

ADICION DE LISINA Y TREONINA AL SORGO Y SU EFECTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA DE CERDAS GESTANTES¹

JOSE A. CUARON I.²

RICHARD P. CHAPPLE³

ROBERT A. EASTER⁴

RESUMEN

Cien cerdas híbridas fueron empleadas en dos experimentos para evaluar la respuesta inmunológica de cerdas gestantes ante el empleo de las siguientes raciones isonitrogenadas: sorgo-pasta de soya (12% P.C.); sorgo (Basal); basal + L-treonina; Basal + L-lisina·HCl y basal + L-treonina + L-lisina·HCl. Los criterios de respuesta productiva al parto respondieron positivamente a la adición de lisina. En el primer experimento, las cerdas alimentadas con dietas adicionadas de treonina tuvieron títulos más altos de anticuerpos vs. albúmina sérica bovina en plasma ($P < 0.03$) y en el suero del calostro ($P < 0.06$). Esta respuesta fue también observada en el plasma de lechones ($P < 0.07$) provenientes de cerdas que

recibieron lisina durante la gestación. Cuando el dextrán fue empleado como antígeno la adición de cualquiera de los dos aminoácidos tendió ($P < 0.17$) a aumentar la respuesta materna en cuanto a anticuerpos circulantes, observándose en el plasma sanguíneo de los lechones una respuesta definida por la interacción entre lisina y treonina ($P < 0.10$).

Al medir el rechazo de aloimplantes de piel en las cerdas, sólo un efecto de la adición de lisina ($P < 0.007$) pudo ser detectado; las cerdas bajo estos tratamientos rechazaron los implantes con mayor rapidez. Sin embargo, 95% de todos los aloimplantes fueron rechazados 30 días después de la cirugía, independientemente de los tratamientos nutricionales. Estos resultados indican que las respuestas celulares se ven frenadas en la ausencia de un nivel adecuado de lisina. Por otro lado, los títulos de IgG son aparentemente más altos en cerdas consumiendo sorgo adicionado con treonina. Sin embargo, una deficiencia de treonina parece no tener mayores consecuencias sobre la capacidad productiva de la cerda, ya que la adición al sorgo de sólo lisina fue suficiente para mantener la ganancia de peso de la cerda durante la

1 Illinois Ag. Experimental Sta., University of Illinois, Urbana, Ill., 61801.

2 Coordinación de Nutrición-Zona Centro, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Apdo. Postal 41-652, Palo Alto, Cuajimalpa, D. F., 05110; con apoyo del CONACyT como becario, expediente No. 19482

3 Department of Animal Science and Ag. Biochem., University of Delaware, Newark, DE 19711.

4 Department of Animal Science, University of Illinois, Urbana, Ill. 61801.

gestación y transferir suficientes anticuerpos a la camada.

INTRODUCCION

En dos trabajos previos (Cuarón, Chapple y Easter, 1984a; 1984b) al emplear criterios de respuesta corporales, i.e., retención de nitrógeno, ganancia de peso y comportamiento productivo durante la lactación, definimos a la lisina como el primer aminoácido limitante del sorgo para cerdas gestantes. Sin embargo, la suplementación con treonina previno una depresión en los niveles circulantes de IgG al final de la gestación. Así, esto dio como resultado una aparente respuesta al segundo aminoácido limitante, aún en la ausencia de niveles adecuados del primer limitante. Hallazgos similares han sido previamente descritos por otros autores (Kenney et al., 1970; José y Good, 1973; Lotan et al., 1980). En vista de estos resultados y al considerar que el contenido de treonina en las inmunoglobulinas es relativamente alto (Wilkinson y Crumpton, 1963; Smith y Greene, 1947), propusimos a la treonina como el primer aminoácido limitante de la proteína del sorgo para el mantenimiento de los niveles circulantes de IgG en la cerda gestante. Sin embargo, resulta cuestionable si una deficiencia, naturalmente ocurriente, de treonina puede resultar en una menor protección contra la invasión de un antígeno.

En estos experimentos evaluamos el efecto de la lisina, la treonina o de ambas adicionadas al sorgo sobre la respuesta inmunológica de cerdas gestantes, medida ésta como la unión de anticuerpos a antígenos específicos y el rechazo de aloimplantes de piel. Los antígenos fueron seleccionados por sus características contrastantes, ya que la albúmina sérica bovina genera una respuesta humoral

después de la mediación de células T, mientras que el dextrán funciona como un antígeno timo-independiente (Katz y Bencerraf, 1972; Bellanti, 1978). Los aloimplantes de piel fueron empleados para observar las respuestas inmunológicas celulares, ya que el rechazo de un tejido implantado es básicamente el resultado de citotoxicidad (Billingham y Silvers, 1961; Cerrotini y Brunner, 1974; Carpenter, D'Apice y Abbas, 1976).

MATERIAL Y METODOS

Un total de 100 cerdas híbridas, multiparas (con un promedio de 1.6 pariciones previas), y con un peso inicial promedio de 184.5 kg, fueron usadas en dos experimentos. Los tratamientos fueron impuestos 56 días después de la monta (previa confirmación de la gestación) y las cerdas fueron alojadas hasta el día 109 de gestación en jaulas individuales dentro de un edificio de clima controlado. A partir del día 110 de gestación las cerdas se alojaron en jaulas de parición.

A las cerdas se les asignó totalmente al azar una de las 5 raciones de gestación (Cuadro 1): sorgo-pasta de soya (12% P.C); sorgo-L-ácido glutámico (basal, 12% P.C.) y las isonitrogenadas; basal + L - treonina; basal + L-lisina·HCl y basal + L-treonina + L-lisina·HCL. Cada animal fue alimentado individualmente a razón de 2.0 kg/día en una sola comida.

Experimento 1.

Para medir la respuesta de la unión específica antígeno-anticuerpo, 13 cerdas por tratamiento fueron inyectadas intramuscularmente con 1 mg/kg de peso corporal de albúmina sérica bovina (ASB)¹ en un adyuvante com-

1 Libre de globulinas. Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.

CUADRO 1. COMPOSICION DE LAS RACIONES BASAL Y DE REFERENCIA^a.

Ingrediente (%)	R a c i ó n	
	Sorgo - Pasta de soya	Basal
Sorgo	91.62	92.45
Pasta de soya	5.80	---
Almidón de maíz	---	0.45
L-ácido glutámico	---	4.50
Fosfato dicálcico	1.71	1.90
Roca fosfórica	0.42	0.25
Vitaminas ^b	0.10	0.10
Minerales traza ^b	0.35	0.35
T o t a l	100.00	100.00
COMPOSICION ANALIZADA, %		
Nitrógeno	1.92	1.92
Lisina	0.37	0.19
Treonina	0.35	0.22

a) Las raciones experimentales se prepararon al añadir a la ración - basal L-lisina·HCl (0.288% para resultar en un consumo de 8.50 g de lisina/día) y/o L-treonina (0.15% para resultar en consumo de 6.80 g de treonina/día). Las adiciones de aminoácidos se hicieron ajustando los niveles de almidón y L-ácido glutámico para resultar en raciones isonitrogenadas.

b) Cuarón, Chapple y Easter, 1984b.

pleto de Freund durante los días 95 y 109 de gestación. Para observar las respuestas primarias y secundarias, las cerdas fueron sangradas por punción de la vena cava anterior y de la vena marginal auricular durante los días 100 de gestación y al parto, respectivamente. El plasma fue almacenado (-20°C) para su posterior análisis. Los lechones (3 por camada) se sangraron 6 h después del nacimiento por punción de la cava, obteniendo el plasma en forma inmediata y congelándolo (-20°C) para su almacenamiento. Se obtuvieron muestras de calostro, al parto, que fueron procesadas (Cuarón, Chapple y Easter, 1984) para la obtención del suero.

Las muestras de plasma sanguíneo y suero de calostro fueron sujetas a la prueba de Farr (Farr, 1958), que se basa en la precipitación cuantitativa de gammaglobulinas en una solución saturada (50%) de sulfato de amonio. En la prueba, ¹²⁵I-ASB es añadida a diluciones seriadas del espécimen y los títulos de unión antígeno-anticuerpo son calculados a partir de la emisión de rayos gamma en el precipitado. La iodación de la ASB se logró por el método de cloramina-T, según fue descrito por Farr en 1958. El promedio de actividad específica de ¹²⁵I-ASB empleada fue de 1.08 x 10⁶ cpm/mg y 0.050 mg de la ASB iodada fueron añadidos por tubo de

reacción. Adicionalmente las muestras de plasma sanguíneo y de suero de calostro fueron analizadas para determinar proteína total (Lowry *et al.*, 1951) e IgG, empleando placas comerciales² para inmunodifusión radial (Mancini, Carbonara y Heremans, 1965).

Para poder evaluar la citotoxicidad celular, se hicieron aloimplantes al día 100 después de la monta, siguiendo las recomendaciones de Billingham y Silvers (1961). Para ello, pares de cerdas fueron inducidas a anestesia general empleando pentobarbital sódico y dos porciones de tejido cutáneo (6 cm de diámetro) fueron tomadas de la porción dorsal de la región lumbar de cada cerda. Una de las porciones de tejido fue reimplantada en la misma cerda (homoimplante), mientras que la otra fue implantada en la otra cerda (aloimplante). El homoimplante fue empleado como un control para la técnica. Para asegurar la permanencia de los implantes, éstos fueron suturados en 4 puntos con sutura absorbible (cat gut crómico del calibre 0) y un antibiótico tópico fue aplicado (en base oleosa) durante las primeras 48 h después de implantado el tejido. Lo anterior fue hecho para evitar vendajes que pudieran haber impedido la detección de rechazos tempranos. Todos los implantes fueron observados diariamente y el rechazo fue registrado a la primera evidencia de éste, empleando como criterio el obscurecimiento y la observación de arrugas en el tejido transplantado, posteriormente el rechazo fue confirmado por desprendimiento del tejido. Los casos de aceptación del implante fueron confirmados por la ausencia de signos de rechazo después de 14 días de realizada la cirugía, lo cual se aseguró por

² Research Products, Miles Laboratories, Inc., Elkhart Indiana, U.S.A.

la evidencia de crecimiento de pelo en el tejido implantado 30 días después de la cirugía. Los casos en los que los aloimplantes fueron dañados mecánicamente (por rascado) u obviamente infectados (e.g., descarga purulenta), así como los individuos en los que los homoimplantes fueron aparentemente rechazados fueron excluidos de la cuenta de rechazos.

Experimento 2.

La unión específica de anticuerpos contra dextrán fue medida en 7 cerdas por tratamiento con una modificación de la prueba de Farr (Farr, 1958), se utilizó como antígeno dextrán de alto peso molecular³. La iodinación del dextrán se consiguió por la adición de tiramina, después de la oxidación de la molécula con metaperiodato de sodio, seguida de iodinación utilizando cloramina-T (Keck, 1972). Entonces el ¹²⁵I-tiraminil-dextrán (con una actividad específica promedio de 6.25 x 10⁴ cpm/mg) fue añadido a razón de 0.040 mg por tubo de reacción. Los procedimientos generales, de inmunización y sangrado fueron según se describió en el experimento 1.

Los criterios de respuesta comunes a ambos experimentos, (i.e., cambio de peso durante la gestación (día 56 al día 100 después de la monta), número y peso de los lechones vivos al parto, proteína e IgG en plasma sanguíneo y suero de calostro, fueron analizados estadísticamente siguiendo un modelo completamente al azar (Steel y Torrie, 1960), incluyendo el efecto de experimento. Cuando el efecto de experimento no fue significativo ($P > 0.25$), los términos del error fueron sumados para probar los efectos de dieta. El análisis de varianza se siguió conforme a un diseño comple-

³ A partir de *Leuconostoc mesenteroides*, cepa B-512, con peso molecular promedio de 79,000. Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. U.S.A.

tamente al azar con los tratamientos arreglados como un factorial 2 (niveles de lisina) por 2 (niveles de treonina) con un tratamiento de referencia (sorgo-pasta de soya). Las comparaciones en el arreglo factorial fueron hechas por grado único de libertad para encontrar efectos de lisina, treonina o de la interacción de ambos, o bien para comparar el tratamiento de referencia con el resto.

Para tener una indicación de la afinidad antígeno-anticuerpo, la unión específica fue estadísticamente analizada al comparar las pendientes (en la porción lineal descendente de la curva) obtenidas a partir de:

$$Y = \alpha_i + \beta_i X_{ij} + \xi_{ij}, \text{ en donde:}$$

Y = porcentaje de unión específica observado (cpm en la muestra, menos cpm de resonancia sobre el total de cpm en el ensayo);

α_i = intersección (concentración más alta de la muestra en la que menos del 100% de la unión antígeno-anticuerpo fue observada);

β_i = pendiente de la regresión atribuible al tratamiento (i.e., depresión en el % de unión al incrementar el factor de dilución);

X_{ij} = logaritmo base 10 del factor de dilución;

ξ_{ij} = Error experimental

Los resultados de cada muestra fueron integrados a la ecuación de regresión y el título al 33% de unión fue predicho; así los resultados se expresan como el logaritmo base 10 del factor de dilución al que se obtuvo el 33% de la unión antígeno-anticuerpo (log CU-33), éstos fueron entonces sujetos a un análisis de varianza según se propuso para los criterios de producción.

El rechazo de los aloimplantes se analizó estadísticamente al comparar las pendientes de la porción recta de la curva de rechazo, integrando el %

de rechazos en función de los días posquirúrgicos a un modelo de regresión lineal:

$$Y = \alpha_i + \beta_i X_{ij} + \xi_{ij}, \text{ en donde:}$$

Y = casos de rechazo, % (número de casos de rechazo/el total de casos x 100);

α_i = intersección

β_i = pendiente de la línea de regresión por tratamiento (rechazo, % en función de los días);

X_{ij} = variable independiente (tiempo, en días, a partir de que el primer caso de rechazo fue observado y hasta el parto).

ξ_{ij} = error experimental

Los análisis estadísticos se siguieron según las recomendaciones de Steel y Torrie (1960) y los cálculos fueron facilitados por el Sistema de Análisis Estadístico (SAS, 1979).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los criterios de respuesta productiva, la proteína e IgG plasmáticas, así como los contenidos en el suero del calostro fueron similares ($P > 0.25$) en ambos experimentos, por lo que los resultados fueron unidos y analizados en conjunto, y se resumieron en los Cuadros 2 y 3. La ganancia diaria de peso en las cerdas (Cuadro 2) fue superior ($P < 0.01$) ante la adición de lisina a la dieta basal y aunque numéricamente ($P < 0.13$) los pesos de los lechones parecieron ser superiores ante la adición de lisina a las dietas de las madres, el tamaño y peso de las camadas al nacimiento no fueron afectadas ($P > 0.20$) por el tratamiento durante gestación. Los resultados de las determinaciones de proteína total e IgG en plasma sanguíneo y suero de calostro (Cuadro 3) sólo sugirieron diferencias en el caso del plasma de las cerdas, al responder la proteína plasmática a la suplementación con lisina ($P < 0.12$), mientras que IgG

CUADRO 2. COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE CERDAS CONSUMIENDO RACIONES BASADAS EN SORGO DURANTE LA SEGUNDA MITAD DE LA GESTACION^a.

Criterio	Tratamiento					EEM ^b
	S-Soya	Basal (B)	B+Tre	B+Lis	B+Tre+Lis	
Peso inicial, kg	186	187	185	183	184	4.200
Ganancia de peso/cerda (g/día) ^c	320	230	230	310	360	25.600
Lechones vivos al parto	10.70	10.70	10.90	20.60	10.80	0.460
Peso de la camada al parto (kg) ^d	15.14	13.81	14.08	14.13	14.89	0.587
Peso del lechón al parto (kg) ^{d,e}	1.42	1.29	1.30	1.33	1.38	0.040

- a) 20 observaciones por tratamiento en 2 experimentos; no se encontró efecto del experimento ($P > 0.25$). Los tratamientos se impusieron al día 56 de gestación.
- b) Error estándar de la media.
- c) La ganancia diaria de peso se calculó del día 56 de gestación al día 109, encontrándose un efecto por la adición de lisina ($P < 0.01$).
- d) Lechones nacidos vivos.
- e) Respuesta ($P < 0.13$) a la adición de lisina.

resultó más elevada ($P < 0.10$) en cerdas que recibieron treonina suplementaria. El efecto de la adición de aminoácidos al sorgo coincide con nuestras observaciones previas (Cuaron, Chapple y Easter, 1984a; 1984b) y con los resultados de otros autores (Rippel et al., 1965a; 1965b; Hesby et al., 1970; Baker et al., 1970; Mahan, 1977; Corley et al., 1983), al señalar que la deficiencia del primer aminoácido limitante, lisina en este caso, redujo la ganancia de peso de las cerdas durante gestación, sin afectar el peso de la camada al nacimiento. Así, puede concluirse que la sola adición de lisina al sorgo para la formulación de raciones de gestación,

es suficiente para resultar en una buena respuesta productiva al parto. La respuesta a treonina en el plasma sanguíneo de las cerdas confunde el cuadro.

El requerimiento por treonina se incrementa al aproximarse el parto (Rippel et al., 1965b), hecho que aparentemente responde a la observación de una elevada concentración de este aminoácido en el calostro (Beacom y Bowland, 1951), reflejo del gran contenido de treonina en las inmunoglobulinas (Smith y Greene, 1947). Por otro lado, la cerda parece tener una especial habilidad para sustraer las proteínas plasmáticas para la síntesis del calostro (Porter,

CUADRO 3. PROTEINA E IgG EN PLASMA SANGUINEO Y SUERO DE CALOSTRO EN RES PUESTA A RACIONES DE GESTACION BASADAS EN SORGO^a.

Criterio	Tratamiento					EEM ^b
	B+Soya	Basal (B)	B+Tre	B+Lis	B+Tre+Lis	
	----- Proteína (g/100 ml) -----					
Plasma de las cerdas ^{c,d}	6.50	6.30	6.37	6.60	6.47	0.129
Suero del calostro ^c	15.46	15.32	15.59	15.56	15.63	0.736
Plasma de los lechones ^e	4.56	4.69	4.41	4.46	4.39	0.256
	----- IgG (mg/ml) -----					
Plasma de las cerdas ^{c,f}	16.40	14.57	15.86	15.20	16.12	0.528
Suero de calostro ^c	63.17	61.45	60.07	62.49	64.38	3.317
Plasma de los lechones ^e	11.85	11.01	11.70	12.31	11.18	0.974

a) Medias de 20 observaciones por tratamiento; los tratamientos fueron impuestos a partir del día 56 de gestación.

b) Error estándar de la media.

c) Las muestras se obtuvieron al parto.

d) Respuesta ($P < 0.12$) a la adición de lisina.

e) Las muestras fueron tomadas 6 hs después del nacimiento.

f) Respuesta ($P < 0.10$) a la adición de treonina.

1976), lo que explicaría la ausencia de diferencias en calostro y, por ende, en el plasma de los lechones. Sin embargo, el hecho de haber observado una respuesta a treonina para el mantenimiento de la IgG plasmática en la cerda parturienta, nos hace sugerir a este aminoácido como primer limitante en el sorgo para esta función; lo que nos conduce a preguntarnos sobre la importancia relativa de aminoácidos específicos para el mantenimiento de respuestas inmunes. Kenney *et al.*, (1968; 1970) encontraron un diferente orden de limitancia de aminoácidos que depende del criterio de respuesta empleado para evaluar las dietas (en su caso, crecimiento y respuesta inmunológica

ca), esta respuesta diferencial apoya nuestras observaciones y confirma las de Lotan *et al.*, (1980), que definieron, en gluten de trigo para ratas, a la lisina como el primer aminoácido limitante para el crecimiento y a la treonina como el primer limitante para la respuesta inmunológica.

Al medir los títulos de la unión específica antígeno-anticuerpo como un desafío controlado a la capacidad inmunológica del animal, que requiere de una mayor síntesis de proteína de alta especificidad, esperamos mostrar la necesidad de suplementación con treonina a cerdas gestantes alimentadas con la ración basal (dependientes de la calidad de proteína del sorgo). Los títulos de anticuerpos al ser

CUADRO 4. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ANTICUERPOS *vs.* ASB EN EL PLASMA DE CERDAS Y LECHONES, Y EN EL SUERO DEL CALOSTRO, DE CERDAS RECIBIENDO RACIONES BASADAS EN SORGO, DURANTE LA SEGUNDA MITAD DE LA GESTACION.

Parámetro	Tratamiento ^a					EEM ^b
	S-Soya	Basal (B)	B+Tre	B+Lis	B+Tre+Lis	
----- Plasma de las cerdas -----						
Intersección	97.69	91.46	97.06	93.13	99.18	2.848
Pendiente	-35.84	-34.11	-34.60	-33.75	-35.92	1.427
Log CU-33 ^{c,d}	1.80	1.69	1.83	1.78	1.84	0.038
----- Suero del calostro -----						
Intersección	109.87	87.48	99.54	101.00	104.79	4.495
Pendiente	-37.23	-29.96	-33.98	-35.61	-35.10	2.252
Log CU-33 ^{c,f}	2.02	1.74	1.91	1.87	2.00	0.078
----- Plasma de los lechones -----						
Intersección	53.10	40.97	48.29	50.56	53.52	2.639
Pendiente ^d	-28.80	-22.26	-25.88	-27.96	-29.46	2.095
Log CU-33 ^{c,g}	0.58	0.25	0.45	0.53	0.59	0.114

- a) Los tratamientos se impusieron al día 56 de gestación.
b) Error estándar de la media.
c) Logaritmo base 10 del factor de dilución al que se predijo de las ecuaciones individuales de regresión el 33% de unión del anticuerpo al antígeno (% de unión *vs.* el factor de dilución); $r^2 \geq 0.86$.
d) Respuesta a la adición de treonina ($P < 0.03$).
e) Respuesta a la adición de lisina ($P < 0.13$).
f) Respuesta a la adición de treonina ($P < 0.06$).
g) Respuesta a la adición de lisina ($P < 0.07$).

expresados como el porcentaje de unión al antígeno, son una medida de concentración y de la afinidad relativa del anticuerpo por el antígeno. Por lo que, dos especímenes que muestren un título similar de anticuerpos pueden ser el resultado de una baja concentración de anticuerpos de alta afinidad o una alta concentración de los mismos pero de baja afinidad. Por

lo tanto, al comparar la capacidad de unión del anticuerpo al antígeno ante diluciones seriadas, es posible llegar a obtener una estimación de la afinidad de los anticuerpos.

Aunque se detectaron anticuerpos *vs* ASB en el plasma de las cerdas al día 100 de gestación (i.e., 5 días después de la primera inmunización), el título promedio fue muy bajo (log

CU-33= -1.035) y fue confundido en muchos casos con las cuentas de resonancia del ensayo (éstas representaron aproximadamente el 5% del total de cpm añadidas por tubo de ensayo). El Cuadro 4 resume los resultados obtenidos después de la inmunización secundaria para la unión específica anti-ASB en el plasma materno, suero del calostro y plasma de los lechones. El título de anticuerpos (log CU-33) fue más alto ($P < 0.03$) en cerdas que recibieron treonina suplementaria; este mismo efecto de treonina se repitió en el suero del calostro ($P < 0.06$); más aún, en la comparación de las pendientes sugirió un efecto de la adición de lisina a la dieta ($P < 0.13$), esto es, los títulos de anticuerpos vs ASB declinaron más rápidamente al incrementar gradualmente el factor de dilución en las muestras provenientes de animales suplementados con lisina. En contraste, el log CU-33 en el plasma de los lechones respondió positivamente ($P < 0.07$) a la suplementación de lisina en las madres, mientras que las pendientes de las líneas resultaron con un efecto debido a treonina ($P < 0.03$).

Similar a lo observado en la respuesta primaria anti ASB, la respuesta primaria vs dextrán no fue del todo confiable, lo que se complica en este caso por un alto porcentaje de cuentas de resonancia (aproximadamente el 30% del total de cpm por tubo de ensayo); esto quizá se debió a la precipitación del ¹²⁵I-tiraminil-dextrán en la solución saturada al 50% con sulfato de amonio⁴. Sin embargo, debe mencionarse que el título obtenido después de la inmunización primaria (log CU-33= 1.036) fue nota-

4 En experiencias futuras, este problema podría ser prevenido iodinando dextrán de menor peso molecular (i.e., 10,000) para la parte *in vitro* del experimento, ya que los determinantes antigénicos serían idénticos.

blemente más alto que aquél observado en el caso de ASB. Es posible que la respuesta primaria no se haya detectado ya que las cerdas, al nacimiento fueron tratadas (intramuscularmente) con soluciones de hierro dextrán, lo que deja abierta la posibilidad de que los animales hubiesen tenido una respuesta anamnésica. De cualquier forma los resultados ante la segunda inmunización experimental son válidos para observar una respuesta secundaria típica. Los títulos vs dextrán (log CU-33), así como las pendientes e intersecciones de las curvas para las muestras de plasma sanguíneo y suero de calostro, se resumen en el Cuadro 5. La única diferencia detectada en este caso fue para el log CU-33 del suero del calostro del tratamiento de referencia vs Basal + treonina + lisina ($P < 0.03$), mientras que en el plasma de los lechones se encontró una interacción entre lisina y treonina ($P < 0.10$), al ser más altos los títulos en lechones provenientes de cerdas suplementadas con ambos aminoácidos.

Los desafíos antigénicos fueron empleados para evaluar el efecto de deficiencia como un factor limitante en la síntesis de proteína por los linfocitos. Así, las diferencias en respuesta obtenidas con el uso de ASB o dextrán como antígenos puede residir en las características intrínsecas de éstos.

La ASB es una molécula compleja, que como antígeno, para observar respuesta, requiere de la cooperación de linfocitos B y T; en cambio, dextrán funciona como un mitógeno de las células B. Así la respuesta generada por este antígeno provoca la síntesis de diferentes clases de inmunoglobulinas, lo que a su vez resulta en diferentes comportamientos homeostáticos de los anticuerpos. El ritmo catabólico de IgA como res-

CUADRO 5. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ANTICUERPOS vs. DEXTRAN EN EL PLASMA DE CERDAS Y LECHONES Y EN EL SUERO DEL CALOSTRO DE CERDAS RECIBIENDO RACIONES BASADAS EN SORGO DURANTE LA SEGUNDA MITAD DE LA GESTACION.

Parámetro	Tratamiento ^a					EEM ^b
	S-Soya	Basal (B)	B+Tre	B+Lis	B+Tre+Lis	
----- Plasma de las cerdas -----						
Intersección	83.11	81.28	79.97	76.45	77.43	5.028
Pendiente	-23.45	-25.67	-21.72	-19.98	-20.04	3.033
Log UC-33 ^c	2.14	1.93	2.16	2.18	2.23	0.100
----- Suero del calostro -----						
Intersección	46.62	44.76	73.88	74.06	76.29	3.481
Pendiente	-15.49	-19.18	-17.67	-17.01	-19.07	2.119
Log UC-33 ^{c,d}	2.60	2.28	2.27	2.45	2.20	0.118
----- Plasma de los lechones -----						
Intersección	46.62	44.76	45.14	44.31	47.86	1.957
Pendiente	-14.62	-13.26	-14.44	-12.43	-14.25	1.180
Log UC-33 ^{c,e}	0.93	0.85	0.80	0.90	1.01	0.104

- a) Los tratamientos se impusieron al día 56 de gestación.
- b) Error estándar de la media.
- c) Logaritmo base 10 del factor de dilución al que se predijo de las ecuaciones individuales de regresión el 33% de unión antígeno-anticuerpo - (% de unión vs. el factor de dilución). $r^2 \geq 0.84$.
- d) Soya es diferente ($P < 0.03$) de B + Tre + Lis.
- e) Interacción entre lisina y treonina ($P < 0.10$).

puesta secundaria a Igm inicial (las clases generadas por inmunización con dextrán) es independiente de la concentración sérica (Fahey y Sell, 1965); en cambio, el catabolismo de IgG (generada por ASB) es directamente proporcional a su concentración en la circulación periférica (Solomon *et al.*, 1964; Fahey y Robeinson, 1963); Dubiski y Fradette, 1966) y por lo tanto más susceptible a los cambios inducidos en el metabolismo

proteico por dietas inadecuadas en aminoácidos (Lanza-Jacoby *et al.*, 1982); de aquí que en la evaluación de la respuesta empleando ASB como antígeno se haya encontrado una mayor definición que ante el uso de dextrán.

Al observar que los patrones de respuesta en el calostro y en el plasma de los lechones no correspondieron con los obtenidos en las cerdas, los resultados sugieren un

transporte selectivo de las moléculas de los anticuerpos generados favoreciendo la transferencia de inmunidad a la progenie. El transporte de IgG está bien fundamentado, mientras que el de IgA parece ser no tan claro (Kaeberle y Segre, 1964; Porter, 1969). En el caso de IgG, se sabe que la fracción constante de la molécula es transportada a través de membranas más eficientemente que la porción variable y esta porción constante parece ser el factor determinante para el establecimiento de las constantes de degradación de la molécula, siendo éstas en proteínas de elevada afinidad (Voss y Voss, 1977). Lo anterior quizá explique por qué la concentración inicial de los anticuerpos (intersección) fue en general más alta en el caso de los animales suplementados con treonina, pero a medida que se incrementó el factor de dilución, el título fue mayor en el caso de los animales que recibieron

lisina adicional (denotado por la pendiente de la línea), lo que definiría a los anticuerpos de los animales que recibieron lisina como de mayor afinidad.

La posibilidad de transferencia de anticuerpos de mayor afinidad contribuye a explicar las más altas tasas de sobrevivencia en camadas provenientes a cerdas suplementadas con lisina (Baker et al., 1970; Hasby et al., 1970; Cuarón, Chapple y Easter, 1984b). Sin embargo, dados los mayores títulos de anticuerpos en los lechones de cerdas recibiendo lisina suplementaria, no puede negarse el hecho de que el efecto de sobrevivencia esté confundido con un mayor consumo de calostro, hecho que se fundamenta en las observaciones (Woerman y Speer, 1976; Cuarón, Chapple y Easter, 1984 b) acerca de una mayor producción de leche en cerdas consumiendo niveles adecuados de lisina; así, este efecto de lisina puede ser de mayor trascen-

CUADRO 6. EFECTO DE LA RACION DE GESTACION SOBRE EL RECHAZO (%) DE ALO IMPLANTES DE PIEL EN CERDAS GESTANTES^a.

Tratamiento	N	Intersección	Pendiente ^c	Días para 100% ^d de rechazos
S-Soya	8	- 0.94	11.81	8.4
Basal (B)	9	- 8.42	8.92	12.2
B + Tre	10	-12.55	8.12	13.9
B + Lis	10	-12.87	11.26	10.0
B + Tre + Lis	11	-11.20	12.07	9.2
Error estándar		5.885	1.102	

a) Análisis de regresión lineal, % de rechazo/tiempo; $r^2 \geq .96$.

b) 13 cerdas por tratamiento fueron inicialmente implantadas.

c) Efecto de la adición de lisina ($P < 0.007$).

d) Predichos de la ecuación de regresión, el origen de la línea se fijó 24 hs antes del primer rechazo, así el número real al 100% de rechazo es 5 días mayor.

dencia que el de treonina sobre el mantenimiento de los niveles de IgG, presumiblemente con mejor afinidad. Por lo tanto, la importancia de la concentración total de una clase de inmunoglobulinas (i.e., IgG) es relativa, al ser la concentración de anticuerpos con una actividad específica por un antígeno dado, de mayor relevancia.

Las manipulaciones de aminoácidos usadas en los presentes trabajos fueron suficientemente severas como para deprimir la ganancia de peso materna y las fracciones proteicas observadas. La respuesta fue aún más clara en el caso de rechazo a los aloimplantes de piel (Cuadro 6).

La mayoría de los homoiimplantes no fueron rechazados, fue detectado sólo un 17% de pérdidas por infección o rascado, lo que confirmó lo adecuado del procedimiento. Aproximadamente el 26% de los casos no fueron incluidos en los cálculos del porcentaje de rechazo a causa de daños en el tejido por causas diferentes a la respuesta inmune del animal. El primer aloimplante rechazado se detectó 6 días después de la cirugía y se observó que 95%, del total de rechazos fueron registrados entre los días 8 y 14 posquirúrgicos. Treinta días después de la cirugía sólo 2 cerdas (ambas en el tratamiento B + tre) mostraron una aparente aceptación por el aloimplante. En el análisis de regresión se fijó el origen de la línea 24 h antes de que se detectara el primer caso de rechazo, por lo que en el Cuadro 6, el número de días predicho para obtener 100% de rechazo está codificado por un factor de 5. El rechazo de aloimplantes se vio favorecido por la suplementación con lisina ($P < 0.007$), al ser el porcentaje de rechazos más rápido en los individuos suplementados con este aminoácido.

Al respecto Rosenau y Moon (1961) y Bloom (1971) demostraron que las células efectoras involucradas en el rechazo a aloimplantes son las timo dependientes. En otros estudios (Cooper, Wood y Mariani, 1974) se demostró que los cambios en las proteínas plasmáticas inducidas por una deficiencia de aminoácidos fue responsable por cambios en la viscosidad del plasma y por lo tanto en el flujo de éste a los tejidos. Un incremento en la filtración de componentes celulares de la sangre para compensar una posible depresión en el volumen sanguíneo, pudo haber resultado en una mayor presión intersticial que haya modificado la respuesta de rechazo. La citotoxicidad celular, medida por el rechazo de aloimplantes, es consistente con las observaciones hechas en el caso de la capacidad de unión antígeno-anticuerpo. Las células "T" parecieron ser responsables de la modificación de la respuesta inmunológica inducida por la dieta, donde un efecto positivo de la suplementación de lisina fue detectado, lo que es congruente con observaciones previas en animales de laboratorio (Jose y Good, 1971; 1973; Lotan *et al.*, 1980). Ahora bien, las diferencias en el tiempo de rechazo se pueden haber debido a diferencias en el complejo de histocompatibilidad tanto de donadores como de receptores.

La razón para las diferencias en respuesta inmunológica inducidas por lisina o treonina no está del todo clara, pero podría sugerirse que las alteraciones generadas por cambios en las células efectoras, en respuesta al desbalance, o deficiencia de aminoácidos, modificó la cooperación entre células linfoides, su proliferación, diferenciación y distribución o ambas, todo girando alrededor de su metabolismo proteico. Los resultados

de los presentes experimentos subrayan la importancia de lisina como primer aminoácido limitante del sorgo. Las consecuencias biológicas de las pequeñas diferencias provocadas por la deficiencia de treonina son cuestionables, ya que la homeostasis de las células y las poblaciones de anticuerpos probablemente tienden a mantener la eficiencia inmunológica del animal, para permitir la prevalencia de la especie. Por lo tanto, el efecto de treonina sobre el mantenimiento de los niveles de IgG puede relegarse a un segundo plano. Sin embargo, de subyacerse la necesidad de estudios sobre los requerimientos de aminoácidos para funciones específicas, que pueden no reflejar los requerimientos del animal como un todo.

Nuestros resultados sugieren que la respuesta inmunológica celular parece tener relación directa con las respuestas corporales. Sin embargo, las respuestas de la función humoral no están siempre en concordancia con el orden de aminoácidos limitantes medidos con las funciones productivas del animal.

SUMMARY

One hundred crossbred sows were used in two experiments to evaluate immunological responses in gravid swine as influenced by these isonitrogenous diets: 12% crude protein sorghum-soybean meal (S-SBM); sorghum (B); B + L-threonine; B + L-lysine · HCl; B + L-threonine + L-lysine · HCl. Reproductive criteria responded positively to lysine supplementation when measured at parturition. In the first experiment, sows fed diets supplemented with threonine had greater antibody titers vs bovine serum albumin (BSA) in plasma ($P < .03$) and colostrum whey ($P < .06$).

This response was also seen ($P < .07$) in plasma of piglets from sows fed diets supplemented with lysine. When dextran was used as an antigen, the supplementation of either lysine or threonine only tended ($P < .17$) to improve maternal circulating antibody titers. Colostrum whey antidextran titers were greater in the S-SBM-fed sows. A lysine by threonine interaction ($P < .10$) was observed for antibody titers in piglet plasma. Skin allograft rejection was measured, and a positive ($P < .007$) effect of lysine supplementation was observed. Sows fed diets with added lysine rejected the grafted skin sooner. However, 95% of all allografts were rejected by 30 d after surgery regardless of dietary treatment. The results tend to indicate that cellular responses are impaired by lysine deprivation. The IgG antibody titers were apparently higher in sows fed the threonine supplemented diets. A threonine deficiency apparently is not of major consequence to the reproductive performance of the sow, since the dietary addition of only lysine improved gestation weight gains and the transfer of antibodies to the sow's offspring.

LITERATURA CITADA

- BAKER, D.H., BECKER, D.E., JENSEN, A.H., and HARMON, B.G., 1970. Reproductive performance and progeny development in swine as influenced by protein restriction during various portions of gestation. *J. Anim. Sci.*, 31:526.
- BEACOM, S.E. and BOWLAND, J.P., 1951. The essential amino acid (except tryptophan) content of colostrum and milk of the sow. *J. Nutr.*, 45:419.
- BELLANTI, J. A. (ed.). 1978 Immunology II **W. B. Saunders Co.**, Philadelphia, PA.
- BILLINGHAM, R.E. and SILVERS, W.K., 1961. Transplantation of tissues and cells. **The Wistar Institute Press**, Philadelphia, PA.

- BLOOM, B.R. 1971. *in vitro* approaches to the mechanism of cell-mediated immune reactions. **Adv. Immunol.**, 13:101.
- CARPENTER, C.B., D'APICE, A.J.F., and ABBAS, A.K., 1976. The role of antibodies in the rejection and enhancement of organ allografts. **Adv. Immunol.** 22:1.
- CERROTINI, J.C. and BRUNNER, K.T. 1974. Cell mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity. **Adv. Immunol.**, 18:67.
- COOPER, W.C., WOOD, R.A. and MARIANI, T., 1974. Effects of protein insufficiency on immune responsiveness. **Amer. J. Clin. Nutr.**, 27:647.
- CORLEY, J.R., ESCH, M. W., BAHR, J.M. and EASTER, R.A., 1983. Amino acid supplementation of low-protein diets for swine: Effect of gestation treatment on reproductive performance of gilts and sows. **J. Anim. Sci.**, 56:108.
- CRUMPTON, M.J., and WILKINSON, J. M., 1963. Amino acid composition of human and rabbit γ -globulins and the fragments produced by reduction. **Biochem. J.**, 88:228.
- CUARON, J. A., CHAPPLE, R. P., and EASTER, R.A., 1984a. Effect of lysine and threonine supplementation to sorghum gestation diets on nitrogen balance and plasma constituents in first-litter gilts. **J. Anim. Sci.**, 58:631.
- CUARON, J.A., CHAPPLE R.P., y EASTER, R.A., 1984b. Adición de lisina al sorgo durante el último tercio de la gestación y suplementación de lisina, durante la subsecuente lactación de cerdas lactantes alimentadas con sorgo y pasta de ajonjolí. **Téc. Pec. Méx.**, 47:21.
- DUBISKI, S. and FRADETTE, K., 1966. The feedback mechanism in immunoglobulin synthesis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 122:126.
- FAHEY, J.L. and ROBINSON, A.G., 1963. Factors controlling serum gammaglobulin concentrations. **J. Exp. Med.**, 118:845.
- FAHEY, J.L. and SELL, S., 1965. The immunoglobulins of mice. V. The metabolic (catabolic) properties of five immunoglobulin classes. **J. Exp. Med.**, 122:41.
- FARR, R.S., 1958. A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I*BSA and antibody. **J. Infect. Dis.** 103:239.
- HESBY, J. H., CONRAD, J.H., PLUMLEE, M.P. and HARRINGTON, R.B., 1970. Nitrogen balance and serum protein response of gestating swine fed opaque-2 corn, normal corn and corn soybean diets. **J. Anim. Sci.**, 31:481.
- JOSE, D.G. and GOOD, R.A., 1971. Absence of enhancing antibody in cell mediated immunity to tumor heterografts in protein deficient rats. **Nature.**, 231:323.
- JOSE, D.G. and GOOD, R.A., 1973. Quantitation of nutritionally essential amino acid deficiency upon immune responses to tumors in mice. **J. Exp. Med.**, 137:1.
- KAEBERLE, M.L. and SEGRE, D., 1964. Intestinal absorption of homologous and heterologous serum globulins by the newborn pig. **Amer. J. Vet. Res.**, 25:1096.
- KATZ, D.H. and BENACERRAF, B., 1972. The regulatory influence of activated T cells on B cell responses to antigen. **Adv. Immunol.**, 15:1.
- KECK, K. 1972. An easy method for labelling polysaccharides with radioactive iodine. **Immunochem.**, 9:359.
- KENNEY, M.A., RODERUCK, C.E., ARNRICH, L. and PIEDAD, F., 1968. Effect of protein deficiency on the spleen and antibody formation in rats. **J. Nutr.**, 95:173.
- KENNEY, M.A., MAGEE, J. L., and PIEDAD-PASCUAL, F., 1970. Dietary amino acids and immune response in rats. **J. Nutr.**, 100:1063.
- LANZA-JACOBY, J., SKIBBER, J., MILLER, E., KERR, J., WEISS, S.M., and ROSATO, F.E., 1982. Effects of protein malnutrition and tumor growth on serum total complement, C3 and IgG levels during *E. coli* infection in the rat. **Nutr. Res.**, 2:277.
- LOTAN, R.S., MOKADY, S. and HORENSTEIN, L., 1980. The effect of lysine and threonine supplementation on the immune response of growing rats fed wheat gluten diets. **Nutr. Rep. Int.**, 22:313.
- LOWRY, O.N., ROSENBRACH, N.J., FARR, A., and RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193:265.

- MAHAN, D.C. 1977. Effect of feeding various gestation and lactation protein sequences on long term reproductive performance in swine. *J. Anim. Sci.*, 45:1061.
- MANCINI, G., CARBONARA, A.O. and HEREMANS, J.F., 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.*, 2:235.
- PORTER, P. 1969. Transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM to lacteal secretions in the parturient sows and their absorption in the neonatal pig. *Biochem. Biophys. Acta.*, 236:319.
- PORTER, P. 1976. Immunoglobulin mechanisms in health and nutrition from birth to weaning. *Proc. Nutr. Soc.*, 35:273.
- RIPPEL, R.H., RASMUSSEN, O.G., JENSEN, A.H., NORTON, H.W. and BECKER, D.E., 1965a. Essential amino acid supplementation of intact proteins fed to the gravid gilt. *J. Anim. Sci.*, 24:373.
- RIPPEL, R.H., RASMUSSEN, O.G., JENSEN, A.H., NORTON, H.W. and BECKER, D.E., 1965b. Some amino acid requirements of the gravid gilt fed a purified diet. *J. Anim. Sci.*, 24:378.
- ROSENAU, W. and MOON, H.D., 1961. Lysis of homologous cells by sensitized lymphocytes in the tissue culture. *J. Natl. Cancer Inst.*, 27:471.
- S.A.S. 1979. Statistical Analysis System. User's Guide. **SAS Institute Inc.**, Cary, N.C.
- SMITH, E.L. and GREENE, R.D., 1947. Further studies on the amino acid composition of immune proteins. *J. Biol. Chem.*, 171:355.
- SOLOMON, A., WALDMAN, T.A., FAHEY, J. L., and McFARLANE, A.S., 1964. Metabolism of Bence-Jones proteins. *J. Clin. Invest.*, 43:103.
- STEEL, R.G.D., and TORRIE, J.H., 1960. Principles and Procedures of Statistics. **Mc Graw-Hill Book Co.**, Inc., New York, N.Y.
- VOSS, E.W. and VOSS, V.H., 1977. Comparative catabolic rates of antihapten IgG antibodies of different affinities. *Immunochem.*, 14:741.
- WOERMAN, R.L. and SPEER, V.C., 1976. Lysine requirement for reproduction in swine. *J. Anim. Sci.*, 42:114.