

EFFECTO DE L-GLUTAMINA SOBRE CÉLULAS CD2⁺ Y CD3⁺ EN EL INTESTINO DELGADO DEL CERDO DESTETADO PRECOZMENTE

Hernández GJC*¹, Borbolla SAG¹, Vega-Lopez MA².

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México DF; ² Departamento de Patología Experimental. Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN. México D.F.

Introducción. La inclusión de glutamina (Gln) en la dieta de los lechones inmediatamente (2d) antes del destete (<21 d), ha prevenido la atrofia de vellosidades y la hiperplasia de las criptas comúnmente observada en el periodo posdestete (1,2). Estudios recientes sugieren que la Gln, es la principal fuente energética para linfocitos y macrófagos (3) al igual que para las células del epitelio intestinal. Además, la Gln participa en la biosíntesis de nucleótidos purinas y pirimidinas, en la proliferación de células del sistema inmune por estimulación antigénica y juega un importante papel en la producción de radicales libres y citocinas (4). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del aminoácido Gln suplementado en la dieta sobre subpoblaciones linfocitarias del intestino delgado en el periodo inmediato posterior al destete precoz.

Material y Métodos. Se destetaron 50 cerdos convencionales (Large White X Yorkshire) de 14±2 días de edad. Al inicio del experimento se sacrificaron 5 cerdos lactantes (testigos), el resto de los animales fueron divididos en tres grupos de 15 cerdos cada uno y se les proporcionó un alimento preiniciador de tipo comercial (Nupig SEW, México) adicionado con L-Gln (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Tokyo, Japan) a porcentajes de 0.0, 1.0 y 1.5% durante todo el tiempo que duró el experimento. Cinco cerdos de cada tratamiento fueron sacrificados los días 3, 7 y 14 después del destete. Se tomaron muestras de duodeno, yeyuno e ileon y se congelaron inmediatamente (-196°C). Posteriormente se realizaron cortes histológicos (5mm) de las muestras para ser teñidas por inmunohistoquímica empleando anticuerpos monoclonales anti-cerdo CD2⁺ (MAC80 Serotec, United Kingdom) y anti-humano CD3⁺ (CD3-12 Serotec, United Kingdom). Empleando un analizador de imágenes asistido por computadora (Image Pro Plus V, Media Cybernetics), se efectuó el conteo de las células teñidas positivamente en el epitelio (EP), lámina propia (LP) y criptas (CRI) de 5 vellosidades y 5 regiones de criptas seleccionadas al azar por cada muestra de intestino. Los resultados se expresaron como frecuencia celular (células/mm) en el EP y densidad celular (células/mm²) para LP y CRI. El análisis estadístico se realizó empleando un diseño factorial 3x3 para evaluar las diferencias entre los grupos en tratamiento y la edad de los cerdos. Los resultados se analizaron por la prueba de ANOVA con el procedimiento GLM y prueba de Tukey utilizando el programa SPSS versión 10.0.

Resultados. El efecto de la Gln sobre los marcadores CD2⁺ y CD3⁺ se presenta en los cuadros 1 y 2, respectivamente. En la LP del duodeno, se registró un incremento en la densidad de células CD2⁺

Cuadro 1. Densidad de marcadores CD2⁺ en el intestino delgado a diferentes días posdestete*.

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

*Los resultados se reportan en Epitelio como células/mm; en Lámina propia y criptas como células/mm².

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

* Cuadro 2. Densidad de marcadores CD3⁺ en el intestino delgado a diferentes días postdestete*.

Días postdestete	Tratamientos con Glutamina (%)								
	duodeno			yeyuno			íleon		
Epitelio	0	1	1.5	0	1	1.5	0	1	1.5
0	13 \pm 4	—	—	9 \pm 4	—	—	12 \pm 6	—	—
3	15 \pm 7	13 \pm 2	15 \pm 4	14 \pm 7 ^a	18 \pm 5 ^b	20 \pm 6 ^b	17 \pm 6 ^a	20 \pm 8	22 \pm 4 ^b
7	16 \pm 4	18 \pm 3	18 \pm 5	16 \pm 5 ^a	19 \pm 5 ^a	24 \pm 10 ^b	20 \pm 5	22 \pm 10	22 \pm 13
14	22 \pm 13	25 \pm 12	26 \pm 12	20 \pm 9	23 \pm 6	25 \pm 8	26 \pm 15	31 \pm 15	24 \pm 9
Lamina propia									
0	1023 \pm 482	—	—	956 \pm 826	—	—	1561 \pm 561	—	—
3	1229 \pm 732 ^a	809 \pm 564 ^a	1880 \pm 718 ^b	1080 \pm 488 ^a	1848 \pm 1114 ^b	2096 \pm 1178 ^b	1974 \pm 1068 ^a	2294 \pm 777	1812 \pm 707 ^b
7	1014 \pm 626	813 \pm 513	968 \pm 581	1452 \pm 817	1667 \pm 836	1976 \pm 918	1692 \pm 629	1503 \pm 611	1862 \pm 643
14	1402 \pm 1156	934 \pm 281	1105 \pm 592	2236 \pm 952	2341 \pm 717	2016 \pm 878	1493 \pm 678	1790 \pm 601	1356 \pm 495
Criptas									
0	461 \pm 116	—	—	605 \pm 152	—	—	1012 \pm 1253	—	—
3	599 \pm 192 ^a	423 \pm 143 ^b	579 \pm 198 ^a	636 \pm 177	701 \pm 255	589 \pm 162	371 \pm 134	394 \pm 114	419 \pm 194
7	514 \pm 166	569 \pm 122 ^a	452 \pm 105 ^b	598 \pm 119 ^a	872 \pm 334 ^b	798 \pm 150 ^a	333 \pm 123 ^a	500 \pm 304 ^b	416 \pm 174
14	504 \pm 133	511 \pm 190	479 \pm 184	587 \pm 183 ^a	595 \pm 219 ^a	852 \pm 243 ^b	472 \pm 282	534 \pm 609	348 \pm 119

*Los resultados se reportan en Epitelio como células/mm; en Lámina propia y criptas como células/mm².

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

en el grupo con el porcentaje más alto de Gln (1.5%) durante todo el tiempo que duró el experimento. El grupo 1% de Gln mostró el mismo incremento al día 14 PD. En la LP del duodeno, la densidad de linfocitos CD3⁺ aumentó en los primeros 3 días PD con el tratamiento 1.5% de Gln. En este tiempo, en la LP del yeyuno se registró un incremento en ambas subpoblaciones celulares, CD2⁺ y CD3⁺, en todos los grupos tratados con glutamina. En el EP del yeyuno el mayor efecto de Gln se observó por un aumento en la frecuencia de CD3⁺ y CD2⁺ en el grupo 1.5% de Gln a partir del destete hasta el día 7 para el primer marcador y hasta el final del experimento para el segundo caso. En la región del íleon el día 3 PD fue el único tiempo que registró un incremento en la frecuencia de CD2⁺ y CD3⁺ con el nivel más alto de Gln. El día 7 PD, en CRI del duodeno se registró un incremento en la densidad de CD3⁺ en el grupo 1% de Gln. A partir de este tiempo, en la región de CRI del yeyuno la densidad de CD2⁺ y CD3⁺ aumentaron y este comportamiento continuó solo para el último marcador hasta el día 14 PD. En el íleon, se presentó un importante aumento en la densidad de CD2⁺ con el nivel más alto de Gln durante todo el tiempo del experimento. Lo contrario se observó con el marcador CD3⁺ donde se registró un drástico descenso en la densidad celular desde el momento del destete, sin ningún cambio originado por la adición del aminoácido. En todas las regiones del intestino delgado y en la mayoría de las veces se observó un rápido incremento en la frecuencia y densidad de CD2⁺ y CD3⁺, a los primeros 3 días PD con el grupo de inclusión más alto de Gln.

Discusión. El efecto del destete demostró un incremento inmediato de subpoblaciones linfocitarias CD2⁺ y CD3⁺, con mayor efecto en los grupos con el nivel más alto de Gln. Este incremento durante todo el tiempo del experimento en la LP del duodeno sugiere actividad de estas células en el procesamiento hacia el reconocimiento de microorganismos patógenos y desarrollo de tolerancia antigénica. En EP del yeyuno y en CRI del íleon el mayor incremento de éstas células, sugiere que la Gln pudo participar como sustrato energético y precursor de ácidos nucleicos para la replicación de linfocitos, estimulados por la respuesta antigénica del nuevo ambiente que rodea al lechón. Sin embargo en CRI del íleon, el aumento de CD2⁺ parece estimular células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) y en menor proporción linfocitos B, debido a que estas células comparten el mismo receptor CD2⁺.

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

Agradecemos al CONACyT (proyecto 26383-B) por el apoyo financiero y al Departamento de Producción Animal: Cerdos de la FMVZ de la UNAM. México por su apoyo técnico.

Referencias. 1. De La Cruz LA. 1999. Tesis de Licenciatura. México, D.F. México. FMVZ. UNAM; 2. Pluske JR, et al. 1997. *Liv Prod Sci* 51: 215-236; 3. Manhart N, et al. 2001. *Ann Surg* 234: 92-7; 4. Newsholme P, et al. 1999. *J Nutr Biochem* 10: 316-324.