ocurre el destete del lechón criado bajo condiciones intensivas. La relación de células T CD4⁺ y CD8⁺ en los primeros días de vida es contraria a la que se puede observar en un cerdo adulto ⁽¹⁶⁷⁾ en este último la relación es 1:1, mientras que en el cerdo joven la disparidad en la relativa proliferación de estas células T es mayor de 1; lo que puede potencialmente influenciar la capacidad del lechón para regular la respuesta inmune ^(183; 184). Además los niveles absolutos de linfocitos en la lámina propia y de los compartimentos intraepiteliales en el destete están por debajo de los niveles de un adulto, lo que puede comprometer la defensa inmunológica en contra de infecciones. El retiro del suplemento maternal de inmunoglobulinas en este tiempo, elimina la protección inmunológica pasiva en el lumen intestinal, haciendo vulnerable a la mucosa a infecciones oportunistas tales como *E. coli* y rotavirus ⁽⁵⁾.

Pulmón

El pulmón y vías respiratorias superiores son superficies mucosales comunes para infecciones por bacterias ⁽¹⁸⁵⁾, que existen comúnmente como microflora comensal en muchos individuos sin signos de enfermedad; si el balance del estado del comensalismo se altera, el resultado del desequilibrio es una infección. Los individuos que están inmunocomprometidos o tienen un bajo estado inmunitario son altamente susceptibles a infecciones por bacterias, virus o interacción de ambos patógenos ^(186, 187). Se han empleado modelos animales para el estudio del desarrollo y patogénesis así como de los mecanismos

efectores de inmunidad en el tracto respiratorio, a través de la inmunidad mucosal y estrategias de vacunación ^(188, 189) para prevenir infecciones en el pulmón. Estos estudios han establecido la importancia de de la inmunidad mucosal en esas infecciones. La diseminación de la respuesta inmune después de emplear regímenes que inducen una respuesta significativa han sugerido que la polarización de las células T cooperadoras puede ser un factor fundamental en la protección efectiva en el pulmón ^(188, 189). Las investigaciones en este campo son prometedoras para entender los mecanismos efectores de la inmunidad en el pulmón, por lo que el desarrollo de un modelo de inmunidad en el tracto respiratorio requiere del estudio de: (1) tipo y número de células en el órgano, (2) cambios con la edad y el destete, (3) efecto de la vacunación e inmunoestimuladores, (4) activación de macrófagos, (5) reclutamiento de leucocitos, (6) producción de citocinas (derivadas de células CD4, macrófagos y otras células), (7) activación de polimorfos para incrementar la fagocitosis, y finalmente (8) control y regulación de la respuesta inmune ^(190, 191).

La activación de células T por antígenos específicos de células T induce su función inmune a través de la secreción de citocinas Th1 y Th2. La diferente concentración o la polarización de estas citocinas tienen la capacidad de modular la respuesta inmune en una infección. La respuesta de Th1 o Th2 en los linfonodos es rápida con la resultante interacción de células T y B determinando el respectivo tipo de inmunidad celular (Th1) o humoral (Th2) ^(192, 193). La respuesta de las células T en su mayor parte produce un patrón de citocinas combinado ^(194, 195). Una respuesta Th1 es dominada por células que producen IFN γ que está asociado con la producción de IgG2a ⁽¹⁹⁶⁾ en ratones, mientras que las células que

producen IL-4 inducen un cambio secuencial a IgG1 ⁽¹⁹⁷⁾ y corresponde con una respuesta tipo Th2.

La influencia de la población residente dentro del tejido en el tiempo de infección es esencial para una respuesta rápida, control y protección contra la enfermedad. Se han encontrado diferencias significativas en cinéticas celulares asociadas con el número de células fagocíticas y citocinas inflamatorias (TNF α) ^(198, 191) entre animales inmunes y no inmunes.

En resumen, la protección de las vías respiratorias involucra la producción de mediadores inflamatorios y reclutamiento de células efectoras, así como la producción de citocinas proinflamatorias y quimocinas tales como TNF α , interleucina 1-b y proteínas inflamatorias de macrófagos. Estas señales químicas promueven la infiltración y activación de PMNs, macrófagos y linfocitos. El proceso inflamatorio también requiere regulación a través de la producción de receptores antagonistas y citocinas anti inflamatorias. Las células T CD4 son una población que tiene un papel muy importante en la regulación de la inflamación ⁽¹⁹⁹⁾. La producción de citocinas por otros tipos celulares, células T CD8 y $\gamma\delta$ son proinflamatorias y también tienen actividad antiinflamatoria ^(200, 201), las cuales juegan un papel importante en la respuesta inmune en este órgano.

En la actualidad no existen estudios sobre el desarrollo y maduración de la inmunidad en el pulmón en las diferentes etapas de la vida del cerdo, por lo cual es importante determinar el tipo, proporción y número de células del sistema inmune en etapas como el destete con el fin de entender las causas de su mayor susceptibilidad a enfermedades en este periodo tan crítico y la manera de poder evitarlas o disminuir su incidencia.

Efecto del destete

Intestino

La activación del sistema inmune gastrointestinal durante el destete ha sido descrito en varias especies animales ^(202; 203; 204; 205; 206) en el humano ^(207; 208) y en el cerdo ^(167; 96; 209; 175). Los cerdos destetados al día 21 de edad tienen un incremento de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en la lámina propia yeyunal dentro de los 2 a 7 días después del destete ⁽⁹⁶⁾. Similarmente Pluske y colaboradores ⁽²⁰⁹⁾ reportaron un incremento de CD4⁺ en la lámina propia yeyunal dentro de las 24 horas posteriores a la separación materna; sin embargo, no hubo cambio en CD8⁺. En contraste Vega-López y colaboradores (1995), reportaron que en cerdos destetados a la misma edad, se observó un incremento de células CD2⁺ en la lámina propia al 4^o día posdestete en comparación con cerdos control no destetados; sin embargo, las células CD4⁺ o CD8⁺ no se incrementaron, indicando que la infiltración de las células son del fenotipo CD2⁺CD4⁻CD8⁻. Estos mismos autores también observaron un incremento en los granulocitos/macrófagos en la lámina propia de la cripta y vellosidad de la región proximal del intestino delgado y un aumento en células MHC II, después del destete. Paradójicamente a pesar de la afluencia de inmunocitos dentro de la mucosa intestinal, no hay evidencia de un incremento en la activación de células T o macrófagos después del destete, lo que está determinado por la expresión de receptores de IL-2 ^(167; 175). Se conoce que del día 1 al 47 hay un cambio gradual fenotípico en la población de células CD4⁺, CD8⁺, monocitos granulocitos y macrófagos (expresan antígeno de superficie SWC-3), el efecto del destete a los 17 se analizó para comparar la población antes y después del destete ⁽¹⁷⁵⁾. Ya que los cambios significativos en las variables inmunológicas, tales como la expresión de linfocitos T y MHC, han

sido observados en las primeras 24 horas después del destete ^(96; 209) se requiere una rigurosa y eventual comprobación para ilustrar la alteración dinámica en la inmunidad intestinal en el periodo posterior al destete. En este sentido el estudio de Solano-Aguilar ⁽¹⁷⁵⁾ proporciona datos sobre las grandes alteraciones de los linfocitos en la mucosa en el primer mes después del destete. La conexión de la activación del sistema inmune intestinal en esta etapa con la respuesta inflamatoria metabólica en el nivel sistémico ⁽²¹⁰⁾ disminuye la relación de altura de la vellosidad: profundidad de la cripta, inmediatamente después del destete, seguido de un aumento en las concentraciones de citocinas proinflamatorias IL-1 en plasma en la fase aguda ⁽¹⁷⁵⁾.

Las alteraciones observadas en las poblaciones celulares en esta fase son debidas a la pérdida de la homeostasis del tracto digestivo, la disminución en la cantidad de estas células para procesar antígenos en la dieta es menor, llevando a un mayor tiempo en el restablecimiento de la vellosidad y de la cripta en la mucosa intestinal y por consiguiente en el número de estas células que proporcionan protección inmune. El efecto del destete en las células es evidente en intestino y tomando esto de base, se podría especular que en el parénquima pulmonar la alteración se vería reflejada en una menor cantidad celular que no pueden montar una respuesta inmune eficaz, aunado al tiempo en que las poblaciones se recuperan, haciendo susceptible al cerdo a enfermedades respiratorias en ese período.

Estimulación inmune

La activación del sistema inmune (SI) tiene un papel muy importante en el desarrollo productivo del cerdo. En cualquier parte del mundo donde se producen

cerdos de forma semiintensiva o intensiva, los problemas comúnmente observados son las enfermedades respiratorias. Las patologías respiratorias afectan directamente e indistintamente los pulmones derecho e izquierdo (lóbulos apical, cardíaco, diafragmático). La afectación depende del agente etiológico y su interacción con otros microorganismos. En distintos estudios se ha coincidido en que a medida que aumenta el daño en el pulmón, el comportamiento productivo disminuye ^(211; 212; 213) produciendo importantes pérdidas económicas durante el crecimiento del animal ^(214; 215; 216).

Los animales poseen sistemas de defensa (p.e. el sistema inmune) que actúa conteniendo o destruyendo antígenos antes de que ocurran cambios que representen una amenaza importante para la vida. En un estudio ⁽²¹⁷⁾ sobre la influencia de la activación del sistema inmune en el crecimiento, se demostró que cerdos con un nivel de activación alto del sistema inmune tienen un mayor consumo diario de alimento, menor ganancia diaria de peso y una mayor conversión alimenticia. En este mismo estudio se observó que al minimizar la exposición a antígenos y por lo tanto, la activación del sistema inmunitario durante el desarrollo del animal, se obtuvieron mejores consumos y ganancias de peso, mayor desarrollo muscular y menor cantidad de alimento consumido por kg de ganancia de peso, (cuadro 4), ⁽²¹⁷⁾. En dicho estudio los parámetros inmunitarios fueron monitoreados para asegurar un nivel alto y bajo de activación del sistema inmune, a través de linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y CD4:CD8 y concentraciones de alfa-1-acilglicoproteínas, los cerdos con activación baja tenían menor número de estos linfocitos y de esta proteína comparados con los cerdos con activación alta.

Cuadro 4 Efectos del nivel de activación del sistema inmune (SI) sobre la velocidad, eficacia y composición del crecimiento en cerdos de 6 a 27 Kg. de peso vivo ^a

	Activación del SI		Cambio
	Bajo	Alto	
Peso vivo, Kg.			
Inicial	6.4	5.9	
Final	27.2	25.9	
Crecimiento y utilización del alimento			
Consumo diario, g	973	863	+110
Ganancia diaria, g	676	477	+119
Índice de conversión	1.44	1.81	-.037
Composición del crecimiento ^b			
Ganancia de proteína, g/día	105	65	+ 40
Ganancia de grasa, g/día	67	63	+ 4
Ganancia grasa/ganancia proteína	0.64	0.95	- 0.31

^aAdaptado de Williams ^(218; 219). Los cerdos (sólo machos castrados) fueron alimentados *ad libitum*.

^bLa deposición de nutrientes corporales se designó utilizando la técnica de sacrificios comparativos

La importancia que tienen en la actualidad las enfermedades respiratorias en la producción de cerdo y los antígenos que los afectan (virus, bacterias) por separado, o su interacción, hace más difícil su tratamiento y resolución a través de costosos antibióticos que alargan el tiempo de engorda. Actualmente no se conoce a fondo el sistema inmune pulmonar porcino y mucho menos como actúan y se ven afectadas las células que lo integran. Lo que da pie a investigar el posible efecto que puede tener la arginina sobre el número y proporción de esas células.

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es un proceso que permite caracterizar e incluso separar diferentes poblaciones celulares mediante el uso de anticuerpos monoclonales (MAb) con diferentes fluorocromos (fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), etc); contra los marcadores de superficie específicos de cada subpoblación que se desee estudiar. La ventaja analítica de la citometría de flujo tiene como base la habilidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen. El análisis multiparamétrico hace posible evaluar poblaciones celulares particulares dentro de una mezcla compleja, detectando su capacidad para dispersar la luz (tamaño de las células) y la fluorescencia que emiten (tipo de célula). Las mediciones obtenidas se indican en porcentajes de cada población ⁽²²⁰⁾. Estas características son la base de la técnica conocida como FACS (Clasificador de células activadas por fluorescencia) (Fig. 6). El funcionamiento del FACS es relativamente sencillo y se describe a continuación. Una suspensión celular se inyecta al flujo laminar del aparato (Beckton Dickinson Immunocytometry Systems; 1995), donde las células pasan una después de la otra (500–4000/seg) a través de un capilar y llegan hasta un rayo láser. Cuando este rayo incide en una célula, la luz de excitación sale hacia delante y hacia los lados de la célula. La luz dispersada hacia adelante provee información sobre el tamaño de la célula. La luz dispersada hacia los lados provee información sobre la granularidad y morfología celular.

1. FSC: Luz difractada en ángulos pequeños entre 1° y 10°. Generalmente proporcional al tamaño celular y detectado con filtros axiales que se encuentran en la misma dirección del rayo.

2. SSC: Luz reflejada en ángulos mayores. Proporcional a la granularidad o complejidad interna de la célula. Detectada con filtros axiales situados a 90°.

La otra característica que podemos medir con el citómetro (FACSCalibur) es la fluorescencia. La luz azul de láser de Argón de 488 nm de salida, excita a un fluorocromo (FITC) que esté unido a un anticuerpo (Ac) específico y emite luz a diferente longitud de onda. La energía se libera en forma de luz y calor. La intensidad de la fluorescencia es proporcional al número de Ac unidos a la célula. La intensidad de fluorescencia depende de variables químicas (número de moléculas de fluorocromo/Ac), la luz fluorescente se procesa, a través del fotomultiplicador, en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por el software del citómetro (Fig. 5).

Históricamente, la evaluación en cualquier órgano se hacía por medio de la patología generando datos cualitativos de la muestra analizada. En la década pasada se tuvo un interés creciente para utilizar herramientas que redujeran la subjetividad humana y mejorar el trabajo. La citometría de flujo permite analizar diferentes características en una sola célula, a través de imágenes que ofrecen la capacidad de generar resultados rápidos y confiables. En este estudio se empleó esta tecnología para caracterizar las células en sangre, tonsila palatina, lavado bronquioalveolar, y lóbulos apicales y diafragmáticos del pulmón del cerdo, para monitorear los cambios en el número celular, por medio de marcadores de superficie para linfocitos T, B y macrófagos. La evaluación de las muestras generó datos computarizados más descriptivos y cuantitativos. La optimización de esta técnica permite incrementar el número de muestras analizadas por día, un mejor estudio y condiciones experimentales y evaluar mejor la significancia estadística entre grupos comparados. La combinación de la técnica de citometría de flujo y

del análisis de imágenes se obtienen datos cuantitativos y biológicamente relevantes sobre la evaluación de métodos tradicionales.

FACS (Clasificador de células activadas por fluorescencia)

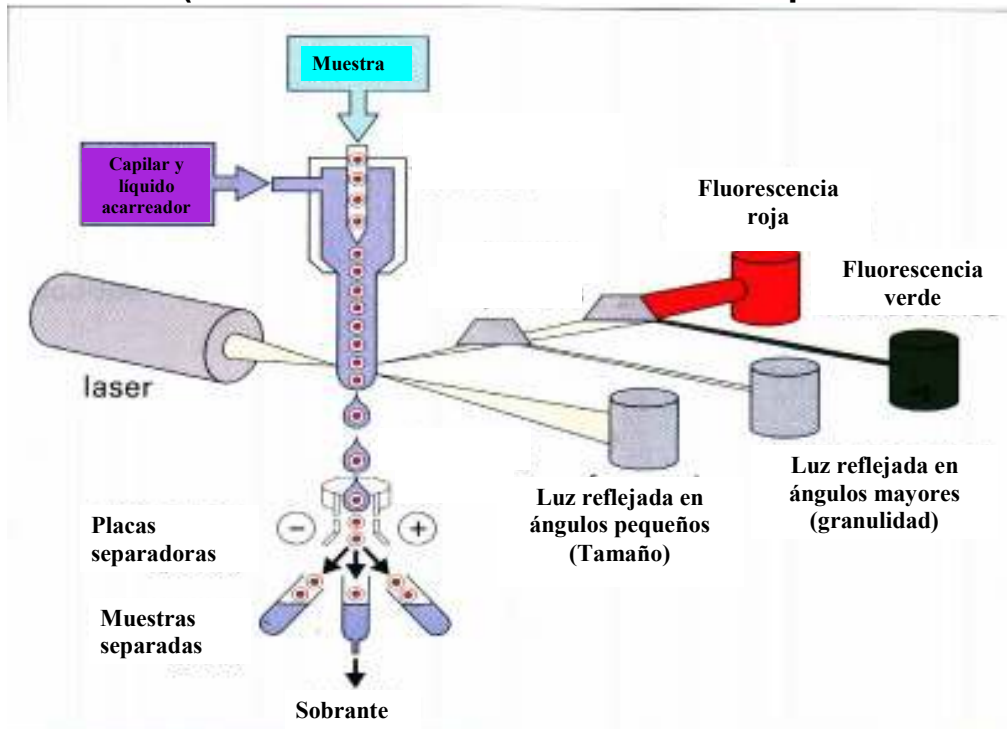


Figura 5. Sistema óptico del FACS. El láser incide en la célula y ésta dispersa la luz de manera lateral y frontal al tiempo que emite fluorescencia. La luz y la fluorescencia son detectadas por separado (Beckton Dickinson immunocytometry system: 1995. <http://www.ícnet.uk/axp/facs/davies/flor.html>. 1995, consultada el 25 de enero de 2008. ⁽²²¹⁾)

JUSTIFICACIÓN

El cerdo joven, al ser destetado presenta una inmadurez digestiva que evita que aproveche eficientemente los nutrientes que aporta una dieta no láctea, además, su sistema inmune no está completamente desarrollado y la separación materna repentina disminuye aun más su funcionamiento debido al estrés ocasionado, lo cual vuelve al lechón más susceptible a enfermedades digestivas y respiratorias por virus o bacterias, que afectan por lo general a los lóbulos apicales y diafragmáticos. Esto ha impulsado la búsqueda de métodos para activar al sistema inmune para mejorar la respuesta fisiológica del lechón en el proceso del destete. La L-arginina ha demostrado que es un aminoácido esencial en el cerdo joven (<20 kg) y durante periodos de máxima exigencia como el destete o la enfermedad. La deficiencia de L-arginina en esta etapa conlleva a una menor tasa de crecimiento del animal, se incrementan los días requeridos para alcanzar su peso de venta. Durante un proceso infeccioso, el sistema inmune es desafiado continuamente, incrementando el requerimiento de L-arginina que ayuda en la fagocitosis, aumenta la actividad citotóxica de los macrófagos, regula la activación, proliferación y maduración en células del sistema inmune. El estudio de las poblaciones del sistema inmune en el parénquima pulmonar permitirá establecer un modelo cuantitativo para evaluar cambios, en poblaciones relevantes, debido a factores ambientales (destete) o tratamientos (L-arg).

HIPÓTESIS

La inclusión de L-arginina en la dieta del cerdo recién destetado, incrementará algunos parámetros productivos y aumentará el número de células del sistema inmune en el parénquima pulmonar durante el postdestete.

OBJETIVOS

Evaluar el efecto de la inclusión de diferentes concentraciones de L-arginina en la dieta de cerdos recién destetados, sobre los principales parámetros productivos peso vivo, ganancia diaria de peso, consumo diario de alimento y conversión alimenticia.

Evaluar el efecto de la administración de 0% y 1.0 % de L-arginina sobre el porcentaje y número de células del sistema inmune en sangre, tonsila, lavado traqueobronquial y en los lóbulos apicales y diafragmáticos derechos e izquierdos del pulmón.

MATERIAL Y METODOS

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 de la Universidad Nacional Autónoma de México; ubicadas en Ciudad Universitaria, Av. Universidad No 3000. Delegación Coyoacán. México, D. F. C. P. 04510, y en el laboratorio de Inmunobiología de las Mucosas, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, ubicado en Avenida Politécnico Nacional No 2508. Col. San Pedro Zacatenco, México, D. F. C. P. 07360.

INSTALACIONES

Antes del arribo de los lechones a las instalaciones de la Facultad, estas fueron lavadas y desinfectadas. Un día antes del arribo se encendieron las fuentes de calor para mantener una temperatura de $30 \pm 2^\circ \text{C}$ de manera constante. Las instalaciones cuentan con 16 corrales con piso y paredes de cemento, distribuidos en dos líneas paralelas de ocho corrales cada una y divididos por un pasillo central; cada corral cuenta con una lechonera de madera con una dimensión de 90 x 60 x 60 cm, con un foco de 100 watts y un tapete térmico como fuente de calor. Durante esta etapa, el alimento se proporcionó a través de un comedero de plástico tipo tolva, con capacidad para 5 bocas y dimensiones de 75 x 20 x 69 cm y una capacidad de 40 kg (KANE, Iowa. EE.UU). Los corrales cuentan también con dos bebederos de chupón desmontables para cerdos recién destetados con una capacidad de 7.5 litros

(KANE, Iowa. EE.UU); que se encontraban uno a una altura de 0.39 cm y otro a 0.70 cm del piso, lo cual permitió el libre acceso al agua independientemente del tamaño del animal. La ventilación fue regulada mediante dos inyectores y dos extractores de aire, localizados en la parte superior de las paredes de las instalaciones. La temperatura fue monitoreada mediante termómetros de temperatura máximas y mínima los cuales estaban a la altura del lomo de los animales.

ANIMALES

1. Estudio nutricional: se utilizaron 60 cerdos de 21 ± 2 días de edad, recién destetados, con un peso promedio de 5 kg, producto de la cruce de cerdos (Duroc x Landrace) híbridos provenientes de una granja especializada en la producción de animales para abasto, ubicada en el municipio de Texcoco, Estado de México. Los animales recibieron las prácticas de manejo rutinarias para cerdos lactantes: corte y desinfección de ombligo; aplicación de hierro dextrán al tercer día de nacidos, castración de los machos a los 5 días de edad y descolado. A su arribo a las instalaciones de la Facultad los cerdos fueron pesados y separados por sexo. Los pesos se establecieron en orden decreciente, tomando los primeros cuatro pesos y colocándolos en un corral, al azar y sucesivamente hasta colocar a todos los animales. En cada tratamiento hubo 15 animales (N= 3 o 4 animales por corral). Los tratamientos fueron asignados al azar entre los corrales, 4 corrales fueron para el grupo control con 0% de L-arginina, 4 corrales con inclusión del 1% de L-arginina, 4 corrales con 1.5% de L-arginina y 4 corrales con 2% de L-arginina.

2. Estudio inmunológico. Al cabo de 1 mes del inicio de los tratamientos se tomaron 10 animales al azar. Cinco de estos animales provenían del grupo

control (0% de L-arginina) y 5 animales provenían del grupo que recibió el tratamiento de 1% de L-arginina, todos fueron sacrificados de manera humanitaria (descrito en toma de muestras) para obtener muestras de sangre, lavado bronquioalveolar (BAL), tonsila, lóbulo apical izquierdo (LAI), lóbulo apical derecho (LAD), lóbulo diafragmático izquierdo (LDI) y lóbulo diafragmático derecho (LDD), para la evaluación inmunológica.

TRATAMIENTOS

A su arribo se les proporcionaron 50 gramos de alimento comercial por animal (descritas más adelante) y se les dio libre acceso al agua. Los tratamientos se distribuyeron aleatoriamente y se suministraron al segundo día de su llegada a las instalaciones. Los tratamientos experimentales consistieron en administrar L-arginina cristalina (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd Tokio, Japón) a concentraciones del 1, 1.5, y 2 %, además, del grupo control (0% de L-arginina). El alimento se pesó antes de ser ofrecido a los cerdos y se registró diariamente el desperdicio de éste, para poder calcular los consumos totales por corral por día. La cantidad diaria ofrecida se calculó basándose en el consumo total (ofrecido menos el desperdicio) del día anterior. La cantidad de L-arginina se estimó de acuerdo al consumo total de alimento por corral del día anterior y se proporcionó por vía oral, una vez al día, diluida en agua destilada como vehículo durante 30 días, al grupo control se le dio agua destilada para que los animales recibieran el mismo manejo.

DIETAS

DIETA FASE 1 CONTROL NEGATIVO DE 6-10 KG

Fórmula: 1 - Fase I CONTROL.NEGATIVO.

Uso: Fase I 6-10 Kg CONTROL.NEGATIVO.

INGREDIENTS ANALYSIS

FORMULA	PRICE RANGES			RESTRICTIONS COST			
	WEIGH!	MINIMUM	REAL	MAXIMUM	MINIMUM	MAXIMUM	COST
COD INGREDIENT							
164 SORGO 8%	502.208 !	1.039	1.800	1.885	0.000		\$0.00
268 LACTOSA	171.717 !	1.344	8.000	9.960	0.000	180.000	\$0.00
097 P.SOYA 47%	130.000 !	0.000	2.900	4.556	0.000	130.000	\$1.66
255 Concentrado Soya	50.000 !	6.229	11.900	Infinite	50.000	100.000	\$5.67
108 Harina de Pescado (Specials) 6	40.000 !	5.972	8.800	Infinite	40.000		\$2.83
173 PLASMA PORCINO	35.000 !	8.688	38.900	Infinite	35.000	40.000	\$30.21
295 Harina Sangre AP 301	30.000 !	7.730	9.300	Infinite	30.000		\$1.57
166 FOSFATO 21/18	16.968 !	1.028	4.050	25.083	0.000		\$0.00
184 Calcio, Carbonato 38%	10.605 !	0.000	0.570	1.347	0.000		\$0.00
530 Bact-Acid	3.000 !	1.344	19.000	Infinite	3.000	3.000	\$17.66
133 METIONINA 99%	2.793 !	1.412	25.800	148.235	0.000		\$0.00
134 LISINA	2.276 !	1.382	17.000	30.986	0.000		\$0.00
247 LEVADURA VIVA	2.000 !	8.853	22.700	Infinite	2.000	2.000	\$13.85
201 MINS.CERDOS	1.200 !	1.185	6.500	Infinite	1.200	1.200	\$5.31
527 Colina 70%	0.900 !	1.344	10.200	Infinite	0.900	0.900	\$8.86
144 SAL	0.433 !	1.344	1.430	37.468	0.000		\$0.00
211 VIT.INI.CERDOS	0.350 !	1.314	109.000	Infinite	0.350	0.350	\$107.69
440 Sucram	0.200 !	1.344	238.510	Infinite	0.200	0.200	\$237.17
141 L-TRIPTOFANO	0.177 !	151.288	255.000	390.534	0.000		\$0.00
524 Oxidox Plus	0.150 !	1.344	18.000	Infinite	0.150	0.150	\$16.66
135 L-TREONINA	0.023 !	7.814	31.520	77.910	0.000		\$0.00

WEIGHT: 1,000.000 COST: \$5,682.08 COST PER TON: \$5,682.08

SHADOW PRICES

COD INGREDIENT	REAL	SHADOW
424 Suero de leche	7.800	6.592
169 ACEITE VEGETAL	6.500	1.344

NUTRIENTS ANALYSIS

CONTROLLED NUTRIENTS

COD NUTRIENT	MIN	REAL	MAX	COST	COD NUTRIENT	MIN	REAL	MAX	COST
003 E.M. CERDOS (KC/KG)	3300.003	302.03		\$0.00	004 E. N. CERDOS (KC/KG)	1999.63			\$0.00
012 PROT. CRUDA (%)		22.219		\$0.00	016 ARGININA (%)		1.278		\$0.00
017 LISINA (%)	1.600	1.600		\$198.68	019 METIONINA (%)	0.480	0.607		\$0.00
020 MET+CISTINA (%)	0.960	0.960		\$247.03	022 TRIPTOFANO (%)	0.304	0.304		\$2,588.33
023 TREONINA (%)	0.960	0.960		\$307.92	029 VALINA (%)		1.348		\$0.00
031 FIBRACRUDA (%)		2.263		\$0.00	034 GRASACRUDA (%)		1.926		\$0.00
036 CALCIO (%)	0.850	1.000	1.000	\$19.84	037 FOSF.TOTAL (%)	0.750	0.750	0.850	\$144.92
038 FOSF.DISP. (%)	0.420	0.536	0.450	\$0.00	040 SODIO (%)	0.180	0.180	0.220	\$2.23
043 LACTOSA (%)	17.000	17.000	20.000	\$67.23	046 LISINADIGCDO (%)		1.459		\$0.00
051 TRIPDIG CDOS (%)		0.250		\$0.00	052 TREONDIGCDO (%)		0.765		\$0.00
053 COLINA (MG/KG)		1116.70		\$0.00					

DIETA FASE 1 CONTROL POSITIVO DE 6-10 KG

Fórmula: 2 - Fase I CONTROL.POSITIVO.
 Uso: Fase I 6-10 Kg CONTROL.PPOSITIVO.

INGREDIENTS ANALYSIS

FORMULA		PRICE RANGES			RESTRICTIONS COST			
COD	INGREDIENT	WEIGH!	MINIMUM	REAL	MAXIMUM	MINIMUM	MAXIMUM	COST
164	SORGO 8%	501.568 !	1.039	1.800	3.057	0.000		\$0.00
268	LACTOSA	171.717 !	1.502	8.000	10.134	0.000	180.000	\$0.00
097	P.SOYA 47%	130.000 !	0.000	2.900	4.543	0.000	130.000	\$1.64
255	Concentrado Soya	50.000 !	6.142	11.900	Infinite	50.000	100.000	\$5.76
108	Harina de Pescado (Specials) 6	40.000 !	6.248	8.800	Infinite	40.000		\$2.55
173	PLASMA PORCINO	35.000 !	8.840	38.900	Infinite	35.000	40.000	\$30.06
295	Harina Sangre AP 301	30.000 !	7.938	9.300	Infinite	30.000		\$1.36
166	FOSFATO 21/18	16.976 !	0.571	4.050	23.689	0.000		\$0.00
184	Calcio, Carbonato 38%	7.044 !	0.002	0.570	1.347	0.000		\$0.00
147	OXIDO DE ZINC	4.000 !	0.569	12.070	Infinite	4.000	4.000	\$11.50
530	Bact-Acid	3.000 !	0.569	19.000	Infinite	3.000	3.000	\$18.43
133	METIONINA 99%	2.795 !	1.940	25.800	141.240	0.000		\$0.00
134	LISINA	2.278 !	1.635	17.000	29.200	0.000		\$0.00
247	LEVADURA VIVA	2.000 !	8.035	22.700	Infinite	2.000	2.000	\$14.66
201	MINS.CERDOS	1.200 !	0.569	6.500	Infinite	1.200	1.200	\$5.93
527	Colina 70%	0.900 !	0.569	10.200	Infinite	0.900	0.900	\$9.63
144	SAL	0.439 !	0.570	1.430	40.868	0.000		\$0.00
211	VIT.INI.CERDOS	0.350 !	0.569	109.000	Infinite	0.350	0.350	\$108.43
440	Sucram	0.200 !	0.569	238.510	Infinite	0.200	0.200	\$237.94
141	L-TRIPTOFANO	0.177 !	1.877	255.000	374.842	0.000		\$0.00
524	Oxidox Plus	0.150 !	0.569	18.000	Infinite	0.150	0.150	\$17.43
190	SULF.DE COBRE	0.125 !	0.569	12.360	Infinite	0.125	0.125	\$11.79
536	Carbadox 98%	0.056 !	0.569	7.000	Infinite	0.056	0.056	\$6.43
135	L-TREONINA	0.025 !	2.139	31.520	72.945	0.000		\$0.00
WEIGHT: 1,000.000		COST: \$5,729.43	COST PER TON: \$5,729.43					

SHADOW PRICES

COD	INGREDIENT	REAL	SHADOW
424	Suero de leche	7.800	6.485
169	ACEITE VEGETAL	6.500	2.459

NUTRIENTS ANALYSIS

CONTROLLED NUTRIENTS

COD	NUTRIENT	MIN	REAL	MAX	COST	COD	NUTRIENT	MIN	REAL	MAX	COST
003	E.M. CERDOS (KC/KG)	3300.003	300.00		\$0.24	004	E. N. CERDOS (KC/KG)	1997.90			\$0.00
012	PROT.CRUDA (%)		22.214		\$0.00	016	ARGININA (%)		1.278		\$0.00
017	LISINA (%)	1.600	1.600		\$195.61	019	METIONINA (%)	0.480	0.607		\$0.00
020	MET+CISTINA (%)	0.960	0.960		\$242.10	022	TRIPTOFANO (%)	0.304	0.304		\$2,585.74
023	TREONINA (%)	0.960	0.960		\$301.75	029	VALINA (%)		1.347		\$0.00
031	FIBRACRUDA (%)		2.261		\$0.00	034	GRASACRUDA (%)		1.925		\$0.00
036	CALCIO (%)	0.850	0.861	1.000	\$0.00	037	FOSF.TOTAL (%)	0.750	0.750	0.850	\$165.68
038	FOSF.DISP. (%)	0.420	0.536	0.450	\$0.00	040	SODIO (%)	0.180	0.180	0.220	\$22.31
043	LACTOSA (%)	17.000	17.000	20.000	\$65.64	046	LISINADIGCDO (%)		1.459		\$0.00
051	TRIPDIG CDOS (%)		0.250		\$0.00	052	TREONDIGCDOS (%)		0.766		\$0.00
053	COLINA (MG/KG)		1116.28		\$0.00						

DIETA FASE 2 CONTROL NEGATIVO DE 7-12 KG.

Fórmula: 3 - Fase II CONTROL.NEGATIVO.
 Uso: Fase II 7 - 12 kg Control Negativo

INGREDIENTS ANALYSIS

FORMULA	PRICE RANGES			RESTRICTIONS COST			
	WEIGH!	MINIMUM	REAL	MAXIMUM	MINIMUM	MAXIMUM	COST
COD INGREDIENT							
164 SORGO 8%	518.950 !	1.761	1.800	2.199	0.000		\$0.00
097 P.SOYA 47%	131.482 !	2.526	2.900	2.936	0.000	145.000	\$0.00
424 Suero de leche	130.000 !	5.538	7.800	Infinite	130.000	175.000	\$2.26
522 Estrilvo (Concentrado de Soya)	80.000 !	3.231	11.900	Infinite	80.000	100.000	\$8.67
268 LACTOSA	41.111 !	2.291	8.000	11.671	0.000		\$0.00
169 ACEITE VEGETAL	35.479 !	3.906	6.500	11.042	0.000		\$0.00
108 Harina de Pescado (Specials) 6	30.000 !	5.251	8.800	Infinite	30.000		\$3.55
166 FOSFATO 21/18	13.848 !	2.196	4.050	23.353	0.000		\$0.00
184 Calcio, Carbonato 38%	7.301 !	0.000	0.570	11.519	0.000		\$0.00
134 LISINA	3.386 !	15.994	17.000	27.432	0.000		\$0.00
530 Bact-Acid	3.000 !	0.000	19.000	Infinite	3.000	3.000	\$20.81
247 LEVADURA VIVA	2.000 !	1.434	22.700	Infinite	2.000	2.000	\$21.27
201 MINS.CERDOS	1.300 !	0.000	6.500	Infinite	1.300	1.300	\$7.82
527 Colina 70%	0.800 !	0.000	10.200	Infinite	0.800	0.800	\$12.01
133 METIONINA 99%	0.793 !	19.637	25.800	89.767	0.000		\$0.00
211 VIT.INI.CERDOS	0.350 !	0.000	109.000	Infinite	0.350	0.350	\$110.72
440 Sucram	0.200 !	0.000	238.510	Infinite	0.200	0.200	\$240.32

WEIGHT:1,000.000 COST:\$4,448.04 COST PER TON:\$4,448.04

SHADOW PRICES

COD INGREDIENT	REAL	SHADOW
173 PLASMA PORCINO	38.900	4.943
135 L-TREONINA	31.520	29.124
295 H.SANGRE AP 301	9.300	5.468
144 SAL	1.430	0.000
141 L-TRIPTOFANO	255.000	2.711
005 TRYPTOSINE 15/70	66.000	12.097

NUTRIENTS ANALYSIS

CONTROLLED NUTRIENTS

COD NUTRIENT	MIN	REAL	MAX	COST	COD NUTRIENT	MIN	REAL	MAX	COST
003 E.M. CERDOS (KC/KG)	3300.00	3300.00	3350.00	\$1.05	004 E. N. CERDOS (KC/KG)	2074.79			\$0.00
012 PROT. CRUDA (%)		19.676		\$0.00	016 ARGININA (%)		1.142		\$0.00
017 LISINA (%)	1.400	1.400	1.450	\$181.99	019 METIONINA (%)	0.399	0.399	0.413	\$222.80
020 MET+CISTINA (%)	0.784	0.699	0.812	\$0.00	022 TRIPTOFANO (%)	0.238	0.249	0.247	\$0.00
023 TREONINA (%)	0.868	0.868	0.899	\$253.78	029 VALINA (%)		1.069		\$0.00
031 FIBRACRUDA (%)		2.418		\$0.00	034 GRASACRUDA (%)		5.479		\$0.00
036 CALCIO (%)	0.900	0.900	1.000	\$61.12	037 FOSF.TOTAL (%)	0.750	0.750	0.850	\$229.74
038 FOSF.DISP. (%)	0.420	0.537	0.450	\$0.00	040 SODIO (%)	0.180	0.197	0.220	\$0.00
043 LACTOSA (%)	12.000	12.000	13.000	\$57.67	046 LISINADIGCDO (%)		1.254		\$0.00
051 TRIPDIG CDOS (%)		0.202		\$0.00	052 TREONDIGCDOS (%)		0.674		\$0.00
053 COLINA (MG/KG)		1392.37		\$0.00					

DIETA FASE 2 CONTROL POSITIVO DE 7-12 KG.

Fórmula: 4 - Fase II CONTROL.POSITIVO.
 Uso: Fase II 7 - 12 kg CONTROL.POSITIVO.

INGREDIENTS ANALYSIS

FORMULA	PRICE RANGES				RESTRICTIONS COST		
	COD INGREDIENT	WEIGH!	MINIMUM	REAL	MAXIMUM	MINIMUM	MAXIMUM
164 SORGO 8%	511.399 !	1.596	1.800	1.832	0.000		\$0.00
097 P.SOYA 47%	132.950 !	2.735	2.900	3.089	0.000	145.000	\$0.00
424 Suero de leche	130.000 !	5.805	7.800	Infinite	130.000	175.000	\$1.99
522 Estrilvo (Concentrado de Soya)	80.000 !	3.348	11.900	Infinite	80.000	100.000	\$8.55
268 LACTOSA	41.111 !	1.940	8.000	11.238	0.000		\$0.00
161 SEBO DE RES	37.415 !	3.903	4.000	6.500	0.000		\$0.00
108 Harina de Pescado (Specials) 6	30.000 !	4.496	8.800	Infinite	30.000		\$4.30
166 FOSFATO 21/18	13.896 !	0.239	4.050	16.490	0.000		\$0.00
184 Calcio, Carbonato 38%	7.271 !	0.000	0.570	8.627	0.000		\$0.00
134 LISINA	3.349 !	11.718	17.000	23.442	0.000		\$0.00
530 Bact-Acid	3.000 !	0.000	19.000	Infinite	3.000	3.000	\$19.07
147 OXIDO DE ZINC	2.750 !	0.000	12.070	Infinite	2.750	2.750	\$12.14
247 LEVADURA VIVA	2.000 !	3.038	22.700	Infinite	2.000	2.000	\$19.66
133 METIONINA 99%	1.653 !	9.503	25.800	46.608	0.000		\$0.00
201 MINS.CERDOS	1.300 !	0.063	6.500	Infinite	1.300	1.300	\$6.44
527 Colina 70%	0.800 !	0.000	10.200	Infinite	0.800	0.800	\$10.27
190 SULF. DE COBRE	0.500 !	0.000	12.360	Infinite	0.500	0.500	\$12.43
211 VIT.INI.CERDOS	0.350 !	0.000	109.000	Infinite	0.350	0.350	\$109.04
440 Sucram	0.200 !	0.000	238.510	Infinite	0.200	0.200	\$238.58
536 Carbadox 98%	0.056 !	0.000	7.000	Infinite	0.056	0.056	\$7.07
WEIGHT:1,000.000		COST:\$4,419.26		COST PER TON:\$4,419.26			

SHADOW PRICES

COD INGREDIENT	REAL	SHADOW
173 PLASMA PORCINO	38.900	4.858
135 L-TREONINA	31.520	18.950
295 H.SANGRE AP 301	9.300	4.793
144 SAL	1.430	0.000
169 ACEITE VEGETAL	6.500	4.000
141 L-TRIPTOFANO	255.000	2.146
005 TRYPTOSINE 15/70	66.000	12.451

NUTRIENTS ANALYSIS

CONTROLLED NUTRIENTS

COD NUTRIENT	MIN	REAL	MAX	COST	COD NUTRIENT	MIN	REAL	MAX	COST
003 E.M. CERDOS (KC/KG)	3300.00	3300.00	3350.00	\$0.51	004 E. N. CERDOS (KC/KG)	2075.25			\$0.00
012 PROT.CRUDA (%)		19.731		\$0.00	016 ARGININA (%)		1.145		\$0.00
017 LISINA (%)	1.400	1.400		\$188.82	019 METIONINA (%)	0.399	0.484		\$0.00
020 MET+CISTINA (%)	0.784	0.784		\$233.83	022 TRIPTOFANO (%)	0.238	0.249		\$0.00
023 TREONINA (%)	0.868	0.868		\$163.77	029 VALINA (%)		1.069		\$0.00
031 FIBRACRUDA (%)		2.398		\$0.00	034 GRASACRUDA (%)		5.653		\$0.00
036 CALCIO (%)	0.900	0.900	1.000	\$16.35	037 FOSF.TOTAL (%)	0.750	0.750	0.850	\$182.84
038 FOSF.DISP. (%)	0.420	0.538	0.450	\$0.00	040 SODIO (%)	0.180	0.197	0.220	\$0.00
043 LACTOSA (%)	12.000	12.000	13.000	\$61.21	046 LISINADIGCDO (%)		1.254		\$0.00
051 TRIPDIG CDOS (%)		0.202		\$0.00	052 TREONDIGCDOS (%)		0.674		\$0.00
053 COLINA (MG/KG)		1391.50		\$0.00					

TOMA DE DATOS Y VARIABLES A ANALIZAR

Parámetros productivos

Se realizó el registro del peso, ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA) a lo largo del periodo experimental,

El registro de los pesos se realizó al inicio del periodo experimental y durante cada semana en todos los grupos. Con ello se calculó la GDP durante todo el periodo experimental. El CDA se registró diariamente, ya que de ello dependió la administración de L-arginina a los cerdos. La CA se calculó a partir de la división del CDA entre la GDP, por semana.

Ensayos inmunológicos

Para este trabajo se utilizó la técnica de Citometría de Flujo (se describe más adelante) y anticuerpos monoclonales empleados contra los marcadores de superficie porcino fueron: CD3, CD4, CD8, $\gamma\delta$ (para linfocitos T), IgM, CD19, (para linfocitos B), SWC-3, MHC-II, CD14 (para macrófagos). La clona, fuente, origen y dilución de los anticuerpos se describen en el cuadro 4.

TOMA DE MUESTRAS PARA CITOMETRIA

Antes de sacrificar a los cerdos se tomaron muestras de sangre periférica por venopunción yugular en tubos con heparina (100 UI/ml) como anticoagulante. Para la obtención del tracto cardio-respiratorio (tráquea, pulmones y corazón), así como de la tonsila palatina, el animal se sobredosificó con pentobarbital sódico (1ml/5kg PV/IV) (Pentobarbital Cheminova); observando la respiración y reflejos del animal para verificar su insensibilidad. Posteriormente se desangró

realizando incisiones de las venas femorales. Una vez desangrado se extrajeron los pulmones y corazón teniendo cuidado de no lesionarlos, así como las tonsilas palatinas. Al tener los órganos fuera de la cavidad torácica se colocaron en hielo y fueron trabajados rápidamente para evitar la muerte celular.

TECNICA PARA LA OBTENCION DE LEUCOCITOS EN SANGRE

La sangre (15 mililitros), se diluyó 1:2 con PBS (solución de fosfatos buferado), se homogenizó y estratificó sobre un colchón de 5 ml de Ficoll-Hypaque (Ameshan Pharmacia Biotec AB, EE.UU) ⁽²²²⁾ (figura 6). Posteriormente se centrifugó a 1800 x g por 45 min a temperatura ambiente. Las células de la interfase fueron recolectadas y lavadas 2 veces con RPMI-1640 (SIGMA, EE.UU) incompleto (SIN SUERO FETAL BOVINO). Las células se resuspendieron en RPMI-1640 completo (con 10% de suero fetal bovino) y se mantuvieron en hielo hasta su uso.

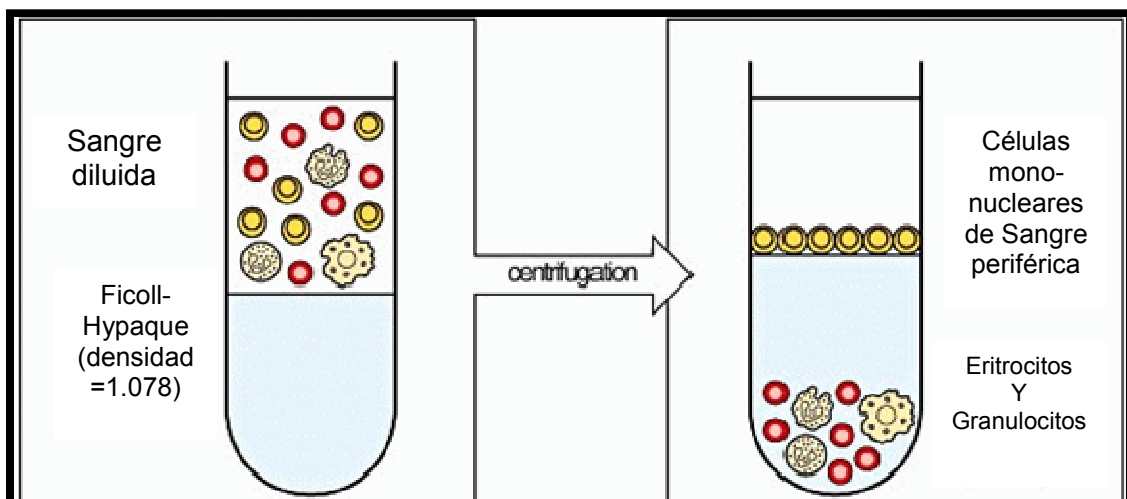


Figura 6. Aislamiento de linfocitos, sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque (Current Biology Ltd. 1997)

TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS EN LAVADO BRONQUIOALVEOLAR, PARÉNQUIMA PULMONAR Y TONSILAS

La vena cava y la aorta que se encontraban expuestas (abiertas), así como la tráquea se anudaron con hilo cáñamo para evitar la entrada de algún líquido extraño. En la aurícula izquierda se realizó una incisión con un bisturí, para retirar el exceso de sangre y se infiltró solución salina fisiológica (SSF), a través de la vena pulmonar hasta que se observó la salida de SSF clara por la aurícula. Posteriormente se realizó un lavado traqueo-bronquial total en pulmón (derecho e izquierdo), infiltrando 60 ml de SSF introduciéndola y extrayéndola 2-3 veces por la tráquea. El líquido obtenido se depositó en tubos de polipropileno de 50 ml y se mantuvo en hielo hasta que fue centrifugado a 1800 x g por 5 min, resuspendiendo la pastilla celular resultante con RPMI-1640 completo (²²³). Una vez que se realizaron los lavados, a los lóbulos apicales y diafragmáticos por separado, se les retiró cuidadosamente el árbol bronquial con la ayuda del bisturí o tijeras para obtener el parénquima del cual se tomaron 10g. El parénquima pulmonar se pesó y maceró en cajas de Petri lo más finamente posible para ayudar a la digestión enzimática y la liberación de las células. En el caso de la tonsila, solo se pesó y se maceró. El macerado de parénquima y tonsila obtenidos se depositó en tubos de 50 ml que contenían 25 ml de RPMI-1640 incompleto (sin SFB) (ver anexo), con 150 UI/ml de Colagenasa tipo IV (Worthington Biochemical Corporation, NJ. EE.UU) para 10g de tejido. Este preparado se incubó a 37°C con agitación constante durante 90 min. Una vez terminada la incubación, los tubos se retiraron y se mantuvieron en hielo, hasta que las muestras se filtraron en una tela de

organza, para retirar el tejido no digerido, y se tomó la suspensión celular, que se centrifugó a 450 x g durante 10 min a 4°C para sedimentar las células, retirando el sobrenadante que poseía el medio con la enzima. A la pastilla celular que se obtuvo en la centrifugación del lavado traqueo-bronquial (BAL), parénquima y tonsila se le adicionaron 5 ml de buffer de lisis para eritrocitos (ver anexo), y se dejó actuar durante 2-5 min para las muestras que lo requerían. La acción del buffer de lisis fue detenida agregando RPMI-1640 completo (5 ml), y eliminado mediante centrifugación a 450 x g durante 10 min a 4°C, decantando cuidadosamente y resuspendiendo la pastilla en 5 ml de RPMI-1640 completo. Esta suspensión se mantuvo en hielo.

CONTEO CELULAR

Para el conteo celular se tomaron 20 µl de las suspensiones de células más 20 µl de azul de tripán (ver anexo) se contaron en la cámara de Neubauer, para determinar su viabilidad y su rendimiento. Al contar las células en la cuadrícula para rojos se multiplicaron por 5 (cuadros que se contabilizaron) por 2 (dilución de la muestra) por 10 000 (factor constante) y finalmente fueron multiplicadas por el volumen total de células (5 ml) obteniendo el número total de células.

de células por mililitro = # de células contadas x 5 x 2 x 10,000.

total de células = # de células por mililitro x 5.

Esta operación se realizó para todas las muestras en estudio.

ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES

En el cuadro 5 se describen los anticuerpos primarios monoclonales anticuerdo y el anticuerpo policlonal secundario utilizados, en la citometría de flujo.

Cuadro 5. Anticuerpos monoclonales y policlonaes utilizados en el análisis fenotípico de sangre, tonsila, parénquima pulmonar y lavado traqueobronquial (BAL) porcino por citometría de flujo.

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Dilución	Clona	Isotipo	Casa comercial
Panel para detectar linfocitos T				
CD3	1/2000	8E6	IgG1	VMRD
CD4	1/1000	10-2H2	IgG2b	VMRD
CD8	1/100	MIL-12	IgG2a	VMRD
Γδ	1/2000	PG74C1	IgM	VMRD
Panel para detectar linfocitos B				
IgM	1/5000	5C9	IgG1	* Univ. Bristol
CD19	1/2500	CC-55	IgG1	* Univ. Bristol
Panel para detectar Macrófagos				
SWC-3	1/200	22-15	IgG1	* Univ. Bristol
MCH-II	1/200	MSA-3	IgG2a	* Univ. Bristol
CD19	1/50	MIL-2	IgG2b	* Univ. Bristol
Anticuerpo secundario fluoresceinado				
Anticuerpo	Dilución	Conjugado	Casa comercial	Animal de origen
Anti- IgG, IgA e IgM	1/1000	FITC	CAPPEL	Cabra

* Proporcionados por la Dr. K. Haverson, de la Universidad de Bristol, Gran Bretaña.

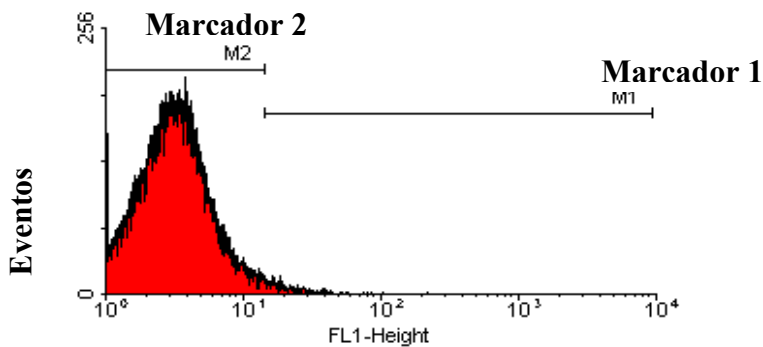
PROCEDIMIENTO PARA EL ANALISIS CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUJO

Los resultados capturados en el citómetro de flujo fueron analizados con el programa WinMDI 2.8 (²²⁴). Este programa tiene diferentes opciones de análisis de poblaciones celulares como son:

- A. Histograma
- B. Gráfica por puntos (dot plot)
- C. Gráfica de densidad o puntos con contorno (density plot or a contour plot)
- D. Gráfica de tres dimensiones (3-dimensional play)

La opción que se utilizó para este estudio fue histograma (Fig.8). El histograma reveló la intensidad de fluorescencia contra el número de células adquiridas (eventos) para todas las muestras. Para evaluar la intensidad de la fluorescencia se selecciono el canal FL1 (530-560 nm) cercano a la longitud de onda del conjugado utilizado (FITC, Isotiocianato de fluoresceína) que es de 530 nm. Dentro del histograma se obtuvo el porcentaje de células positivas al marcador utilizado, esto es a través del desplazamiento de la curva hacia la derecha con respecto al control (células solas sin anticuerpo primario). El análisis se realizó en todas las muestras, obteniéndose los valores relativos, el procedimiento se describe a continuación:

- Se abrió el programa WinMDI 2.8
- Se creó un histograma que establece el valor basal con el control de células solas (sangre) (Fig. 7) y luego se comparó con la intensidad de fluorescencia de un marcador celular (CD8) (Fig. 8).



Intensidad de fluorescencia

Fig.7 Histograma de células mononucleares sanguíneas (control) de un cerdo de 51 días de edad.

Cuadro 6. Resultados totales de células adquiridas (events), los valores numéricos de cada marcador (1 y 2) en porcentaje, se tomó el valor de M1 (control resaltado en negritas. Fig. 8).

File: 050405.045 Sangre: Células Solas1					
Total Events 30000 Gated Events 30000-100.00%					
System: Log Parameter Means: Geometric					
Param name	M	Low,High	Events	%Total	%Gated
FL1-Heigh	0	0,1023	30000	100.00	100.00
	1	299,1023	775	2.58	2.58
	2	0, 296	29192	97.31	97.31

- Al histograma creado se le sobrepuso la muestra con el marcador específico de superficie CD8 (células en rojo), obteniéndose el valor del marcador (Fig. 8), el cual se restó al valor de la muestra control (contorno negro) (cuadro 7)

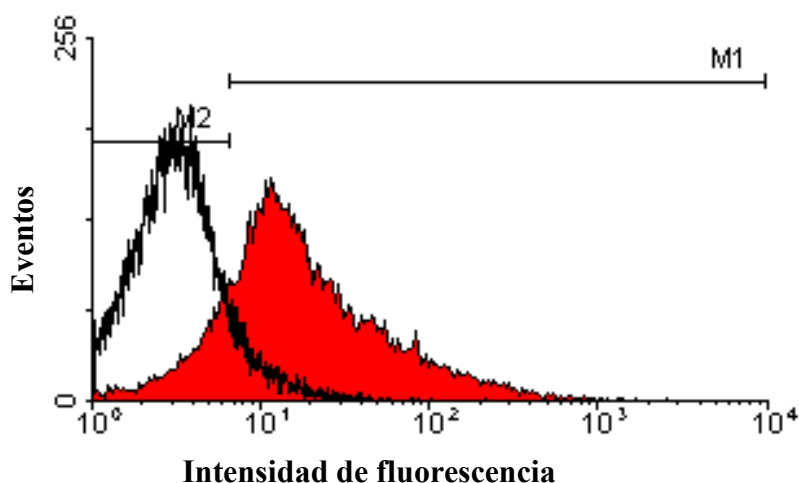


Fig. 8. Histograma de células mononucleares sanguíneas (contorno negro representa el control) y células positivas al marcador CD8 de un cerdo de 51 días de edad.

Cuadro 7. Resultados totales, de células adquiridas (eventos), valores numéricos de cada marcador (1 y 2), se tomo el valor de M1 (resaltado en negritas) al que se le restó la muestra control (M2).

File: 050405.047 Sample: CD8					
Total Events 30000 Gated Events 30000-100.00%					
System: Log Parameter Means: Geometric					
Param name	M	Low,High	Events	%Total	%Gated
FL1-Heigh	0	0,1023	30000	100.00	100.00
	1	210,1023	25331	84.44	84.44
	2	0, 210	4756	15.85	15.85

- Estos dos valores se registraron para obtener el porcentaje total de los valores relativos y los eventos positivos, de cada muestra.
- Al término del análisis de cada muestra los datos se tabularon por marcador tomando los valores relativos del grupo control (0% de L-arginina) y del grupo tratado (1% de L-arginina) para su análisis estadístico en el programa GraphPad Prism 3 (Avid metasync, EE.UU).

OBTENCIÓN DE LOS VALORES ABSOLUTOS A PARTIR DE LOS VALORES RELATIVOS

Una vez conocido el número total de células presentes en cada muestra (descrito anteriormente) ya sea por gramo o mililitro, se tomó el porcentaje de los valores relativos, obtenidos por citometría de cada muestra, el cual se multiplicó por el total de células que se tuvo en el volumen final de cada muestra y se dividió entre 100. Esta operación permitió conocer los números absolutos de cada marcador en cada muestra del grupo de animales control (0% L-arginina) y del grupo tratado (1% L-arginina), los resultados de cada muestra: sangre, tonsila, lavado bronquioalveolar, lóbulo apical derecho, lóbulo apical izquierdo, lóbulo diafragmático derecho y lóbulo diafragmático izquierdo se analizaron en el programa GraphPad Prism 3 (Avid metasync, EE.UU),.

DISEÑO EXPERIMENTAL NUTRICIONAL

En la evaluación de los parámetros nutricionales se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Los parámetros productivos tuvieron como unidad experimental y de análisis para las variables consumo diario de alimento y conversión alimenticia al corral, y al cerdo como unidad experimental en las variables peso vivo y ganancia diaria de peso. Para el análisis estadístico, se utilizó un análisis de varianza y una prueba estándar de separación de medias para comparar los tratamientos, utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SPSS V 10.

El modelo estadístico seguido fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + E_{ij}$$

Donde:

μ = Media poblacional

τ_i = Efecto del i 'ésimo tratamiento $1 < i < 4$

E_{ij} = Error aleatorio experimental

DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA EVALUACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Los parámetros inmunológicos tuvieron como unidad experimental al cerdo y los tratamientos. En caso del análisis en la cuantificación celular, las unidades experimentales fueron las muestras: sangre, tonsilas, lavados bronquioalveolares, lóbulos

apical y diafragmático derecho e izquierdo. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba no paramétrica U Mann de Whitney para la comparación de los tratamientos, del programa GraphPad Prism 3 (Avid metasync, USA).

El modelo estadístico seguido fue;

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + E_{ij}$$

Donde:

μ = Media poblacional

τ_i = Efecto del i 'ésimo tratamiento $1 < i < 2$

E_{ij} = Error aleatorio experimental.

RESULTADOS

NUTRICIONAL

Para evitar confusión con el porcentaje de inclusión de arginina de cada grupo experimental con los resultados, se asignó una letra a cada tratamiento siendo las siguientes: 0% = A, 1%= B, 1.5%= C y 2%= D.

a) Peso

El peso inicial promedio al destete de los cerdos fue de 5.3 ± 1.38 kg, el peso alcanzado al final de cada semana se presenta en el cuadro 8. En la primera y segunda semanas no hubo diferencia estadística, en la tercera semana los animales que recibieron B y C de L-arginina tuvieron una diferencia estadística ($P < 0.05$), teniendo pesos similares y siendo superiores en 6% y 16% que los cerdos que recibieron 2% y 0% ($8.55 \pm .40$, $8.55 \pm .39$ vs $7.23 \pm .45$ y $8.00 \pm .41$). A la cuarta semana el grupo que recibió el tratamiento B tuvo diferencia estadística ($P < 0.05$), siendo superior en un 15%, que los animales que recibieron D, (12.36 vs 10.55).

A la quinta semana el grupo que recibió B tuvo diferencia estadística ($P < 0.05$), siendo superior en un 14%, que los animales que recibieron D, (16.10 vs 13.85). En la sexta semana el grupo que recibió 1% tuvo diferencia estadística ($P < 0.05$), siendo superior en un 12.5%, que los animales que recibieron D, (19.80 vs 17.31)

b) Ganancia de peso

La ganancia diaria de peso (GDP) alcanzada al final de cada semana se presenta en el cuadro 8. La GDP en la primera y segunda semanas para los grupos experimentales con A (control), B, C y D con L-arginina no mostraron diferencia estadística ($P > 0.05$). Sin embargo, en la tercer semana la GDP los cerdos que recibieron B y C de L-arginina fueron 20 y 21% superiores ($P < 0.05$), respecto a los que recibieron A y B (296 g, 299 g vs 247 g, 207 g) respectivamente. En el caso de los cerdos suplementados con D la GDP disminuyó 17% ($P < 0.05$) comparado con los animales tratados con A y 30% ($P < 0.05$) con respecto a los animales que recibieron las dosis menores de L-arginina A; B Y C (207 g vs 247 g, 296 g y 299 g). Durante las siguientes semanas del periodo experimental (semanas 4, 5 y 6), no se observaron diferencias ($P < 0.05$) en ninguna de las dosis evaluadas sin embargo, es interesante observar que la menor GDP durante todo el periodo experimental se presentó en aquellos animales que recibieron D.

Cuadro 8. Efecto de la adición de L-arginina sobre la ganancia diaria de peso y pesos de cerdos destetados a los 21 días y con seguimiento hasta los 52 días de edad.

Tratamiento				
L-Arginina				
	A	B	C	D
Variable	0%	1%	1.5%	2%
Semana	Peso, kg.			
1*	5.49 ± 0.14	5.50 ± 0.14	5.49 ± 0.13	5.19 ± 0.15
2	6.27 ± 0.25	6.47 ± 0.25	6.46 ± 0.24	5.78 ± 0.28
3	8.00 ± 0.41 ^{abc}	8.55 ± 0.40 ^{ab}	8.55 ± 0.39 ^{ab}	7.23 ± 0.45 ^c
4	11.72 ± 0.60 ^{ab}	12.36 ± 0.58 ^a	11.91 ± 0.56 ^{ab}	10.55 ± 0.65 ^c
5	15.55 ± 0.65 ^{ab}	16.10 ± 0.62 ^a	15.54 ± 0.61 ^{ab}	13.85 ± 0.70 ^c
6	19.30 ± 0.80 ^{ab}	19.80 ± 0.77 ^a	19.34 ± 0.74 ^{ab}	17.31 ± 0.86 ^c
Semana	Ganancia diaria de peso, g.			
1*	62 ± 0.01	80 ± 0.01	53 ± 0.01	76 ± 0.02
2	145 ± 0.02	165 ± 0.02	153 ± 0.02	101 ± 0.03
3	247 ± 0.02 ^{ab}	296 ± 0.02 ^b	299 ± 0.02 ^b	207 ± 0.03 ^a
4	507 ± 0.03	541 ± 0.03	476 ± 0.03	467 ± 0.03
5	548 ± 0.02	532 ± 0.02	532 ± 0.02	471 ± 0.03
6	535 ± 0.03	529 ± 0.03	529 ± 0.03	494 ± 0.04

^{a,b} Medias con distinta literal en la misma fila muestran diferencia significativa $P < 0.05$

* En la semana 1 los cerdos tenían 21 días de edad

Cada grupo experimental contó con 15 cerdos

c) Consumo de alimento

El consumo diario de alimento a lo largo de la semana se muestra en el cuadro 9. Durante las seis semanas del periodo experimental, no hubo diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), entre los tratamientos asignados a los animales que fueron A, B, C y D

d) Conversión alimenticia

La conversión alimenticia en cada semana se muestra en el cuadro 9. Durante las dos primeras semanas no se encontró diferencia estadística entre los grupos tratados. En la tercera semana el grupo de animales tratados con D de L-arginina, tuvieron diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) siendo mejores

que los animales que recibieron A, B (1.72 vs 1.84, 1.93). En la cuarta y quinta semana no se encontraron diferencias estadísticas en los grupos experimentales ($P>0.05$). En la sexta semana el grupo de animales que se les suministro D, tuvieron diferencia estadística ($P<0.05$) siendo mejores en un 9.2% y 10.1%, que los animales que recibieron A, B (1.77 vs 1.95 y 1.97)

Cuadro 9. Efecto de la adición de L-arginina sobre el Consumo diario de alimento y conversión alimenticia de cerdos destetados a los 21 días y con seguimiento hasta los 52 días de edad.

Tratamiento				
L-Arginina				
	A	B	C	D
Variable	0%	1%	1.5%	2%
Semana	Consumo diario de alimento, kg.			
1*	0.074 ± 0.01	0.649 ± 0.01	0.052 ± 0.01	0.072 ± 0.01
2	0.199 ± 0.02	0.243 ± 0.02	0.232 ± 0.02	0.217 ± 0.20
3	0.404 ± 0.05	0.452 ± 0.05	0.471 ± 0.05	0.410 ± 0.05
4	0.730 ± 0.05	0.832 ± 0.05	0.795 ± 0.05	0.793 ± 0.05
5	0.881 ± 0.06	0.940 ± 0.06	0.937 ± 0.06	0.923 ± 0.06
6	1.016 ± 0.08	1.027 ± 0.08	0.935 ± 0.08	0.923 ± 0.08
Semana	Conversión Alimenticia.			
1*	1.58 ± 0.30	1.12 ± 0.30	1.07 ± 0.37	1.37 ± 0.37
2	2.59 ± 0.85	1.45 ± 0.98	2.81 ± 0.85	1.65 ± 0.98
3	1.84 ± 0.21 ^{ab}	1.93 ± 0.21 ^{ab}	1.73 ± 0.21 ^{b,c}	1.72 ± 0.21 ^c
4	1.44 ± 0.21	1.56 ± 0.12	1.67 ± 0.21	1.62 ± 0.12
5	1.67 ± 0.12	1.81 ± 0.12	1.83 ± 0.12	1.87 ± 0.12
6	1.95 ± 0.23 ^{ab}	1.97 ± 0.23 ^a	1.86 ± 0.23 ^{ab}	1.77 ± 0.23 ^c

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila muestran diferencia significativa P < 0.05

* En la semana 1 los cerdos tenían 21 días de edad

Cada grupo experimental contó con 15 cerdos

INMUNOLÓGICO

Rendimiento de células de cada tejido

Los valores (cuadros 10-17) de cada muestra pueden ser consultados en el anexo 2.

- Sangre
- Tonsila
- Lavado bronquioalveolar (BAL)
- Parénquima del lóbulo apical izquierdo (PLAI)
- Parénquima del lóbulo apical derecho (PLAD)
- Parénquima del lóbulo diafragmático izquierdo (PLDI)

- g) Parénquima del lóbulo diafragmático derecho (PLDD)
- h) Valores promedio generales

Cuadros y análisis estadístico de los valores relativos y absolutos

Los cuadros de los valores relativos y absolutos de cada muestra así como de sus marcadores de superficie de los dos grupos experimentales, obtenidos por citometría de flujo se compararon estadísticamente, a través de la prueba de U-Mann-Whitney del programa GraphPad Prism 3 y se pueden observar en el anexo 2.

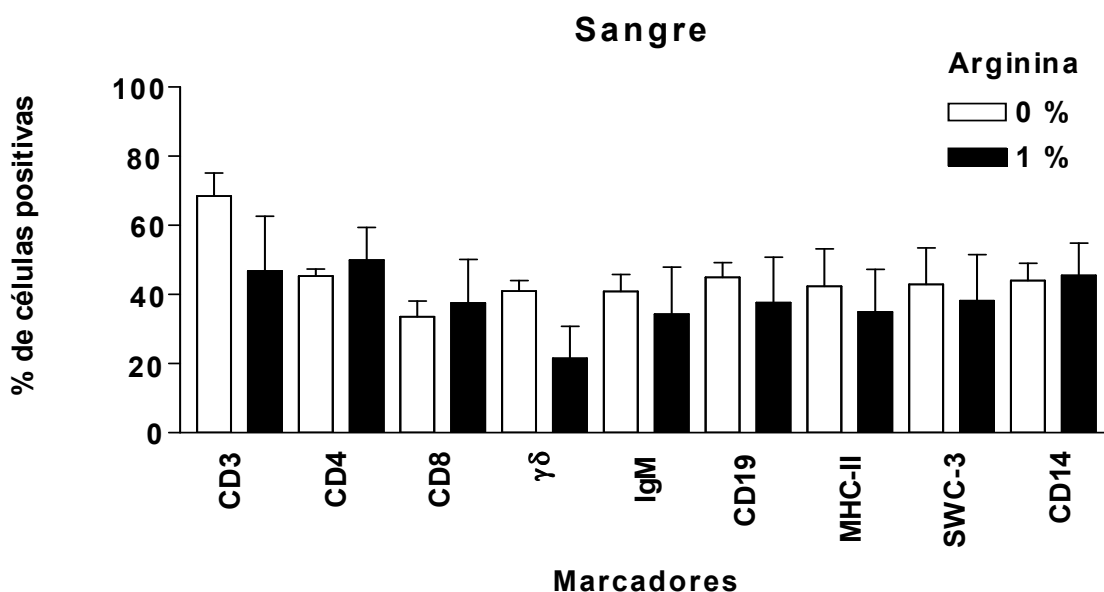
Gráficas y análisis estadístico de los valores relativos de cada muestra

Sangre

La figura 9 muestra los valores relativos de superficie de linfocitos T, B y macrófagos (cuadro 18 anexo 2), de sangre periférica, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento. Cada barra representa el promedio \pm eem (error estándar de la media) de 5 animales por tratamiento.

Los porcentajes para linfocitos T fueron en CD3 (68.58 ± 14.67 y 46.79 ± 35.33), CD4 (45.41 ± 4.48 y 49.97 ± 21.20), CD8 (33.65 ± 10.02 y 37.50 ± 28.30) y $\gamma\delta$ (40.93 ± 6.87 y 21.54 ± 20.60). Linfocitos B: IgM (40.85 ± 11.10 y 35.67 ± 28.41), CD19 (44.95 ± 9.58 y 37.59 ± 29.46) y macrófagos: MHC-II (42.38 ± 24.29 y 34.97 ± 27.56), SWC-3 (42.99 ± 23.61 y 38.22 ± 29.86) y CD14 (44.06 ± 11.21 y

45.58±20.88), no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos.



* Diferencia estadística significativa de $P > 0.05$

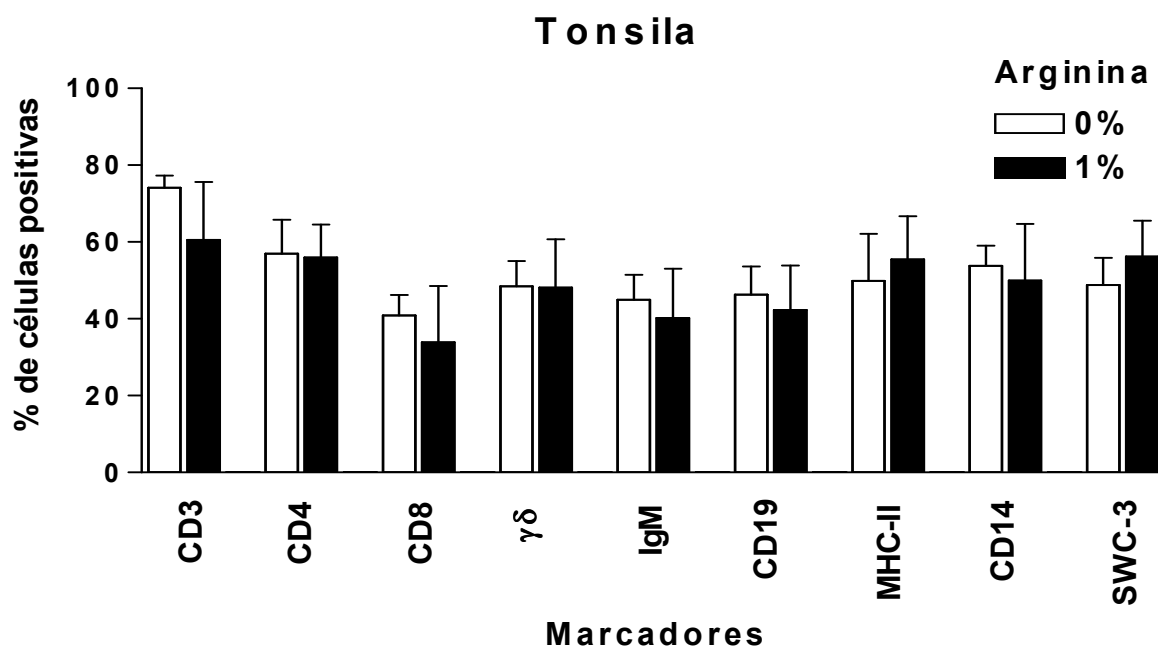
** Diferencia estadística significativa de $P > 0.01$

Figura 9. Análisis por citometría de flujo de los valores relativos de células mononucleares de sangre de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron por 30 días, 0 % (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Tonsila

La figura 10 muestra los valores relativos de linfocitos T, B y macrófagos, (cuadro 19 anexo 2), de tonsila, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento. Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamiento. Los porcentajes para linfocitos T fueron en CD3 (74.10±7.17 y 60.54±33.68), CD4 (56.94±19.86 y 55.94±19.20), CD8 (40.84±11.93 y 33.90±32.73) y $\gamma\delta$ (48.49±14.68 y 48.12±28.19). Linfocitos B: IgM (44.96±14.49 y 40.21±28.61), CD19 (46.29±16.44 y 42.33±25.89) y macrófagos: MHC-II (49.88±27.34 y 55.47±25.12), SWC-3 (53.82±11.75 y

49.97±32.94) y CD14 (48.82±15.70 y 56.21±20.80), no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos.



* Diferencia estadística significativa de $P > 0.05$

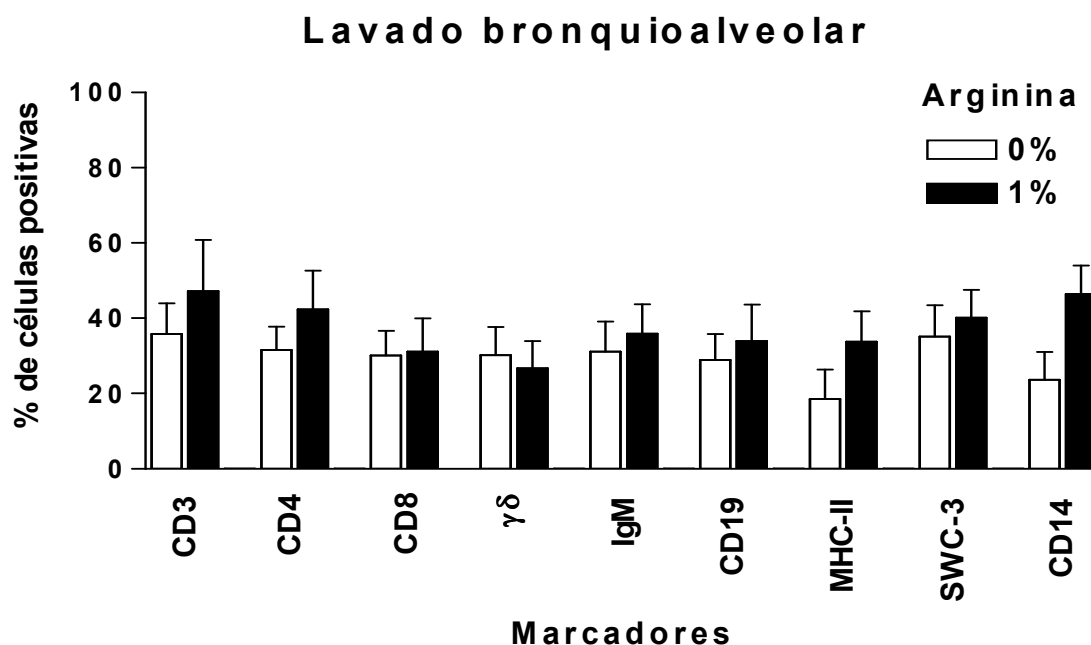
** Diferencia estadística significativa de $P > 0.01$

Figura 10. Análisis por citometría de flujo de los valores relativos de células de tonsila de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron por 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Lavado bronquioalveolar (BAL)

La figura 11 muestra los valores relativos de linfocitos T, B y macrófagos, de (cuadro 20 anexo 2), de células de lavado bronquioalveolar, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento. Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamiento. Los porcentajes para linfocitos T fueron en CD3 (35.81±18.24 y 47.18±30.35), CD4 (31.57±13.86 y 42.35±23.02), CD8 (30.12±14.78 y 31.16±19.67) y $\gamma\delta$ (30.21±16.71 y 26.67±16.32). Linfocitos B: IgM (31.10±18.00 y 35.87±17.56), CD19 (28.98±15.30 y 33.95±21.69) y macrófagos: MHC-II (18.55±17.47 y

33.83±17.93), SWC-3 (35.11±18.67 y 40.10±16.73) y CD14 (23.60±16.65 y 46.48±16.85), no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos.



* Diferencia estadística significativa de $P > 0.05$

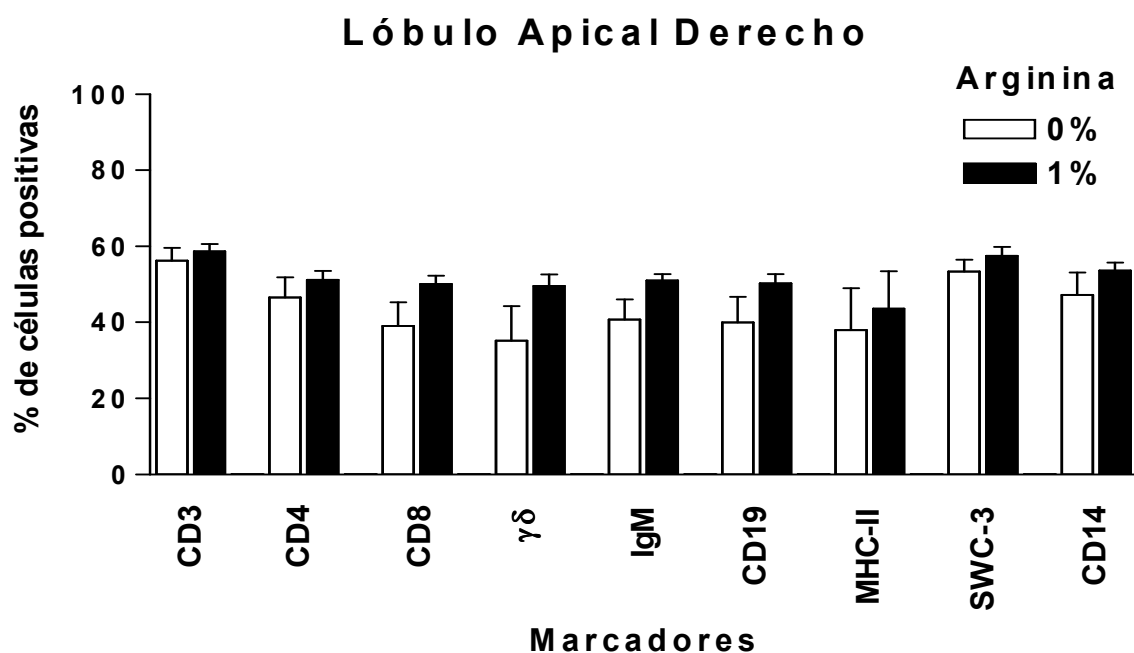
** Diferencia estadística significativa de $P > 0.01$

Figura 11. Análisis por citometría de flujo de los valores relativos de células de lavado bronquioalveolar de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron por 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Parénquima del lóbulo apical derecho (PLAD)

La figura 12 muestra los valores relativos de linfocitos T, B y macrófagos, de los valores relativos (cuadro 21 anexo 2), de células de lóbulo apical derecho, de 10 cerdos de dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento, Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamiento. Los porcentajes para linfocitos T fueron en CD3 (56.20±7.60 y 58.70±4.36), CD4 (46.55±11.92 y 51.20±5.16), CD8 (39.08±13.96 y 50.09±4.97) y $\gamma\delta$ (33.53±23.66 y 49.59±6.73). Linfocitos B: IgM (40.73±11.92 y 51.04±3.71),

CD19 (39.99 ± 15.01 y 50.29 ± 5.50) y macrófagos: MHC-II (37.99 ± 24.59 y 43.59 ± 21.98), SWC-3 (53.35 ± 6.89 y 57.58 ± 5.12) y CD14 (47.17 ± 13.25 y 53.62 ± 4.59), no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos.



* Diferencia estadística significativa de $P > 0.05$

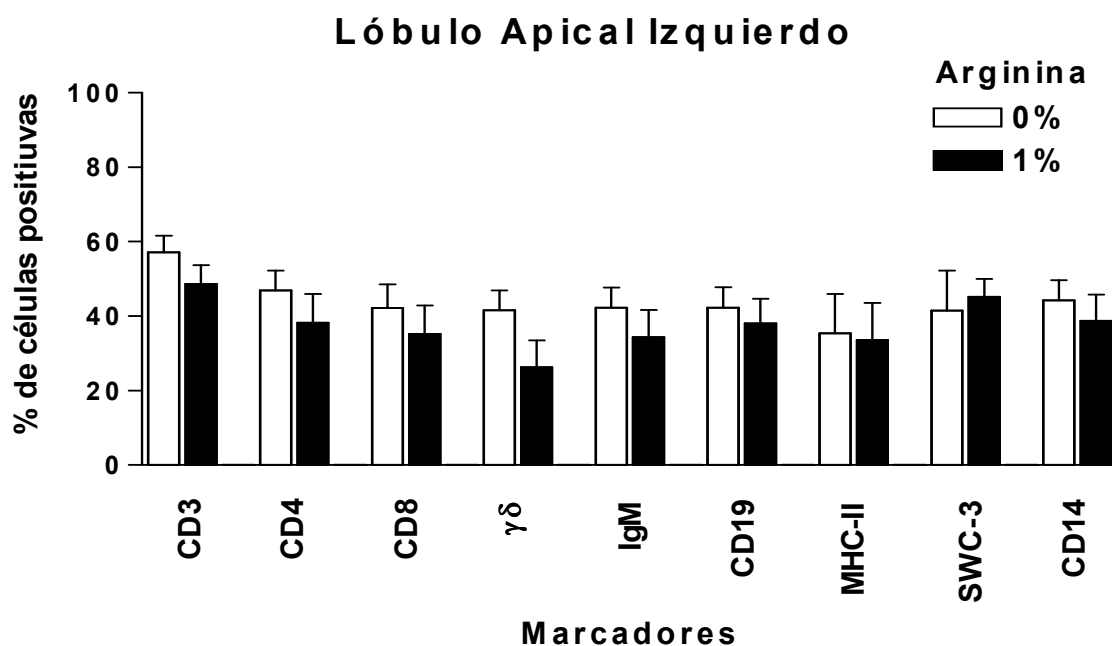
** Diferencia estadística significativa de $P > 0.01$

Figura 12. Análisis por citometría de flujo Valores relativos de células de lóbulo apical derecho de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Parénquima del lóbulo apical izquierdo (PLAI)

La figura 13 muestra los valores relativos de linfocitos T, B y macrófagos, (cuadro 22 anexo 2), de lóbulo apical izquierdo, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento, Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamiento. Los porcentajes para linfocitos T fueron en CD3 (57.09 ± 10.11 y 48.62 ± 11.46), CD4 (46.85 ± 12.01 y 38.20 ± 17.40), CD8 (42.24 ± 14.06 y 35.18 ± 17.15) y $\gamma\delta$ (41.64 ± 11.79 y 26.26 ± 16.33). Linfocitos B:

IgM (42.28 ± 12.23 y 34.34 ± 16.48), CD19 (42.29 ± 12.22 y 38.07 ± 14.79) y macrófagos: MHC-II (35.35 ± 23.71 y 33.59 ± 22.30), SWC-3 (41.50 ± 23.88 y 45.22 ± 10.85) y CD14 (44.24 ± 11.97 y 38.80 ± 15.61), no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos.



* Diferencia estadística significativa de $P > 0.05$

** Diferencia estadística significativa de $P > 0.01$

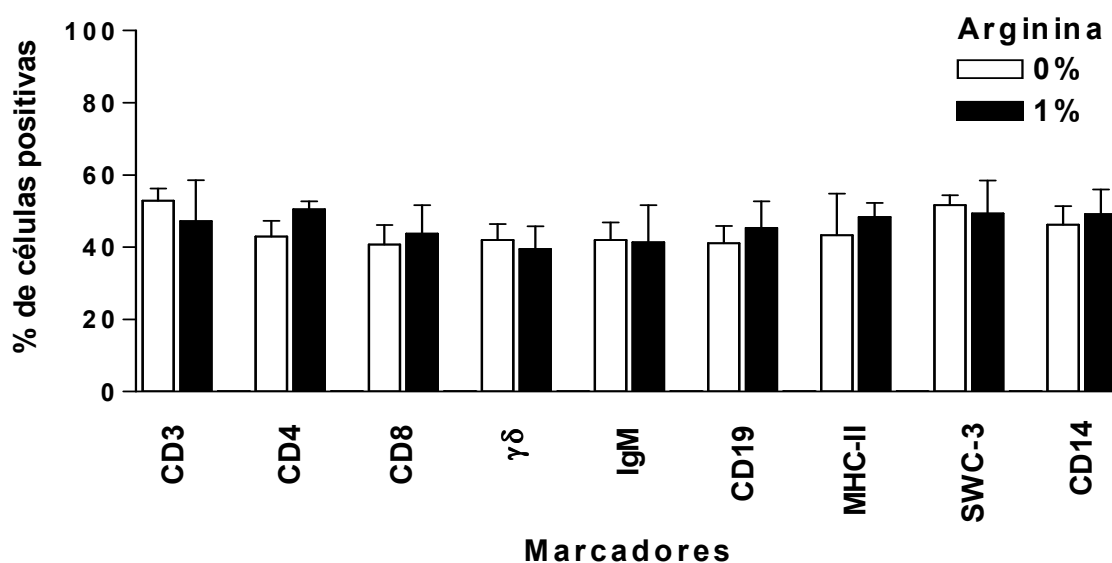
Figura 13. Análisis por citometría de flujo de los valores relativos de células del lóbulo apical izquierdo de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron por 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Parénquima del lóbulo diafragmático derecho (PLDD)

La figura 14 muestra los valores relativos de linfocitos T, B y macrófagos (cuadro 23 anexo 2), de lóbulo diafragmático derecho, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento. Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamiento. Los porcentajes para linfocitos T fueron en CD3 (52.90 ± 7.59 y 47.14 ± 25.42), CD4 (42.97 ± 9.68 y 50.57 ± 4.78), CD8 (40.75 ± 12.28 y 43.76 ± 17.73) y $\gamma\delta$ (42.04 ± 9.78 y 39.51 ± 14.04). Linfocitos

B: IgM (42.07 ± 10.83 y 41.34 ± 23.02), CD19 (41.13 ± 10.57 y 45.35 ± 16.42) y macrófagos: MHC-II (43.34 ± 25.77 y 48.38 ± 8.83), SWC-3 (51.71 ± 6.20 y 49.34 ± 20.36) y CD14 (46.25 ± 11.53 y 49.24 ± 15.21), no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos.

Lóbulo Diafragmático Derecho



* Diferencia estadística significativa de $P > 0.05$

** Diferencia estadística significativa de $P > 0.01$

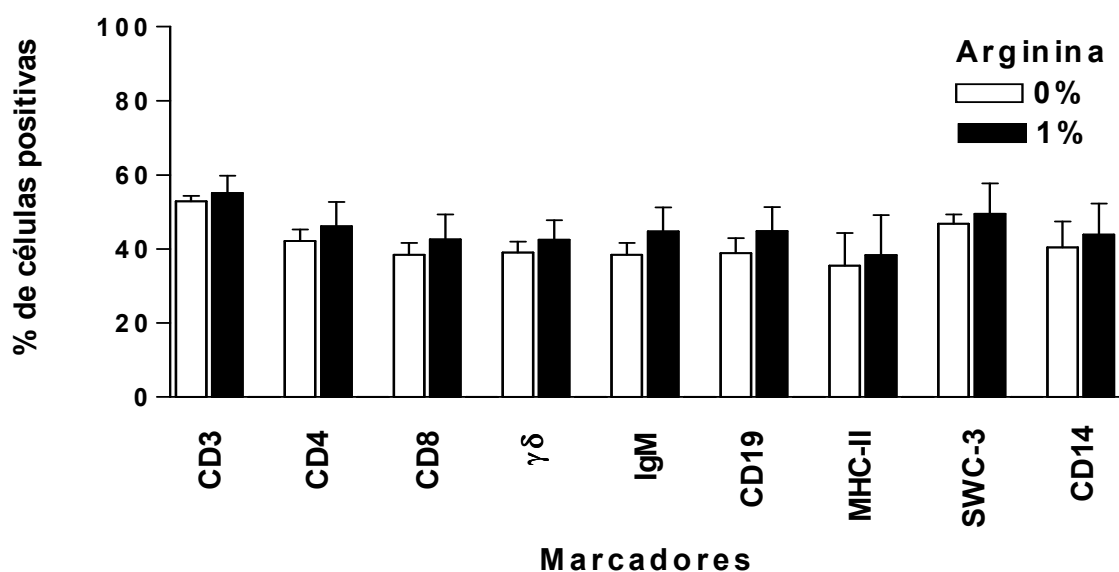
Figura 14. Análisis por citometría de flujo de los valores relativos de células de lóbulo diafragmático derecho de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y para macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Parénquima del lóbulo diafragmático izquierdo (PLDI)

La figura 15 muestra los valores relativos de linfocitos T, B y macrófagos (cuadro 24 anexo 2), de lóbulo diafragmático izquierdo, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento, Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamientos. Los porcentajes para linfocitos T fueron en CD3 (52.86 ± 3.31 y 55.16 ± 10.35), CD4 (42.20 ± 6.39 y 46.11 ± 14.74), CD8 (38.50 ± 7.11 y 42.60 ± 14.94) y $\gamma\delta$ (39.07 ± 6.53 y 42.50 ± 11.74). Linfocitos B:

IgM (38.49 ± 7.00 y 44.69 ± 14.62), CD19 (38.90 ± 8.99 y 44.80 ± 14.39) y macrófagos: MHC-II (35.49 ± 19.68 y 38.31 ± 24.26), SWC-3 (46.87 ± 5.40 y 49.45 ± 18.43) y CD14 (40.41 ± 15.62 y 43.90 ± 18.60), no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos.

Lóbulo Diafragmático Izquierdo



* Diferencia estadística significativa de $P > 0.05$

** Diferencia estadística significativa de $P > 0.01$

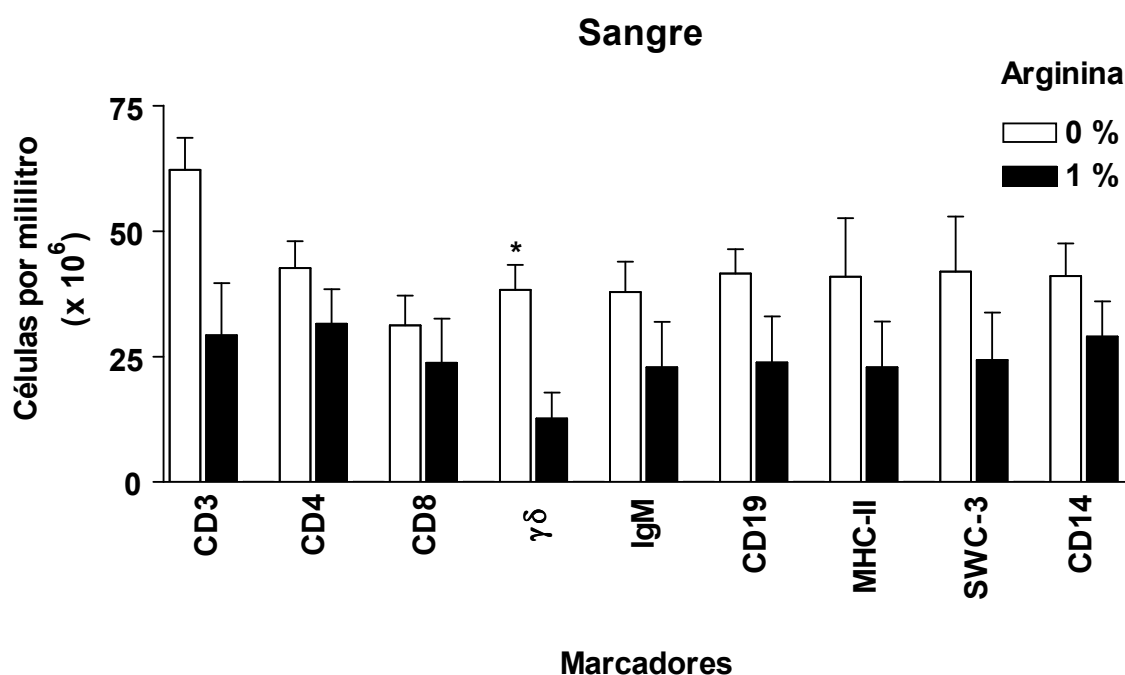
Figura 15. Análisis por citometría de flujo de los valores relativos de células de lóbulo diafragmático izquierdo de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Gráficas y análisis estadístico de los valores absolutos de cada muestra

La obtención de los valores relativos de cada marcador de superficie, se multiplicó por el número total de células en cada muestra y se dividieron entre 100, para obtener los valores absolutos de cada una de ellas.

Sangre

La figura 17 muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos (cuadro 25 anexo 2), de sangre periférica, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento. Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamiento, posteriores al destete, el eje vertical muestra el número (millones) de células por ml y el eje horizontal muestra los marcadores empleados así como el grupo control y tratado con arginina, para linfocitos T fueron en CD3 (62.23 ± 11.95 y 29.23 ± 23.33) CD4 (42.62 ± 11.95 y 31.52 ± 15.34) CD8 (31.24 ± 13.21 y 23.71 ± 19.64), γ - δ (38.27 ± 11.18 y 12.62 ± 11.62) mostró una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) a favor del grupo control en valores absolutos. IgM (37.84 ± 13.5 y 22.83 ± 20.32) CD19 (41.54 ± 10.93 y 23.81 ± 20.46) MHC-II (40.89 ± 26.17 y 22.86 ± 20.4) SWC-3 (41.89 ± 24.65 y 24.36 ± 21) CD14 (41.04 ± 14.43 y 28.98 ± 15.67) no tuvieron diferencias estadísticas significativas.



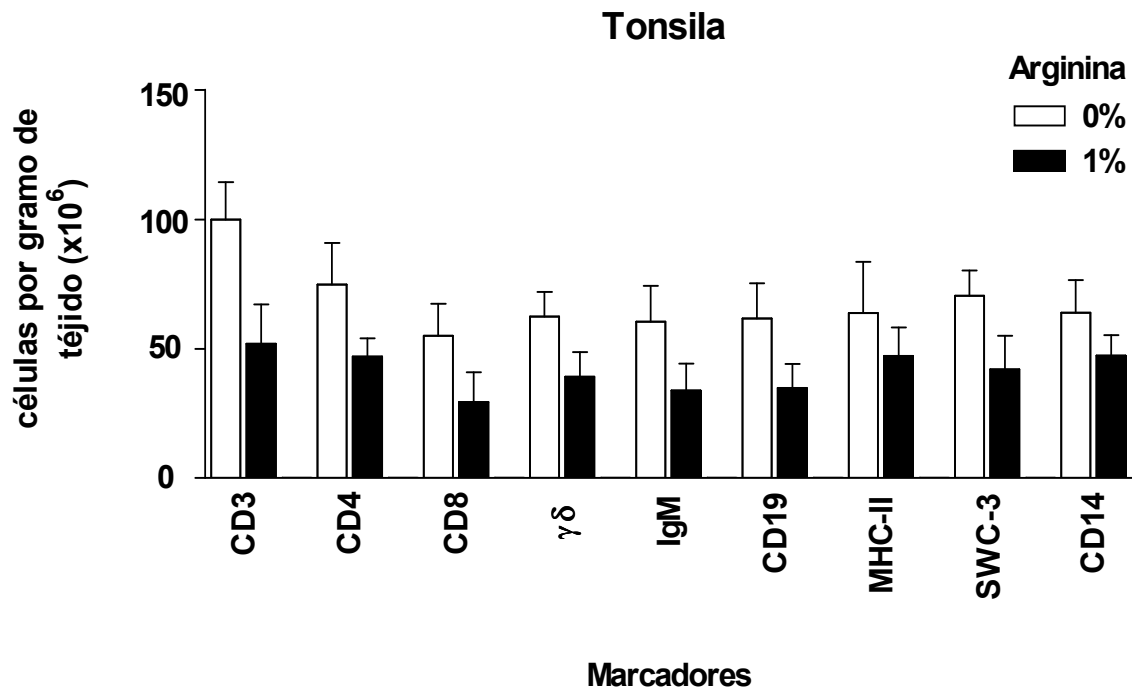
* Diferencia estadística significativa de $P < 0.05$

** Diferencia estadística significativa de $P < 0.01$

Figura 17. Análisis por citometría de flujo de los valores absolutos de células mononucleares de sangre de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron por 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Tonsila palatina

La figura 18 muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos (cuadro 26 anexo 2), de tonsila palatina de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento. Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamiento, posteriores al destete, el eje vertical muestra el número (millones) de células por gramo y el eje horizontal muestra los marcadores empleados así como el grupo control y tratado con arginina, para linfocitos T fueron en CD3 (99.9 ± 32.11 y 51.76 ± 34.28), CD4 (74.78 ± 35.9 y 46.91 ± 15.78), CD8 (54.95 ± 27.52 y 29.32 ± 25.66), $\gamma\delta$ (62.44 ± 21.18 y 39.12 ± 21.25), IgM (60.45 ± 31.09 y 33.83 ± 23.01), CD19 (61.63 ± 30.67 y 34.79 ± 20.72), MHC-II (63.63 ± 44.49 y 47.16 ± 24.75), SWC-3 (70.49 ± 21.54 y 41.95 ± 28.91), CD14 (63.85 ± 12.61 y 47.25 ± 17.85), no hubo diferencia estadística significativa entre tratamientos.



* Diferencia estadística significativa de $P < 0.05$

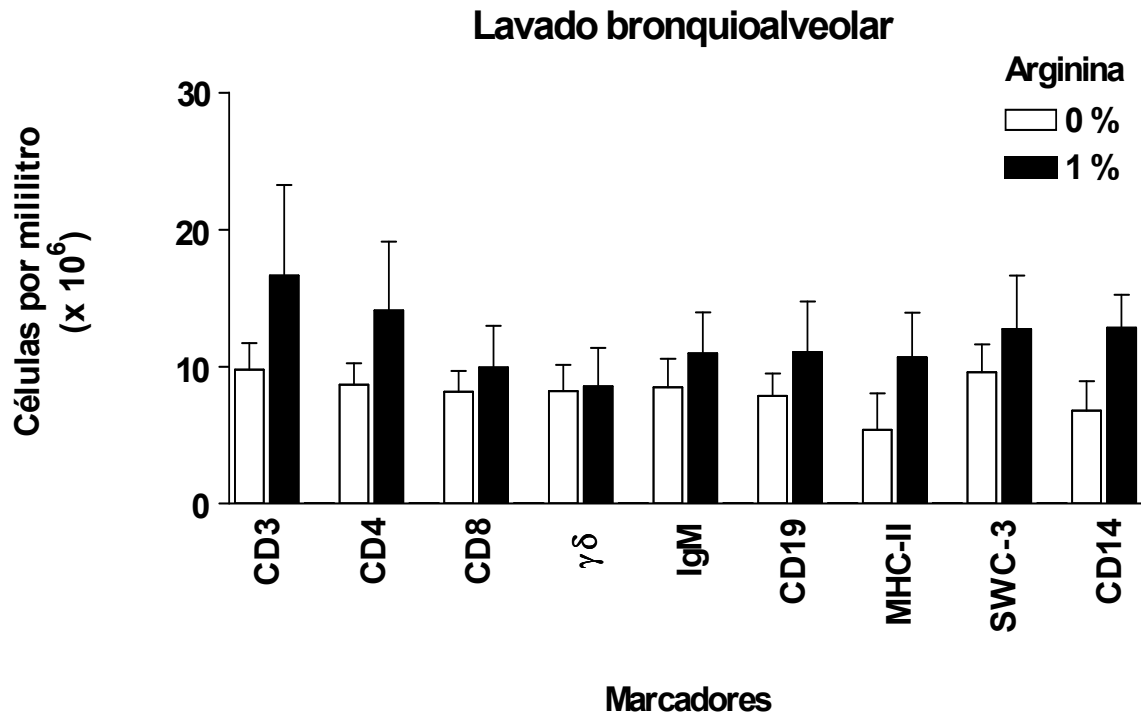
** Diferencia estadística significativa de $P < 0.01$

Figura 18. Análisis por citometría de flujo de los valores absolutos de células de tonsila palatina de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron por 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Lavado bronquioalveolar

La figura 19 muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos (cuadro 27 anexo 2), de lavado bronquioalveolar, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento. Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamiento posteriores al destete, el eje vertical muestra el número (millones) de células por ml y el eje horizontal muestra los marcadores empleados así como el grupo control y tratado con arginina, para linfocitos T fueron en CD3 (9.75 ± 4.39 y 16.64 ± 14.78), CD4 (8.65 v 3.56 y 14.07 ± 11.23), CD8 (8.17 v 3.39 y 9.94 ± 6.73), $\gamma\delta$ (8.21 v 4.25

y 8.57 ± 6.22), IgM (8.49 ± 4.65 y 10.96 ± 6.69), MHC-II (5.38 ± 5.92 y 10.68 ± 7.26), SWC-3 (9.57 ± 4.57 y 12.73 ± 8.75), CD14 (6.78 ± 4.81 y 12.89 ± 5.35) no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos.



* Diferencia estadística significativa de $P > 0.05$

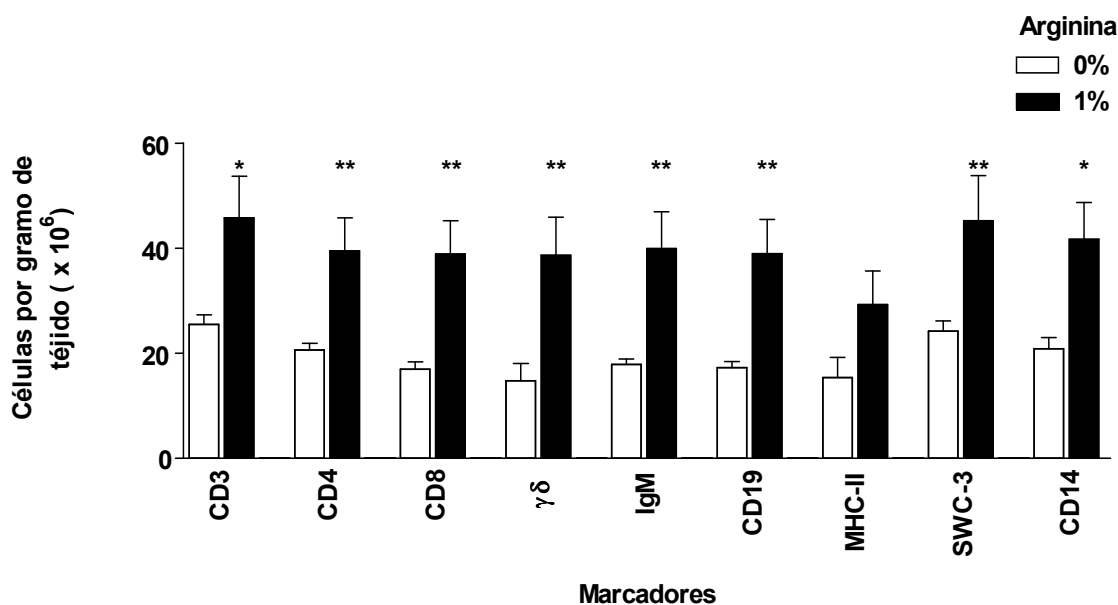
** Diferencia estadística significativa de $P > 0.01$

Figura 19. Análisis por citometría de flujo de los valores absolutos de células de lavado bronquioalveolar de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron por 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Lóbulo apical derecho

La figura 20 muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos (cuadro 28 anexo 2), del lóbulo apical derecho, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento. Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamiento, posteriores al destete, el eje vertical muestra el número (millones) de células por gramo y el eje horizontal muestra los marcadores empleados así como el grupo control y tratado con arginina, para linfocitos T fueron en CD3 (25.48 ± 4.10 y 45.78 ± 17.7) mostrando una diferencia significativa ($P < 0.05$), CD4 (20.57 ± 2.94 y 39.54 ± 13.91) con diferencia estadística significativa ($P < 0.01$), CD8 (16.98 ± 2.95 y 38.39 ± 14.17) con diferencia significativa ($P < 0.01$), γ - δ (14.79 ± 7.23 y 38.69 ± 16.12) con diferencia estadística significativa ($P < 0.01$), IgM (17.85 ± 2.41 y 39.94 ± 15.57) con diferencia significativa ($P < 0.01$), CD19 (17.23 ± 2.69 y 38.99 ± 14.46) con diferencia estadística significativa ($P < 0.01$), MHC-II (15.37 ± 8.46 y 29.36 ± 14.36) sin diferencia estadística significativa, SWC-3 (24.24 ± 4.24 y 45.29 ± 19.19) con diferencia significativa ($P < 0.01$), CD14 (20.89 ± 4.70 y 41.70 ± 15.74) con una diferencia estadística significativa de ($P < 0.05$), las diferencia fueron a favor del grupo tratado.

Lóbulo Apical Derecho



* Diferencia estadística significativa de $P < 0.05$

** Diferencia estadística significativa de $P < 0.01$

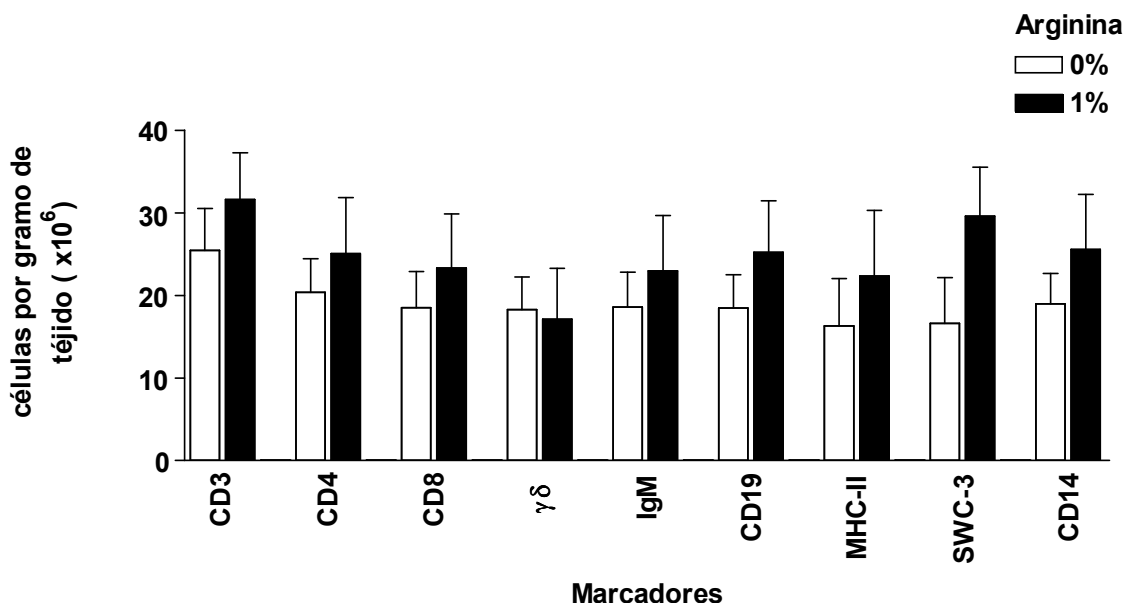
Figura 20. Análisis por citometría de flujo de los valores absolutos de células de lóbulo apical derecho de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron por 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y para macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Lóbulo apical izquierdo

La figura 21 muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos (cuadro 29 anexo 2), del lóbulo apical izquierdo, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento. Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamiento, posteriores al destete, el eje vertical muestra el número (millones) de células por gramo y el eje horizontal muestra los marcadores empleados así como el grupo control y tratado con arginina, para linfocitos T fueron en CD3 (25.45 ± 11.39 y 31.60 ± 12.71) CD4 (20.36 ± 9.14 y 25.08 ± 15.10) CD8 (18.50 ± 9.85 y 23.31 ± 14.68) $\gamma\delta$ (18.27 ± 8.86 y 17.11 ± 13.81) IgM (18.63 ± 9.33 y 22.97 ± 14.99) CD19 (18.47 ± 9.06 y 25.22 ± 14) MHC-II (16.30 ± 12.87 y 23.34 ± 17.83) SWC-3 (16.61 ± 12.38 y

29.63 ± 13.19) CD14 (18.99 ± 8.23 y 25.59 ± 14.86) no hubo diferencia estadística significativa entre tratamientos.

Lóbulo Apical izquierdo



* Diferencia estadística significativa de $P > 0.05$

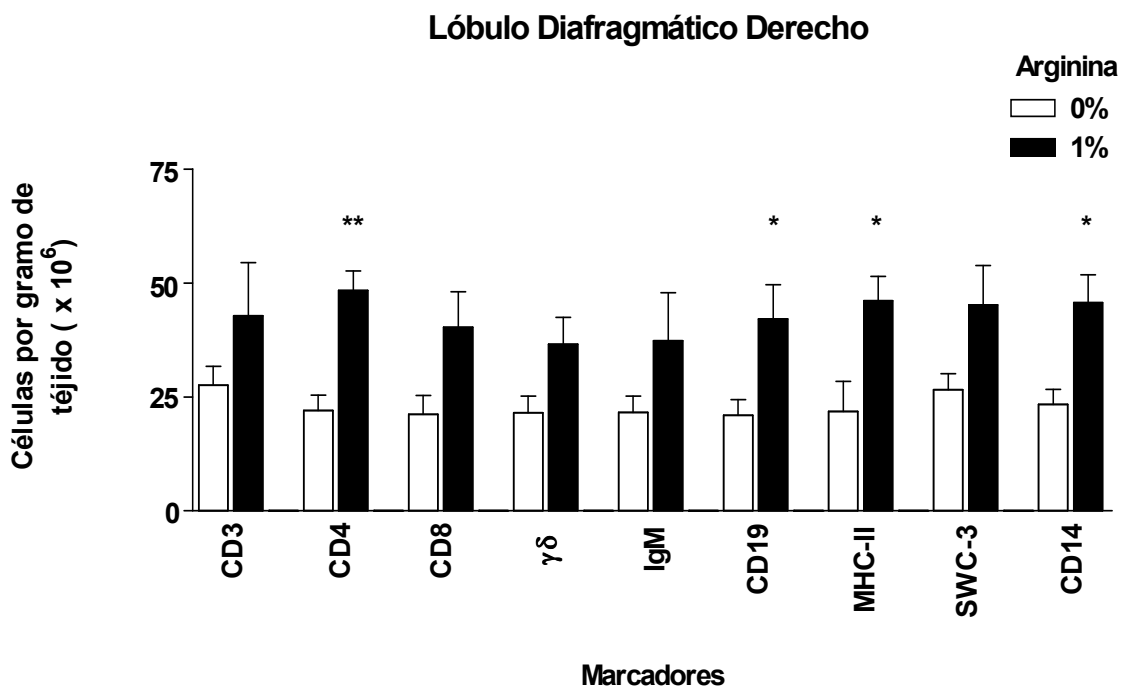
** Diferencia estadística significativa de $P > 0.01$

Figura 21. Análisis por citometría de flujo de los valores absolutos de células de Lóbulo apical izquierdo de 10 cerdos 51 días de edad, que recibieron por 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y para macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Lóbulo diafragmático derecho

La figura 22 muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos (cuadro 30 anexo 2), del lóbulo diafragmático derecho, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento. Cada barra representa el promedio ± eem de 5 animales por tratamiento, posteriores al destete, el eje vertical muestra el número (millones) de células por gramo y el eje horizontal muestra los marcadores empleados así como el grupo control y tratado con arginina, para linfocitos T fueron en CD3 (27.51 ± 9.41 y 42.80 ± 26.1), CD4 (22.03 ± 7.59 y 48.32 ± 9.54) con diferencia estadística significativa ($P < 0.01$) en

el grupo tratado, CD8 (21.14 ± 9.24 y 40.29 ± 17.48), $\gamma\delta$ (21.56 ± 8.02 y 36.51 ± 13.36), IgM (21.57 ± 8 y 37.35 ± 23.38), CD19 (20.98 ± 7.62 y 42.12 ± 16.72) con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) del grupo tratado, MHC-II (21.77 ± 14.85 y 46.09 ± 11.9) con diferencia significativa ($P < 0.05$) del grupo tratado, SWC-3 (26.60 ± 7.79 y 45.19 ± 19.31), CD14 (23.35 ± 7.45 y 45.64 ± 13.72) con diferencia estadística significativa de ($P < 0.05$) del grupo tratado.



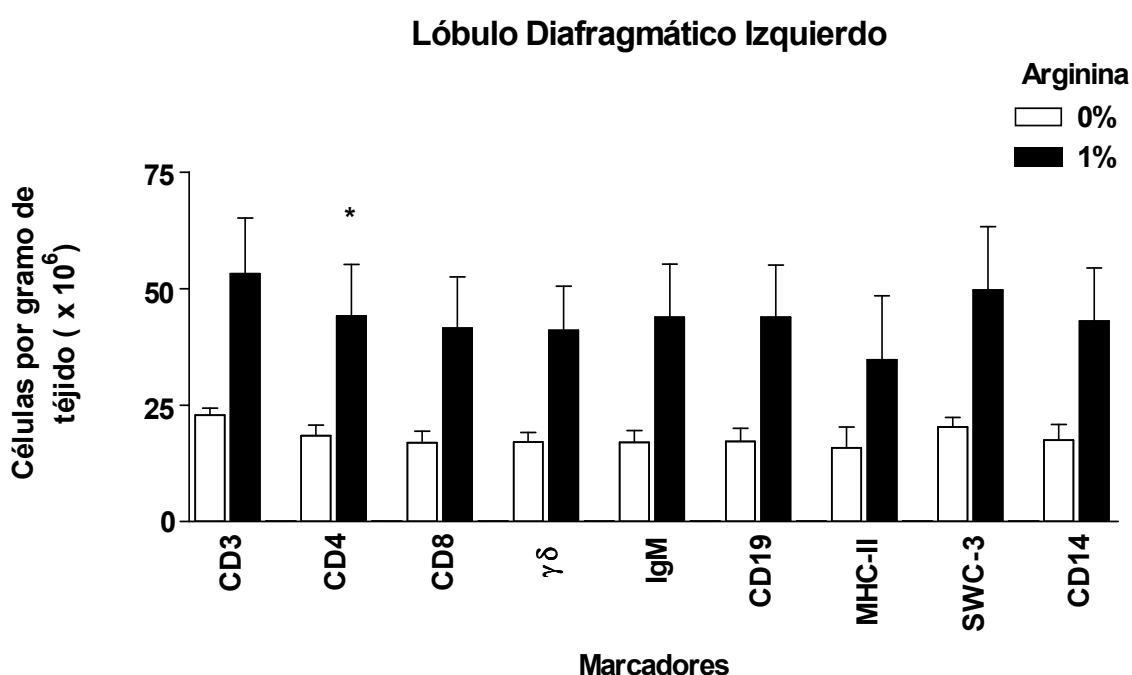
* Diferencia estadística significativa de $P < 0.05$

** Diferencia estadística significativa de $P < 0.01$

Figura 22. Análisis por citometría de flujo de los valores absolutos de células de lóbulo diafragmático izquierdo de 10 cerdos de 51 de edad de edad, que recibieron por 30 días, 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el eem de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y para macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Lóbulo diafragmático izquierdo

La figura 23 muestra los valores absolutos de linfocitos T, B y macrófagos (cuadro 31 anexo 2), del lóbulo diafragmático izquierdo, de 10 cerdos de los dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento. Cada barra representa el promedio \pm eem de 5 animales por tratamiento, posteriores al destete, el eje vertical muestra el número (millones) de células por gramo y el eje horizontal muestra los marcadores empleados así como el grupo control y tratado con arginina, para linfocitos T fueron en CD3 (22.52 ± 3.37 y 53.23 ± 26.73), CD4 (18.44 ± 5.14 y 44.16 ± 24.64) con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) a favor del grupo tratado, CD8 (16.96 ± 5.48 y 41.54 ± 24.58), $\gamma\delta$ (17.07 ± 4.65 y 41 ± 21.24), IgM (17.01 ± 5.67 y 43.85 ± 25.49), CD19 (17.22 ± 6.28 y 43.84 ± 25.19), MHC-II (15.83 ± 10 y 34.71 ± 30.76), SWC-3 (20.36 ± 4.46 y 49.74 ± 30.29), CD14 (17.53 ± 7.41 y 43.01 ± 26) todos sin diferencia significativa entre tratamientos.



* Diferencia estadística significativa de $P < 0.05$

** Diferencia estadística significativa de $P < 0.01$

Figura 23. Análisis por citometría de flujo de los valores absolutos de células de lóbulo diafragmático izquierdo de 10 cerdos de 51 días de edad, que recibieron por 30 días 0% (barras blancas) o 1% de L-arginina (barras negras). Los resultados se analizaron en el programa GraphPad Prism 3, las barras indican el promedio más el error estándar de células positivas al marcador de superficie detectado con anticuerpos monoclonales de 5 cerdos por grupo: linfocitos T (CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$), linfocitos B (IgM y CD19) y para macrófagos (MHC-II, SWC-3 y CD14).

Discusión

PARÁMETROS PRODUCTIVOS

PESO

Los animales en este estudio no presentaron disminución en los pesos, como lo observado por Pluske ⁽⁵⁾ y Remillard ⁽⁸⁹⁾, al momento del destete y no se observó en las siguientes dos semanas postdestete ^(80, 84). Durante este tiempo las enzimas secretadas por el tejido pancreático no son suficientes ni las adecuadas para digerir el tipo de proteína y concentración de nutrientes de la dieta sólida ⁽⁸²⁾.

La atrofia de las vellosidades intestinales impide la asimilación de nutrientes y aminoácidos esenciales para su crecimiento. Debido, tal vez, a la inmadurez enzimática, en las dos primeras semanas el peso de los cerdos no presentó diferencias estadísticas significativas en los tratamientos. A lo largo del experimento no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos y el grupo control, confirmando que el porcentaje de inclusión utilizado tal vez no fue el adecuado en los grupos tratados para expresar su potencial genético sobre el peso durante el periodo experimental. El empleo de un exceso (desequilibrio) en la cantidad de aminoácidos, en este caso de arginina al 2 % demuestra tener un efecto negativo sobre el peso. Estudios en cerdos han demostrado que un desequilibrio de aminoácidos cristalinos (sintéticos) en la dieta, se absorben en el intestino mucho más rápido ⁽¹⁹⁾ y la concentración de

los niveles plasmáticos del aminoácido aumenta, por consiguiente la circulación de otros aminoácidos se ve afectada, esto ocasiona la saturación de receptores que transportan al aminoácido en la célula donde la arginina compite con la lisina ⁽¹⁹⁾. Bajo estas condiciones la eficiencia de la dieta y el crecimiento son afectados, lo que conlleva a un menor peso ⁽¹⁹⁾, como lo observado en el grupo tratado con el 2% del aminoácido (cuadro 8).

GANANCIA DIARIA DE PESO

De igual forma, la ganancia diaria de peso (GDP) no presentó diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) (cuadro 8) en las dos primeras semanas de tratamiento. En la tercera semana, el grupo del 2% presentó una reducción significativa ($P < 0.05$) en comparación a los otros grupos tratados, teniendo la menor GDP (0.207g vs 0.299g y 0.296g). Lo cual pudo deberse a la mayor cantidad de L-arginina administrada en agua como vehículo en el grupo del 2% pudiendo influir en la capacidad estomacal disminuyendo la cantidad de alimento consumido; sin embargo, una cantidad en exceso de aminoácido sintético, se manifiesta en un efecto adverso en el consumo de alimento que consecuentemente también conlleva a la reducción de ganancia diaria de peso ⁽¹⁹⁾. Esto mismo fue observado por Kumta (1958) con ratas, donde demuestra que un desequilibrio de aminoácidos daña la eficiencia de utilización de las proteínas en la dieta, confirmando que la retención de nitrógeno (N) disminuye, indicando que los efectos del desequilibrio son mediados vía reducción en el apetito de los animales de granja.

De la cuarta a la sexta semana no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos (cuadro 8). Sin embargo, en la quinta semana el grupo del 1% muestra una menor GDP a la observada en la cuarta semana,

esto se puede atribuir a que se suprimió la adición de L-arginina oralmente y que la limitada capacidad de síntesis endógena ⁽²⁰⁾ no fue la adecuada para mantener el máximo potencial de crecimiento ⁽¹¹⁾, lo que se observa también en el grupo del 1.5% de la quinta a la sexta semana (cuadro 8), lo cual se puede afirmar en este estudio. Con estos resultados, probablemente se necesitaría administrar L-arginina hasta que los cerdos sean capaces de sintetizarla endógenamente (40 kg) para poder observar diferencias significativas en la GDP entre los tratamientos en trabajos posteriores.

CONSUMO DIARIO DE ALIMENTO

El consumo diario de alimento durante todo el periodo experimental no presentó diferencia estadística entre los grupos experimentales.

CONVERSION ALIMENTICIA

En la conversión alimenticia, el grupo del 2% presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) en la tercera y sexta semana experimental; sin embargo, al término de la prueba se ve reflejado en un menor peso en comparación al resto de los grupos tratados, debido al exceso de aminoácido, el cual tiene un efecto que disminuye el crecimiento y esto es consistentemente observado como una rápida y marcada reducción en el consumo de alimento. Harper y Roger (1965) reportaron que ratas que fueron alimentadas con un desequilibrio (exceso) en la dieta, reducen su consumo de alimento dentro de las 3-6 horas. Por tal motivo el crecimiento es reducido como una consecuencia de la disminución en el consumo de nutrientes. Esta hipótesis es aceptada como una explicación satisfactoria por los efectos de la desproporción de aminoácidos en las ratas y

por lo tanto podría tener aplicación en otros animales ⁽¹⁹⁾. Además, el desagradable sabor de la arginina, inducía a que los animales tardaran más tiempo en consumir la dieta, por lo cual las alternativas para suministrar la arginina para posteriores estudios serían a través de sonda esofágica, bolos comprimidos, capsulas orales, dilución en ácidos débiles (ácido acético), para evitar la disminución del consumo de alimento y el manejo excesivo de los cerdos. Sin embargo no se presentaron diferencias.

ESTUDIO INMUNOLÓGICO

La selección de los animales para el estudio trasversal inmunológico se determinó por el comportamiento de los parámetros productivos, siendo los de mejor peso los del grupo del 1% de L-arginina. Al sacrificio de los animales, se realizó la necropsia para la toma de los órganos los cuales no mostraron ninguna lesión macroscópica en ninguno de los animales control y tratados.

CELULAS DEL SISTEMA INMUNE (SI)

VALORES RELATIVOS

Los valores relativos indican la proporción de poblaciones celulares en un órgano misma que siempre guarda una relación equilibrada en los animales sanos, el aumento o diferencia en este parámetro indicaría una pérdida en la homeostasis ^(225, 226).

El análisis de los valores relativos de sangre (Fig. 10), tonsila (Fig. 11), lavado traqueoalveolar (Fig.12) y parénquima pulmonar (Fig. 13-16), no mostró diferencia estadística significativa ($P>0.05$), entre los tratamientos lo que significa que aun con la administración de L-arginina, la proporción celular no

se vio alterada para indicar una pérdida o promoción de la homeostasis en los cerdos.

VALORES ABSOLUTOS

La transformación de los valores relativos en absolutos permite la cuantificación celular real de cada muestra analizada por citometría para evaluar un órgano, esto es particularmente importante porque se puede suponer que un número mayor de células en un órgano podrán establecer una mejor respuesta inmunológica frente a un desafío en el animal.

SANGRE

Los valores absolutos de sangre (Fig. 17) del grupo tratado tuvieron una disminución significativa ($P < 0.05$) en linfocitos T γ - δ , posiblemente debida a que la inclusión del 1% de L-arginina tiene un efecto sobre la maduración de las células ^(58; 59; 60, 62), haciendo que salgan en menor tiempo del torrente sanguíneo, el cual solo lo utilizan como medio de transporte para llegar al órgano blanco.

TONSILA

Los valores absolutos de células de tonsila (Fig. 18) no mostraron diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre el grupo control y los tratados. La tonsila palatina es un órgano linfoide secundario donde se realiza la inducción de la respuesta inmune por la interacción entre las células T y B, que contribuyen en la formación de la primera línea de defensa ⁽²²⁷⁾. No hubo diferencias significativas, probablemente debido a que es un órgano que madura rápidamente, alrededor de los 30 días de edad, por lo que las poblaciones

celulares de linfocitos T, B y macrófagos se mantienen en un nivel constante como en la vida adulta (180 días), como lo que indica Wilson (2005) que en cerdos convencionales, después de 15 días del nacimiento el rápido desarrollo de las poblaciones celulares T, B o accesorias es conducido por la colonización de la micro flora normal la cual puede tener patógenos no obligados *Streptococcus suis* ⁽²²⁸⁾, y por lo que la inclusión de L-arginina no mostró el efecto de estimulación y maduración sobre las células de la tonsila palatina.

LAVADO BRONQUIOALVEOLAR

Los valores absolutos del lavado bronquioalveolar (Fig. 19), al igual que en las muestras de sangre y tonsila no mostraron diferencia significativa ($P>0.05$) entre los grupos experimentales. Las reacciones inmunes del pulmón porcino no son sólo de interés como modelo para enfermedades humanas, pero son de mayor importancia veterinaria en afecciones con bacterias como *Actinobacillus pleuroneumoniae*, que son extremadamente comunes ^(229; 230). Las partículas antigénicas pueden alcanzar el pulmón vía tracto bronquial o sanguínea en el cerdo, ambos sitios están muy bien equipados con macrófagos. La mayoría de células recuperadas a través del lavado bronquioalveolar (BAL) son macrófagos, que también es el caso en cerdos libres de gérmenes ^(231, 232). Obviamente, el número total de macrófagos y de linfocitos T y B dependerá de la exposición a antígenos, pero bajo condiciones libres de patógenos la estimulación inespecífica también atrae macrófagos dentro del lumen alveolar ⁽²³³⁾. Basados en estos resultados se puede pensar que no debe haber diferencia entre las poblaciones en el BAL de animales normales con pulmones macroscópicamente sanos ⁽²³⁴⁾ y tratados con arginina, probablemente debido

a que el lumen alveolar no recibe el aporte sanguíneo directamente para aumentar las poblaciones celulares o la retención de células en el tejido se prolonga al no haber algún desafío antigénico en el lavado bronquioalveolar.

LÓBULO APICAL DERECHO

Los valores absolutos del lóbulo apical derecho (Fig. 20), presentaron diferencia estadística significativa de ($P < 0.05$ y $P < 0.01$) a favor del grupo tratado en linfocitos T, B y macrófagos excepto para MHC-II. En la actualidad no se conoce al detalle la fisiología de este lóbulo, pero se puede suponer que el aumento de células fue debida a la inclusión de arginina exógena, la cual tiene efecto en la diferenciación, maduración y en la expresión de receptores (58; 59; 60, 62) de las células y del lóbulo lo que favorecería su retención. En segunda instancia, a su posición anatómica que hace que tenga una mayor irrigación sanguínea en el pulmón (46) y por la tanto una mayor circulación de células, donde probablemente el equilibrio de llegada es mayor que el de salida en el lóbulo. Esta posición lo hace el primer lóbulo en entrar en contacto con antígenos del medio ambiente por lo que debe procesar mucho más rápido y en mayor cantidad los antígenos para montar una respuesta inmune eficaz, lo cual sugiere que la maduración del lóbulo es anticipada y que la inclusión de arginina al aumentar las células del SI, tendrá una trascendencia en los mecanismos de inmunidad humoral y celular en la defensa del organismo (319). Estos probables factores ofrecen nuevas líneas de investigación para posteriores estudios.

LÓBULO APICAL IZQUIERDO

Los valores absolutos del lóbulo apical izquierdo (Fig. 21), de ambos grupos experimentales no mostraron diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos. Teniendo como base que las poblaciones celulares en animales sanos son estables sin un estímulo antigénico, al no encontrar diferencias significativas en el lóbulo apical izquierdo, se podría sugerir que la administración del aminoácido no produjo la cantidad suficiente de poliaminas y a la insuficiente síntesis o inhibición de enzimas en el lóbulo ^(61; 28), las cuales están involucradas en la expresión de receptores en la maduración celular ^(58; 59; 60, 62). Además, probablemente debido a la geometría del árbol vascular que es determinante en la distribución del flujo sanguíneo en el pulmón ⁽²³⁵⁾, en animales y humanos se ha demostrado que la distribución vertical del flujo sanguíneo es poca cuando se está en posición de decúbito ^(236; 237; 238; 239), lo que podría tener influencia en la disponibilidad del aminoácido en este lóbulo, aunado al hecho de no conocer al detalle la fisiología en este lóbulo, por lo que se requiere ahondar en la investigación de estos puntos.

LÓBULO DIAFRAGMÁTICO DERECHO

Los valores absolutos del lóbulo diafragmático derecho (Fig. 22), presentaron diferencia estadística significativa ($P < 0.05$ y $P < 0.01$), a favor del grupo tratado, en linfocitos T, B y macrófagos, la cual tiene efecto en la diferenciación, maduración de las células y en la expresión de receptores ^(58; 59; 60, 62). Sin embargo, solo algunas poblaciones como CD4, linfocito T cooperador, presentaron diferencia significativa lo que sugiere que el tiempo de maduración de este lóbulo probablemente sea más tardío que el del lóbulo apical derecho

por lo cual el arribo de las células será distinto. Vega-López (1993; 1994; 1995) demuestra que la distribución de las diferentes poblaciones del SI en el intestino son desiguales en las diversas etapas de vida del cerdo lo cual también podría estar sucediendo en los lóbulos pulmonares. Este hecho se ratifica por los aumentos en linfocitos B (CD19) en este lóbulo y de macrófagos (MHC-II y de CD14) pero no en el lóbulo diafragmático izquierdo.

LÓBULO DIAFRAGMÁTICO IZQUIERDO

Los valores absolutos del lóbulo diafragmático izquierdo (Fig. 23) mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) a favor del grupo tratado solo en linfocitos CD4. El que solo este marcador haya tenido diferencia significativa sugiere que hay diferencias en el efecto de la L-arginina entre el pulmón derecho y el izquierdo, mismas que podrían relacionarse a su anatomía, desarrollo y fisiología y en la actualidad no han sido estudiados con este enfoque, por lo cual en este trabajo no se puede aclarar porque los lóbulos derechos e izquierdos presentan diferencias.

Lo descubierto en células del sistema inmune en décadas pasadas así como los hallazgos recientes en animales y en humanos sanos, han demostrado que suplementar arginina oral e intravenosamente mejora la actividad de células T y B, (41; 71; 73; 74; 28; 27; 78; 56;76). En un trabajo paralelo a este estudio, Roldán (2008) demostró que el tratamiento con arginina en cerdos destetados aumenta el índice fagocítico, la capacidad fagocítica y el índice reductivo en macrófagos pulmonares ⁽²³⁴⁾ que son muy importantes en la actividad del sistema inmune (SI). Además, la arginina, glutamina y cisteína, entre otros aminoácidos, son los mejores prototipos de precursores metabólicos con funciones bien definidas

(inmunoestimuladoras) y su aplicación se expande a la nutrición humana y producción en animales para abasto.

Este estudio preliminar genera nueva información acerca del potencial productivo que tiene y puede representar la inclusión de L-arginina en la etapa postdestete en la porcicultura actual, caracterizada por demandar una alta calidad de nutrientes en la dieta, que cubran los requerimientos diarios de mantenimiento así como en el crecimiento ⁽¹¹⁾. Al suplementar la cantidad adecuada de arginina entre otros aminoácidos y reducir el estrés generado por factores ambientales, físicos, psicológicos y de manejo, el cerdo joven expresará su máximo potencial de crecimiento en esta fase. Además, de que podría tener un mejor efecto sobre células del SI en los diferentes tejidos, el desarrollo de órganos secundarios del SI sería más rápido en madurar, y tendría una mejor respuesta inmune a las enfermedades respiratorias a las cuales son altamente susceptibles en esta etapa.

Debido a la escasa información disponible sobre la inmunidad en el parénquima pulmonar, este estudio es precursor al encontrar diferencias en las poblaciones celulares entre los lóbulos pulmonares, lo cual requiere de la confirmación experimental de los resultados mediante la realización de estudios posteriores p.e. utilizando alternativas para suministrar la arginina a través de sonda esofágica, bolos comprimidos, capsulas orales, dilución en ácidos débiles (ácido acético), para hacer más eficiente la administración evitando el manejo excesivo de los cerdos. Además, sería interesante emplear diferentes edades del cerdo, aumentar el universo de la muestra, desafiarlos antigénicamente, determinar la activación celular de las diferentes poblaciones,

actividad enzimática, limitación y exceso de sustrato, lo cual ayudaría a entender el mecanismo de las células en los diferentes lóbulos pulmonares.

Para posteriores estudios que se realicen sobre esta línea de investigación y superar los obstáculos que presentó este trabajo y que pudieron influir en los resultados obtenidos tanto en los ensayos nutricionales como en los inmunológicos se sugiere:

- Emplear suficiente personal para la administración del alimento así como del aminoácido
- Aumentar el universo de la muestra para los ensayos inmunológicos
- Mejorar la vía de administración del aminoácido
- Realizar los experimentos en una sola institución (UNAM o CINVESTAV) para evitar el efecto del transporte prolongado de las muestras

Conclusión

- ❖ La inclusión de 1% y 1.5% de L-arginina tuvo un efecto benéfico en el peso vivo de los animales en la tercera semana post-tratamiento entre tratamientos pero sin ser significativamente diferente al grupo control.
- ❖ El grupo con 1% de L-arginina tuvo el mayor peso al finalizar la prueba experimental entre tratamientos pero sin ser significativamente diferente al grupo control.
- ❖ El exceso de L-arginina 2% tiene un efecto negativo sobre el peso.
- ❖ El consumo diario de alimento no fue afectado por la suplementación de arginina en los animales control y tratados.
- ❖ La conversión alimenticia no mejoró con la inclusión de L-arginina en los animales tratados durante los 30 días del periodo experimental.
- ❖ La inclusión del 1% de L-arginina durante el tiempo de prueba indujo un incremento de linfocitos T, B y macrófagos en los lóbulos apical y diafragmático derecho.
- ❖ La inclusión del 1% de L-arginina durante el tiempo de prueba no tuvo el mismo efecto en el incremento celular de las diferentes poblaciones en el lóbulo apical y diafragmático izquierdo.
- ❖ El incremento de las poblaciones celulares podría tener una significancia relevante en animales sanos frente a desafíos antigénicos.
- ❖ Los principales parámetros productivos del cerdo recién destetado no fueron estadísticamente diferentes entre el grupo control y los grupos suplementados con arginina. La razón de este efecto es desconocida y entre las posibles causas se podrían encontrar; la limitada síntesis endógena de arginina, la digestibilidad de esta en la dieta, su capacidad

de absorción por los enterocitos en intestino, nivel de saturación de los receptores para ingresarla a la célula, la forma química de la molécula utilizada es este estudio y la vía de administración, entre otras.

- ❖ La respuesta positiva de la L-arginina sobre algunas poblaciones celulares del parénquima pulmonar de cerdos sanos, aunada al pobre efecto sobre los parámetros productivos hacen necesarios estudios adicionales para establecer una dosis óptima de arginina que incremente tanto los parámetros productivos y mejore la inmunidad en cerdos sanos así como en animales inmunocomprometidos por estrés y enfermedades virales.

Anexo 1

Soluciones utilizadas

Solución Salina Fisiológica (SSF)

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

Azul de tripano

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

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

Cloruro de sodio (NaCl)	8g
Cloruro de potasio (KCl).....	0.2g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	0.2g
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O).....	1.15g
Disolver en 500ml de agua bidestilada y ajustar el pH a 7.3 con HCL 1N ó NaOH 5N	

Solución de lisis para eritrocitos

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

Medio RPMI completo

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

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.

Medio RPMI incompleto

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

Solución con enzima (Colagenasa)

Colagenasa tipo IV “243 UI/mg” (Worthington Biochemical Corporation).... 15.23 mg
RPMI-1640 incompleto.....25.0 ml

Solución amortiguadora de fosfatos con azida de sodio y suero normal de cerdo

Suero normal de Cerdo.....5.0 ml
Azida de sodio (NaN₃).....0.1 g
PBS.....c.b.p 100 ml

Solución fijadora de p-formaldehído al 1%

p-formaldehído.....1.0 g
PBS.....c.b.p. 100 ml

Agregar al paraformaldehído 60 ml de PBS, calentar en agitación hasta 60°C, adicionando unas gotas de NaOH para disolver el paraformaldehído.

Anexo 2

Cuadros de rendimiento celular y de marcadores de superficie de valores relativos y absolutos.

Rendimiento de células de cada tejido

Sangre

El cuadro 10 representa células mononucleares de sangre tomadas de 10 cerdos, aisladas a través de ficoll-hypaque de dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento (0% y 1% de L-arginina), la viabilidad fue del 100 % en ambos grupos. El rendimiento (prom \pm desviación estándar) del grupo control 0% fue de 9.38 ± 2.49 millones de células en 10 mililitros, y el grupo tratado 1% fue de 12.96 ± 4.08 millones de células en 10 mililitros. No hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre grupos.

Cuadro 10. Rendimiento de células mononucleares de sangre de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Sangre							
Total de células (x 10 ⁶)							
		0 % de L-arginina			1 % de L-arginina		
Cerdo	Viabilidad	Total de cels	Muestra	Cel x ml	Total de cels	Muestra	Cel x ml
1	100%	73.5	10 ml	7.35	103.5	10 ml	10.35
2	100%	113.5	10 ml	11.35	141.0	10 ml	14.10
3	100%	123.5	10 ml	12.35	209.5	10 ml	20.95
4	100%	93.0	10 ml	9.30	108.0	10 ml	10.80
5	100%	65.5	10 ml	6.55	86.0	10 ml	8.60
Prom		93.8		9.38	129.6		12.96
Desv stnd		24.91		2.49	48.89		4.08
SEM		11.17		1.11	21.95		2.19

Cel x ml= Células por mililitro

La sangre se obtuvo por venipunción yugular, se diluyó 1:2 con PBS, se homogenizó y se estratificó sobre un colchón de Ficoll-Hypaque para contarse y ajustarse. El número de células vivas/ml se multiplicó por el volumen total de la suspensión donde se contenían (5ml) y se dividió entre los 10 ml de la sangre original obteniéndose el número de células por mililitro.

Tonsila

El cuadro 11 representa células de tonsila tomadas de 10 cerdos, separadas por medio de centrifugación de dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento (0% y 1% de L-arginina), la viabilidad fue del 100% en ambos grupos. El rendimiento (prom \pm desviación estándar) del grupo control 0% fue de 34.15 ± 12.06 millones de células en 10 gramos, y el grupo tratado 1% fue de 21.65 ± 27.34 millones de células en 10 gramos. No hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre grupos.

Cuadro 11. Rendimiento de células de tonsila de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Tonsila							
Total de células (x 10 ⁶)							
0 % de L-arginina				1 % de L-arginina			
Cerdo	Viabilidad	Total de cels	Muestra	Cel x ml	Total de cels	Muestra	Cel x ml
1	100%	174.5	10 gramos	43.62	90.0	10 gramos	22.5
2	100%	198.0	10 gramos	49.50	134.5	10 gramos	33.625
3	100%	88.5	10 gramos	22.12	70.5	10 gramos	17.625
4	100%	95.5	10 gramos	23.87	80.5	10 gramos	20.125
5	100%	126.5	10 gramos	31.625	57.5	10 gramos	14.375
Prom		136.60		34.15	86.60		21.65
SD		48.24		12.06	29.36		7.34
SEM		21.63		5.40	13.16		3.29

Cel x ml= Células por mililitro

Tonsila, se pesó y se maceró para la digestión y ayudar a la penetración de la enzima y la liberación de las células. El macerado obtenido se depositó en tubos de 50 ml que contenían RPMI-1640 incompleto (sin SFB) más Colagenasa tipo IV. El número de células vivas/ml se multiplicó por el volumen total de la suspensión donde se contenían (5 ml) y se dividió entre los 10 g del parénquima original obteniéndose el número de células por mililitro.

Lavado bronquioalveolar (BAL)

El cuadro 12 representa células de lavado bronquioalveolar tomadas de 10 cerdos, de dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento (0% y 1% de L-arginina) la viabilidad fue del 100% en ambos grupos. El rendimiento (prom \pm desviación estándar) del grupo control 0% fue de 0.64 ± 0.40 millones de células en 50 mililitros, y el grupo tratado 1% fue de 0.58 ± 0.18 . No hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre grupos.

Cuadro 12. Rendimiento de células de lavado bronquioalveolar de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Lavado Bronquioalveolar							
Total de células (x 10⁶)							
		0 % de L-arginina			1 % de L-arginina		
Cerdo	Viabilidad	Total de cels	Muestra	Cel x ml	Total de cel s	Muestra	Cel x ml
1	100%	21.00	50 ml	.42	16.00	50 ml	.32
2	100%	40.50	50 ml	.81	62.50	50 ml	1.25
3	100%	37.00	50 ml	.74	14.50	50 ml	.29
4	100%	19.00	50 ml	.38	26.00	50 ml	.52
5	100%	28.50	50 ml	.57	42.00	50 ml	.84
Prom		29.20		0.58	32.20		0.64
SD		9.49		0.18	20.17		0.40
SEM		4.25		0.08	9.04		0.18

Cel x ml= Células por mililitro

Se realizo un lavado traqueo-bronquial total en pulmón. El líquido obtenido se mantuvo en hielo y se centrifugó (4° c) y se resuspendió la pastilla celular en RPMI-1640 completo. El número de células vivas/ml se multiplicó por el volumen total de la suspensión donde se contenían (5 ml) y se dividió entre los 50 ml del lavado original obteniéndose el número de células por mililitro.

Parénquima del lóbulo apical derecho (PLAD)

El cuadro 13 representa células del lóbulo apical derecho tomadas de 10 cerdos, separadas por medio de digestión enzimática de dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento (0% y 1% de L-arginina) la viabilidad fue del 100 % en ambos grupos. El rendimiento (prom \pm desviación estándar) del grupo control 0% fue de 4.66 ± 1.23 millones de células en 10 gramos, y el grupo tratado 1% fue de 7.81 ± 2.95 millones de células en 10 gramos. No hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre grupos.

Cuadro 13. Rendimiento de células de parénquima del lóbulo apical derecho de cerdos de 51 días, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Apical Derecho							
Total de células (x 10 ⁶)							
0 % de L-arginina					1 % de L-arginina		
Cerdo	Viabilidad	Total de cels	Muestra	Cel x ml	Total de cels	Muestra	Cel x ml
1	100%	61.00	10 gramos	6.10	125.00	10 gramos	12.50
2	100%	29.00	10 gramos	2.90	83.00	10 gramos	8.30
3	100%	55.50	10 gramos	5.55	76.50	10 gramos	7.65
4	100%	43.00	10 gramos	4.30	52.00	10 gramos	5.20
5	100%	44.50	10 gramos	4.45	54.00	10 gramos	5.40
Prom		46.6		4.66	78.1		7.81
SD		12.36		1.23	29.53		2.95
SEM		5.55		0.55	13.24		1.32

Cel x ml= Células por mililitro

Al lóbulo apical derecho se le retiró cuidadosamente el árbol bronquial para obtener el parénquima que se maceró para la digestión. El macerado obtenido se depositó en tubos de 50 ml que contenían RPMI-1640 incompleto (sin SFB) más Colagenasa tipo IV. El número de células vivas/ml se multiplicó por el volumen total de la suspensión donde se contenían (5 ml) y se dividió entre los 10 g del parénquima original obteniéndose el número de células por mililitro.

Parénquima del lóbulo apical izquierdo (PLAI)

El cuadro 14 representa células del lóbulo apical izquierdo tomadas de 10 cerdos, separadas por medio de digestión enzimática de dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento (0% y 1% de L-arginina), la viabilidad fue del 100 % en ambos grupos. El rendimiento (prom \pm desviación estándar) del grupo control 0% fue de 4.35 ± 1.51 millones de células en 10 gramos, y el grupo tratado 1% fue de 6.3 ± 1.43 millones de células en 10 gramos. No hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre grupos.

Cuadro 14. Rendimiento de células de parénquima del lóbulo apical izquierdo de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Apical Izquierdo							
Total de células (x 10 ⁶)							
0 % de L-arginina					1 % de L-arginina		
Cerdo	Viabilidad	Total de cels	Muestra	Cel x ml	Total de cels	Muestra	Cel x ml
1	100%	64.50	10 gramos	6.45	64.00	10 gramos	6.40
2	100%	30.00	10 gramos	3.0	82.00	10 gramos	8.20
3	100%	32.50	10 gramos	3.25	70.00	10 gramos	7.00
4	100%	54.50	10 gramos	5.4	44.50	10 gramos	4.45
5	100%	36.00	10 gramos	3.6	54.50	10 gramos	5.45
Prom		43.5		4.35	63		6.3
SD		15.17		1.51	14.36		1.43
SEM		6.80		0.68	6.44		0.64

Cel x ml= Células por mililitro

Al lóbulo apical izquierdo, se le retiró cuidadosamente el árbol bronquial para obtener el parénquima que se maceró para la digestión. El macerado obtenido se depositó en tubos de 50 ml que contenían RPMI-1640 incompleto (sin SFB) más Colagenasa tipo IV. El número de células vivas/ml se multiplicó por el volumen total de la suspensión donde se contenían (5 ml) y se dividió entre los 10 g del parénquima original obteniéndose el número de células por mililitro.

Parénquima del lóbulo diafragmático derecho (PLDD)

El cuadro 15 representa células del lóbulo diafragmático derecho tomadas de 10 cerdos, separadas por medio de digestión enzimática de dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento (0% y 1% de L-arginina) la viabilidad fue del 100 % en ambos grupos. El rendimiento (prom \pm desviación estándar) del grupo control 0% fue de 5.11 ± 1.20 millones de células en 10 gramos, y el grupo tratado 1% fue de 9.71 ± 2.52 millones de células en 10 gramos. No hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre grupos.

Cuadro 15 Rendimiento de células por gramo de parénquima del lóbulo diafragmático derecho de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Diafragmático Derecho							
Total de células (x 10 ⁶)							
		0 % de L-arginina			1 % de L-arginina		
		Total de			Total de		
Cerdo	Viabilidad	cels	Muestra	Cel x ml	cels	Muestra	Cel x ml
1	100%	58.50	10 gramos	5.85	125.00	10 gramos	12.50
2	100%	59.00	10 gramos	5.90	95.00	10 gramos	9.50
3	100%	39.50	10 gramos	3.95	116.50	10 gramos	11.65
4	100%	62.00	10 gramos	6.20	61.00	10 gramos	6.10
5	100%	36.50	10 gramos	3.65	88.00	10 gramos	8.80
Prom		51.1		5.11	97.1		9.71
SD		12.07		1.20	25.22		2.52
SEM		5.41		0.54	11.31		1.13

Cel x ml= Células por mililitro

Al lóbulo diafragmático derecho, se le retiró cuidadosamente el árbol bronquial para obtener el parénquima que se maceró para la digestión. El macerado obtenido se depositó en tubos de 50 ml que contenían RPMI-1640 incompleto (sin SFB) más Colagenasa tipo IV. El número de células vivas/ml se multiplicó por el volumen total de la suspensión donde se contenían (5 ml) y se dividió entre los 10 g del parénquima original obteniéndose el número de células por mililitro.

Parénquima del lóbulo diafragmático izquierdo (PLDI)

El cuadro 16 representa células del lóbulo diafragmático izquierdo tomadas de 10 cerdos, separadas por medio de digestión enzimática de dos grupos experimentales, 5 animales por tratamiento (0% y 1% de L-arginina) la viabilidad fue del 100 % en ambos grupos. El rendimiento (prom \pm desviación estándar) del grupo control 0% fue de 4.36 ± 0.90 millones de células en 10 gramos, y el grupo tratado 1% fue de 9.38 ± 4.0 millones de células en 10 gramos. No hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre grupos.

Cuadro 16 Rendimiento de células por gramo de parénquima del lóbulo diafragmático izquierdo de cerdos de 51 días de edad, tratados 30 días con 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Diafragmático Izquierdo							
Total de células (x 10 ⁶)							
0 % de L-arginina					1 % de L-arginina		
Cerdo	Viabilidad	Total de cels	Muestra	Cel x ml	Total de cels	Muestra	Cel x ml
1	100%	42.00	10 gramos	4.20	140.50	10 gramos	14.05
2	100%	47.50	10 gramos	4.75	81.00	10 gramos	8.10
3	100%	34.00	10 gramos	3.40	132.00	10 gramos	13.20
4	100%	57.00	10 gramos	5.70	54.50	10 gramos	5.45
5	100%	37.50	10 gramos	3.75	61.00	10 gramos	6.10
Prom		43.6		4.36	93.8		9.38
SD		9.03		0.90	40.07		4.0
SEM		4.05		0.40	17.97		1.7

Cel x ml= Células por mililitro

Al lóbulo diafragmático izquierdo, se le retiró cuidadosamente el árbol bronquial para obtener el parénquima que se maceró para la digestión. El macerado obtenido se depositó en tubos de 50 ml que contenían RPMI-1640 incompleto (sin SFB) más Colagenasa tipo IV. El número de células vivas/ml se multiplicó por el volumen total de la suspensión donde se contenían (5 ml) y se dividió entre los 10 g del parénquima original obteniéndose el número de células por mililitro.

Valores promedio generales

El cuadro 17 representa el valor promedio de todas las muestras al final del periodo experimental, los cerdos tuvieron una edad de 51 días de edad, se trataron durante 30 días con 0 % y 1 %, el rendimiento (prom \pm desviación estándar) celular para sangre fue para 0% de 93.8 ± 11.17 vs 1% de 129.6 ± 21.92 , tonsila 0% de 29.2 ± 4.25 vs 1% de 32.2 ± 9.04 , lavado bronquioalveolar 0% de 136.6 ± 21.6 vs 1% de 86.6 ± 13.16 , lóbulo apical izquierdo 0% de 43.5 ± 6.80 vs 1% de 63 ± 6.44 , lóbulo apical derecho 0% de 46.6 ± 5.55 vs 1% de 78.1 ± 13.24 , lóbulo diafragmático izquierdo 0% de 43.6 ± 4.05 vs 1% de 93.8 ± 17.97 , lóbulo diafragmático derecho 0% de 51.1 ± 5.41 vs 1% de 97.1 ± 11.31 . No hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre muestras de cada grupo.

Cuadro 17. Valores del rendimiento celular promedio general por tejido.

Tratamiento de L-arginina			
Tejido	0%	1%	Diferencia
Sangre	93.8 ± 11.17	129.6 ± 21.92	NS
Tonsila	29.2 ± 4.25	32.2 ± 9.04	NS
Lavado Bronquioalveolar	136.6 ± 21.6	86.6 ± 13.16	NS
Lóbulo Apical Izquierdo	43.5 ± 6.80	63 ± 6.44	NS
Lóbulo Apical Derecho	46.6 ± 5.55	78.1 ± 13.24	NS
Lóbulo Diafragmático Izquierdo	43.6 ± 4.05	93.8 ± 17.97	NS
Lóbulo Diafragmático Derecho	51.1 ± 5.41	97.1 ± 11.31	NS

NS= No significativa

Cuadro 18 Valores relativos de células positivas mononucleares de sangre periférica de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Sangre									
Tratamiento 0%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	78,94	38,33	32,65	31,42	31,47	34,26	6,50	1,65	33,88
2	75,38	45,16	47,67	36,80	50,88	42,50	65,91	52,11	56,11
3	43,05	44,98	19,41	41,94	26,39	38,12	29,62	46,64	35,94
4	69,59	49,47	33,67	46,69	47,90	55,44	59,42	60,04	38,01
5	75,93	49,09	34,87	47,79	47,62	54,44	50,45	54,51	56,37
Prom	68,58	45,41	33,65	40,93	40,85	44,95	42,38	42,99	44,06
DE	14,67	4,48	10,02	6,87	11,10	9,58	24,29	23,61	11,21
EEM	6,58	2,01	4,49	3,08	4,98	4,30	10,89	10,59	5,03

Tratamiento 1%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	3,78	56,31	4,32	1,45	3,16	1,73	17,11	1,33	44,38
2	29,35	26,28	24,52	24,17	25,58	25,72	26,86	28,39	26,44
3	88,49	77	77,76	2,79	80,20	79,34	83,36	81,62	78,10
4	34,68	30,65	28,31	27,84	28,16	28,65	29,33	29,38	28,43
5	77,66	59,59	52,61	51,47	41,26	52,50	18,21	50,39	50,54
Prom	46,79	49,97	37,50	21,54	35,67	37,59	34,97	38,22	45,58
DE	35,33	21,20	28,30	20,60	28,41	29,46	27,56	29,86	20,88
EEM	15,84	9,51	12,69	9,24	12,74	13,21	12,36	13,39	9,36

Cuadro 19 Valores relativos de células positivas mononucleares de tonsila de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Tonsila									
Tratamiento 0%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	63,11	21,84	20,88	23,80	21,15	21,09	1,38	34,33	20,91
2	74,14	65,68	51,80	49,23	56,61	56,19	64,24	54,59	55,43
3	72,27	61,40	41,50	61,87	41,61	40,23	62,20	62,28	58,70
4	80,58	65,62	47,82	56,73	54,42	63,40	65,34	63,84	54,38
5	80,38	70,16	42,20	50,81	50,99	50,55	56,23	54,05	54,68
Prom	74,10	56,94	40,84	48,49	44,96	46,29	49,88	53,82	48,82
DE	7,17	19,86	11,93	14,68	14,49	16,44	27,34	11,75	15,70
EEM	3,21	8,91	5,35	6,58	6,50	7,37	12,26	5,27	7,04

Tratamiento 1%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	3,21	40,47	2,38	14,53	6,80	4,40	17,6	1,31	40,59
2	68,94	42,82	32,05	31,57	34,25	35,8	54,64	46,92	42,27
3	83,66	77,79	70,95	71,32	70,53	71,23	69,80	69,47	65,39
4	85,96	76,09	62,95	82,52	68,85	60,91	84,80	89,14	88,77
5	60,92	42,54	1,17	40,64	20,63	39,31	50,51	43,02	44,05
Prom	60,54	55,94	33,90	48,12	40,21	42,33	55,47	49,97	56,21
DE	33,68	19,20	32,73	28,19	28,61	25,84	25,12	32,94	20,80
EEM	15,10	8,61	14,68	12,64	12,83	11,59	11,27	14,77	9,33

Cuadro 20. Valores relativos individuales de células de lavado bronquioalveolar, de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Lavado Bronquioalveolar									
Título 0%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	63,25	50	51,81	52,35	55,74	49,53	6,23	63,15	47,6
2	38,38	34,46	31,09	34,50	36,14	31,06	36,89	38,43	31,5
3	19,24	17,60	16,73	15,64	16,94	16,52	1,53	18,68	19,11
4	39,23	37,85	34,98	37,05	36,43	36,21	37,87	38,05	16,03
5	18,95	17,96	15,98	11,52	10,24	11,58	10,21	17,26	3,78
Prom	35,81	31,57	30,12	30,21	31,10	28,98	18,55	35,11	23,60
DE	18,24	13,86	14,78	16,71	18,00	15,30	17,47	18,67	16,65
EEM	8,18	6,21	6,63	7,49	8,07	6,86	7,83	8,37	7,47

Tratamiento 1%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	2,93	12,32	1,77	3,16	14,7	1,36	8,71	19,67	63,63
2	62,54	49,61	28,88	28,56	31,94	35,71	34,17	41,82	33,64
3	53,16	51,18	47,29	48,66	52,08	51,3	53,75	52,85	52,19
4	83,06	71,58	51,14	30,08	55,60	55,26	47,36	59,18	58,71
5	34,21	27,08	26,72	22,91	25,02	26,14	25,17	26,96	24,24
Prom	47,18	42,35	31,16	26,67	35,87	33,95	33,83	40,10	46,48
DE	30,35	23,02	19,67	16,32	17,56	21,69	17,93	16,73	16,85
EEM	13,61	10,32	8,82	7,32	7,87	9,73	8,04	7,50	7,56

Cuadro 21. Valores relativos de células del lóbulo apical derecho, de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Apical Derecho									
Tratamiento 0%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	48,71	28,84	24,58	26,19	27,73	27,62	1,47	46,52	26,21
2	66,84	61,16	58,05	54,96	54	60,54	65,44	64,46	62,8
3	51,06	43,77	33,22	-4,27	29,35	25,2	27,46	51,53	51,3
4	61,26	52,37	49,09	48,22	50,3	49,82	51,58	54,54	48,52
5	53,12	46,6	30,44	42,55	42,25	36,76	44,02	49,71	47,03
Prom	56,20	46,55	39,08	33,53	40,73	39,99	37,99	53,35	47,17
DE	7,60	11,92	13,96	23,66	11,92	15,01	24,59	6,86	13,25
EEM	3,41	5,35	6,26	10,61	5,35	6,73	11,03	3,07	5,94

Tratamiento 1%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	59,99	49,17	49	52,56	51,83	49,7	4,75	61,46	53,16
2	55,77	53,09	49,25	49,07	50,72	51,74	51,57	59,71	57,48
3	56,70	45,20	49,05	39,98	50,29	43,78	50,38	48,79	46,26
4	55,28	49,57	44,81	47,96	46,01	47,63	52,14	57,51	53,72
5	65,78	58,95	58,33	58,37	56,37	58,6	59,11	60,42	57,47
Prom	58,70	51,20	50,09	49,59	51,04	50,29	43,59	57,58	53,62
DE	4,36	5,16	4,97	6,73	3,71	5,50	21,98	5,12	4,59
EEM	1,96	2,31	2,23	3,02	1,66	2,47	9,86	2,30	2,06

Cuadro 22. Valores relativos de células del lóbulo apical izquierdo, de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Apical Izquierdo									
Tratamiento 0%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	55,34	33,49	28,23	30,46	31,54	29,37	28,27	2,17	28,67
2	43,73	39,18	33,56	32,77	33,15	35,99	38,29	40,74	38,09
3	55,39	49,18	44,12	40,05	41,73	40,81	0,67	53,48	49,44
4	71,93	65,12	64,87	60,05	62,26	61,98	65,55	65,41	60,55
5	59,05	47,28	40,41	44,87	42,71	43,32	43,99	45,69	44,43
Prom	57,09	46,85	42,24	41,64	42,28	42,29	35,35	41,50	44,24
DE	10,11	12,01	14,06	11,79	12,23	12,22	23,71	23,88	11,97
EEM	4,53	5,38	6,30	5,28	5,48	5,48	10,63	10,71	5,37

Tratamiento 1%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	43,10	14,01	14,27	18,39	16,38	23,46	0,47	39,71	18,55
2	54,40	51,08	47,09	48,56	50,01	51,02	50,53	57,33	55,1
3	62,64	55,89	54,90	6,71	53,21	54,17	55,78	56,04	52,65
4	32,46	27,04	21,14	21,31	22,56	22,78	23,69	32,96	28,44
5	50,52	42,97	38,49	36,31	29,53	38,92	37,46	40,08	39,26
Prom	48,62	38,20	35,18	26,26	34,34	38,07	33,59	45,22	38,80
DE	11,46	17,40	17,15	16,33	16,48	14,79	22,30	10,85	15,61
EEM	5,14	7,80	7,69	7,32	7,39	6,63	10,00	4,87	7,00

Cuadro 23. Valores relativos de células del lóbulo diafragmático derecho, de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Diafragmático Derecho									
Tratamiento 0%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	50,99	29,74	25,37	26,72	26,7	24,66	0,8	44,86	28,54
2	51,98	50,08	47,46	46,23	49,72	48,67	61,52	54,17	55,95
3	52,73	50,77	47,33	45,05	50,41	48,9	62,26	55,69	57,05
4	64,92	48,73	53,56	52,76	48,99	47,07	54,55	58,43	46,2
5	43,88	35,54	30,05	39,45	34,55	36,34	37,56	45,41	43,52
Prom	52,90	42,97	40,75	42,04	42,07	41,13	43,34	51,71	46,25
DE	7,59	9,68	12,28	9,78	10,83	10,57	25,77	6,20	11,53
EEM	3,40	4,34	5,51	4,39	4,85	4,74	11,56	2,78	5,17

Tratamiento 1%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	1,98	42,82	12,18	14,88	0,18	16,07	34,09	13,34	22,68
2	55,09	51,26	49,11	48,16	51,05	51,16	55,22	61,54	58,61
3	62,64	49,92	52,32	45,08	52,73	54,54	54,11	56,66	53,24
4	59,19	53,81	51,48	48,03	50,99	51,78	52,86	61,07	59,64
5	56,96	55,03	53,69	41,38	51,74	53,18	45,60	54,09	52,02
Prom	47,17	50,57	43,76	39,51	41,34	45,35	48,38	49,34	49,24
DE	25,42	4,78	17,73	14,04	23,02	16,42	8,83	20,36	15,21
EEM	11,40	2,14	7,95	6,30	10,32	7,36	3,96	9,13	6,82

Cuadro 24. Valores relativos de células del lóbulo diafragmático izquierdo, de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Diafragmático Izquierdo									
Tratamiento 0%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	53,42	31,42	30,02	31,97	29,77	27,3	2,42	40,28	14,19
2	50,33	50,58	49,68	48,6	48,86	51,16	54,97	53,27	53,38
3	54,87	44,54	36,7	36,06	36,01	33,63	37,17	51,55	50,52
4	48,76	41,99	39,02	36,2	40,64	41,05	42,58	44,2	39,38
5	56,9	42,46	37,1	42,53	37,18	41,35	40,31	45,06	44,59
Prom	52,86	42,20	38,50	39,07	38,49	38,90	35,49	46,87	40,41
DE	3,31	6,93	7,11	6,53	7,00	8,99	19,68	5,40	15,62
EEM	1,49	3,11	3,19	2,93	3,14	4,03	8,83	2,42	7,01
Tratamiento 1%									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	52,09	33,36	33,05	37,53	38,32	38,18	3,42	51,74	36,14
2	65,36	62,50	58,95	58,75	61,13	61,43	60,87	70,43	68,69
3	64,89	60,94	58,22	50,38	59,38	58,99	61,59	62,43	56,5
4	40,49	31,98	26,97	30,02	29,02	30,08	29,24	24,72	21,6
5	52,96	41,77	35,79	35,8	35,62	35,34	36,41	37,91	36,59
Prom	55,16	46,11	42,60	42,50	44,69	44,80	38,31	49,45	43,90
DE	10,35	14,74	14,94	11,74	14,62	14,39	24,26	18,43	18,60
EEM	4,64	6,61	6,70	5,27	6,55	6,45	10,88	8,26	8,34

Cuadro 25 Valores absolutos de células positivas mononucleares de sangre periférica de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

SANGRE									
Tratamiento 0%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	58.02	28,17	23,99	23,09	23,13	25,18	4,77	1,21	24,9
2	85.55	51,25	54,1	41,79	57,54	48,23	74,8	59,14	63,68
3	53.16	55,55	23,97	51,79	32,59	47,07	36,58	57,6	44,38
4	64.71	46	31,31	43,42	44,54	51,55	55,26	55,83	35,34
5	49.73	32,15	22,83	31,3	31,19	35,65	33,04	35,7	36,92
Prom	62.23	42,62	31,24	38,27	37,84	41,54	40,89	41,89	41,04
DE	14,19	11,95	13,21	11,18	13,5	10,93	26,17	24,65	14,43
EEM	6,36	5,35	5,92	5,01	6,05	4,90	11,73	11,05	6,47
Tratamiento 1%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	2,41	36,03	2,76	0,92	2,02	1,1	10,95	0,85	28,4
2	24,06	21,54	20,1	19,81	20,97	21,09	22,02	23,27	21,68
3	61,94	53,9	54,43	1,95	56,14	55,53	58,34	57,13	54,67
4	15,43	13,63	12,59	12,38	12,53	12,74	13,05	13,07	12,65
5	42,32	32,47	28,67	28,05	22,48	28,61	9,92	27,46	27,54
Prom	29,23	31,52	23,71	12,62	22,83	23,81	22,86	24,36	28,98
DE	23,33	15,34	19,64	11,62	20,32	20,46	20,4	21	15,67
EEM	10,46	6,87	8,80	5,21	9,11	9,17	9,14	9,41	7,02

Cuadro 26. Valores absolutos de células positivas de tonsila periférica de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Tonsila									
Tratamiento 0%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	110,12	38,11	36,43	41,53	36,9	36,8	2,4	59,9	36,48
2	146,79	130,04	102,56	97,47	112,08	111,25	127,19	108,08	109,75
3	63,95	54,33	36,72	54,75	36,82	35,6	55,04	55,11	51,94
4	76,95	62,66	45,66	54,17	51,97	60,54	62,39	60,96	51,93
5	101,68	88,75	53,38	64,27	64,5	63,94	71,13	68,37	69,17
Prom	99,9	74,78	54,95	62,44	60,45	61,63	63,63	70,49	63,85
DE	32,11	35,9	27,52	21,18	31,09	30,67	44,49	21,54	28,14
EEM	14,39	16,09	12,34	9,49	13,94	13,75	19,95	9,65	12,61
Tratamiento 1%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	2,88	36,42	2,14	13,07	6,12	3,96	15,84	1,17	36,53
2	92,72	57,59	43,1	42,46	46,06	48,15	73,49	63,1	56,85
3	58,98	54,84	50,01	50,28	49,72	50,21	49,2	48,97	46,09
4	69,19	61,25	50,67	66,42	55,42	49,03	68,26	71,75	71,45
5	35,02	24,46	0,67	23,36	11,86	22,6	29,04	24,73	25,32
Prom	51,76	46,91	29,32	39,12	33,83	34,79	47,16	41,95	47,25
DE	34,28	15,78	25,66	21,25	23,01	20,72	24,75	28,91	17,85
EEM	15,37	7,07	11,50	9,52	10,31	9,29	11,09	12,96	8,00

Cuadro 27. Valores absolutos de células positivas de lavado bronquioalveolar de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Lavado Bronquioalveolar									
Tratamiento 0%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	13,28	10,5	10,88	10,99	11,7	10,4	1,3	13,26	1
2	15,54	13,95	12,59	13,97	14,63	12,57	14,94	15,56	12,75
3	7,11	6,51	6,19	5,78	6,26	6,11	0,56	6,9	7,07
4	7,45	7,19	6,64	7,03	6,92	6,87	7,19	7,22	3,04
5	5,4	5,11	4,55	3,28	2,91	3,3	2,9	4,91	1,07
Prom	9,75	8,65	8,17	8,21	8,49	7,85	5,38	9,57	6,78
DE	4,39	3,56	3,39	4,25	4,65	3,65	5,92	4,57	4,81
EEM	1,96	1,59	1,52	1,90	2,08	1,63	2,65	2,04	2,15
Tratamiento 1%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	0,46	1,9	0,28	0,5	2,35	0,21	1,3	3,1	10,18
2	39,08	31	18,05	17,85	19,96	22,31	21,35	26,13	21,02
3	7,7	7,42	6,85	7,05	7,55	7,43	7,79	7,66	7,56
4	21,59	18,61	13,29	7,82	14,45	14,36	12,31	15,38	15,26
5	14,36	11,37	11,22	9,62	10,5	10,97	10,57	11,32	10,18
Prom	16,64	14,07	9,94	8,57	10,96	11,06	10,68	12,73	12,84
DE	14,78	11,23	6,73	6,22	6,69	8,19	7,26	8,75	5,35
EEM	6,62	5,03	3,01	2,78	3	3,67	3,25	3,92	2,39

Cuadro 28. Valores absolutos de células positivas de lóbulo apical derecho de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Apical Derecho									
Tratamiento 0%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	29,71	17,59	14,99	15,97	16,91	16,84	0,89	28,37	15,98
2	19,38	17,73	16,83	15,93	15,66	17,55	18,97	18,69	18,21
3	28,33	24,29	18,43	2,3	16,28	13,98	15,24	28,59	28,47
4	26,34	22,51	21,1	20,73	21,62	21,42	22,17	23,45	20,86
5	23,63	20,73	13,54	18,93	18,8	16,35	19,58	22,12	20,92
Prome	25,48	20,57	16,98	14,79	17,85	17,23	15,37	24,24	20,89
DE	4,1	2,94	2,95	7,23	2,41	2,69	8,46	4,24	4,7
EEM	1,83	1,31	1,32	3,24	1,08	1,20	3,79	1,901	2,10
Tratamiento 1%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	74,98	61,46	61,25	65,7	64,78	62,12	5,9	76,82	66,45
2	46,28	44,06	40,87	40,72	42,09	42,94	42,8	49,55	47,7
3	43,37	34,57	37,52	30,58	38,47	33,49	38,54	37,32	35,38
4	28,74	25,77	23,3	24,93	23,92	24,76	27,11	29,9	27,93
5	35,52	31,83	31,49	31,51	30,43	31,64	31,91	32,62	31,03
Prom	45,78	39,54	38,89	38,69	39,94	38,99	29,26	45,24	41,7
DE	17,7	13,91	14,17	16,12	15,57	14,46	14,36	19,19	15,74
EEM	7,93	6,23	6,35	7,22	6,9	6,48	6,43	8,60	7,05

Cuadro 29. Valores absolutos de células positivas de lóbulo apical izquierdo de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Apical Izquierdo									
Tratamiento 0%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	35,69	21,6	18,2	19,64	20,34	18,94	18,23	1,3	18,49
2	13,11	11,75	10,06	9,83	9,94	10,79	11,48	12,22	11,42
3	18	15,98	14,33	13,01	13,56	13,26	0,21	17,38	16,06
4	39,2	35,49	35,35	32,72	33,93	33,77	35,72	35,64	32,99
5	21,25	17,02	14,54	16,15	15,37	15,59	15,83	16,44	15,99
Prom	25,45	20,36	18,5	18,27	18,63	18,47	16,3	16,61	18,99
DE	11,39	9,14	9,85	8,86	9,33	9,06	12,87	12,38	8,23
EEM	5,10	4,09	4,41	3,97	4,18	4,06	5,77	5,55	3,69
Tratamiento 1%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	27,58	8,9	9,1	11,76	10,48	15,01	0,31	25,41	11,87
2	44,6	41,88	38,61	39,81	41	41,83	41,43	47,01	45,18
3	43,84	39,12	38,43	4,6	37,24	37,91	39,04	39,22	36,85
4	14,44	12,03	9,4	9,4	10	10,13	10,54	14,66	12,65
5	27,53	23,41	20,97	19,78	16,09	21,21	20,41	21,84	21,39
Prom	31,6	25,08	23,31	17,11	22,97	25,22	22,34	29,63	25,59
DE	12,71	15,1	14,68	13,81	15	14	17,83	13,19	14,86
EEM	5,69	6,77	6,58	6,19	6,72	6,27	7,99	5,91	6,66

Cuadro 30. Valores absolutos de células positivas de lóbulo diafragmático derecho de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Diafragmático Derecho									
Tratamiento 0%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	29,82	17,39	14,84	15,63	15,61	14,42	0,46	26,24	16,69
2	30,66	29,54	28	27,27	29,33	28,71	36,29	31,96	33,01
3	20,82	20,05	18,69	17,79	19,91	19,31	24,59	21,99	22,53
4	40,25	30,21	33,2	32,71	30,37	29,18	33,82	36,22	28,64
5	16,01	12,97	10,96	14,39	12,61	13,26	13,7	16,57	15,88
Prom	27,51	22,03	21,14	21,56	21,57	20,98	21,77	26,6	23,35
DE	9,41	7,59	9,24	8,02	8	7,62	14,85	7,79	7,45
EEM	4,21	3,40	4,14	3,59	3,	3,41	6,65	3,49	3,34
Tratamiento 1%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	2,47	53,52	15,22	18,6	0,22	20,08	42,61	16,67	28,35
2	52,33	48,69	46,65	45,75	48,49	48,6	52,45	58,46	55,67
3	72,97	58,15	60,95	52,51	61,43	63,53	63,03	66	62,02
4	36,1	32,82	31,4	29,29	31,1	31,58	32,24	37,25	36,38
5	50,12	48,42	47,24	36,41	45,53	46,79	40,12	47,59	45,77
Prom	42,8	48,32	40,29	36,51	37,35	42,12	46,09	45,19	45,64
DE	26,1	9,54	17,48	13,36	23,38	16,72	11,9	19,31	13,72
EEM	11,70	4,27	7,83	16.370	10,48	7,49	5,33	8,65	6,15

Cuadro 31. Valores absolutos de células positivas de lóbulo diafragmático izquierdo de cada marcador de superficie (promedio, desviación estándar y el error estándar de la media) en millones de células de la población de linfocitos T, B y macrófagos, tratados con 0% y 1% de L-arginina.

Lóbulo Diafragmático Izquierdo									
Tratamiento 0%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	22,43	13,19	12,6	13,42	12,5	11,46	1,01	16,91	5,9
2	23,9	24,02	23,59	2308	23,2	24,3	26,11	25,3	25,35
3	18,65	15,14	12,47	12,26	12,24	11,43	12,63	17,52	17,17
4	27,79	23,93	22,24	20,63	23,16	23,39	24,27	25,19	22,44
5	21,33	15,92	13,91	15,94	13,94	15,5	15,11	16,89	16,72
Prom	22,82	18,44	16,96	17,07	17,01	17,22	15,83	20,36	17,53
DE	3,37	5,14	5,48	4,65	5,67	6,28	10	4,46	7,41
EEM	1,51	2,30	2,45	2,08	2,54	2,81	4,48	2	3,32
Tratamiento 1%									
(número de células de cada marcador)10 ⁶									
Animal	CD3	CD4	CD8	γ - δ	IgM	CD19	MHC-II	SWC-3	CD14
1	73,18	46,87	46,43	52,72	53,83	53,64	4,8	72,69	50,77
2	52,94	50,62	47,74	47,58	49,51	49,75	49,3	57,04	55,63
3	85,65	80,44	76,85	66,5	78,38	77,86	81,29	82,4	74,58
4	22,06	17,42	14,69	16,36	15,81	16,39	15,93	13,47	11,77
5	32,3	25,47	21,83	21,83	21,72	21,55	22,21	23,12	22,31
Prom	53,23	44,16	41,51	41	43,85	43,84	34,71	49,79	43,01
DE	26,73	24,64	24,58	21,24	25,49	25,19	30,76	30,29	29,59
EEM	11,98	11,04	11,02	9,52	11,43	11,29	13,79	13,58	13,26

Bibliografía

1. Herrera HG. Efecto de la adición en la dieta de L-Glutamina sobre la capacidad digestiva y el sistema inmune intestinal de lechón destetado precozmente (Tesis de Maestría) México, D.F. UNAM, 2004.
2. Dunsford BR. Conceptos modernos en la nutrición de lechones destetados. Temas de actualidad para la industria porcina. 1999
3. Kim, S. W, I. Osaka, W. L. Hurley, and Easter R. A. Mammary gland growth as influenced by litter size in lactating sows: impact on lysine requirement. *J Anim Sci* 1999 77: 3316-3321.
4. Kim. S. W and Easter R. A. Nutrient mobilization from body tissues as influenced by litter size in lactating sows. *J Anim Sci* 2001 79: 2179-2186.
5. Pluske, J. R., D. J. Hampson, and I. H. Williams. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: A review. *Livest. Prod. Sci.* 1997, 51:215–236.
6. King, R.H and Pluske,J.R. Nutritional management of the pig in preparation for weaning. In:Weaning the pig. First published: Wageningen Academic Published, 2003:37
7. Dunshea, FR., D.K Kerton, Cranwell P.D., Campbell R.G., Mullan B.P., King R.H., Pluske J.R. Dietary lysine requeriments of heavy and light pigs weaned at 14 days of age. *Aust Agric Res.* 2000: 51:531-9
8. Whittemore, CT. and D.M. Green. Growth of the young weaned pig. In: M.A. Varley and J. Wiseman (editors). *The weaner pig: Nutrition and Management.* CAB International, 2001:pp 1-15
9. Dunshea, FR., D.K Kerton, P.J. Easeon, J.R. Pluske and T. Moyes. Diets containing high. quality animal proteins increase growth of early-weaned. Pigs. *Australian Journal of agricultural research* 2002:53, 779-784.
10. Wu G., C.J. Meininger, D.A Knabe, F.W. Bazer, and J. M. Rhoads. Arginine nutrition in development, health and disease *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000:3:59-66
11. Wu G, Darrell A. Knabe and Sung Woo Kim. Arginine nutrition in neonatal pigs. *J. Nutr.* 2004:134: 2783S–2790S
12. Ball R.O. Amino acid requeriments of piglets: Implications for early weaning. University of Alberta, Departament of agricultural, Food & Nutritional Science. 2000.
13. Forbes, J.M. Voluntary food intake and diet selection in farm animals. CABINTERNATIONAL 1995
14. Ensminger and Perry, 1997. Cow-Calf system; Stockers: Stockers (feeder) Cattle. In: *Beef Cattle Science.* Seven edition.
15. Pluske, J. R., I.H. Williams and F.X. Aherne, 1995. Nutrition of the neonatal pig. In: M.A. Varley (editors), *The neonatal pig Development and Survival.* CAB International, Wallingford, Oxon., pp. 187-235.
16. Robert F. P. Bertolo, Paul B. Pencharz and Ronald O. Ball. Organ and Plasma Amino Acid Concentrations Are Profoundly Different in Piglets Fed Identical Diets via Gastric, Central Venous or Portal Venous Routes *J. Nutr.* 2000:130: 1261-1266
17. Jiang R., Chang X., Stoll B., Ellis K. L., Shypailo R.J., weaver E., Campbell J., Burrin D.G. Dietary plasma protein is used more efficiently

- than extruded soy protein for lean tissue growth in early weaned pigs. *J. Nutr* 2000; 130:2016-2019
18. Baker, D.H.. *Ideal Protein For Swine and Poultry*. Biokowa Technical Review No.4. Biokowa, Inc., Chasterfield, Mo., U.S.A. 1994: PP 16.
 19. ¹⁹, J.P.F. *Aminoacids in animal nutrition*. Second ed. CAB International 2003.
 20. Wu, G., and D. A. Knabe. Arginine synthesis in enterocytes of neonatal pigs. *Am. J.Physiol.* 1995 269:R621-R629.
 21. Wu G, Paula K. Davis, Nick E. Flynn, Darrell A. Knabe and J. Todd Davidson. Endogenous synthesis of arginine plays an important role in maintaining arginine homeostasis in postweaning growing. Pigs. *J. Nutr* 1997;127: 2342–2349.
 22. Guilhermet, R. G. 1996. Fonctions nutritionnelles et métaboliques de l'arginine. *INRA Prod. Anim.* 1996;9:265–272.
 23. Mavromichalis I, TM Parr, VM Gabert and DH Baker. True ileal digestibility of amino acids in sow's milk for 17-day-old pigs. *J. Anim. Sci* 2001;79:707-713.
 24. Field CJ, Johnson I, Pratt VC. Glutamine and arginine: immunonutrients for improved health. *Med Sci Sports Exerc.* 2002 Jul;32(7 Suppl):S377-388.
 25. Hernández J.C., Borbolla A.G. y Vega-López M.A. Effect of dietary glutamina on small intestinal CD2+ cells in early weaned pigs. *Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society*, Ames, Iowa. 2002.
 26. Tong BC, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginina. *Mini Rev Med Chem* Oct; 2004;4(8):823-32.
 27. Potenza M.A., Nacci C. and Mitolo-Chieppa D. Immunoregulatory Effects of L-Arginine and Therapeutical Implications *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 2001, 1, 67-77.
 28. Ochoa JB, Strange J, Kearney P, Gellin G, Endean E, Fitzpatrick E. Effects of L-arginine on the proliferation of T lymphocyte subpopulations. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2001:Jan-Feb;25(1):23-29.
 29. Banzal V. Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003;Mar 6(2) 223-228
 30. Bernad AC, Mistry SK, Morris SM Jr, O'Brien WE, Tsuei BJ, Maley ME, Shirley LA, Kearney PA, Boulanger BR, Ochoa JB. Alterations in arginina metabolic enzymes in trauma. *Shock* 2001;Mar; 15(3):215-219.
 31. Li P, Yin YL, Li D, Woo Kim S, Wu G. Amino acids and immune function. *Br J Nutr* 2007 Aug 98(2): 237-52.
 32. Deusdelia Teixeira de Almedia, Maria Luisa Santaolara Ayora, Eulalia Alonso Iglesias. La arginina en su contexto metabólico y fisiológico. *Acta Bioquím. Cin Latinoam* 2003; 37 (2): 165-179.
 33. Evoy D, Lieberman MD, Fahey TJ 3rd, Daly JM. Immunonutrition: the role of arginine. *Nutrition.* 1998 Jul-Aug;14(7-8):611-7.
 34. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology [review]. *Pharmacol Rev* 1991; 43 (2): 109-42.
 35. Jeremy Appleton, ND. Arginine:clinical potencial of a semi-essential amino acid. *Alternative medicine review.* 2002;7(6) 512-19.

36. Mori Masataka and Tomomi Gotoh. Arginine Metabolic Enzymes, Nitric Oxide and Infection. *J.Nutr.* 2004;134: 2820S–2825S.
37. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond [review]. *Biochem J* 1998; 15: 336 (Pt 1):1-17.
38. Donald JA, Broughton BR. Nitric oxide control of lower vertebrate blood vessels by vasomotor nerves. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005 Oct;142(2):188-197.
39. Reyes AA, Karl IE, Klahr S. Role of arginine in renal disease. [review]. *Am J Physiol* 1994; 267 (3 PT 2):F331-346.
40. Larsson H, Ahrén B. Effects of arginine on the secretion of insulin and islet amyloid polypeptide in humans. *Pancreas* 1995; 11 (2): 201-205.
41. Barbul A, Sisto DA, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine stimulates lymphocyte immune response in healthy human beings. *Surgery.* 1981 Aug; 90(2):244-51.
42. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide [review]. *Free Rad Biol Med.*1998; 25 (4-5): 434-56.
43. Stuart-Smith K. Demystified. Nitric oxide [review]2002; 55 (6): 360-6
44. Culotta E, Koshland DE Jr. NO news is good news. *Science.* 1992 Dec 18;258(5090):1862-1865.
45. Pezzuto L, Bohlen HG. Extracellular arginine rapidly dilates in vivo intestinal arteries and arterioles through a nitric oxide mechanism. *Microcirculation.* 2008 Feb;15(2):123-135.
46. 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 Mar; 102(3):1281-1288.
47. Mateo, R. D., G. Wu, F. W. Bazer, J. C. Park, I. Shinzato, and S. W. Kim. 2007. Dietary arginine supplementation enhances gestation performance in gilts. *J. Nutr.* 137:652-656.
48. Catz SD, Carreras MC, Poderoso JJ. Nitric oxide synthase inhibitors decrease human polymorphonuclear leukocyte luminol-dependent chemiluminescence. *Free Radic Biol Med.* 1995 Dec;19(6):741-8.
49. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997; 48:489-509.
50. Colasanti M, Suzuki H. The dual personality of NO [review]. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21(7): 249-252.
51. Torreilles J, Guérin CM. Does nitric oxide stress exist?[Review]. *C R Séances Soc Biol Fil* 1995; 189 (3):389-400.
52. Butler AR, Rhodes P. Chemistry, analysis, and biological roles of S-nitrosothiols [review]. *Anal Biochem.*1997; 249 (1): 1-9.
53. De Berrazueta JR. El óxido nítrico: un gas intercelular con acciones fisiológicas y tóxicas. Nuevas perspectivas. *Rev Esp Cardiol* 1994; 47: 199-208.
54. Rodeberg DA, Chaet MS, Bass RC, Arkovitz MS, Garcia.VF. Nitric oxide: An overview [review]. *Am J Surg* 1995;170 (3): 292-303.
55. Halász, A and A. Baráth. 1998. Biogenic amines the chemical compounds of special biological activity. In: S. Bardócz, A White and G. Hajós. (editor), Biogenically active amines in food. Volume II; Metabolic effects of Biologically Active amines in Food. Luxembourg: Office for Pfficial Publications of the European Communities. Pp. 1-7

56. 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 Aug 1;171(3):1232-1239
57. Guo X, Rao JN, Liu L, Zou T, Keledjian KM, Boneva D, Marasa BS, Wang JY. Polyamines are necessary for synthesis and stability of occludin protein in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Jun; 288(6):G1159-1169.
58. Tabor CW, Tabor H. Polyamines [review]. *Annu Rev Biochem* 1984; (53): 747-790
59. Pegg AE. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *J Biochem* 1986; 234 (2):249-262.
60. Seiler N. Polyamine metabolism [review]. *Digestión.*1990; 46 (Suppl 2): 319-330.
61. Langkamp-Henken B, Johnson LR, Viar MJ, Geller AM, Kotb M. Differential effect on polyamine metabolism in mitogen- and superantigen-activated human T-cells. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Oct 23;1425(2):337-347.
62. Seiler N, Raul F. Polyamines and the intestinal tract. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2007;44(4):365-411
63. Johnson, L.R and S.A. McCormack. 1994. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. In: L.R Johnson (editor), *Physiology of the gastrointestinal tract.* Raven Press, New York. Pp 611-641.
64. Blachier, F. Intestinal polyamines. In: J.P Laplace, C. Fevrier and A. Barbeau (editor), *Digestive Physiology in pigs.* Proceedings of the VII Symposium. Saint Malo, France EAAP publication 1997: 88, 222-233.
65. Morris DR, Marton LJ. editores. *Polyamines in biology and medicine.* New York: Marcel Dekker; 1981.
66. Jeevanandam M, Ali MR, Young DH, Schiller WR. Polyamine levels as biomarkers of injury response in polytrauma victims. *Metabolism* 1989; 38 (7): 625-30.
67. Levaas E. Hypothesis: Spermine may be an important epidermal antioxidant [review]. *Med Hypotheses* 1995; 45 (1): 59-67.
68. Sigal, R.K, Shou, J, and Daly J.M. Parenteral arginine infusion in humans: nutrient substrate or pharmacologic agent. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1992 16(5) 423-428.
69. Efron D, Barbul A. Role of arginine in immunonutrition. *Gastroenteral.* 2000;35 (suppl12) 20-23
70. Popovic PJ, Zeh HJ 3rd, Ochoa JB. Arginine and immunity. *J Nutr.* 2007 Jun;137(6 Suppl 2):1681S-1686S
71. Tachibana K, Mukai K, Hiraoka I, Moriguchi S, Takama S, Kishino Y. Evaluation of the effect of arginine-enriched amino acid solution on tumor growth. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1985 Jul-Aug;9(4):428-434
72. Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery.* 1990 Aug;108(2):331-6; discussion 336-7
73. Cerra, F.B., Lehman, S., Konstantinides, N., Konstantinides, F., Shronts, E.P. and Holman, R. Effect of enteral nutrient on in vitro tests of immune function in ICU patients: a preliminary report. *Nutrition*, 1990, 6(1), 84. (discussion 96-98).

74. Taheri F, Ochoa JB, Faghiri Z, Culotta K, Park HJ, Lan MS, Zea AH, Ochoa AC. L-Arginine regulates the expression of the T-cell receptor zeta chain (CD3zeta) in Jurkat cells. *Clin Cancer Res.* 2001 Mar;7(3 Suppl):958s-965s.
75. Wouter J. de Jonge, Karin L. Kwinkkers, Anje A. te Velde, Sander J.H. van Deventer, Martijn A. Nolte, Reina E. Mebius, Jan M. Ruijter, Marinus C. Lamers, and Wouter H. Lamers. Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *J Clin Invest.* 2002 Nov;110(10):1539-1548
76. Peng X, You ZY, Yan H, Wang P, Zhou X, Liu J, Wang SL. [Comparative study on the influence of arginine hydrochloride and arginine acetate on the immune function and acid-base balance in rabbits with severe burns]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2005 Aug;21(4):262-5
77. LeBien TW. Arginine: an unusual dietary requirement of pre-B lymphocytes? *J Clin Invest.* 2002 Nov; 110(10): 1411-1413.
78. De Jonge WJ, Kwinkkers 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 Nov;110(10): 1539-1548.
79. Pluskle, JR and Dong, GZ. 1998. Factors influencing the utilisation of colostrum and milk. In: M.W.A. Versteng, P.J. Moughan and J.W. Schrama (editors), *The lactating Sow.* Wageningen Pers, Wageningen, pp. 45-70.
80. Hampson DJ, Kidder DE. Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. *Res Vet Sci.* 1986 Jan;40(1):24-31.
81. Zijlstra RT, Whang KY, Easter RA, Odle J. Effect of feeding a milk replacer to early-weaned pigs on growth, body composition, and small intestinal morphology, compared with suckled littermates. *J Anim Sci.* 1996 Dec;74(12):2948-2959
82. Makkink CA, Negulescu GP, Qin G, Verstegen MW. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets. *Br J Nutr.* 1994 Sep; 72(3):353-368.
83. Xu RJ. Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: a review. *Reprod Fertil Dev.* 1996;8(1):35-48
84. Rantzer D, Kiela P, Thaela MJ, Svendsen J, Ahrén B, Karlsson S, Pierzynowski SG. Pancreatic exocrine secretion during the first days after weaning in pigs. *J Anim Sci.* 1997 May;75(5):1324-1331.
85. Medel. P, Latorre. M^a A y Mateos G.G. Nutrición y alimentación de lechones destetados precozmente XV Curso de Especialización. *Avances en nutrición y alimentación animal.* 1999
86. Tokach MD, Pettigrew JE, Johnston LJ, Overland M, Rust JW, Cornelius SG. Effect of adding fat and (or) milk products to the weanling pig diet on performance in the nursery and subsequent grow-finish stages. *J Anim Sci.* 1995 Nov; 73(11):3358-3368.
87. DR. Carlos campabadal Ph. D. Alimentación del lechón al destete. Centro de investigaciones en nutrición animal Dr. Héctor navarro González asociación americana de soya. 1996.

88. Whang, K. Y, McKeith, F. K, Kim, S. W. and Easter R. A. Effect of starter feeding program on growth performance and gains of body components from weaning to market weight in swine. *J Anim Sci* 2000 78: 2885-2895.
89. Remillard RL, Dudgeon DL, Yardley JH. Atrophied small intestinal responses of piglets to oral feedings of milk. *J Nutr.* 1998 Dec; 128(12 Suppl):2727S-2729S.
90. Wolter, B. F, Ellis, M, Corrigan, B.P, DeDecker, J.M, Curtis, S. E, Parr, E. N, and Webel D. M. Impact of early postweaning growth rate as affected by diet complexity and space allocation on subsequent growth performance of pigs in a wean-to-finish production system. *J. Anim. Sci.* 2003. 81:353-359
91. Boe, K. The process of weaning in pigs: when the sow decides. *Applied Animal Behavioural Science* 1991:30, 47-59.
92. Martin P. The meaning of weaning. *Anim Behav.* 1984;32:1257-1558
93. Ribot A. El lechón: destete y transición. En: Buxadé C, editor. *Porcinocultura intensiva y extensiva. Zootecnia Bases de Producción Animal. Toma VI. España:MundiPrensa, 1996:171-179*
94. Nabuurs MJ, Hoogendoorn A, van der Molen EJ, van Osta AL. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in The Netherlands. *Res Vet Sci.* 1993 Jul;55(1):78-84
95. McCracken, K.J. and D. Kelly. Development of digestive function and nutrition/disease interactions in the weaned pig. In: Farrell, D.J, editors. *Recent advances in animal nutrition in Australia.* Department of Biochemistry, Microbiology and Nutrition, University of New England, Armidale, Australia 1993 pp.182-192
96. McCracken, B.A, M.E. Spurlock, M.A. Roos, F.A. Zuckerman and H.R. Gaskins. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *Journal of Nutrition.* 1999:129, 613-619.
97. Dantzer Robertr and Pierre Mornede. Stress in farm animals: a need for reevaluation. *Journal of Animal Science.*1983;Vol. 57, No. 1
98. Broussard, S. R, Zhou, J. H, Venters, H. D, Bluthe, R. M, Freund, G. G, Johnson R. W, Dantzer R., and Kelley K. W. At the interface of environment-immune interactions:Cytokine and growth-factor receptors. *J. Anim. Sci.*2000: 79(E. Suppl.):E268–E284
99. Lallès Jean-Paul, Paolo Bosi, Hauke Smidt and Chris R. Stokes. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society (2007), 66: 260-268 Cambridge University Press*
100. Bark, L. J, T. D. Crenshaw, and V. D. Leibbrandt. The Effect of Meal Intervals and Weaning on Feed Intake of Early Weaned Pigs. *J Anim Sci* 1986 62: 1233-1239
101. Pluske, J.R and Williams, I. H. Split weaning increases the growth of light piglets during lactation. *Australian Journal of Agricultural Research.* 1996:47, 513-523
102. Cranwell, P.D. Development of the neonatal gut and enzyme systems. In: Varley M.A. (editor). *The neonatal pig: Development and survival.* UK Cab International. 1995:99-145
103. Dritz, S. S, Owen, K. Q, Nelssen, J. L, Goodband, R. D, and Tokach M. D. Influence of weaning age and nursery diet complexity on

- growth performance and carcass characteristics and composition of high-health status pigs from weaning to 109 kilograms. *J Anim Sci* 1996 74: 2975-2984.
104. Britt JH, Almond GW, Flowers WL. Disease of the reproductive system. In: Taylor JD, Barbara E. Straw EB, D'Allaire S, William L. Mengelin LW, Editors. *Diseases of swine 8th AMES, IOMA U.S.A OIWA STATE INIVERSITY PRESS* 2000; 883-912.
 105. Batista, L. 1997. Evaluación de la productividad de un sistema de destete temprano a través de la informática. Seminario sobre actualidades del destete temprano: La Piedad Michoacán. Julio 25-26:3-7
 106. Mahan, D. C. Effect of weight, split-weaning, and nursery feeding programs on performance responses of pigs to 105 kilograms body weight and subsequent effects on sow rebreeding interval. *J Anim Sci* 1993 71: 1991-1995
 107. Drum, S.D, Walker, R.D, Marsh, M. M. Mellencamp, and V. L. King. 1998. Growth performance of segregated early-weaned versus conventionally weaned pigs through finishing. *Swine Health Prod.* 1998;6:203–210
 108. Chiba, L. I, Ivey, H. W, Cummins, K. A. and Gamble B. E. Growth performance and carcass traits of pigs subjected to marginal dietary restrictions during the grower phase. *J Anim Sci* 1999 77: 1769-1776
 109. Hessel, E. F., Reiner, K. s, and Van den Weghe H. F. A. Socializing piglets before weaning: Effects on behavior of lactating sows, pre- and postweaning behavior, and performance of piglets. *J Anim Sci* 2006 84: 2847-2855.
 110. Worobec E.K, Duncan I.J.H.; Widowski T.M. The effects of weaning at 7, 14 and 28 days on piglet behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, Volume 62, Number 2, 15 February 1999. pp. 173-182(10)
 111. Holland, R.E. Some infectious causes of diarrhea in farm animals. *Clinical Microbiology reviews*. 1990;3, 345-375
 112. Stokes, C.R. and Bourne. 1989. Mucosal immunity. In: Halliwell, R.E.W. and N.T. Gorman (editors). *Veterinary Clinical Immunology*. W.B. Saunders Company, USA.;pp. 164-192
 113. Moeser AJ, Ryan KA, Nighot PK, Blikslager AT. Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Aug;293(2):G413-G421.
 114. Sarradell J, Pérez AM, Comba E, Pereira N, Anthony L, Andrada M, Segalés J. [Pathological findings in pigs affected by the postweaning multisystemic wasting syndrome in Argentina] *Rev Argent Microbiol*. 2004 Jul-Sep;36(3):118-124
 115. Pass, A.D, Bolton, R.B. 1993. Aparato respiratorio. Principios de clinopatología de medicina veterinaria. Ed. Acribia. S.A.
 116. Morilla González Antonio. 2005. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. 2^a. Ed. México:Editorial El Manual Moderno
 117. Gaskin, H.R y Kelley, K.W. 1995. Inmunología y mortalidad neonatal. En: *El lechón recién nacido*. Ed. Acribia S.A. España.:39

118. Guzmán, I.P. Procesos respiratorios en el cebo porcino: factores predisponentes y etiológicos. *Ciencias Veterinarias*. Septiembre 2001
119. Wolter, B. F, Ellis, M, Curtis, S. E, Parr, E. N, and Webel D. M. Group size and floor-space allowance can affect weanling-pig performance. *J Anim Sci* 2000 78: 2062-2067
120. Wolter B. F, Ellis, M, Curtis, Augspurger, S. E. N. R, D. N. Hamilton, E. N. Parr, and Webel D. M. Effect of group size on pig performance in a wean-to-finish production system. *J. Anim. Sci.* 2001. 79:1067–1073.
121. Christensen, G, Sorensen, V and Mousing, J. 2006. Diseases of the respiratory System. In: *Diseases of swine*. Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengelin, W.L., and Taylor, D.J. (editors). Iowa State University Press. 9th Ed.
122. Morrison, R.B, Hilley, H.D and Leman, A.D. Comparison of methods for assessing the prevalence and extent of pneumonia in market weight swine. *Can Vet J.* 1985;26:381-384
123. Heilmann, P, Müller, G and Finterbusch, L. Lobäre deposition radioaktiv markierter *Pasteurella multocida* aereosole in den lungen von ferkeln und kälber. *Arch Exper Vet Med.* 1988;42:490-501
124. Guyton, Arthur C. 2002. *Manual de fisiologia medica* /Arthur C. Guyton, John E. Hall. Madrid : McGraw-Hill Interamericana.
125. Done, S.H. Some aspects of respiratory defence with especial reference to immunity. *Pig Vet Soc Proc.* 1988;20:31-60
126. Neumann, R, Leonhardt, W, Ballin, A, Mehlhorn, G, and Diecke, S. Die methode der intravitales lungenuln beim Schwein-Gewinnung und Differenzierung von Alveolarzellen. *Arch Exp Vet Med.* 1985;39:525-534
127. Roitt's 2001. *Essential immunology* /Ivan M. Roitt, Peter J. Delves Malden, Massachusetts. Blackwell Science.
128. Stanley, H.D. 2000. The environment, micro-organisms, anatomy and cellular defence of the respiratory tract: an epithelial battleground. The 16th International Pig Veterinary Society Congreso, Melbourne, Australia. Sept.17-20
129. Dee SA and Joo HS. Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. *Vet Rec.* 1994 Jul 2;135(1):6-9
130. Moore, C. Clinical presentation of mystery swine disease in the growing pig. In *Proc Mystery Swine Dis Comm Meet Livest Conserv Inst.* Denver, Colo. 1990. pp173-175
131. Loula, T. Mystery pig disease. *Agri-practice.*1991;12:23-34
132. Blaha T. Epidemiological investigations into PEARs in Germany: Consequences in fattening pigs. *Proc Int Congr Pig Vet Soc.* 1992;12:126
133. Keffaber, K, Stevenson, G, Van Alstine, W, Kanitz, C, Harris, L, Gorcyca, D, Schlesinger, K, Schultz, R, Chladek, D and Morrison, R. SIRS virus infection in nursery/grower pig. *Am Assoc Swine Pract Newsl.* 1992;4:38-39
134. White, M e C. The clinical signs and symptoms of blue-eared pig disease (PRRS). *Pig Vet J.* 1992;28:62-68.

135. Halbur PG, Paul PS, Meng XJ, Lum MA, Andrews JJ, Rathje JA. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J Vet Diagn Invest.* 1996 Jan;8(1):11-20
136. Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol. J.L.M., Ter Laak.E.A., Bloemraad, K., De Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., Den Besten, A., Wagenaar, F., *et al.* Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet Q.* 1991;13:121-130
137. Goyal SM. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 1993 Oct;5(4):656-64
138. Voicu IL, Silim A, Morin M, Elazhary MA. Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. *Vet Rec.* 1994 Apr 16;134(16):422-3
139. Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol.* 1995 Jul;32(4):361-373
140. Rossow KD, Benfield DA, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Collins JE. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol.* 1996 Sep;33(5):551-556
141. Molitor, T.W., Xiao, JÇ and Choi, C.S. PRRS virus infection of macrophages: Regulation by maturation and activations state. In Proc 27th Annu Meet Am Assoc Swine Pract. 1996. pp 563-569
142. Choi, C., Gustafson, K., chinsakchai, S., Hill, H and Molitor, T. Heterogeneity of porcine alveolar macrophage subpopulations: Immune functions and susceptibility to PEARs virus. *Proc Int Congr Pig Vet Soc.* 1994;13:97
143. Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 1995 Jan;7(1):3-16
144. Wannemuehler, M.W., Minino, F.C and Ross, R.F. Immune supresión of *Mycoplasma hyopneumoniae* infected swine. *Proc Int Org Mycoplasma.* 1988;7:72
145. Weng, C.N and Lin, W.H. Cell-mediated immune response in pig after *Mycoplasma hyopneumoniae* infection: Effect of immunosuppression on pneumonia in pig induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* . *J.Chin Soc Vet Sci* 1988;14:276-273
146. Messier S. and Ross RF. Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res.* 1990 Jan;51(1):52-58.
147. Vega-López MA. Sistema inmune intestinal porcino. *Ciencia Veterinaria.* 6-1994:145-168
148. Stokes CR, Haverson K, Bailey M. Antigen presenting cells in the porcine gut. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996 Nov;54(1-4):171-177
149. Bikker P, Dirkzwager A, Fledderus J, Trevisi P, le Huërrou-Luron I, Lallès JP, Awati A. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal

- characteristics in newly weaned piglets. *J Anim Sci.* 2006 Dec;84(12):3337-3345
150. Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol.* 2007 May;102(5):1178-1186
 151. Charley B, Riffault S, Van Reeth K. Porcine innate and adaptive immune responses to influenza and coronavirus infections. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1081:130-136
 152. Buda A, Sands C, Jepson MA. Use of fluorescence imaging to investigate the structure and function of intestinal M cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005 Jan 2;57(1):123-134
 153. Snoeck V, Peters IR, Cox E. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res.* 2006 May-Jun; 37(3):455-67.
 154. Bianchi AT, Scholten JW, Moonen Leusen BH, Boersma WJ. Development of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pig as a function of organ, age and housing. *Dev Comp Immunol.* 1999 Sep;23(6):511-520
 155. Pabst R, Binns RM. The immune system of the respiratory tract in pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 1994 Oct;43(1-3):151-6.
 156. Whitehead BF, Stoehr C, Finkle C, Patterson G, Theodore J, Clayberger C, Starnes VA. Analysis of bronchoalveolar lavage from human lung transplant recipients by flow cytometry. *Respiratory Medicine* (1995) 89, 27-34.
 157. Segalés J, Alonso F, Rosell C, Pastor J, Chianini F, Campos E, López-Fuertes L, Quintana J, Rodríguez-Arriola G, Calsamiglia M, Pujols J, Domínguez J, Domingo M. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol.* 2001 Aug 30;81(1-2):37-44.
 158. Tingstedt JE, Tornehave D, Lind P, Nielsen J. Immunohistochemical detection of SWC3, CD2, CD3, CD4 and CD8 antigens in paraformaldehyde fixed and paraffin embedded porcine lymphoid tissue. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003 Aug 15;94(3-4):123-32.
 159. Silflow RM, Degel PM, Harmsen AG. Bronchoalveolar immune defense in cattle exposed to primary and secondary challenge with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005 Jan 10;103(1-2):129-139.
 160. Ait-Ali T, Wilson AD, Westcott DG, Clapperton M, Waterfall M, Mellencamp MA, Drew TW, Bishop SC, Archibald AL. Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated Swine alveolar macrophages. *Viral Immunol.* 2007 Spring;20(1):105-118.
 161. Tsegaye A, Wolday D, Otto S, Petros B, Assefa T, Alebachew T, Hailu E, Adugna F, Measho W, Dorigo W, Fontanet *al*, van Baarle D, Miedema F. Immunophenotyping of blood lymphocytes at birth, during childhood, and during adulthood in HIV-1-uninfected Ethiopians. *Clin Immunol.* 2003 Dec;109(3):338-46.
 162. Agostini C, Zambello R, Trentin L, Cerutti A, Bulian P, Crivellaro C, Cipriani A, Semenzato G. Gamma delta T cell receptor subsets in the

- lung of patients with HIV-1 infection. *Cell Immunol.* 1994 Jan;153(1):194-205
163. Braun RK, Sterner-Kock A, Kilshaw PJ, Ferrick DA, Giri SN. Integrin alpha E beta 7 expression on BAL CD4+, CD8+, and gamma delta T-cells in bleomycin-induced lung fibrosis in mouse. *Eur Respir J.* 1996 Apr;9(4):673-9
 164. Pabst, R.M Geist, H.J. Rothkötter and F.J. Fritz. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunology.* 1988;64:539-544
 165. Bianchi AT, van der Heijden PJ. Antigen presenting cells and B-cells in the pig. *Vet Immunol Immunopathol.* 1994 Oct;43(1-3):63-68
 166. Rothkötter, H.J., S. Möllhoff and R. Pabst. The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs. *Scandinavian Journal of Immunology.* 1999;50:31-38
 167. Vega-López MA, Bailey M, Telemo E, Stokes CR. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995 Feb;44(3-4):319-27
 168. Vega-López MA, Arenas-Contreras G, Bailey M, González-Pozos S, Stokes CR, Ortega MG, Mondragón-Flores R. Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. *Dev Immunol.* 2001;8(2):147-158.
 169. Rothkötter HJ, Ulbrich H, Pabst R. The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatr Res.* 1991 Mar;29(3):237-242
 170. Whary MT, Zarkower A, Confer FL, Ferguson FG. Age-related differences in subset composition and activation responses of intestinal intraepithelial and mesenteric lymph node lymphocytes from neonatal swine. *Cell Immunol.* 1995 Jul;163(2):215-221
 171. Binns RM, Duncan IA, Powis SJ, Hutchings A, Butcher GW. Subsets of null and gamma delta T-cell receptor+ T lymphocytes in the blood of young pigs identified by specific monoclonal antibodies. *Immunology.* 1992 Oct;77(2):219-227
 172. Vega-López MA, Telemo E, Bailey M, Stevens K, Stokes CR. Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet Immunol Immunopathol.* 1993 Jun;37(1):49-60
 173. Zuckermann FA, Gaskins HR. Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. *Immunology.* 1996 Mar;87(3):493-499
 174. Zuckermann FA. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999 Dec 15;72(1-2):55-66
 175. Solano-Aguilar GI, Vengroski KG, Beshah E, Douglass LW, Lunney JK. Characterization of lymphocyte subsets from mucosal tissues in neonatal swine. *Dev Comp Immunol.* 2001 Apr;25(3):245-263
 176. Chu RM, Glock RD, Ross RF, Cox DF. Lymphoid tissues of the small intestine of swine from birth to one month of age. *Am J Vet Res.* 1979 Dec;40(12):1713-1719

177. Bianchi AT, Zwart RJ, Jeurissen SH, Moonen-Leusen HW. Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992 Aug;33(3):201-221
178. Stokes C.R, M.A. Vega-López, M. Bailey, E. Telemo and B.G. Miller, 1992. Immune development in the gastrointestinal tract of the pig. In: Varley, M.A., P.E.V. Williams and T.L.J. Lawrence (editors), *Neonatal Survival and Growth*. British society of Animal Production, Occasional Publication 15, 9-12.
179. Rothkötter HJ, Kirchhoff T, Pabst R. Lymphoid and non-lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs. *Gut.* 1994 Nov; 35(11):1582-1589.
180. Pabst R, Rothkötter HJ. Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999 Dec 15;72(1-2):167-73.
181. Bourne FJ, Curtis J. The transfer of immunoglobins IgG, IgA and IgM from serum to colostrum and milk in the sow. *Immunology.* 1973 Jan;24(1):157-162
182. Brown PJ, Bourne FJ. Development of immunoglobulin-containing cell populations in intestine, spleen, and mesenteric lymph node of the young pig, as demonstrated by peroxidase-conjugated antisera. *Am J Vet Res.* 1976 Nov;37(11):1309-1314
183. Miller, B and C. Stokes. 1994. The neonatal and postweaned pig. In: Cole, D.J.A., J. Wiseman and M.A. Varley (editors), *Principles of Pig Science*. Nottingham University Press, UK, pp. 75-84
184. Stokes CR, Bailey M, Wilson AD. Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Vet Immunol Immunopathol.* 1994 Oct;43(1-3):143-50
185. Murphy TF, Sethi S. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1067–1083.
186. Nicotra B, Rivera M, Luman JI, Wallac RJ. *Branhamella catarrhalis* as a lower respiratory tract pathogen in patients with chronic lung disease. *Arch Intern Med* 1986; 146:890–893.
187. Butt H, Clancy RL, Cripps AW, et al. Bacterial colonization of the respiratory tract in chronic bronchitis. *Aust NZ J Med* 1990;20:35–38.
188. Kyd JM, Cripps AW. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: challenges in developing a vaccine, *J. Biotech.* 1999; Aug 20;73(2-3):103-8
189. Kyd J, Cripps A. Identifying vaccine antigens and assessing delivery systems for the prevention of bacterial infections, *J. Biotech.* 2000; Sep 29;83(1-2):85-90
190. Buret A, Dunkley M, Clancy RL, Cripps AW. The protective role of pulmonary neutrophils in rats intestinally immunized with *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mestecky J, et al., editors. *Advances in Mucosal Immunology*. New York: Plenum Press, 1995:765–79.
191. Foxwell AR, Kyd JM, Cripps AW. Kinetics of inflammatory cytokines in the clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* from the lung. *Immunol Cell Biol* 1998;76:556–559.
192. Flynn S, Toellner KM, Raykundalia C, Goodall M, Lane P. CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand,

- instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *J Exp Med* 1998;188:297–304.
193. Toellner K-M, Luther SA, Sze DM-Y, et al. T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. *J Exp Med* 1998; 187:1193–1204.
 194. Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today* 1995; 16:374–379.
 195. Kelso A, Groves P, Ramm L, Doyle AG. Single cell analysis by RT-PCR reveals differential expression of multiple type 1 and 2 cytokine genes among cells within polarized CD4₊ T cell populations. *Int Immunol* 1999; 11:617–621.
 196. Snapper CM, Peschel C, Paul WE. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B lymphocytes stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1988;140:2121–2127.
 197. Snapper CM, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1987;139:10–7.
 198. Buret A, Dunkley ML, Pang G, Clancy RL, Cripps AW. Pulmonary immunity to *Pseudomonas aeruginosa* in intestinally immunized rats: roles of alveolar macrophages, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1a. *Infect Immun* 1994;62: 5335–43.
 199. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787–793.
 200. Tsukaguchi K, Lange BD, Boom WH. Differential regulation of IFN-g, TNF-a and IL-10 production by CD4₊abTCR₊ T cells and Vg2₊gd T cells in response to monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*-H37Ra. *Cell Immunol* 1999;194:12–20.
 201. Cerwenka A, Morgan TM, Dutton RW. Naive, effector and memory CD8 T cells in protection against pulmonary influenza virus infection: homing properties rather than initial frequencies are crucial. *J Immunol* 1999; 163:5535–5543.
 202. Cummins AG, Munro GH, Miller HR, Ferguson A. Association of maturation of the small intestine at weaning with mucosal mast cell activation in the rat. *Immunol Cell Biol.* 1988a Oct-Dec;66 (Pt 5-6):417-422
 203. Cummins AG, Steele TW, LaBrooy JT, Shearman DJ. Maturation of the rat small intestine at weaning: changes in epithelial cell kinetics, bacterial flora, and mucosal immune activity. *Gut.* 1988b Dec;29(12):1672-1679
 204. Cummins AG, Thompson FM, Mayrhofer G. Mucosal immune activation and maturation of the small intestine at weaning in the hypothyroid (nude) rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1991 Apr;12(3):361-368
 205. Thompson FM, Mayrhofer G, Cummins AG. Dependence of epithelial growth of the small intestine on T-cell activation during weaning in the rat. *Gastroenterology.* 1996 Jul;111(1):37-44
 206. Masjedi M, Tivey DR, Thompson FM, Cummins AG. Activation of the gut-associated lymphoid tissue with expression of interleukin-2

- receptors that peaks during weaning in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999 Nov;29(5):556-562
207. Machado CS, Rodrigues MA, Maffei HV. Gut intraepithelial lymphocyte counts in neonates, infants and children. *Acta Paediatr.* 1994 Dec;83(12):1264-1267
208. Cummins AG, Thompson FM. Postnatal changes in mucosal immune response: a physiological perspective of breast feeding and weaning. *Immunol Cell Biol.* 1997 Oct;75(5):419-429
209. Pluske, J.R., H.R Gaskin, P.C.H Morel, D.K. Revell, M.R. King and E.A.C. James. The number of villous and crypt CD4+ T cells in the jejunum of piglets in increases after weaning. In: Crnwell, P.D. (editor), *Manipulating Pig Production VII.* Australasian Pig Science Association, Australia, 1999 pp.244.
210. McCracken, B.A, R.H. Gasakin, P.J, Ruwe-kaiser, K.C. Klasing and D.E. Jewell, 1995. Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning. *Journal of nutrition* 125, 2838-2845.
211. González, R., Martínez, A., Quiñones, R., Tandrón, E. "Algunas consideraciones diagnosticas y económicas de las patologías respiratorias de origen bacteriano en cerdos en el periodo 1992-1998 en la provincia de Villa clara" [Tesis de Maestría].1999
212. Cedré, María del Rosario. Dinámica lesional y microbiológica en neumonías de origen bacteriano en cerdos sacrificados en el matadero "Osvaldo Herrera". Impacto sanitario y económico. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad central de las Villas. 2000
213. Fuentes, Marta. Entendiendo el complejo respiratorio porcino. Laboratorios BIOGRAM C.A. www.porcinocultura@porcinocultura.com. 2002
214. Zielinski, G.C., Brunori, J. 1997. Evaluación de parámetros productivos en cerdos criados al aire libre vacunados contra Neumonía enzoótica. VII Congreso Latinoamericano de especialistas en Cerdos y V Congreso Nacional de Producción Porcina. Córdoba. Argentina.
215. Eich, K.O. Neumonía Enzoótica Porcina. Enfermedades del cerdo en explotaciones intensivas. EDIMED. 1991:22-24
216. Loeffen, W.A. A production balancing Act. *Rev. Pig Progress. Special.*2001:2-6
217. Sthahly, T. Influencia de la activación del sistema inmunitario sobre la productividad y las características nutricionales de dietas para cerdos. XII Curso de especialización FEDNA. Madrid, 7-8 de Noviembre. 1996
218. Williams, N. H., T. S. Stahly, and D. R. Zimmerman. 1997a. Effect of chronic immune system activation on the rate, efficiency, and composition of growth and lysine needs of pigs fed from 6 to 27 kg. *J. Anim. Sci.* 75:2463-2471.
219. Williams, N. H., T. S. Stahly, and D. R. Zimmerman. 1997b. Effect of chronic immune system activation on nitrogen retention, partial efficiency of lysine utilization, and lysine needs of pigs. *J. Anim. Sci.* 75:2472-2480

220. Parks, D.R and Herzenberg, L.A. Fluoresce-Activated Cell Sorting: Theory, Experimental Optimization, and Applications in Lymphoid Cell Biology. *Methods in Enzymology*. 1984;108:197-241
221. <http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/flor.html>. 1995.
222. Bøyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. 1976 Jun;Suppl 5:9-15.
223. Pillai S, Pillai C, Mitscher LA, Cooper R. Use of Quantitative Flow Cytometry to Measure Ex Vivo Immunostimulant Activity of Echinacea: The Case for Polysaccharides. *J Altern Complement Med*. 2007 Aug;13(6):625-634
224. www.cyto.purdue.edu/flowcyt/labinfo/images/TutorialWinMDI.pdf
225. Terstappen LW, Johnson D, Mickaels RA, Chen J, Olds G, Hawkins JT, Loken MR, Levin J. Multidimensional flow cytometric blood cell differentiation without erythrocyte lysis. *Blood Cells*. 1991;17(3):585-602; discussion 603-605.
226. Terstappen LW, Levin J. Bone marrow cell differential counts obtained by multidimensional flow cytometry. *Blood Cells*. 1992; 18(2):311-30; discussion 331-2.
227. Wilson S, Norton P, Haverson K, Leigh J, Bailey M. Development of the palatine tonsil in conventional and germ-free piglets. *Dev Comp Immunol*. 2005;29(11):977-987.
228. Smith HE, Vecht U, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Biermann Y, Smits MA. Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infect Immun* 1996;64:4409–4412.
229. Sebunya TN, Saunders JR. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *J Am Vet Med Assoc*. 1983 Jun 15;182(12):1331-1337.
230. Rossi-Campos A, Anderson C, Gerlach GF, Klashinsky S, Potter AA, Willson PJ. Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine*. 1992; 10(8):512-518.
231. Gehrke I, Pabst R. [Bronchoalveolar lavage in the pig--comparison of normal, pathogen-free and pneumonic animals] *Pneumologie*. 1990a Feb;44 Suppl 1:297-298.
232. Gehrke I, Pabst R. Cell composition and lymphocyte subsets in the bronchoalveolar lavage of normal pigs of different ages in comparison with germfree and pneumonic pigs. *Lung*. 1990b;168(2):79-92.
233. Rothlein R, Gallily R, Kim YB. Development of alveolar macrophages in specific pathogen-free and germ-free Minnesota miniature swine. *J Reticuloendothel Soc*. 1981 Dec;30(6):483-495.
234. Roldán, N. CA. Inclusion de L-arginina en la dieta del cerdo joven y su efecto sobre la fagocitosis en el aparato respiratorio.(Tesis licenciatura) México, D.F. UNAM, 2008.
235. Pabst R. The respiratory immune system of pigs. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996 Nov;54(1-4):191-195.

236. Glenny RW, Bernard SL, Lamm WJ. Hemodynamic effects of 15-microm-diameter microspheres on the rat pulmonary circulation. *J Appl Physiol* 2000 89: 499–504.
237. Beck KC, Rehder K. Differences in regional vascular conductances in isolated dog lungs. *J Appl Physiol* 1986 61: 530–538.
238. Glenny RW, Lamm WJ, Albert RK, Robertson HT. Gravity is a minor determinant of pulmonary blood flow distribution. *J Appl Physiol* 1991 71: 620–629.
239. Jarvis KA, Steffey EP, Tyler WS, Willits N, Woliner M. Pulmonary blood flow distribution in anesthetized ponies. *J Appl Physiol*, 1992 72: 1173–1178.
240. Mure M, Domino KB, Lindahl SG, Hlastala MP, Altemeier WA, Glenny RW. Regional ventilation-perfusion distribution is more uniform in the prone position. *J Appl Physiol* 2000 88: 1076–1083.
241. Pluske, J.R., D.J. Hampson and I.H. Williams. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*. 1997;51:215-236