

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



**“EFECTO DEL ESTRÉS POR CALOR EN LA RESPUESTA INMUNE
DE CERDOS DESAFIADOS CON LIPOPOLISACÁRIDO DE
Escherichia coli”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS**

PRESENTA

NÉSTOR ARCE VÁZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

CODIRECTOR

DR. MIGUEL CERVANTES RAMÍREZ

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

MARZO, 2015.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC), por las facilidades otorgadas durante mis estudios de posgrado.

A la Dra. Adriana Morales Trejo, por su apoyo durante mis estudios de doctorado lo que fortaleció mi formación profesional, y además de su gran colaboración en la realización de esta tesis.

Al Dr. Miguel Cervantes Ramírez, por sus enseñanzas, compartir sus conocimientos y ser participe en esta tesis y durante toda mi formación académica.

Al Dr. B. Alfonso Araiza Piña, por el apoyo y confianza otorgada durante mis estudios y para la realización de esta tesis, así como su amistad para con mi familia.

Al Dr. Hugo Bernal Barragán, por sus valiosas aportaciones para el enriquecimiento de esta tesis.

Al Dr. Ernesto Avelar Lozano, por la revisión y sus oportunos comentarios para la realización de esta tesis.

A todos mis amigos y compañeros del Cuerpo Académico de Nutrición Animal (CANA), por estar en las buenas y en las malas con su servidor y amigo.

A todos y cada uno de ustedes mis más sinceras

GRACIAS

La tesis titulada “**Efecto del estrés por calor en la respuesta inmune de cerdos desafiados con lipopolisacárido de *Escherichia coli***”, fue realizada por C. Néstor Arce Vázquez, con la **dirección de la Dra. Adriana Morales Trejo y codirigida por el Dr. Miguel Cervantes Ramírez**. Como se indica a continuación, el comité particular revisó, aceptó y aprobó el presente trabajo como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

Dra. Adriana Morales Trejo

DIRECTORA

Dr. Miguel Cervantes Ramírez

CO-DIRECTOR

Dr. Benedicto A. Araiza Piña

ASESOR

Dr. Hugo Bernal Barragán

ASESOR

Dr. Ernesto Avelar Lozano

ASESOR

RESUMEN

Se realizó un ensayo para determinar el efecto del estrés por calor en la respuesta inmune de cerdos en crecimiento, desafiados con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*. El estudio se condujo bajo las condiciones naturales de alta temperatura ambiente y baja humedad relativa presentes durante el verano en el valle de Mexicali. Se emplearon 24 cerdos destetados asignados a los tratamientos: 1) ambiente de confort; 2) ambiente de confort, desafiados con LPS; 3) estrés por calor (EC); 4) estrés por calor, desafiados con LPS. El desafío consistió en la administración de 50 µg/kg de PV de LPS o solución salina estéril, 2 veces (desafío 1 y 2) en 14 días. Se registraron la temperatura ambiente y humedad relativa en las salas EC y confort. Se registró la temperatura ótica (TO) de los cerdos a las 0, 2, 4, 8, 24 y 36 horas posdesafío de LPS. Se colectaron muestras de sangre para conteo sanguíneo (hemograma) y determinación de concentración de citocinas en suero. Al final del experimento se colectaron muestras de cuatro cerdos de cada tratamiento para analizar la expresión de interleucina 6 (IL6), interleucina 10 (IL10) e interferón- α (IFN α) en timo y bazo, y HSP90 en músculo largo dorsal e hígado. El comportamiento productivo de los cerdos no se afectó por el EC, ni por el desafío con LPS. La TO se incrementó en los cerdos EC ($P < 0.01$); el desafío con LPS también provocó incremento en TO a las 2-4 horas posdesafío ($P < 0.01$). Después del primer desafío los cerdos en EC presentaron una reducción del 100% en su concentración de monocitos en sangre ($P < 0.05$); aunque el desafío con LPS no afectó ($P > 0.05$) la concentración de otros glóbulos blancos. Después del segundo desafío los cerdos en EC redujeron ($P < 0.05$) su concentración de neutrófilos banda; la concentración de los demás leucocitos no fue afectada por el EC ni por la administración de LPS ($P > 0.05$). El EC modificó la expresión de IL6 e IL10 en timo ($P < 0.05$), mientras que el LPS redujo la expresión de IL10 en ambos tejidos ($P < 0.05$). El IFN α incrementó su expresión por efecto de LPS en bazo ($P < 0.05$), pero no fue afectado por el estrés por calor ($P > 0.10$). El LPS redujo 40 % ($P < 0.05$) la expresión de HSP90 en hígado en los cerdos en EC. Se concluye que el desafío con LPS provoca incremento en la temperatura corporal de los cerdos durante las primeras 2 a 4 h posdesafío, además en condiciones de estrés por calor se modifica la expresión de citocinas en cerdos, lo que podría afectar su respuesta ante agentes patógenos.

Contenido

| | |
|--|-----|
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| CONSEJO PARTICULAR | iii |
| RESUMEN..... | iv |
| ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS | vii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. REVISION DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1. Inmunidad y el estrés por calor severo..... | 3 |
| 2.2. El sistema inmune | 5 |
| 2.3. Órganos del sistema inmune | 7 |
| 2.3.1. Médula ósea | 8 |
| 2.3.2. Timo..... | 9 |
| 2.3.3. Bazo..... | 9 |
| 2.3.5. Vasos linfáticos | 10 |
| 2.4. Células del sistema inmune | 11 |
| 2.4.1. Linfocitos..... | 12 |
| 2.4.2. Neutrófilos..... | 13 |
| 2.4.3. Basófilos..... | 14 |
| 2.4.4. Eosinófilos..... | 14 |
| 2.4.5. Monocitos..... | 15 |
| 2.4.6. Macrófagos..... | 15 |
| 2.5. Citocinas..... | 17 |
| 2.5.1. Interleucina 6 | 18 |
| 2.5.2. Interleucina 10 | 20 |
| 2.5.3. Interferón alfa | 20 |
| 2.5.4. Factor de Necrosis Tumoral alfa | 21 |
| 2.6. Lipopolisacárido de <i>Escherichia coli</i> (LPS) | 22 |
| 2.6.1. Usos en la investigación..... | 23 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 24 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 25 |
| 4.1. Objetivo particular..... | 25 |

| | | |
|------|---|----|
| 5. | MATERIALES Y METODOS | 26 |
| 5.1. | Procedimiento experimental y manejo de los animales | 27 |
| 5.2. | Extracción de ARN y síntesis ADNc | 29 |
| 5.3. | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) | 30 |
| 5.4. | Análisis de citocinas en suero | 32 |
| 5.5. | Análisis estadístico | 32 |
| 6. | RESULTADOS | 33 |
| 6.1. | Condiciones ambientales | 33 |
| 6.2. | Comportamiento productivo de los cerdos | 35 |
| 6.3. | Condición física y temperatura óptica de los cerdos | 37 |
| 6.4. | Hemograma | 39 |
| 6.5. | Expresión de ARNm de citocinas en timo y bazo | 42 |
| 6.6. | Expresión del ARNm de HSP90 en músculo largo dorsal e hígado de los cerdos | 46 |
| 6.7. | Concentración sérica de citocinas | 47 |
| 7. | DISCUSIÓN | 48 |
| 8. | CONCLUSIONES | 58 |
| 9. | LITERATURA CITADA | 59 |
| | ANEXOS | 66 |
| | Anexo 1. Composición nutricional de la dieta utilizada para la alimentación de los cerdos en tratamiento | 66 |
| | Anexo 2. Hemograma de los cerdos pre y pos desafío con LPS en confort y calor (desafío 1 y 2) | 67 |
| | Anexo 3. Expresión relativa de genes en órganos del sistema inmune de cerdos bajo estrés por calor y desafiados con LPS | 68 |

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Dieta experimental administrada a los cerdos en crecimiento alojados en condiciones de confort y estrés por calor. | 26 |
| Cuadro 2. Oligonucleótidos empleados para el análisis de qPCR del ADNc de citocinas, HSP90 y RNA ribosomal 18S | 31 |
| Cuadro 3. Comportamiento productivo de cerdos en confort y estrés por calor desafiados con lipopolisacárido de <i>Escherichia coli</i> | 36 |
| Figura 1. Inmunidad innata y adaptativa | 6 |
| Figura 2. Hematopoyesis..... | 16 |
| Figura 3. Estructura y variabilidad del LPS | 22 |
| Figura 4. Temperatura ambiental (TA) y humedad relativa (HR) en la sala de estrés por calor (A) y la sala de confort (B)..... | 34 |
| Figura 5. Temperatura ótica de los cerdos en estrés por calor (EC) o confort antes (0 horas) y después del desafío 1 (A), desafío 2 (B) y promedio de los desafíos 1 y 2 (C). | 38 |
| Figura 6. Efecto del estrés por calor y el LPS en la concentración de leucocitos sanguíneos de los cerdos antes (◻) y 48 horas después del primer desafío con LPS de <i>E. coli</i> (◼)..... | 40 |
| Figura 7. Efecto del estrés por calor y el LPS en la concentración de leucocitos sanguíneos de los cerdos antes (◻) y 48 horas después del segundo desafío con LPS de <i>E. coli</i> (◼)..... | 41 |
| Figura 8. Expresión de los RNA mensajeros de Interleucina 6 (A), Interleucina 10 (B) e Interferón alfa (C) en bazo de cerdos en condiciones de confort o estrés por calor (EC) con y sin desafío con LPS de <i>E. coli</i> (unidades arbitrarias; relación entre expresión de ARNm específico:ARNr 18S) | 44 |
| Figura 9. Expresión de los RNA mensajeros de Interleucina 6 (A), Interleucina 10 (B) e Interferón alfa (C) en timo de cerdos en condiciones de confort o estrés por calor (EC) con y sin desafío con LPS de <i>E. coli</i> (unidades arbitrarias; relación entre la expresión de ARNm específico:ARNr 18S). | 45 |
| Figura 10. Expresión del RNA mensajero de HSP90 en A) músculo largo dorsal (MLD) y B) hígado de cerdos en condiciones de confort o estrés por calor (EC) con y sin desafío con LPS de <i>E. coli</i> (unidades arbitrarias; relación entre la expresión de ARNm de HSP90:ARNr 18S)..... | 46 |

1. INTRODUCCIÓN

Diversos factores afectan el bienestar y la producción animal, tales como el estado nutricional, el manejo, el ambiente social y las condiciones ambientales. Específicamente en los cerdos se ha demostrado susceptibilidad a cambios ambientales, entre los que destaca el estrés por calor. En esta condición se han observado cambios en la conducta y fisiología de los cerdos, tales como reducción en el consumo de alimento, incremento en la temperatura corporal y tasa respiratoria (Le Bellego et al., 2002; Pearce et al., 2013a). Entre otros mecanismos, los animales en estrés por calor disipan calor mediante una redistribución de su flujo sanguíneo hacia tejidos periféricos, lo que reduce el flujo sanguíneo a órganos internos como los del tracto gastrointestinal, hecho que en consecuencia podría inducir un daño por hipoxia especialmente al epitelio intestinal (Liu et al., 2009). En esta condición, el epitelio está expuesto a bacterias entéricas cuyos lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular constituyen un componente patógeno que en condiciones normales debería iniciar una respuesta inmunológica con la finalidad de ser eliminado del sistema (Lambert, 2009). Si los mecanismos normales de defensa en los cerdos en condiciones de estrés por calor no responden adecuadamente en contra de los organismos patógenos, éstos podrían afectar no solamente su salud, sino también la velocidad de crecimiento y la estabilidad de la piara (Morrow-Tesch et al., 1994; Sutherland et al., 2006).

A nivel celular existen un grupo de proteínas, conocidas como chaperonas moleculares, estas son las proteínas de choque térmico (HSPs) que interactúan con otras proteínas, para hacer frente a la desnaturalización de otras proteínas inducida por el estrés provocado por incremento en la temperatura ambiental (Feder y Hofman, 1999). Las proteínas de choque

térmico (HSP) son abundantes en las células eucariotas, ya que constituyen aproximadamente el 1-2% de las proteínas celulares en condiciones fisiológicas, pero pueden aumentar su expresión en respuesta al estrés (Welch y Brown, 1996). Se cree que del grupo de las HSP la proteína HSP90 puede desempeñar un papel importante para influir en la termotolerancia celular (Deb et al., 2014).

Durante el verano en el valle de Mexicali y en el desierto de Sonora se registran temperaturas superiores a los 40 °C. Esta característica climática permite emplear al Valle de Mexicali como un laboratorio natural para el estudio de los efectos del estrés por calor severo en animales, y en este caso específicamente, para estudiar su relación con la respuesta inmunológica en los cerdos. Una herramienta para activar el sistema inmunológico en cerdos, es la administración de LPS de *Escherichia coli* (Kim et al., 2012). Esta estrategia permite el estudio de respuestas inflamatorias y reduce el riesgo de utilizar un patógeno vivo (Yates et al., 2011); además, el LPS puede entrar a la circulación vía el tracto gastrointestinal (Wan et al., 1989) bajo ciertas condiciones, como en el caso del epitelio intestinal dañado (van Heugten et al., 1994).

Con base en todo lo anterior el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del estrés por calor severo en la respuesta inmune de cerdos en crecimiento desafiados con LPS de *Escherichia coli*.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Inmunidad y el estrés por calor severo

El estrés por calor se define como la serie de alteraciones fisiológicas, metabólicas, inmunológicas y de conducta que sufren los animales cuando se exponen a elevadas temperaturas, donde también la humedad relativa alta puede acentuar este problema (Horowitz et al., 2004; Renaudeau et al., 2010). Los efectos del estrés por calor en cerdos se manifiestan principalmente por un incremento en la frecuencia cardiaca y tasa respiratoria (Christison y Johnson, 1972; Collier et al., 1982; Hanh et al., 1999), y una reducción marcada en el consumo de alimento (Aberle et al., 1974; Bianca, 1976; Huynh et al., 2005; Zumbach et al., 2008). El estrés por calor es un problema frecuente en los sistemas de producción de regiones extremadamente cálidas durante el verano (Waltz et al., 2014), que afecta la salud y producción de los animales.

Comparado con animales (peso inicial = 36.3 kg de peso inicial) mantenidos a una temperatura de confort (24.3 °C), aquellos alojados durante 30 días en condiciones de alta temperatura (32.3 °C) redujeron en 8% la eficiencia alimenticia (Wolp *et al.*, 2012).

El estrés por calor tiene efectos importantes en la fisiología de los animales; entre los que se observan una marcada reducción del consumo de alimento, posiblemente como medida que implementa el animal para reducir la producción de calor metabólico (Pearce et al., 2013a).

Los cerdos sometidos a estrés por calor incrementan su temperatura corporal aproximadamente 1 °C (Liu et al., 2009; Pearce et al., 2013a) por arriba de su temperatura normal. Además incrementan su frecuencia respiratoria y redistribuyen el flujo sanguíneo hacia los tejidos de la periferia para maximizar la eliminación de calor, lo que involucra una

reducción de irrigación sanguínea a órganos internos, tales como el intestino, y, consecuentemente un estado de hipoxia en esos tejidos, que en consecuencia podrían hacerlo susceptible a infecciones (Pearce et al., 2013b). A nivel celular se han observado cambios en la expresión de proteínas de choque térmico o HSPs, como resultado del estrés por calor (Sonna et al., 2002). Todos estos cambios fisiológicos, asociados al estrés por calor, pueden tener un efecto inmunosupresor en los cerdos, haciéndolos susceptibles a otros padecimientos (Sutherland et al., 2006).

La respuesta del sistema inmune en animales es muy compleja ya que es influenciada por diversos factores, tales como el estrés ambiental, enfermedades infecciosas y no infecciosas, y factores propios del animal, tales como la edad, genética, condición social, etc. La teoría más común es que el estrés puede deprimir al sistema inmunitario, aumentando así la susceptibilidad de un animal a padecer enfermedades (Salak-Johnson y McGlone, 2007).

Algunos estudios han demostrado que el sistema inmunológico se deprime por el estrés, mientras que otros no han mostrado ningún efecto del estrés sobre la inmunidad (McGlone et al., 1993 y Hicks et al., 1998). Sin embargo, se ha visto que los animales expuestos a condiciones de estrés por calor severo sufren una alteración en su función inmune, al reducir la proliferación de leucocitos y la producción de anticuerpos en cerdos (Morrow-Tesch et al., 1994) y aves (Jin et al., 2011). Esta respuesta, asociada al incremento en los niveles séricos de cortisol, puede atribuirse a la acción individual o interconectada de diversos factores (Morrow-Tesch et al., 1994; Hicks et al., 1998).

2.2. El sistema inmune

La principal función del sistema inmune es proteger al hospedero contra patógenos. Tradicionalmente la respuesta inmune se ha dividido en inmunidad innata e inmunidad adquirida (Figura 1).

La inmunidad innata es iniciada inmediatamente después de detectar la presencia de agentes patógenos, lo que conduce a 1) una reacción inflamatoria en el sitio infectado por la actividad de citocinas proinflamatorias, y 2) la salida de células presentadoras de antígenos (CPAs) que llevan las señales para la activación de linfocitos específicos (Suradhat, 2005). La inmunidad innata es la primera respuesta ofrecida frente a los microbios, que impide, controla o elimina la infección en el huésped (Abbas et al., 2008). Esta primer estrategia del sistema inmune involucra la producción de una variedad de moléculas, tales como péptidos microbianos, proteínas de fase aguda y citocinas proinflamatorias (e.g. interleucina 1 (IL)-1, IL-6, y factor de necrosis tumoral (TNF)- α , etc.) por células en sitios infectados o afectados (Suradhat, 2005), lo que resulta en la activación de mecanismos de defensa y células fagocitarias (i.e. células dendríticas, macrófagos, neutrófilos) en el tejido cercano (Suradhat, 2005). Los componentes de la inmunidad innata funcionan en todo momento, incluso antes de la infección, al impedir la entrada de los microorganismos a través de superficies epiteliales, tales como la piel, el revestimiento del tracto gastrointestinal y las vías respiratorias (Abbas et al., 2008).

La inmunidad adquirida o adaptativa, llamada así debido a que aparece como respuesta a una infección y se adapta a ella, tiene la capacidad de reconocer una gran cantidad de sustancias microbianas y no microbianas y de reaccionar frente a ellas (Abbas et al., 2008).

Los principales componentes de este tipo de inmunidad son las células llamadas linfocitos y sus productos de secreción, como los anticuerpos (Abbas et al., 2008).

Esta segunda estrategia empleada por el sistema inmune se basa en la generación de una diversidad de anticuerpos y receptores de linfocitos T (TCR) dentro del huésped, así como en la activación de linfocitos específicos en los tejidos linfoides secundarios: en consecuencia esta respuesta dependiente de antígeno, es reconocida como inmunidad adaptativa (Suradhat, 2005; Abbas et al., 2008).

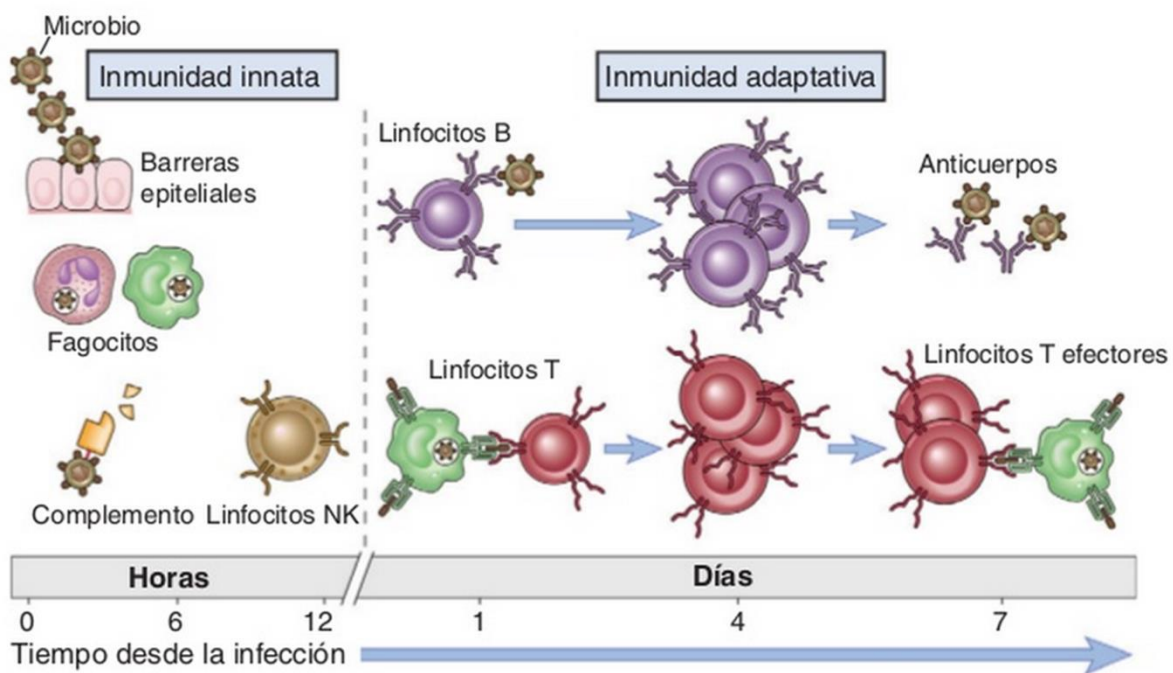


Figura 1. Inmunidad innata y adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata aportan la primera defensa contra las infecciones. Las respuestas inmunitarias adaptativas surgen más tarde y consisten en la activación de los linfocitos (tomado de Abbas et al., 2008).

Los antígenos son llevados a los tejidos linfoides, en donde se seleccionan los linfocitos específicos de antígeno para expandir y diferenciar cualquiera de las poblaciones efectoras de linfocitos que proliferan e inician la inmunidad humoral, mediada por células durante la fase de activación. En estos tejidos las poblaciones de memoria facilitan el reclutamiento rápido de los mecanismos de defensa inmunológica en el caso de una posterior exposición a un antígeno específico (Suradhat, 2005).

Entre las características que distinguen a la respuesta inmunológica adquirida de la innata se incluyen: especificidad, diversidad y memoria (Palomo et al., 2009). En la inmunidad específica, los receptores reconocen a los microorganismos infecciosos e identifican antígenos propios y del medio. Esta capacidad podría considerarse como dañina para el hospedero, ya que la activación del sistema inmune por tales antígenos puede conducir a enfermedades autoinmunes y alergias. En cambio, en la inmunidad adquirida, los receptores reconocen estructuras altamente conservadas presentes en un gran grupo de microorganismos. Estas estructuras son designadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y los receptores involucrados en identificarlas son llamados receptores para reconocimiento del patrón (Hernández y Alvarado 2001).

2.3. Órganos del sistema inmune

El sistema inmune está conformado por una serie de órganos, tejidos y células, esparcidos por todo el cuerpo, que le permiten al organismo distinguir lo propio de lo extraño (Palomo et al., 2009). Desde el punto de vista de sus características estructurales podemos encontrar órganos parenquimatosos como el timo, el bazo y los ganglios linfáticos y estructuras tubulares como los vasos linfáticos, que se encuentra intercomunicando algunos de los órganos mencionados anteriormente (Abbas et al., 2008).

Los órganos linfoides se pueden clasificar en primarios (timo y médula ósea) y secundarios (bazo, ganglios linfáticos, y tejido linfático asociado a mucosas). En los primeros tiene lugar la generación de las células que conforman al sistema inmune (linfopoyesis), además poseen un ambiente idóneo para que los linfocitos adquieran su repertorio de receptores específicos para cada tipo de antígeno.

Los órganos secundarios se encargan de hospedar las células capacitadas funcionalmente para interactuar con microorganismos o antígenos, atrapados por estos órganos, en un entorno adecuado para la interacción y eliminación de agentes extraños al organismo (Palomo et al., 2009). A continuación se describen las características más importantes de los diferentes órganos linfáticos.

2.3.1. Médula ósea

Se considera como el principal órgano linfopoyético primario en cerdos, al igual que en otros mamíferos. Se encuentra distribuida en el interior de todos los huesos del animal, principalmente en los huesos largos. En ella se producen las células madre linfopoyéticas que originarán los futuros macrófagos y linfocitos B y T. Los linfocitos T emigran desde la médula ósea embrionaria a la corteza del timo.

Desde el punto de vista estructural y funcional, la médula ósea está formada por dos grandes compartimentos relacionados entre sí: estroma y hematopoyético (Palomo et al., 2009). El estroma es la zona o parte estructural que brinda sostén y apoyo al parénquima alrededor de la médula ósea. El estroma se origina a partir de la intervención de los vasos sanguíneos que atraviesan el periostio del hueso en formación. El compartimento hematopoyético está formado por los islotes de células hematopoyéticas de las diferentes

líneas celulares (serie granulocítica, serie monocítica, serie eritroblástica, serie megacariocítica y serie linfoide), en sus distintos estadios de maduración (Abbas et al., 2008; Palomo et al., 2009).

2.3.2. *Timo*

El timo se localiza en la cavidad torácica en posición craneal con respecto al corazón. En caballos, bóvidos, ovejas, cerdos y pollos se extiende hacia el cuello hasta la glándula tiroidea (Tizard, 2009). El tamaño del timo es variable; su tamaño relativo es mayor en animales recién nacidos, mientras que su tamaño absoluto es mayor en la pubertad. Puede ser muy pequeño y difícilmente localizable en animales adultos (Tizard, 2009).

Después de la pubertad el timo comienza a involucionar (Palomo et al., 2009). La principal función del timo es participar en la maduración y diferenciación de los linfocitos T, a partir de la proliferación y diferenciación de linfocitos inmunológicamente no competentes que llegan, en estado inmaduro, desde la médula ósea (Palomo et al., 2009). Los linfocitos T y las citocinas por ellos producidas, participan en la defensa contra microorganismos intracelulares (Abbas et al., 2008), en la inmunidad celular, e indirectamente en la inmunidad humoral (Abbas et al., 2008; Palomo et al., 2009).

2.3.3. *Bazo*

Es un órgano linfoide secundario, localizado en la parte izquierda de la cavidad abdominal, y es el órgano linfoide más grande del cuerpo (Palomo et al., 2009). En el cerdo tiene forma alargada y estrecha y es de color rojo brillante.

La función de este órgano linfoide es doble, ya que funciona como un filtro a nivel sanguíneo (los ganglios linfáticos son filtros a nivel linfático) para realizar el

reconocimiento de antígenos (función inmunológica). Además, sirve como almacén de producción de células sanguíneas, principalmente eritrocitos y plaquetas (función hematopoyética; Tizard, 2009; Palomo et al., 2009).

2.3.4. *Ganglios linfáticos*

Los ganglios linfáticos son pequeños órganos linfoides secundarios, ovales y encapsulados, de 1-3 cm de diámetro. A diferencia de otros órganos linfoides, están interpuestos en el trayecto de los vasos linfáticos (formando una red), actuando como filtros de bacterias, otros microorganismos y otras sustancias extrañas, a través de los cuales pasa la linfa en su camino hacia la sangre. Los ganglios linfáticos se encuentran en número variable en diferentes zonas del cuerpo, pero son más abundantes en las regiones axilar, cervical, inguinal, en las cavidades corporales (p.ej. mesenterio) y a lo largo de los vasos mayores (Palomo et al., 2009).

El ganglio linfático está dividido en: área cortical, con linfocitos B; área paracortical, con linfocitos T; y médula central, que contiene linfocitos B, T, macrófagos y células productoras de anticuerpos (Regueiro et al., 2010).

2.3.5. *Vasos linfáticos*

El transporte de los antígenos hacia los ganglios linfáticos tiene lugar básicamente a través de los vasos linfáticos (Abbas et al., 2008). Los vasos linfáticos que transportan la linfa hacia un ganglio linfático son designados como aferentes, y los que la descargan desde el ganglio son los eferentes (Abbas et al., 2008).

2.4. Células del sistema inmune

Las principales células del sistema inmune (Figura 2) incluyen linfocitos, células presentadoras de antígenos y diferentes células fagocíticas organizadas en los tejidos linfoides (Abbas et al., 2008; Palomo et. al., 2009). Las células del sistema inmune derivan de células pluripotentes, a través de un proceso finamente regulado, en el que participan varias citocinas de la médula ósea, órgano en que ocurre la hematopoyesis, proceso por el cual se forman, diferencian y maduran las células sanguíneas (Palomo et al., 2009).

Los leucocitos o glóbulos blancos, son células sanguíneas que se encuentran en la sangre en menor proporción que los eritrocitos (Tizard, 2009). Estas células también pueden encontrarse en la linfa, líquido cefalorraquídeo, tejidos, etc. (Barioglio, 2001). Los leucocitos participan en la defensa de los organismos frente a agentes infecciosos, tales como bacterias, virus, y hongos, entre los más importantes, o bien, frente a cuerpos extraños.

En la sangre se encuentran 5 tipos de leucocitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos. Los tres primeros presentan granulaciones en su citoplasma, por lo que se les denomina *granulocitos*, mientras que a los monocitos y linfocitos se les conoce como *agranulocitos*, al no presentar gránulos en su citoplasma (Barioglio, 2001).

Los valores normales de leucocitos totales en sangre pueden variar entre especies. Por ejemplo, en borregos y vacas es de $4-12 \times 10^9/L$, mientras que en cerdos es de $11-22 \times 10^9/L$ (Manual Merck, 2012) y en humanos $4-10 \times 10^9/L$ (Palomo et al., 2009).

2.4.1. *Linfocitos*

Hay dos poblaciones de linfocitos sanguíneos que se distinguen morfológicamente: los linfocitos grandes, con un citoplasma granuloso, y los linfocitos pequeños, prácticamente sin citoplasma (Parham, 2005). Los primeros son las células efectoras de la inmunidad innata llamadas células NK (natural killer). Los linfocitos pequeños son responsables de la respuesta inmune adaptativa; son pequeños porque circulan en su forma latente e inmadura (Parham, 2005).

Los linfocitos constituyen aproximadamente el 20-25 % de los leucocitos circulantes (Palomo et al., 2009). La mayor parte de los linfocitos que se encuentran en sangre, linfa, ganglios linfáticos y timo son linfocitos T, en cambio un mayor porcentaje de los linfocitos presentes en la médula ósea son linfocitos B; en el bazo y amígdalas el porcentaje de ambas subpoblaciones es similar (Regueiro et al., 2010; Palomo et al., 2009). Los linfocitos, junto con las células presentadoras de antígeno (CPA) son la base celular de la respuesta inmune específica (Palomo et al., 2009).

Los linfocitos se dividen en tres grupos funcionales: los linfocitos T, que participan en la inmunidad adquirida de tipo celular; los linfocitos B, que participan en la inmunidad adquirida de tipo humoral, y las células NK ("Natural Killer") que no expresan marcadores de células T ni células B y que participan en la inmunidad natural o innata (Regueiro et al., 2010; Palomo et al., 2009).

Los linfocitos T cooperadores (Th) $CD4^+$ ayudan a los macrófagos en la eliminación de las moléculas ingeridas y a los linfocitos B en la producción de los anticuerpos; mientras que los linfocitos T citotóxicos (Tc) $CD8^+$ destruyen las células que albergan patógenos

intracelulares, de esta forma suprimen los reservorios de la infección (Abbas et al., 2009). Cuando los linfocitos T vírgenes son estimulados por el antígeno se desarrollan dos tipos celulares de linfocitos: los efectores y de memoria (Tizard, 2009).

2.4.2. *Neutrófilos*

Constituyen el 90 % de las células polimorfonucleares (Regueiro et al., 2010). Los neutrófilos que se encuentran en suspensión en la sangre son células redondeadas, de alrededor de 10 a 20 μm de diámetro (Tizard, 2009; Palomo et al., 2009). Tienen un citoplasma finamente granular, y en el centro del mismo un núcleo segmentado irregularmente (Abbas et al., 2009).

En el citoplasma de neutrófilos se han descrito cuatro tipos de gránulos: los primarios o azurófilos (lisosomas), secundarios (específicos), terciarios y vesículas secretoras.

Los gránulos primarios, son escasos en los estadios maduros, y contienen proteínas microbicidas (peroxidasa, lisozima, proteínas catiónicas, entre otras); proteasas (elastasa, catepsina G) e hidrolasas ácidas (N-acetilglucuronidasa, catepsinas B y D).

Los gránulos secundarios, son los más numerosos en los neutrófilos maduros. Contienen lisozima, colagenasa, fosfatasa alcalina, lactoferrina y otras proteínas (Abbas et al., 2009; Palomo et al., 2009). Los gránulos terciarios contienen principalmente gelatinasa.

El último grupo de gránulos son las llamadas vesículas secretoras, que contienen algunas proteínas plasmáticas (Palomo et al., 2009). Responden a una amplia variedad de agentes quimiotácticos, como determinadas proteínas del complemento (C5a), factores del sistema fibrinolítico, además de productos liberados por otros leucocitos y algunas bacterias (Regueiro et al., 2010).

Cuando los neutrófilos alcanzan los lugares de invasión microbiana, los neutrófilos ingieren y destruyen a las partículas extrañas, tales como bacterias microbianas, mediante la fagocitosis (Abbas et al., 2009).

2.4.3. *Basófilos*

Los basófilos representan menos del 1 % de los leucocitos sanguíneos (Palomo et al., 2009) y presentan gránulos citoplasmáticos (Regueiro et al., 2010) llenos de histamina, sustancia implicada en las reacciones alérgicas (Manual Merck, 2012). Al igual que otros granulocitos, responden a agentes quimiotácticos, y son capaces de liberar el contenido de sus gránulos frente a estímulos (Regueiro et al., 2010). Los basófilos no ingieren células extrañas cuando se encuentran con alérgenos (antígenos que causan reacciones alérgicas), sino que liberan la histamina contenida en sus gránulos, la cual aumenta el flujo sanguíneo a los tejidos dañados (Manual Merck, 2012). Los basófilos también producen sustancias que atraen a los neutrófilos y eosinófilos a un foco de infección (Manual Merck, 2012).

2.4.4. *Eosinófilos*

Los eosinófilos constituyen el 2-5 % de los leucocitos sanguíneos en personas sanas (Regueiro et al., 2010; Palomo et al., 2009), del 0 a 15 % en cerdos y 0 a 20 % en vacas (Manual Merck, 2012). Cerca del 99% de los eosinófilos se encuentra en tejidos a los que llegan luego de un breve paso de aproximadamente 30 minutos por la sangre, después de salir de la médula ósea (Palomo et al., 2009). Su concentración aumenta bajo determinadas condiciones, como procesos alérgicos y parasitosis.

Los eosinófilos responden a agentes quimiotácticos y tienen cierta capacidad fagocítica, aunque preferentemente estas células liberan al exterior el contenido de sus gránulos en

respuesta a parásitos que no pueden fagocitarse (Regueiro et al., 2010; Palomo et al., 2009). Estos gránulos contienen una variedad de mediadores incluyendo enzimas como peroxidasa y fosfolipasa B y la llamada proteína básica principal, todas las cuales tienen efecto deletéreo (mortífero o venenoso) para el tegumento. Así la permeabilidad del tegumento parasitario es seriamente alterada y los eosinófilos pueden también invadir activamente el tegumento (Palomo et al., 2009).

2.4.5. *Monocitos*

Es el primer tipo celular que entra en la sangre periférica sin estar totalmente diferenciado después de abandonar la medula ósea (Abbas et al., 2008). Los monocitos tienen un diámetro de 10 a 15 μm , y poseen un núcleo con forma de riñón y citoplasma granular fino, que contiene lisosomas (Abbas et al., 2008). En su citoplasma los monocitos tienen gránulos azurófilos o primarios que contienen hidrolasas ácidas, las cuales, junto con los mecanismos oxidativos, participan en la destrucción de las partículas fagocitadas. Los monocitos se trasladan a los tejidos cuando se produce una infección (Manual Merck, 2012); una vez que han penetrado en los tejidos, estas células maduran y se convierten en macrófagos (Abbas et al., 2008; Manual Merck, 2012).

2.4.6. *Macrófagos*

Los macrófagos inmaduros circulan por la sangre, donde se denominan monocitos, durante aproximadamente 3 días antes de acceder a los tejidos y transformarse (Abbas et al., 2008; Tizard, 2009). Representan el 5 % del total de la población leucocitaria y tienen una vida media mucho más larga (meses e incluso años) que los neutrófilos en los tejidos (Palomo et al., 2009), y se renuevan en una tasa alrededor del 1 % al día (Tizard, 2009).

Los macrófagos participan en una respuesta inmune temprana y no específica, antes de que se produzca la respuesta de células T. Fagocitan de forma activa grandes partículas, por lo que tienen una importante función en la presentación de antígenos derivados de microorganismos infecciosos como bacterias y parásitos. También son capaces de presentar antígenos a los linfocitos T CD4+ en la fase efectora de la inmunidad celular, siendo estos a su vez, capaces de activar a los macrófagos para que destruyan a estos microorganismos (Palomo et al., 2009). Dependiendo de la zona en que se encuentren los macrófagos reciben diferente nombre, por ejemplo: histiocitos (en tejido conjuntivo), células de Kupffer (revestimiento de los sinusoides hepáticos), microglía (en el cerebro), entre otras (Tizard, 2009).

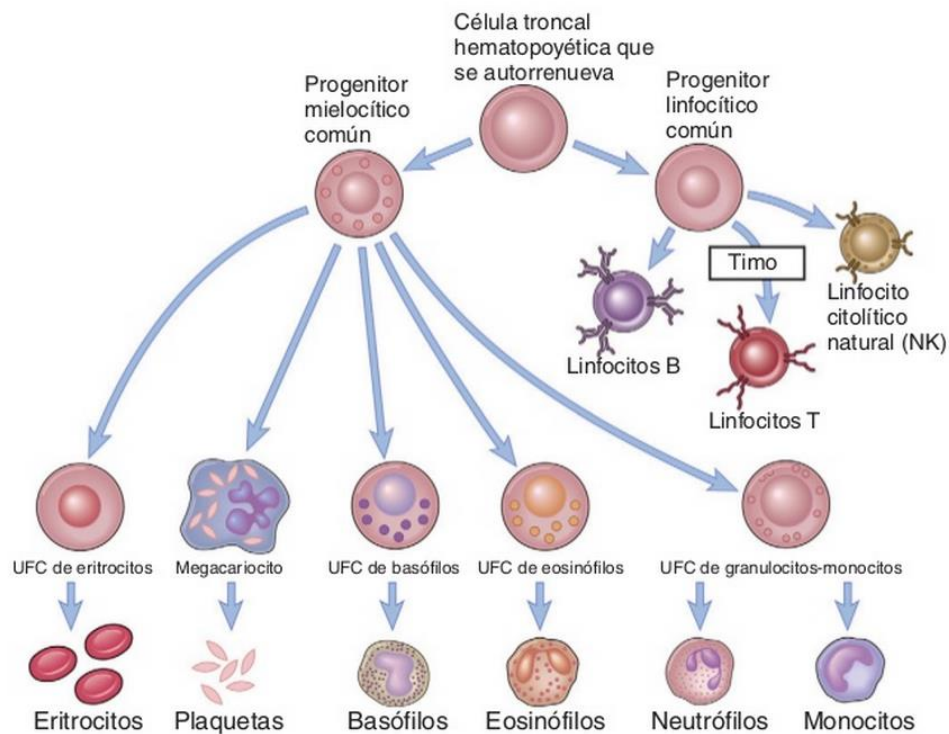


Figura 2. Hematopoyesis. En este “árbol hematopoyético” se representan las diversas estirpes de células sanguíneas (tomado de Abbas et al., 2008).

2.5. Citocinas

Las citocinas son proteínas solubles producidas en forma transitoria por un estímulo (presencia de un antígeno, otra citocina). Participan en múltiples funciones como proliferación y diferenciación celular, hematopoyesis, actividad microbicida, reacción inflamatoria, respuesta inmune específica y no específica, y en procesos relacionados con el desarrollo de los organismos vivos. Las citocinas regulan la respuesta inmune induciendo o inhibiendo la producción de otras citocinas y sus respectivos receptores, así como activando mecanismos de transducción de señales en células blanco o sobre ellas mismas (Palomo et al., 2009). Las citocinas secretadas suelen actuar localmente y durante un periodo breve de tiempo, pudiendo en algunos casos ejercer sus funciones sobre la misma célula productora (actividad autócrina) o sobre células vecinas (actividad parácrina; Palomo et al., 2009).

Las citocinas son pleiotrópicas y redundantes, ya que una citocina puede ejercer una actividad funcional sobre varios tipos celulares, y una determinada función puede ser realizada por diferentes citocinas, respectivamente (Palomo et al., 2009). Las citocinas en general son producidas por una gran variedad de células, como es el caso de la IL-1 la cual es producida por todas las células nucleadas (monocitos, macrófagos, células dendríticas, etc.). Por otra parte, los linfocitos T y los macrófagos son las células que producen la mayor diversidad de citocinas, aunque casi cualquier célula es capaz de producir citocinas ante determinados estímulos (Abbas et al., 2008; Tizard, 2009).

La producción de una citocina desencadena diferentes reacciones, tales como inducir la secreción de al menos otra citocina, suprimir la actividad de otras o bien puede inducir una cascada de citocinas (Palomo et al., 2009). Las citocinas participan regulan y coordinan muchas de las actividades propias de la inmunidad innata y la reacción inflamatoria (Abbas

et al., 2008), y en la respuesta inmune específica y en la hematopoyesis (las citocinas estimulan la proliferación de las células troncales de la médula ósea y su maduración). Estas actividades se manifiestan en la proliferación y diferenciación celular, la inducción de la síntesis de proteínas o de mRNA, su participación en la activación celular, su papel como factores quimiotácticos y también su participación en fenómenos como la apoptosis (Palomo et al., 2009).

2.5.1. Interleucina 6

La interleucina 6 (IL-6) es una citocina producida por los linfocitos T y B, macrófagos, estroma de médula ósea, fibroblastos, células endoteliales, etc. (Palomo et al., 2009; Saavedra et al., 2010). Presenta efectos diversos sobre sus células diana, por ejemplo, en timocitos ejerce un efecto coestimulador para la liberación de linfocitos B maduros; además, estimula la producción de la mayoría de las proteínas de fase aguda (a disturbios de la homeostasis), como proteína C-reactiva, amiloide sérico A, ceruloplasmina, haptoglobina, hemopexina, ferritina (Martinez-Subiela et al., 2001). También estimula la producción de algunas proteínas del sistema del complemento, diferentes proteínas de la cascada de la coagulación y del sistema fibrinolítico, etc. (Saavedra et al., 2010).

La IL-6 induce la producción de hepcidina en el hígado, la cual inhibe la absorción de hierro en duodeno, pero que induce la expresión de ferritina, que promueve el almacenamiento y retención del hierro dentro de los macrófagos (Saavedra et al., 2010). Estos mecanismos conducen a una disminución de la concentración de hierro en la circulación, y por lo tanto a una disponibilidad limitada de hierro para las células eritroides (Weiss y Goodnough, 2005).

La IL-6 coestimula el crecimiento de diferentes colonias de precursores hematopoyéticos, promueve el crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos e interviene en la proliferación y maduración de la serie megacariocítica, que da origen a las plaquetas (Saavedra et al., 2010).

El sistema inmune IL-6 promueve la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B, inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1. También promueve la activación, mediante el aumento en la expresión de selectina-E, de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1), de moléculas de adhesión de las células vasculares (VCAM-1) y promueve la liberación de otros mediadores proinflamatorios por parte de dichas célula (Saavedra et al., 2010).

La IL-6 es, junto con IL-1, TNF- α e INF- γ , un regulador importante de la termogénesis corporal, además se ha demostrado su papel como pirógeno (Saavedra et al., 2010). La fiebre inducida por IL-6, al igual que IL-1 y TNF- α , es causada a través del rápido aumento de la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2, sustancia con potente efecto febril) en el cerebro (Dinarello et al., 1991). Se requiere la activación de los receptores en hipotálamo de PGE2, proporcionando un mecanismo de unión para la fiebre causada por pirógenos exógenos y endógenos (Dinarello, 2004).

Sustancias como los glucocorticoides (corticotropina) tienen la capacidad de inhibir la síntesis de estas citocinas pirogénicas como IL-6 y TNF- α (Macrowiak, 1998).

2.5.2. Interleucina 10

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina producida por las células colaboradoras Th0 y Th2, linfocitos T, CD4+ y CD8+, linfocitos B, macrófagos, etc. (Palomo et al., 2009). Es conocida como la citocina inmunosupresora por excelencia. En macrófagos inhibe la síntesis de muchas otras citocinas, como por ejemplo, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12, y la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II), las cuales presentan antígenos procesados por las CPAs a los linfocitos T colaboradores, y moléculas de adhesión en monocitos (Abbas et al., 2008). También tiene efectos antiproliferativos sobre muchos tipos celulares.

La IL-10 ejerce múltiples actividades inmunomoduladoras, por ejemplo, es un cofactor para el crecimiento de líneas y colonias de células mastocíticas *in vitro*; regula las funciones mediadas por linfocitos B, induciendo la síntesis de IgG, y por linfocitos T, influyendo en el desarrollo de timocitos y células T; ejerce efectos reguladores sobre la angiogénesis. Otras citocinas relacionadas estructural y funcionalmente con la IL-10, son como la IL-19, IL-20 e IL-22, cuyas funciones son todavía poco conocidas (Abbas et al., 2008).

2.5.3. Interferón alfa

El interferón alfa (IFN- α) es una citocina conocida dentro del grupo de interferones de tipo I, junto con IFN- β . Es producida por linfocitos, monocitos y macrófagos, siendo éstos últimos sus principales productores. Ejerce su efecto sobre múltiples tipos celulares, principalmente para la resistencia a virus. Inhibe la proliferación viral al inhibir la replicación del ARN o ADN viral mediante la síntesis de varias enzimas tales como 2'-5'oligoadenil sintetasa, Además, provoca el aumento del MHC-I, ya que los linfocitos citotóxicos (LTc) reconocen los antígenos en función de este último (Palomo et al., 2009).

Los interferones tipo I aumentan la actividad lítica de las células NK, las cuales pueden matar más eficazmente las células infectadas (Palomo et al., 2009).

2.5.4. *Factor de Necrosis Tumoral alfa*

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina producida por monocitos y macrófagos activados, además de otros tipos celulares que incluyen linfocitos T, B y fibroblastos. Esta citocina actúa sobre múltiples tipos celulares como mediador de respuestas inflamatorias e inmunes, regula la proliferación y diferenciación, y tiene efecto citotóxico para células tumorales (Palomo et al., 2009).

A nivel del endotelio vascular, el TNF- α presenta una actividad procoagulante que estimula la expresión de factores tisulares y suprime cofactores importantes para la actividad de la proteína C anticoagulante (Anaya, 2003). El TNF- α activa células endoteliales para que produzcan IL-1; puede inducir la expresión de moléculas pertenecientes al MHC, el antígeno leucocitario humano A y B y activa antígenos que participan en la adherencia de leucocitos y plaquetas a la superficie del endotelio (Hernández y Alvarado, 2001; Tizard, 2009).

TNF- α es un poderoso inductor de respuesta inflamatoria, la cual puede mediar directamente o por intermedio de la IL-1 y otras citocinas proinflamatorias. El TNF- α puede inducir la producción de IL-2, IL4, IL-6, IL-10, IL-1, IL-18 IFN- γ , factor de crecimiento y transformación beta (TGF- β), factor inhibidor de la migración (MIF), entre otros. Igualmente, esta citocina puede estimular la producción de hormonas como el cortisol, la epinefrina, el glucagón, la insulina y la norepinefrina (Anaya, 2003).

2.6. Lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS)

Los lipopolisacáridos (endotoxinas, LPS; Figura 3) son los principales componentes en la superficie de la membrana externa presente en bacterias Gram-negativas, que actúan como fuertes estimuladores de la inmunidad innata o natural (Alexander y Rietschel, 2001). Esta endotoxina consiste en un fosfoglucolípido, denominado lípido A (Alexander y Rietschel, 2001; Bermejo y Duarte, 2003), altamente conservado, anclado a la membrana bacteriana por medio de enlace covalente a un heteropolisacárido hidrofílico, que confiere actividad biológica a la molécula (Bermejo y Duarte, 2003). El heteropolisacárido comprende dos regiones: la cadena *O-específica* también llamada *antígeno O*, formada por unidades repetitivas de oligosacárido, y el *core*. Éste a su vez se subdivide en *core externo* (formado por hexosas), mediante el cual se une al antígeno O; y el *core interno* (formado por heptosas). El lípido A se une a esta porción mediante un residuo llamado KDO (ácido 2-keto-3-deoxioctanoico; Bermejo y Duarte, 2003).

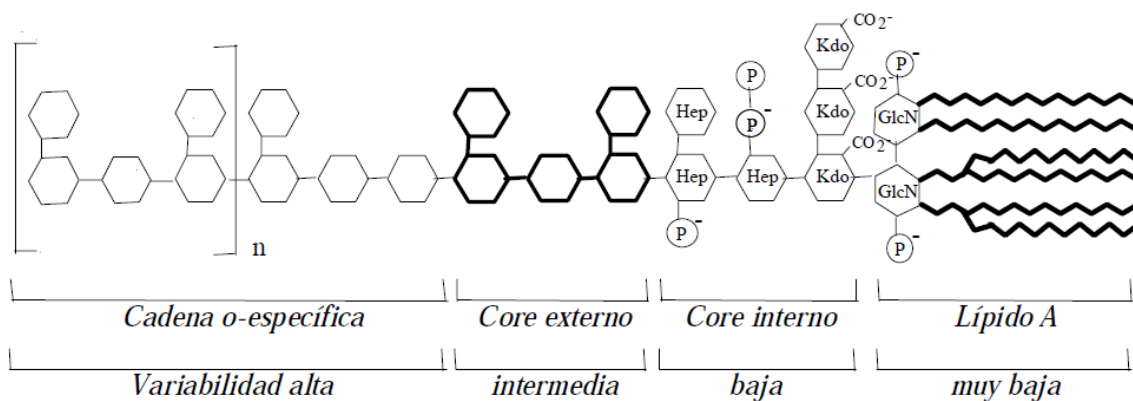


Figura 3. Estructura y variabilidad del LPS (tomado de Bermejo y Duarte, 2003).

Estas moléculas han sido aisladas de una gran variedad de bacterias Gram-negativas y algunas cianobacterias, y sus características estructurales y biológicas así como de la

biosíntesis y relaciones estructura-función de los lipopolisacáridos están siendo estudiadas principalmente con *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (Rojas, 1995).

2.6.1. Usos en la investigación

La administración de LPS de *E. coli* es un modelo empleado en estudios para simular procesos infecciosos agudos, por tener acciones altamente reproducibles y carecer de efectos secundarios asociados a las infecciones crónicas (Yates et al., 2011). Además, en estudios de problemas entéricos, el LPS ha sido catalogado como el principal factor involucrado en la disfunción del intestino, durante procesos de infección causados por bacterias gram negativas (Santos et al., 2010).

El LPS se ha utilizado para estudiar la respuesta inmune en diferentes sistemas biológicos. Por ejemplo, se ha estudiado la biosíntesis del LPS (Wang y Quinn, 2010); su estructura y función, el metabolismo de proteínas (Yates et al., 2011) y aminoácidos (Kim et al., 2012), efectos inmunológicos (Weber y Kerr, 2008), aspectos fisiológicos (Carroll et al., 2011); y choque endotóxico (Netea et al., 2001; Wang y Quinn, 2010). También se han utilizado para inducir la síntesis y secreción de factores de crecimiento tales como interleucinas (Zuckerman et al., 1989).

El LPS es un agente inductor de estrés (Jiang et al., 2009) y ha sido demostrado que es un potente estimulador de macrófagos productores de IL-1, FNT- α (van Heugten et al., 1994) e IL-6 (Webel et al., 1997). Las citocinas proinflamatorias son responsables de cambios metabólicos (reducción en la capacidad de utilización de las grasas) y fisiológicos (e.g. incremento de la temperatura corporal, tasa respiratoria) durante una infección o respuestas inflamatorias (van Heugten et al., 1994; van Heugten et al., 1996; Webel et al., 1997).

3. HIPÓTESIS

El estrés por calor afecta los mecanismos de defensa de los cerdos en crecimiento, y modifica su respuesta inmune ante la presencia de un agente patógeno como el lipopolisacárido de *Escherichia coli*.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del estrés por calor en la respuesta inmune de cerdos en crecimiento desafiados con lipopolisacárido de *Escherichia coli*.

4.1. Objetivo particular

Determinar los efectos del desafío inmunológico con LPS de *E. coli* en cerdos en crecimiento bajo condiciones de estrés por calor severo sobre:

- Comportamiento productivo
- Temperatura corporal
- Biometría hemática (Hemograma)
- Expresión de ARN mensajero (ARNm) de las citocinas de respuesta inflamatoria: IL-6, IL-10 y INF α en los órganos de sistema inmune bazo y timo.
- Expresión de proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90) en músculo largo dorsal e hígado.
- Concentración sérica de citocinas IL-6, IL-10 y TNF α .

5. MATERIALES Y METODOS

El experimento se llevó a cabo durante el verano de 2013 en la Unidad de Metabolismo y Fisiología Animal y el análisis de muestras en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, México.

Para la realización del trabajo experimental se utilizaron dos salas con jaulas de piso elevado de 1.2 x 1.2 m, equipadas con comedero automático de acero inoxidable y bebedero de chupón. En una de las salas se empleó un equipo de aire acondicionado para mantener temperatura ambiental a 26 ± 2 °C (sala de confort); en la otra sala no se controló la temperatura ambiental (sala de estrés por calor, EC), por lo que ésta última estuvo sujeta a las fluctuaciones normales de temperatura que ocurren en el verano en el Valle de Mexicali y que constantemente superan los 42 °C a partir del mediodía.

Cuadro 1. Dieta experimental administrada a los cerdos en crecimiento alojados en condiciones de confort y estrés por calor.

| Ingrediente (%) | |
|---|-------|
| Trigo | 71.48 |
| Pasta de soya | 23.55 |
| L-Lisina-HCl | 0.53 |
| L-Treonina | 0.16 |
| DL-Metionina | 0.12 |
| Aceite de canola | 1.50 |
| Carbonato de calcio | 1.53 |
| Fosfato dicálcico | 0.58 |
| Sal iodada | 0.35 |
| Premezcla de vitaminas y minerales ^a | 0.20 |

^a Proporciona por kg de dieta = 4800 IU vitamina A; 800 IU vitamina D₃; 4.8 IU vitamina E; 1.6 mg vitamina K₃; 4 mg riboflavina; 7.2 mg D-ácido pantoténico; 16 mg niacina; 12.8 µg vitamina B₁₂; 64 mg Zn; 64 mg Fe; 4 mg Cu; 4 mg Mn; 0.36 mg I, and 0.13 mg Se.

La alimentación de los animales sujetos a este experimento consistió en una dieta elaborada con trigo y pasta de soya suplementada con aminoácidos libres (Cuadro 1), y formulada para cubrir los requerimientos de proteína y energía para cerdos en crecimiento (NRC, 1998). Se ofreció agua purificada durante todo el periodo experimental.

5.1. Procedimiento experimental y manejo de los animales

Se utilizaron 24 cerdos en crecimiento $\frac{1}{4}$ Landrace- $\frac{1}{4}$ Yorkshire- $\frac{1}{2}$ Duroc, destetados a los 28 días de edad con peso vivo aproximado de 7.3 kg. Durante el experimento los cerdos fueron alojados por parejas, con agua y alimento a libre acceso. El diseño del experimento se realizó con un arreglo factorial 2 x 2 que incluyó los factores de temperatura ambiental (confort o calor) y el desafío de los cerdos con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* (sin desafío o con desafío). En consecuencia, se formaron parejas de cerdos que se asignaron de forma aleatoria a cada uno de los siguientes cuatro tratamientos: T1, cerdos alojados en sala de confort, no desafiados; T2, cerdos alojados en condiciones de confort, desafiados con LPS de *E. coli*; T3, cerdos alojados en sala de estrés por calor, no desafiados; T4, cerdos alojados en sala de estrés por calor, desafiados con LPS de *E. coli*.

Se registró de la temperatura y humedad dentro de las salas de EC, confort y en el exterior, mediante higo-termógrafos de la marca Thermotracker (San José, CA, USA; software Thermotracker-Pro 3.0) programados para registrar los datos de temperatura ambiental y humedad relativa cada 15 minutos durante todo el periodo experimental.

El experimento consistió en 7 días de adaptación a las jaulas, dieta y condiciones de manejo, seguidos de 14 días de tratamiento, dividido en dos períodos de 7 días cada uno. El primer día de cada período los cerdos de T2 y T4 fueron desafiados con LPS, basado en

estudios previos (van Heugten et al., 1994, Weber y Kerr, 2008; Jiang et al. 2009); el desafío se llevó a cabo a las 1200 hrs con una dosis de 50 µg/kg de PV, de LPS de *E. coli* (Serotipo K-235 Sigma Aldrich) disuelto en 1 ml solución salina estéril (NaCl al 0.9 %) por vía intraperitoneal; a los cerdos de T1 y T3 se les aplicó el mismo volumen (1 ml) de solución salina estéril por la misma vía y en el mismo día y horario de aplicación.

Los cerdos fueron pesados semanalmente desde el inicio de la fase de adaptación hasta el final del experimento, esto para calcular su ganancia diaria de peso; se estimó su consumo de alimento con la misma frecuencia; así como la relación ganancia:consumo (G:C).

Se midió la temperatura corporal de los cerdos con un termómetro óptico (Microlife IR100, Medical Solutions, Inc., USA) antes del desafío con el LPS (0 horas) y a las 2, 4, 8, 24 y 36 horas posdesafío. Para análisis de biometría hemática se colectaron muestras de sangre de la vena yugular antes y después de 48 horas de cada desafío; estas muestras de 6 ml aproximadamente, fueron colectadas en tubos Vacutainer (BD Vacutainer, K2E/K2 EDTA; REF 368171; Franklin Lakes, NJ, USA) con EDTA como anticoagulante, homogenizadas y conservadas en refrigeración para su análisis en un laboratorio de análisis clínicos veterinarios (VetLab, responsable MVZ Myrna Romano Osuna, Mexicali, B.C.; registro SAGARPA # 353).

Para analizar la concentración de citocinas en sangre, se colectaron muestras sanguíneas (6 ml cada una, aproximadamente) a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas posdesafío en tubos vacutainer (BD Vacutainer Suero; REF 368175) sin anticoagulante para recuperar el suero.

Al final del experimento 4 cerdos de cada tratamiento fueron sacrificados por insensibilización con descarga eléctrica. Inmediatamente después del sacrificio se

colectaron muestras de los órganos linfoides bazo y timo. Estas muestras se colocaron en criotubos de 2 ml e inmediatamente fueron congeladas en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a -86°C .

5.2. Extracción de ARN y síntesis ADNc

Las muestras de bazo y timo fueron procesadas para extracción de ARN total con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a la metodología descrita por Méndez et al. (2011). La integridad del ARN total fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Se realizó la síntesis de ADNc mediante retrotranscripción. En un microtubo de 500 μl se colocaron 5 μl de ARN total y se le adicionaron 6 μl de buffer 5x de transcriptasa reversa y 0.75 μl de ADNasa (1 U/ μl , Invitrogen), y 18.25 μl de agua tratada con DEPC (agua libre de nucleasas), la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 min y 5 min a 70°C en un baño seco. Al tubo de reacción se le agregó 1 μl de random primers (0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Invitrogen), 1 μl de DNTP's (10 μM de cada uno), y posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 5 min, al término se colocó en hielo. Se añadieron 2 μl de buffer 5x de transcriptasa reversa, 3 μl de DTT (0.1 M), 1 μl de inhibidor de ribonucleasa (10 U/ μl , RNAsa, Invitrogen) y se incubó a 42°C por 2 min, antes de añadir 1 μl de la enzima transcriptasa reversa (200 U/ μl , Revert Aid H Minus, Fermentas). La reacción se incubó a 42°C por 50 min y 70°C durante 15 min. El producto de ADNc fue conservado a -20°C hasta su uso. El ADNc de cada muestra fue cuantificado a 260 nm por espectrofotometría (Helios β ; Thermo Electron, Rochester, NY, USA), con los valores obtenidos se realizó una dilución a concentración final de 50 ng/ μl , para los análisis de PCR cuantitativo (qPCR).

5.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Para el análisis de expresión de citocinas en tejidos linfoides (IL-6, IL-10, INF- α) y de HSP90 en hígado y músculo se diseñaron oligonucleótidos específicos, de acuerdo a secuencias obtenidas de la base de datos GenBank (Cuadro 2). El ARN ribosomal 18S se empleó como gen constitutivo para normalizar la reacción. Previo a los análisis de qPCR se realizaron pruebas de PCR punto final para estandarizar las condiciones de amplificación de cada ARN mensajero. Los productos de PCR punto final fueron purificados con un kit comercial (GeneJet, Thermo Scientific) y secuenciados (Davis Sequencing Facilities, California, USA), para confirmar la especificidad de los oligonucleótidos y productos obtenidos.

Se llevaron a cabo reacciones de amplificación y cuantificación de ARN mensajeros (qPCR) de IL-6, IL-10 e INF- α en bazo y timo, y de proteína de choque térmico en músculo largo dorsal e hígado. Estas reacciones se realizaron con 1.5 μ l de ADNc (50 ng/ μ l), 1.5 μ l (0.5 μ M) de cada oligonucleótido específico, 12.5 μ l SYBR Green Supermix (mezcla 2x de enzima DNA polimerasa, SYBR Green y ROX 2X; Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) y cbp 25 μ l con agua libre de nucleasas. Las reacciones se llevaron a en un termociclador Chromo 4 con el software MJ opticon monitor 3.1 (Bio-Rad, Herefordshire, UK). Las condiciones de amplificación para qPCR fueron: desnaturalización inicial de 95 °C por 1 minuto, y 45 ciclos (95 °C por 45 segundos, 56 °C por 15 segundos, 72 °C por 1 minuto), al término de cada ciclo se leyó la fluorescencia de las muestras; y al final de los 45 ciclos se realizó una curva de desnaturalización de 60 °C a 90 °C con lectura de fluorescencia cada 0.2 °C. El equipo fue calibrado con una curva estándar utilizando el ARNr 18S clonado en un TOPO vector 4.0 (Invitrogen), la concentración de este producto se determinó en un

espectrofotómetro (Sambrook y Russel, 2001) y a partir de ésta se realizaron diluciones seriadas (factor de dilución 100) para establecer cada punto de calibración.

Cuadro 2. Oligonucleótidos empleados para el análisis de qPCR del ADNc de citocinas, HSP90 y RNA ribosomal 18S

| ARNm | Secuencia del primer | Localización (pb) en el templete | Fragmento (pb) |
|--|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| <i>Interleucina- 6 (IL-6, GenBank:NM_214041.1)</i> | | | |
| Sentido | 5'-CGTGATGCCACCTCAGACAA-3' | 112-131 | 316 |
| Antisentido | 5'-CGCCTCGACATTTCCCTTA-3' | 408-427 | |
| <i>Interleucina-10 (IL-10, GenBank:L20001)</i> | | | |
| Sentido | 5'-CTTCGGCCCAGTGAAGAGTTT-3' | 201-221 | 331 |
| Antisentido | 5'-CGCTTTGTAGACACCCCTCTC-3' | 511-531 | |
| <i>Interferón alfa (INF-α, GenBank:JQ839262.1)</i> | | | |
| Sentido | 5'-CACAGAGTCACCCACCTCAG-3' | 402-421 | 275 |
| Antisentido | 5'-CTTGACCTTCTGGACCTGC-3' | 649-669 | |
| <i>Proteína de choque térmico de 90-kDa (GenBank: NM_213973.1)</i> | | | |
| Sentido | 5'GATCACTTGGCTGTGAAGCA3' | 991-1010 | 470 |
| Antisentido | 5'TTGAGGGAAACCATCTCGTC3' | 1441-1460 | |
| <i>RNA ribosomal 18S (GenBank:AY265350)</i> | | | |
| Sentido | 5'-GCCTCACTAAACCATCCAA-3' | 236-255 | 295 |
| Antisentido | 5'-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC-3' | 511-530 | |

5.4. Análisis de citocinas en suero

Las muestras de sangre colectadas a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas posdesafío en tubos sin anticoagulante fueron centrifugadas a 2000 rpm a 4 °C durante 10 min para obtener el suero sanguíneo, mismo que se almacenó en crioviales de plástico de 2 ml a -20 °C. Las concentraciones en suero de IL-6, IL-10 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) fueron cuantificadas con kits comerciales de ELISA específicos de porcinos (Abcam®, Cambridge, MA, USA). Las muestras fueron analizadas por duplicado, de acuerdo a las indicaciones del protocolo sugerido por el fabricante.

5.5. Análisis estadístico

Los datos fueron sujetos a análisis de varianza, con el procedimiento GLM del Sistema de Análisis Estadístico SAS (Statistical Analysis System 9.1; SAS Institute, Cary, NC, USA). Las diferencias entre tratamientos fueron comparadas mediante contrastes ortogonales preestablecidos (C1: confort vs estrés por calor, C2: sin LPS vs LPS; C3: interacción de efectos principales, TA vs LPS; C4: confort vs confort + LPS y C5: estrés por calor vs estrés por calor + LPS). El nivel de probabilidad de $P \leq 0.05$ fue definido como diferencia estadística significativa.

6. RESULTADOS

6.1. Condiciones ambientales

Las condiciones de temperatura ambiental (TA) y humedad relativa (HR) promediadas por hora durante el período experimental, dentro de las salas EC y confort en donde se alojaron los cerdos de este experimento, se presentan en la Figura 4. De acuerdo a ello, diariamente dentro de la sala EC (Fig. 4A) a las 0700 h se registró la TA más baja (28.9 °C), asociada a la máxima HR (73.4%), que se registró a las 0800 h, correspondiendo esto con el momento en que se realizaba el aseo de los corrales. A partir de ese horario la TA comenzó a incrementar mientras que la HR se reducía paulatinamente hasta registrar 34% a las 1600 h.

El período estresante para los cerdos fue entre las 0800 y las 1800 h cuando la temperatura ambiental se incrementó a partir de 30°C y, sin embargo el periodo más estresante se observó de las 1400 a las 1800 h, y registró alrededor de las 1600 h la máxima temperatura del día (promedio de 36.1 °C), así como la menor HR (34.1 %). A partir de las 1800 h la TA comenzó a disminuir a valores menores de 34 °C.

En la Figura 4B se muestran las condiciones de TA y HR de la sala de confort. La TA de la sala de confort se mantuvo alrededor de los 26 °C de acuerdo al diseño del experimento, mientras que la HR se mantuvo en valores entre 70 y 85%. La humedad relativa de la sala de confort solamente se redujo a 70 %, aproximadamente entre las 1500 y 1800 horas.

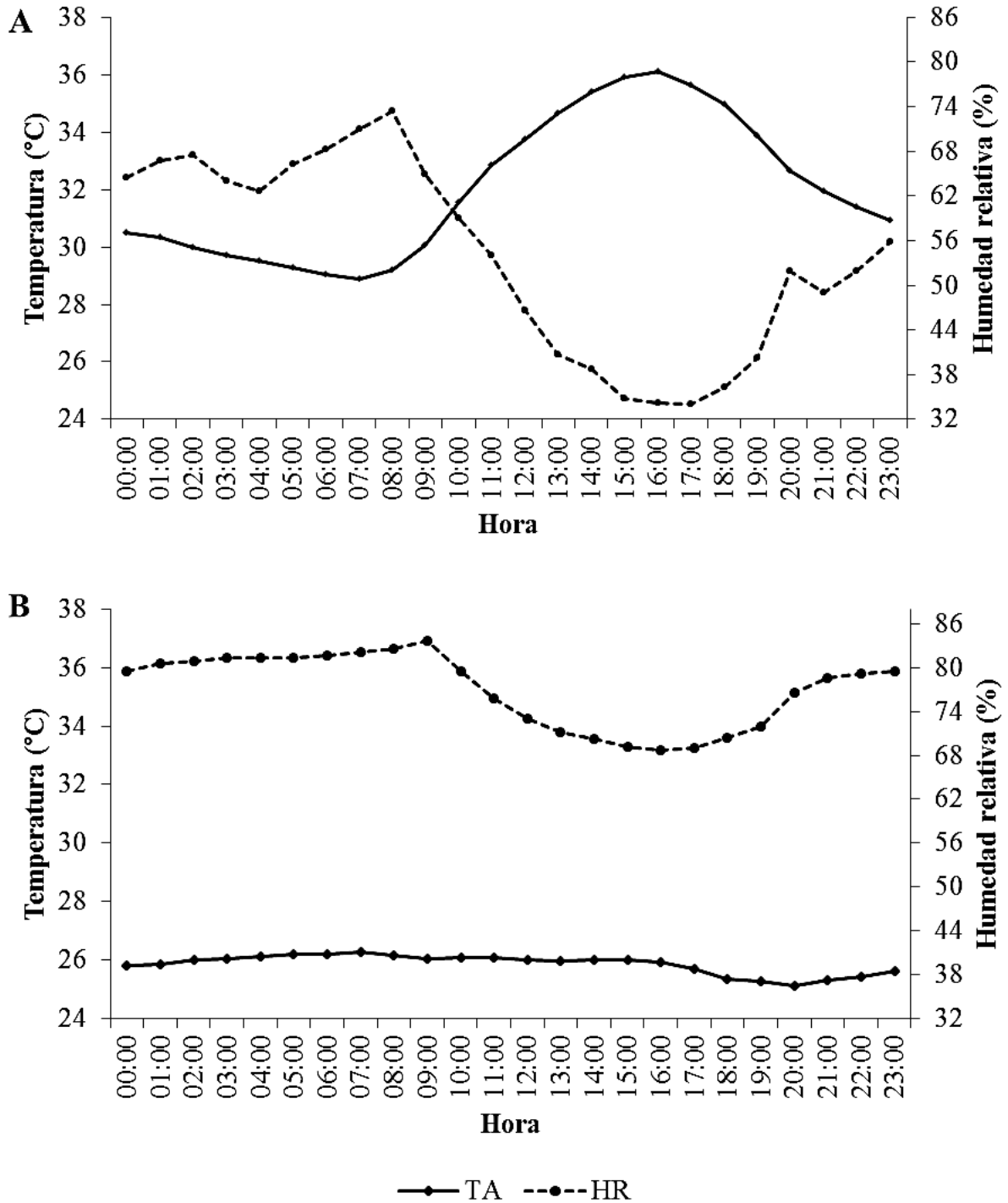


Figura 4. Temperatura ambiental (TA) y humedad relativa (HR) en la sala de estrés por calor (A) y la sala de confort (B). Los valores representan el promedio cada hora durante todo el período experimental de 14 días.

6.2. Comportamiento productivo de los cerdos

En el Cuadro 3 se presentan las variables de comportamiento productivo de los cerdos en condiciones de estrés por calor o confort, desafiados o no con LPS de *E. coli*.

El peso vivo promedio de los cerdos al inicio del experimento fue 7.27 kg; en las semanas posteriores los cerdos ganaron peso de forma homogénea entre tratamientos ($P > 0.10$), de manera que a los 14 y 21 días, el peso promedio de los cerdos fue de 9.65, 12.22 y 15.09 kg respectivamente.

La ganancia diaria de peso (GDP) de los cerdos tampoco fue diferente estadísticamente entre tratamientos ($P > 0.10$). En promedio la GDP de los cerdos en la semana posdesafío 1, fue de 367 g y en la semana posdesafío 2, fue de 410 g. En general, la GDP promedio de ambas semanas fue de 389 g ($P > 0.10$).

El consumo diario de alimento (CDA) por cerdo tampoco fue afectado por los tratamientos a los cuales fueron asignados ($P > 0.05$). En promedio durante la primera semana posdesafío 1 el CDA fue de 891 g/d, en la segunda semana de 1042 g/d; el promedio de los 14 días posdesafíos fue de 967 g/d.

En relación a la relación ganancia:consumo (G:C), los valores promedio de todos los cerdos fueron de 0.386, 0.459 y 0.423, para la primera semana, segunda semana y para el acumulado de las dos semanas posdesafío, respectivamente. Este parámetro G:C, tampoco fue diferente ($P > 0.05$) entre tratamientos.

Cuadro 3. Comportamiento productivo de cerdos en confort y estrés por calor posdesafío con lipopolisacárido de *Escherichia coli*

| Variable ² | Confort | Confort+LPS | EC | EC + LPS | EE | Valor de P ¹ | | |
|-----------------------|---------|-------------|--------|----------|-------|-------------------------|-------|-------|
| | | | | | | C1 | C2 | C3 |
| PV (kg) | | | | | | | | |
| Posdesafío 1 | 9.410 | 10.150 | 9.700 | 9.340 | 0.410 | 0.535 | 0.649 | 0.198 |
| Posdesafío 2 | 11.850 | 13.060 | 12.570 | 11.400 | 0.697 | 0.511 | 0.978 | 0.108 |
| Promedio | 15.078 | 15.708 | 15.440 | 14.130 | 0.926 | 0.521 | 0.718 | 0.310 |
| GDP (kg) | | | | | | | | |
| Posdesafío 1 | 0.349 | 0.416 | 0.410 | 0.294 | 0.062 | 0.636 | 0.700 | 0.160 |
| Posdesafío 2 | 0.461 | 0.378 | 0.410 | 0.390 | 0.046 | 0.673 | 0.278 | 0.502 |
| Promedio | 0.405 | 0.397 | 0.410 | 0.342 | 0.047 | 0.604 | 0.433 | 0.529 |
| CDA [‡] (kg) | | | | | | | | |
| Posdesafío 1 | 0.889 | 1.005 | 0.931 | 0.738 | 0.223 | 0.628 | 0.867 | 0.509 |
| Posdesafío 2 | 0.864 | 1.050 | 1.126 | 1.126 | 0.263 | 0.537 | 0.734 | 0.732 |
| Promedio | 0.876 | 1.027 | 1.029 | 0.937 | 0.240 | 0.908 | 0.914 | 0.620 |
| G:C [‡] | | | | | | | | |
| Posdesafío 1 | 0.365 | 0.374 | 0.478 | 0.328 | 0.051 | 0.585 | 0.263 | 0.215 |
| Posdesafío 2 | 0.665 | 0.416 | 0.390 | 0.363 | 0.137 | 0.265 | 0.344 | 0.441 |
| Promedio | 0.515 | 0.395 | 0.434 | 0.346 | 0.080 | 0.443 | 0.231 | 0.849 |

¹ Valor de P, contrastes: C1: Efecto de TA, C2: Efecto de LPS, C3: Interacción TA x LPS

² PV=Peso vivo, GDP= Ganancia diaria de peso, CDA= Consumo diarios de alimento, G:C= relación ganancia de peso:consumo de alimento

[‡] Valor calculado por pareja de cerdos

6.3. Condición física y temperatura ótica de los cerdos

En el primer desafío, tres cerdos desafiados con LPS que se encontraban alojados en la sala EC y dos cerdos alojados en condiciones de confort presentaron vómito durante las primeras 2 hrs posteriores al desafío. Además se observó depresión y ligeros escalofríos en todos los cerdos desafiados en las primeras cuatro horas posdesafío. Después del segundo desafío solamente dos cerdos de EC presentaron vómito durante las 2 primeras horas posdesafío. Los cerdos que no fueron desafiados con LPS y que solamente se les aplicó solución salina estéril no presentaron ningún signo clínico (fiebre o vómito) durante el período posterior a su administración.

La Figura 5 muestra las variaciones en la temperatura ótica (TO) de los cerdos en condiciones de confort o estrés por calor a las 0, 2, 4, 8, 12, 24 y 36 horas de la administración por vía intraperitoneal, ya sea del desafío con LPS, o de la solución salina. Durante todo el experimento, la TO de los cerdos en condiciones de estrés por calor se mantuvo elevada alrededor de $0.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($P < 0.01$) en comparación con la TO de los cerdos en condiciones de confort.

En el primer periodo de desafío (Fig. 5A) el EC incrementó la temperatura de los cerdos en $1.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($P < 0.01$), y la mantuvo elevada durante las diferentes lecturas. A las 2 y 4 horas postratamiento, los cerdos en EC desafiados con LPS presentaron TO $0.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ mayor ($P \leq 0.05$) comparada con la de los cerdos EC sin desafío de LPS, mientras que a las 8 hrs hubo una tendencia de incrementar la TO ($P = 0.058$) en los cerdos desafiados en EC comparado con EC sin desafío de LPS.

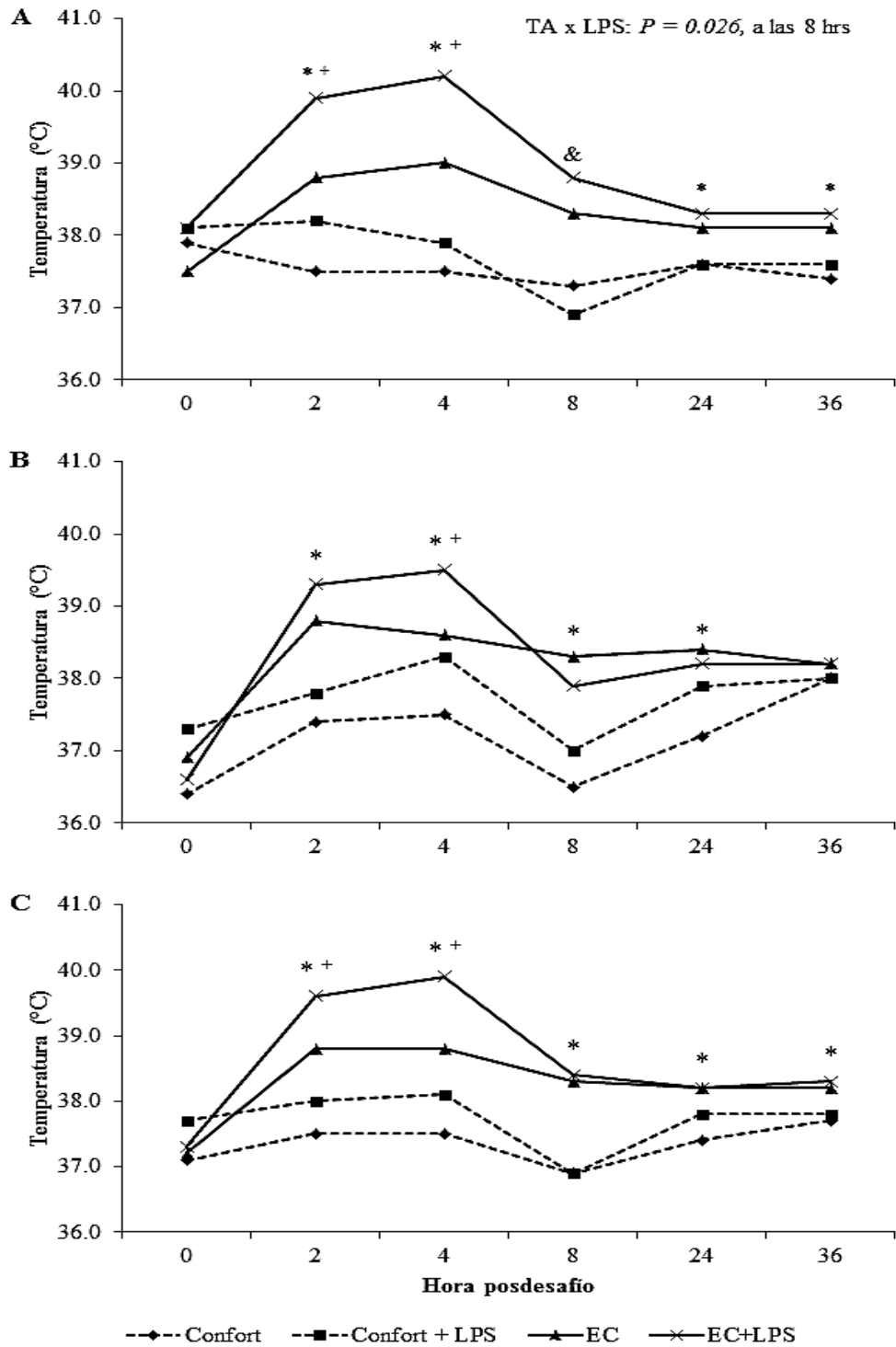


Figura 5. Temperatura ótica de los cerdos en estrés por calor (EC) o confort antes (0 horas) y después del desafío 1 (A), desafío 2 (B) y promedio de los desafíos 1 y 2 (C). Cada punto representa las medias de 6 cerdos de cada tratamiento tomada a las cero, 2, 4, 8, 12, 24 y 36 horas posdesafío en cada tratamiento. * $P < 0.01$, efecto de TA a las horas marcadas; + $P < 0.01$, efecto de LPS a la hora marcada. & Interacción TA x LPS $P < 0.05$.

En la figura 5B, se observa el efecto de la TA y desafío con LPS en la TO de los cerdos durante el segundo desafío. En general, el EC incrementó ($P < 0.05$) la TO de los cerdos aprox. 1.3 °C, comparado con los cerdos en confort; sin embargo a las 36 horas posdesafío los cerdos en EC mostraron una TO similar ($P > 0.05$) a los cerdos en confort. Durante las primeras cuatro horas posdesafío se incrementó ($P = 0.03$) en 1 °C la TO de los cerdos desafiados con LPS.

En general, se observó un incremento en la TO de los cerdos EC después de cada desafío ($P < 0.01$, Fig. 5C), mientras que el incremento en la TO de los cerdos por efecto del LPS se observó durante las primeras 4 horas posdesafío ($P < 0.01$).

6.4. Hemograma

El efecto del estrés por calor y del desafío con LPS de *E. coli* en los cerdos, sobre la población y composición de sus leucocitos sanguíneos 48 horas después de cada uno de los dos desafíos, se muestra en las Figuras 6 y 7. Después del primer desafío, los cerdos en EC presentaron una reducción del 100% en su concentración de monocitos en sangre ($P = 0.038$; Fig. 6E).

El desafío con LPS no afectó ($P > 0.05$) la concentración de otros glóbulos blancos (leucocitos totales, linfocitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos banda y eosinófilos) en cerdos alojados en condiciones de confort ni en estrés por calor (Fig. 6).

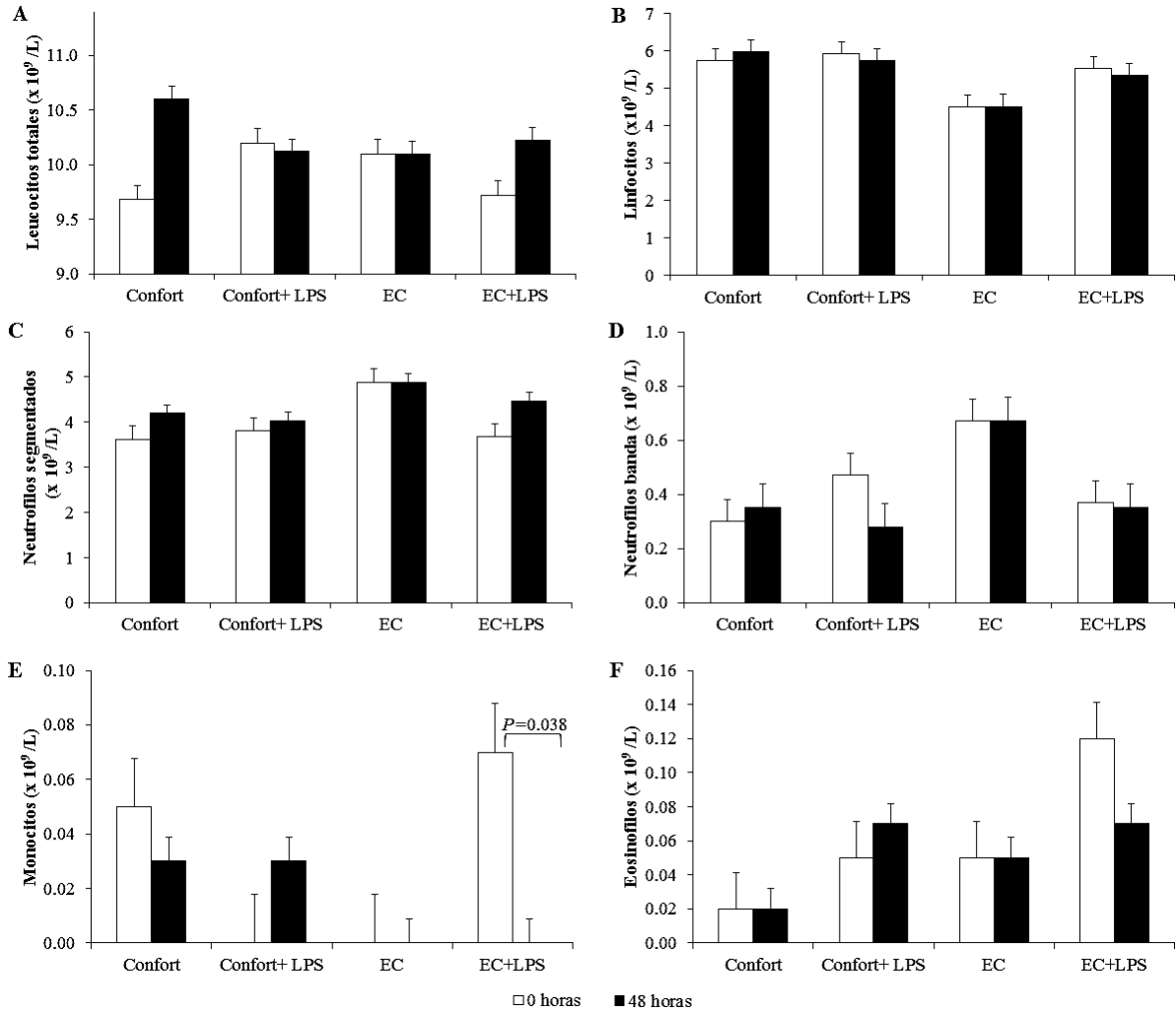


Figura 6. Efecto del estrés por calor y el LPS en la concentración de leucocitos sanguíneos de los cerdos antes (\square) y 48 horas después del primer desafío con LPS de *E. coli* (\blacksquare). A. leucocitos totales, B. linfocitos, C. neutrófilos segmentados, D. neutrófilos banda, E. monocitos, F. eosinófilos. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) son resultado de la comparación dentro de cada tratamiento.

Después de 48 hrs del segundo desafío con LPS de *E. coli*, los cerdos en EC presentaron una reducción ($P = 0.012$) en la concentración de neutrófilos banda (Fig. 7D), la concentración de los demás leucocitos no fue afectada por el EC ni por la administración de LPS ($P > 0.05$). Se observó interacción ($P = 0.030$), entre los efectos principales de TA y LPS, en la concentración de neutrófilos banda, ya que el EC redujo la concentración de neutrófilos banda y además, la reducción fue mayor con la administración de LPS.

Los cerdos en condiciones de confort que no fueron desafiados con LPS, sino que solamente se les administró solución salina estéril, presentaron un incremento del 230% en su concentración sanguínea de Leucocitos totales (Fig. 7; $P = 0.04$). En general, la concentración sanguínea de linfocitos, neutrófilos segmentados, monocitos y eosinófilos de los cerdos no fue afectada ($P > 0.05$) por las condiciones ambientales ni por la administración de LPS (Fig. 7).

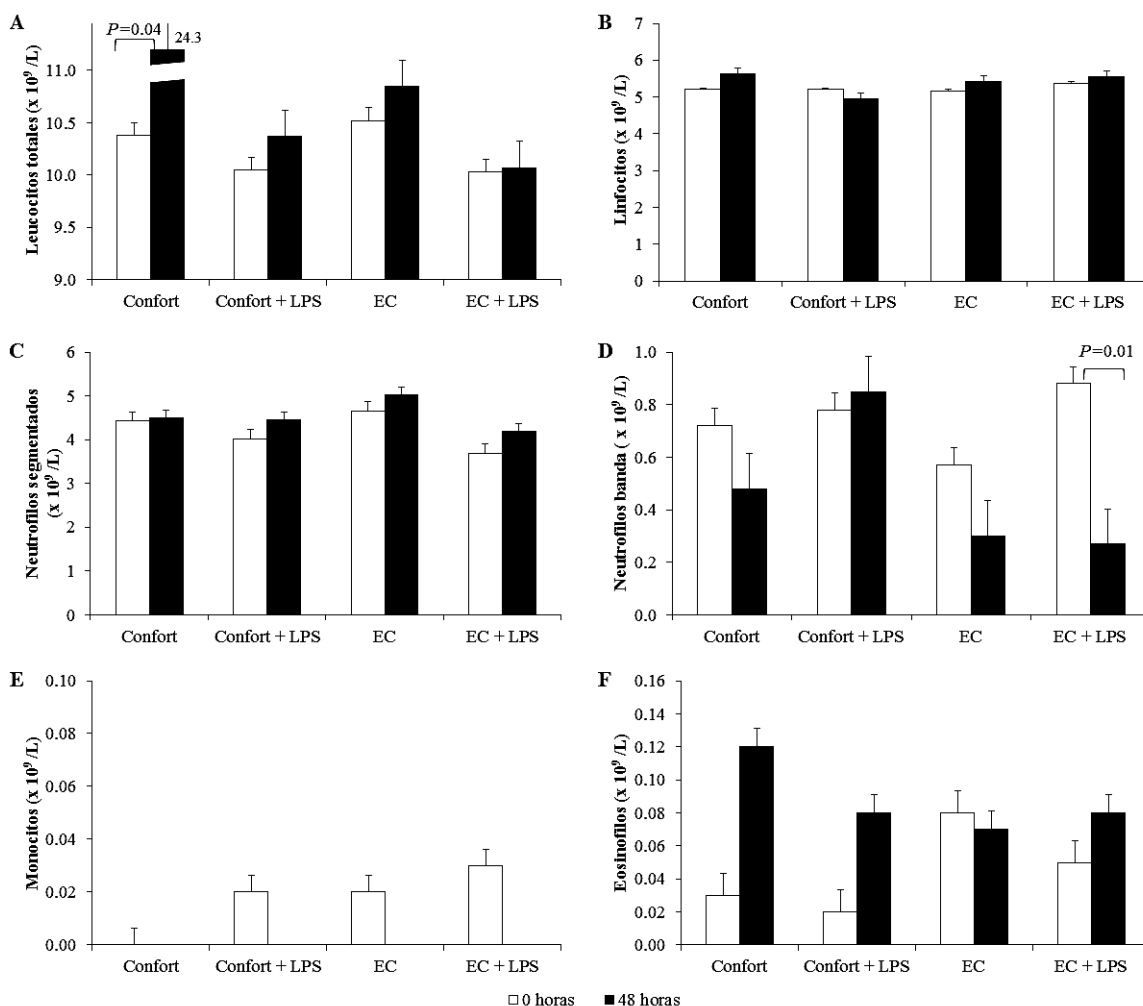


Figura 7. Efecto del estrés por calor y el LPS en la concentración de leucocitos sanguíneos de los cerdos antes (\square) y 48 horas después del segundo desafío con LPS de *E. coli* (\blacksquare). A. leucocitos totales, B. linfocitos, C. neutrófilos segmentados, D. neutrófilos banda, E. monocitos, F. eosinófilos. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) son resultado de la comparación dentro de cada tratamiento.

En el Anexo 2 se presenta los resultados de volumen del paquete celular, concentración de eritrocitos, hemoglobina, plaquetas y proteínas plasmáticas de los cerdos en crecimiento bajo condiciones EC o confort, 48 hrs después de cada desafío. Después de 48 hrs del primer desafío únicamente se incrementó la concentración de las proteínas plasmáticas en los cerdos en confort que no recibieron el desafío con LPS ($P = 0.009$); aparte de ello no se observó alteración en ninguno de los otros parámetros mencionados por efecto del ambiente en que se alojaron los cerdos, ni por el desafío con LPS de *E. coli* ($P > 0.05$).

A las 48 hrs del segundo desafío se redujeron ($P < 0.05$) en los cerdos en estrés por calor desafiados con LPS la concentración corpuscular media de hemoglobina y la concentración de plaquetas; por el contrario, el conteo de plaquetas se incrementó ($P < 0.05$) en los cerdos en confort desafiados con LPS.

6.5. Expresión de ARNm de citocinas en timo y bazo

En las Figuras 8 y 9 se presenta el efecto del EC y desafío con LPS en los cerdos, sobre la expresión relativa del ARNm de las citocinas interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e interferón alfa (INF- α) en bazo y timo (unidades arbitrarias; relación entre expresión de ARNm específico:ARNr 18S). Como punto de comparación se tomó la expresión relativa del ARNm de los cerdos en confort sin desafío de LPS.

Comparado con los cerdos en confort, el EC tendió a incrementar ($P = 0.06$) en un 43 % la expresión relativa de ARNm de IL-6 en bazo (Fig. 8A), mientras que en timo (Fig. 9A) el estrés por calor incrementó 66 % ($P = 0.025$) la expresión de IL-6. No se observó efecto del desafío con LPS en la expresión de IL-6 en esos tejidos ($P > 0.05$).

Comparado con los cerdos en confort, el EC tendió a incrementar ($P = 0.075$) la expresión relativa de IL-10 en bazo en un 36 % (Fig. 8B), mientras que en timo el EC redujo la expresión de IL-10 en un 42 % ($P = 0.007$, Fig. 9B).

Comparado con los cerdos sin desafío de LPS, en los cerdos desafiados con LPS se redujo en 35 % ($P = 0.020$) la expresión relativa de IL-10 en bazo (Fig. 8B), mientras que en timo (Fig. 9B) la reducción en la expresión relativa de IL-10 fue del 40% ($P = 0.01$). Además de ello, se observó una tendencia ($P = 0.052$) de reducción en la expresión relativa de IL-10 en bazo, cuando los cerdos en EC fueron desafiados con LPS (Fig. 8B).

En la expresión relativa de IFN- α (Fig. 8C), se observó la interacción de los factores de TA y LPS ($P = 0.049$), esto se reflejó en un incremento de la expresión de IFN- α en el bazo de los cerdos en confort que fueron desafiados con LPS ($P = 0.009$). La expresión de IFN- α en el timo de los cerdos no cambió ($P > 0.050$) por efecto del ambiente ni por la administración de LPS (Fig. 9C). Comparado con los cerdos en confort, el EC no modificó la expresión relativa de IFN- α ($P > 0.05$) en ninguno de los órganos linfoides estudiados, bazo (Fig. 8C) y timo (Fig. 9C).

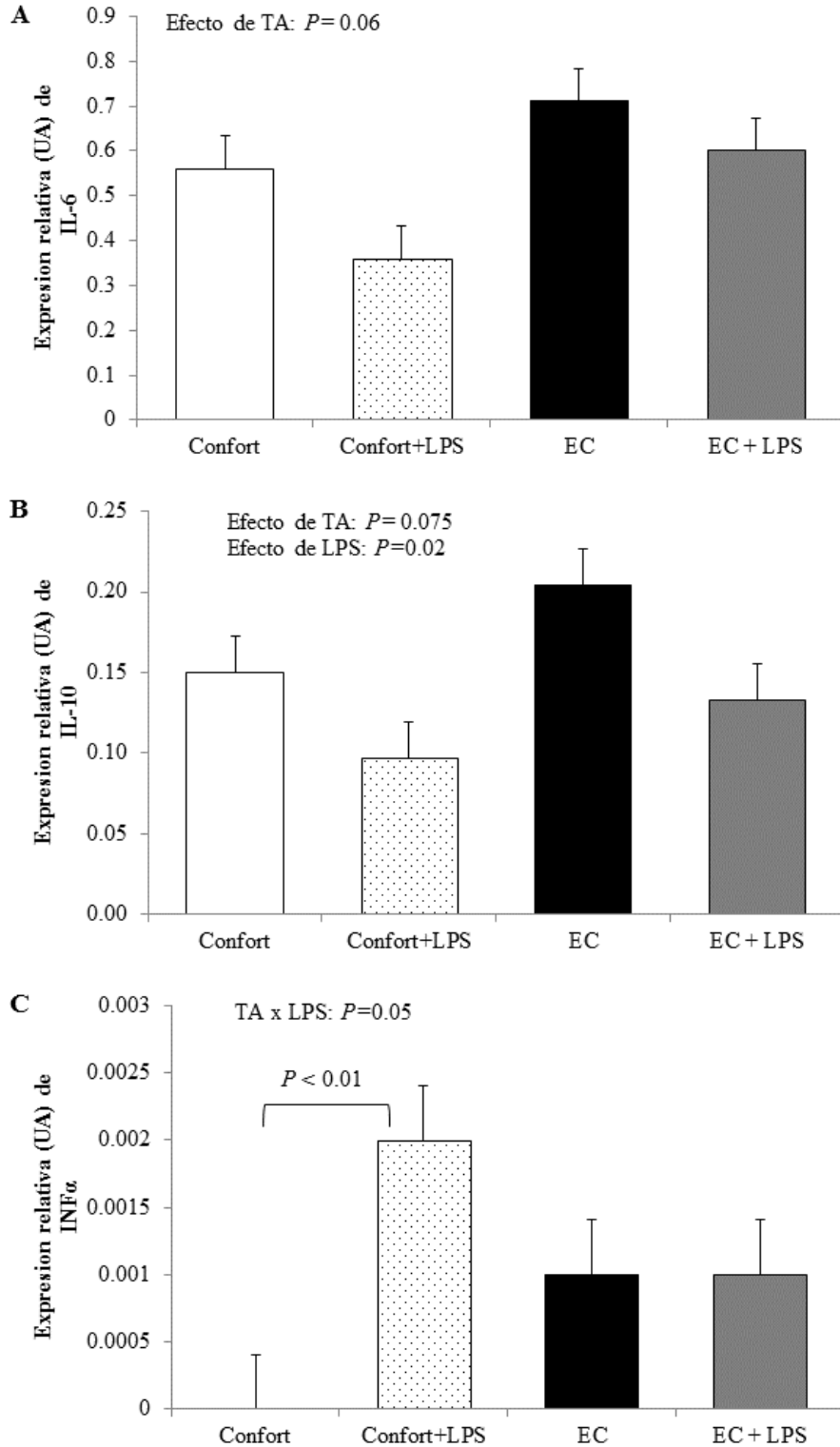


Figura 8. Expresión de los RNA mensajeros de Interleucina 6 (A), Interleucina 10 (B) e Interferón alfa (C) en bazo de cerdos en condiciones de confort o estrés por calor (EC) con y sin desafío con LPS de *E. coli* (unidades arbitrarias; relación entre expresión de ARNm específico:ARNr 18S).

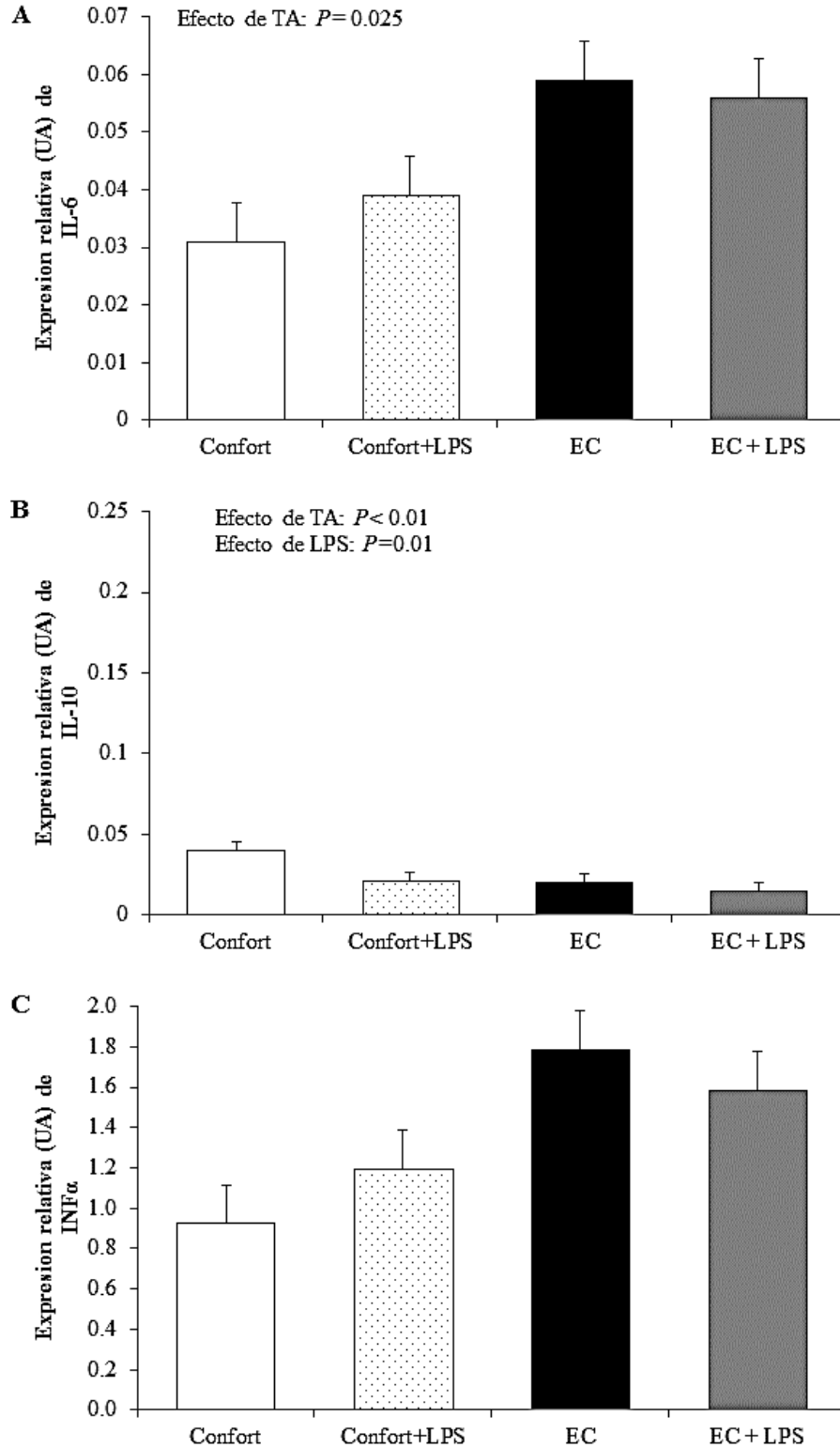


Figura 9. Expresión de los RNA mensajeros de Interleucina 6 (A), Interleucina 10 (B) e Interferón alfa (C) en timo de cerdos en condiciones de confort o estrés por calor (EC) con y sin desafío con LPS de *E. coli* (unidades arbitrarias; relación entre la expresión de ARNm específico:ARNr 18S).

6.6. Expresión del ARNm de HSP90 en músculo largo dorsal e hígado de los cerdos

La expresión relativa de HSP90 en músculo largo dorsal e hígado de los cerdos en EC y desafiados con LPS se muestran en la Figura 10A y 10B, respectivamente. Comparado con los cerdos en confort, el EC no afectó ($P > 0.05$) la expresión de HSP90 en el músculo (Fig. 10A), como tampoco fue modificada tras el desafío con LPS ($P > 0.05$; Fig. 10A).

En hígado se observó interacción entre los efectos principales TA y desafío con LPS ($P = 0.03$) en la expresión de HSP90, ya que en los cerdos en EC y desafiados con LPS se redujo un 40% ($P = 0.04$) la expresión relativa de ARNm de HSP90, en comparación con los cerdos en EC que no recibieron el LPS (Fig. 10B).

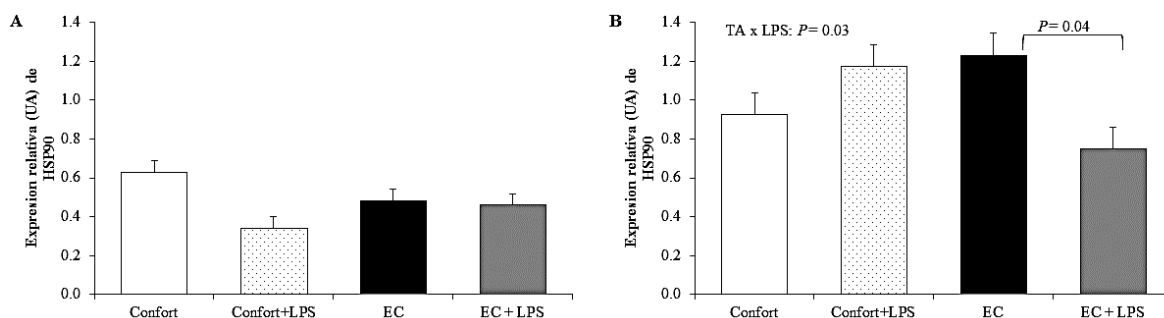


Figura 10. Expresión del RNA mensajero de HSP90 en A) músculo largo dorsal (MLD) y B) hígado de cerdos en condiciones de confort o estrés por calor (EC) con y sin desafío con LPS de *E. coli* (unidades arbitrarias; relación entre la expresión de ARNm de HSP90:ARNr 18S).

6.7. Concentración sérica de citocinas

Los valores de concentración de las citocinas IL-6, IL-10 y TNF- α , ensayados con los kit comerciales, se encontraban por debajo de los límites detectables, por lo tanto fueron descartados de los análisis estadísticos.

7. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del estrés por calor severo en la respuesta inmune de cerdos en crecimiento desafiados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* sobre el comportamiento productivo, biometría hemática, temperatura corporal y en la expresión de genes de las citocinas de respuesta inflamatoria: IL-6, IL-10 e INF α . El estudio se condujo bajo las condiciones naturales de temperatura ambiente y humedad presentes durante el verano en el valle de Mexicali, época en que el clima es extremadamente cálido.

Es bien conocido que la temperatura elevada, así como la humedad, contribuyen al estrés por calor en los animales, lo cual afecta su producción (Pearce et al., 2013a). Sin embargo, cada especie animal responde diferente al estrés por calor. Existe una diferencia en la zona termoneutral (ZT) de diferentes especies animal; en los cerdos de 15-35 kg PV su ZT es de 18 a 26 °C (FASS, 2010), o bien, de 21-27 °C para cerdos de 7 a 25 kg de PV (Straw et al., 2006). El desarrollo y salud óptima del animal se observa en su ZT o zona de confort. Cuando la temperatura es inferior o superior a la ZT, el animal puede experimentar el estrés por frío o por calor, respectivamente (Baker, 2004).

El valle de Mexicali se caracteriza por temperaturas superiores a los 40 °C durante el verano (Morales et al., 2014). En este ensayo se observó que aunque en el interior de la sala donde se encontraban los cerdos asignados al grupo sometido a estrés por calor la temperatura ambiental fluctuaba todos los días entre 29 y 36 °C, y la humedad relativa fluctuaba entre 31-73%, estas condiciones siempre fueron superiores a las condiciones de confort recomendadas para cerdos de esta misma edad y peso, (26 °C para cerdos de 10 kg

PV; NRC, (1998)). De acuerdo con Collin et al. (2001) en estas condiciones los cerdos se encontraban en estrés por calor.

El índice de calor (HI, por sus siglas en inglés “Heat Index”) combina los efectos de la temperatura ambiente y la humedad relativa. De acuerdo con el HI se clasifica al ambiente en zona de alerta, peligro y emergencia (Xin y Harmon, 1998). De acuerdo con ésta, los valores promedio de TA y HR (32 °C y 59.7 % respectivamente) en la sala de EC, la ubican en la zona marcada como emergencia (HI=99.1). Sin embargo en las horas 1200-2100 h, cuando los cerdos fueron desafiados con LPS, el HI (104.1) se encontraba más adentro de la zona de emergencia. Se confirmó que los cerdos se encontraban en condiciones de EC al tener HI superiores al considerado como de confort en otros trabajos, e.g. HI = 81 (Liu et al., 2009), o HI = 77 (Pearce et al., 2013b), de acuerdo a la tabla de Xin y Harmon (1998).

La TA y HR promedio (25.7 °C y 71.9 % respectivamente) mantenidos en la sala de confort, equipada con sistema de enfriamiento, corresponden a un HI en el límite inferior de la zona de alerta (HI=82.2). Estos datos indican que los cerdos en confort se mantuvieron en su zona termoneutral (Straw et al., 2006), a pesar de las variaciones de HR en la sala.

En estudios de estrés por calor, generalmente se utilizan salas con temperatura controlada de 35 °C hasta 40 °C (e.g. Pearce et al., 2012 y 2013a; Johnson et al., 2013; Liu et al., 2009) para inducir por algunas horas la condición de estrés por calor en cerdos en crecimiento. La TA en el presente estudio fue similar a la condición utilizada por Pearce et al. (2012, 2013b), sin embargo, las condiciones de HR fueron más altas en el presente estudio, aunque similares a las utilizadas por Liu et al., (2009). En contraste en el presente

trabajo las condiciones de TA y HR en la sala EC no fueron controladas, por cuanto que las fluctuaciones podrían haber generado un mayor desafío para los cerdos en producción.

El estrés por calor afecta la producción animal en diversas especies, incluidos cerdos (St-Pierre et al., 2003), vacas (Baumgard y Rhoads, 2013) y aves (Sun et al., 2014). Específicamente en los cerdos, la reducción en su velocidad de crecimiento y eficiencia productiva, es más marcada en etapas de crecimiento y finalización, en comparación con cerdos más jóvenes, como los lechones (Baker, 2004). Una de las principales causas que afectan el desarrollo y crecimiento de los cerdos criados en EC es la reducción de hasta el 47-50% en el consumo de alimento (Pearce et al., 2013a; Baumgard y Rhoads, 2013). En consecuencia, en cerdos en crecimiento y finalización se ha reportado una reducción del 10 y 16 % en su ganancia de peso, respectivamente, bajo condiciones de EC (Le Bellego et al., 2002). En otro trabajo llevado a cabo en el valle Mexicali se observó que en condiciones similares de EC, se redujo 11.4 % la ganancia de peso y en la relación ganancia/consumo de cerdos de 30 kg (Morales et al., 2014). A diferencia de los trabajos señalados anteriormente, en el presente estudio no se observaron diferencias en el consumo de alimento, ganancia de peso y eficiencia de alimentación, posiblemente debido a que los cerdos utilizados tenían un peso vivo menor al de los utilizados por Le Bellego et al., (2002) y Morales et al., (2014). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el efecto del EC es más marcado en cerdos de mayor edad y peso vivo.

Las constantes fisiológicas de los animales, tales como temperatura corporal, tasa respiratoria y frecuencia cardiaca, son sensibles a cambios en la temperatura ambiental. El estrés por calor provoca que la tasa respiratoria y frecuencia cardiaca se incrementen (Renaudeau et al., 2010). Específicamente, en EC la temperatura corporal tiende a

incrementarse en aproximadamente 1 °C en aves (Sun et al., 2014), novillos (Gaughan et al., 2010) y cerdos (Pearce et al., 2013a) en comparación con animales de su misma especie criados condiciones de confort. En cerdos, se ha observado que las diferencias de temperatura corporal (1.94 °C entre EC vs TN) se mantiene durante la exposición al EC (Pearce et al., 2013a). En el presente estudio, los cerdos en EC presentaron hipertermia de en promedio 1 °C, observada en su temperatura ótica, antes del desafío con LPS de *E. coli*; y fiebre de 1.6 °C en el día del desafío, comparados con los cerdos en condiciones de confort. Estos resultados de hipertermia son similares a los estudios mencionados anteriormente.

En condiciones de EC, el flujo sanguíneo del organismo es redistribuido para soporte de órganos vitales y para disipar el calor por medio de la circulación periférica (Liu et al., 2009). Esta redistribución del flujo sanguíneo puede provocar isquemia e hipoxia en el tracto gastrointestinal (Pearce et al., 2013b), así como cambios en la concentración de factores inflamatorios, proteínas de choque térmico y en la permeabilidad intestinal (Lambert 2009; Pearce et al., 2013b). En consecuencia, el daño y pérdida en la continuidad de la mucosa intestinal podría permitir el ingreso de elementos como los LPS al organismo (Lambert, 2009).

Los LPS son componentes altamente patógenos de algunas enterobacterias que se encuentran en altas concentraciones en el tracto intestinal (Lambert, 2009). En el presente estudio se utilizó el LPS de *E. coli* como medio para inducir una respuesta inmunológica en los cerdos en estrés por calor. Este desafío inmunológico indujo un estado febril, e inició una respuesta similar a la que ocurre para controlar y eliminar la invasión de patógenos (Carroll et al., 2012) durante las primeras cuatro horas posteriores al desafío con LPS en los

cerdos EC comparados con los cerdos EC que no fueron desafiados, así como una ligera hipertermia en aquellos desafiados en condiciones de confort. En coincidencia con el presente trabajo, Campos et al. (2014) reportaron que, independientemente de la temperatura ambiental (24 vs 30 °C) los cerdos incrementan su temperatura rectal en 1.1 °C en promedio, después del desafío con LPS de *E. coli*, aunque esos autores no observaron cambio en la temperatura corporal de cerdos en confort desafiados con LPS.

En otro trabajo llevado a cabo en lechones recién nacidos, el desafío con LPS no afectó su temperatura corporal cuando fueron mantenidos en condiciones termoneutrales (34 °C; Carroll et al., 2001). Además, durante las cuatro horas posteriores al segundo desafío, los cerdos en EC también presentaron hipertermia, de forma similar a lo sucedido durante el primer desafío, pero de menor intensidad (39.5 °C vs. 40.2 °C, respectivamente). En coincidencia, Campos et al. (2014) reportaron que la temperatura rectal de los cerdos en EC y confort, fue más alta después de la primera inyección con LPS, comparado con inyecciones posteriores. Lo anterior indica que la fiebre observada tras el desafío con LPS estuvo asociada no solamente a las características de patogenicidad del LPS sino también de la condición de estrés en que se mantuvieron a los cerdos.

En el presente trabajo, otros signos observados en los cerdos después del desafío con LPS fueron fiebre, depresión y vómito en algunos de ellos. Esta observación también ha sido reportada por otros autores (Weber y Kerr, 2008) en lechones desafiados con LPS de *E. coli*. Wang et al., (2009) reportaron que el desafío con LPS también provoca diarrea en los lechones a las 12, 24 y 48 h posdesafío, pero en contraste con esos autores, en el presente estudio no se observaron signos de diarrea en los cerdos.

El hemograma es un estudio clínico que proporciona información del estado de salud de los animales a través del conocimiento de los cambios en las concentraciones de los componentes sanguíneos. Sin embargo, los valores fisiológicos normales de los parámetros sanguíneos pueden ser afectados también por factores tales como el sexo, edad, raza (Tripathi et al., 2008). Afolabi et al. (2010) mencionan que los cambios en parámetros hematológicos también permiten elucidar acerca del estado y tensión del organismo frente a factores nutricionales, ambientales, ambiente térmico (temperatura, movimiento y humedad del aire), entorno físico, entorno social, y ambiente microbiano (FASS, 2010); y por factores patológicos al estar expuestos a diferentes patógenos y enfermedades (García-Torres et al., 2011).

Williams et al., (2009) reportaron un incremento en la concentración de los glóbulos blancos en sangre de cerdos después de 24 h del desafío con LPS de *E. coli*, alojados en condiciones de temperatura de confort. Yates et al., (2011) encontraron un efecto similar tras la administración de LPS en ovejas en condiciones termoneutrales. En este estudio no se observó incremento en el número de leucocitos totales en sangre ni por la administración del LPS, ni por efecto del EC. Solamente a las 48 hrs después del segundo desafío se encontraron 2.3 veces más leucocitos totales en los cerdos en confort que no fueron desafiados con LPS, variación que se atribuye a factores ajenos al tratamiento.

El primer desafío con LPS provocó la desaparición de monocitos sanguíneos en los cerdos en EC. En consecuencia, para el momento del segundo desafío esos individuos no habían alcanzado el nivel inicial de monocitos observado el día anterior al primer desafío, lo que podría sugerir que los mecanismos inmunológicos no se restablecieron a sus valores normales. Cuando hay infección en los tejidos, los monocitos son reclutados a la zona

dañada (Manual Merck, 2012) donde maduran y se convierten en macrófagos. La interacción del LPS con células, como macrófagos y células dendríticas, conduce a la formación de mediadores inflamatorios esenciales para la defensa antibacteriana (Freudember et al., 2008). Posiblemente los valores indetectables de monocitos circulantes, pudieron deberse a la maduración de los mismos, sin embargo, en este estudio no fueron analizadas las concentraciones de macrófagos. En relación a la concentración del resto de los leucocitos analizados después del primer desafío no se observaron otros cambios.

Los neutrófilos circulantes son el principal tipo de célula de la inmunidad innata y participa en el mecanismo de defensa del hospedero (García-Torres et al., 2011). Los neutrófilos circulan en sangre como neutrófilos segmentados (forma madura) y neutrófilos banda (forma inmadura). En este estudio a las 48 hrs del segundo desafío se observó una reducción de aproximadamente 70 % en la concentración de neutrófilos banda en los cerdos en EC que recibieron LPS; esto podría sugerir que la reducción de neutrófilos banda fue debida a la maduración de los mismos, sin embargo el conteo de neutrófilos segmentados no se vio afectado en estos mismos cerdos.

Componentes sanguíneos tales como el volumen de paquete celular (VPC) o hematocrito, hemoglobina (HB) y la hemoglobina corpuscular media (HCM) son los principales indicadores para la evaluación de los eritrocitos circulantes, y son importantes en el diagnóstico de la anemia (Peters et al., 2011). También pueden ser utilizados como indicadores de la capacidad de la médula ósea para producir células rojas de la sangre en mamíferos (Etim et al., 2014). En el presente estudio los valores de estos parámetros sanguíneos no fueron afectados por el EC y por el desafío con LPS, lo que podría sugerir que los cerdos se encontraban en buenas condiciones de salud.

Rankshandeh y de Lange (2012) reportaron incremento de proteínas de plasma (fibrinógeno, haptoglobina) en cerdos en crecimiento desafiados con LPS. En contraste, en este estudio la concentración de proteínas plasmáticas no fue afectado por el desafío de LPS, pero se incrementó en los cerdos en confort que no fueron desafiados, variación atribuida a factores externos.

Los cerdos desafiados con LPS en ambas condiciones de temperatura, presentaron cambios en valores de plaquetas a las 48 horas posteriores al segundo desafío, pero a pesar de los cambios en concentración, los valores se encontraban dentro del rango considerado como normal (Manual Merck, 2012). Las plaquetas sanguíneas están implicadas en la coagulación de la sangre. Baja concentración de plaquetas en sangre sugiere que la formación de coágulos se afectaría, lo que resultaría en una excesiva pérdida de sangre frente a una lesión (Etim et al., 2014).

Se ha demostrado que la exposición a temperatura ambiente alta modifica algunos componentes de la función inmune, como conteo de las células T, actividad citosólica de las células natural killer y secreción de citocinas (Han et al., 2010). Se considera que durante el estrés por calor severo hay producción de citocinas proinflamatorias, sin embargo, existe poca información acerca del efecto del estrés por calor sobre la expresión de ARNm de citocinas en cerdos. Welc et al. (2013) reportaron que en músculo esquelético (diafragma y sóleo) de ratones en EC, la expresión del ARNm de IL-6 se incrementa. En contraste con Welc et al., (2013) en este estudio el EC no tuvo efecto sobre la expresión de ARNm de IL-6 en bazo pero sí en timo.

El sistema inmune responde a los desafíos de microorganismos liberando mayor cantidad de citocinas (Kim et al., 2012). Por ejemplo, el TNF- α es asociado con altas concentraciones de LPS en plasma (Weber y Kerr, 2008; Lambert, 2009) y al reconocimiento del LPS por el sistema inmune innato (Triantafilou et al., 2001). Weber y Kerr (2008) reportaron que la abundancia de ARNm de IL-6 y TNF- α se incrementó en hígado de cerdos desafiados con LPS. En estudios con células de bazo (CB) y macrófagos alveolares (MA) porcinos, el desafío con LPS indujo la expresión de ARNm de IL-6 (Lee et al., 2004), aunque la expresión regresó a niveles basales entre las 2 y 24 h posdesafío para MA y CB, respectivamente. En contraste con estos estudios, en el presente trabajo el desafío con LPS no afectó la expresión de ARNm de IL-6 (en bazo) e INF- α (bazo y timo).

En el presente trabajo el desafío con LPS redujo la expresión de ARNm de IL-10, tanto en bazo como en timo. Esta citocina, junto con otras, al ser preinflamatoria, contribuye a amortiguar la magnitud y duración de la inflamación del órgano diana (Khadaroo et al., 2004). Posiblemente estas diferencias en la respuesta al desafío de LPS sea atribuido al tejido analizado y, además, al tiempo de toma de muestras posdesafío, por ejemplo 4 h posdesafío con LPS en el estudio de Weber y Kerr (2008).

Diversos investigadores reportan incremento de los niveles séricos de citocinas por efecto del LPS (e.g., Flores-Mendoza et al., 2008; Williams et al., 2009; Han et al., 2010). Flores-Mendoza et al. (2008) reportaron que el aumento de la expresión del ARNm de IL-10 fue en concordancia con la producción de IL-10 en células dendríticas derivadas de monocitos (mDCs) infectados con LPS y PRSSV. Sin embargo, poco se ha reportado la relación entre expresión de ARNm y abundancia de la citocina.

Las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés “Heat Shock Proteins”) son proteínas altamente conservadas que se expresan constitutivamente en el interior de la célula, y actúan como “chaperonas” moleculares, principalmente frente a situaciones de estrés. Las HSP asociadas a membranas desempeñan un papel en la respuesta inmune, en particular en el reconocimiento del LPS (Triantafilou y Triantafilou 2004). Sin embargo la importancia de HSP90 en respuestas inflamatorias en el hígado es desconocida (Ambade et al., 2012).

En cerdos en EC se ha observado incremento en la abundancia de ARNm de HSP90 en hígado (Morales et al., 2014); en contraste, en este estudio los cerdos en EC desafiados con LPS presentaron menor expresión de ARNm de HSP90 en hígado. En este sentido, Ambade et al. (2012) reportaron que la inhibición de HSP90, inhibe la señalización de LPS en hígado de ratones y reduce la concentración de citocinas proinflamatorias en ese tejido de manera que puede prevenir el daño hepático.

8. CONCLUSIONES

El estrés por calor incrementa la temperatura corporal de cerdos en crecimiento de forma crónica, mientras que el desafío con LPS de *E. coli* solo tiene ese efecto durante las primeras 2 a 4 h posdesafío.

El estrés por calor modifica la expresión de ARNm de las citocinas IL6, IL10 y IFN α , en bazo y timo de cerdos en crecimiento desafiados con LPS de *E. coli*. Este hecho indica la tendencia a que en condiciones de estrés por calor podría modificarse la respuesta inmune ante diversos agentes patógenos.

9. LITERATURA CITADA

- Abbas, A. K., A. H. Litchman, y S. Pillai. 2008. *Inmunología celular y molecular*. 6a ed. Elsevier. Barcelona. 560 p.
- Aberle, E. D., R. A. Merkel, J. C. Forrest, y C. W. Alliston. 1974. Physiological responses of stress susceptible and Stress resistant pigs to heat stress. *J. Anim. Sci.* 38:950-959.
- Afolabi, K.D., A. O. Akinsoyinu, A. R. O. Abdullah, R. Olajide, y S. B. Akinleye. 2011. Haematological parameters of the nigerian local grower chickens fed varying dietary levels of palm kernel cake. *POLJOPRIVREDA* 17(1): 74-78.
- Alexander, C., y E. T. Rietschel. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* 7: 167-202.
- Ambade, A., D. Catalano, A. Lim, y P. Mandrekar. 2012. Inhibition of Heat Shock Protein (Molecular Weight 90 KDa) attenuates proinflammatory cytokines and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. *Liver biology/pathobiology*. doi10.1002/hep.24802.
- Anaya, J. M 2003. Descripción molecular del TNF- α . *Reumatología* 19(2):112-120.
- Baker, J.E. 2004. Effective environmental temperature. *J. Swine Health Prod.* 12(3):140-143.
- Barioglio, C. F. 2001. *Diccionario de producción animal*. 2ª ed. editorial Brujas. Argentina. 375 p.
- Baumgard, L. H., y R. P. Rhoads Jr. 2013. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1:311-337.
- Bermejo, A. y J. Duarte. 2003. Mecanismos de transducción del lipopolisacárido. *Ars. Pharmaceutica.* 44(2): 121-139.
- Campos, P.H.R.F., E. Merlot, M. Damon, J. Noblet, y N. Le Floc'h. 2014. High ambient temperature alleviates the inflammatory response and growth depression in pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *The Vet. Journal.* 200: 404-409.
- Carroll, J. A., N. C. Burdicka, C. C. Chase Jr, S. W. Coleman, y D. E. Spiers. 2012. Influence of environmental temperature on the physiological, endocrine, and immune responses in livestock exposed to a provocative immune challenge. *Domest. Anim. Endocrinol.* 43: 146-153.
- Carroll, J. A., R. L. Matteri, C. J. Dyer, L. A. Beausang, M. E. Zannelli. 2001. Impact of environmental temperature on response of neonatal pigs to an endotoxin challenge. *Am. J. Vet. Res.* 62: 561-566.

- Christison, G. I., y H. D. Johnson. 1972. Cortisol turnover in heat-stressed cows. *J. Anim. Sci.* 35 (5):1005-1010.
- Collier, R.J., D. K. Beede, W. W. Thatcher, L. A. Israel, C. J. Wilcox. 1982. Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. *J. Dairy Sci.* 65: 2213-2227.
- Collin, A., M. J. VAZ, y J. Le Divich. 2002. Effects of high temperature on body temperature and hormonal adjustments in piglets. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 45-53.
- Deb, R., B. Sajjanar, U. Singh, S. Kumar, R. Singh, G. Sengar, y A. Sharma. 2014. Effect of heat stress on the expression profile of Hsp90 among Sahiwal (*Bos indicus*) and Frieswal (*Bos indicus* × *Bos taurus*) breed of cattle: A comparative study. *Gene.* 536 (2): 435-440.
- Dinarello, C. A. 2004. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J. Endotoxin Res.* 10(4):201-22.
- Dinarello, C. A., J. G. Cannon, J. Mancilla, I. Bishai, J. Lees, y F. Cocceani. 1991. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res.* 562:199-2006.
- Etim, N. N., M. E. Williams, U. Akpabio, y E. E. A. Offiong. 2014. Haematological parameters and factors affecting their values. *Agric. Sci.* 2 (1): 37-47.
- Feder, M. E., y G. E. Hofmann. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243-82.
- Federation of Animal Science Societies. 2010. Swine. In: *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching.* 3a ed. p. 142-156.
- Flores-Mendoza, L., E. Silva-Campa, M. Reséndiz, F. A. Osorio, y J. Hernández. 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 720-725.
- Freudenberg, M. A., S. Tchaptchet, S. Kecka, G. Fejera, M. Huber, N. Schütze, B. Beutler, y C. Galanos. 2008. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: Benefits and hazards of LPS hypersensitivity. *Immunobiology* 213: 193-203.
- García, T. S., D. Tejerina, E. Ortega. 2011. Innate immune response of blood neutrophils in Iberian pigs under different production systems. *Livestock Science* 138: 304-307.
- Giovanni, Saavedra R. P. G., G. M. V. Duque, y L. A. G. Naranjo. 2011. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia.* 24(2): 157-166.

- Hahn, G. L. 1999. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *J. Anim. Sci.* 77:10-20.
- Han, A. Y., M. H. Zhang, X. L. Zuo, S. S. Zheng, C. F. Zhao, J. H. Feng, y C. Cheng. 2010. Effect of acute heat stress on calcium concentration, proliferation, cell cycle, and interleukin-2 production in splenic lymphocytes from broiler chickens. *Poult. Sci.* 89: 2063-2070.
- Hernández-Urzúa M. A., y A. Alvarado-Navarro. 2001. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev. Biomed.* 12:272-280.
- Hicks, T. A., J. J. McGlone, C. S. Whisnant, H. G. Kattesh, y R. L. Norman. 1998. Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress1. *J. Anim. Sci.* 76:474-483.
- Horowitz, M., L. Eli-Berchoer, I. Wapinski, N. Friedman, y E. Kodesh. 2004. Stress-related genomic responses during the course of heat acclimation and its association with ischemic-reperfusion cross-tolerance. *J. Appl. Physiol.* 97: 1496-1507.
- Huynh, T. T. T., A. J. A. Aarnink, M. W. A. Verstegen, W. J. J. Gerrits, M. J. W. Heetkamp, B. Kemps, y T. T. Canh. 2005. Effects of increasing temperatures on physiological changes in pigs at different relative humidities. *J. Anim. Sci.* 83:1385-1396.
- Jiang, Z. Y., L. H. Sun, Y. C. Lin, X. Y. Ma, C. T. Zheng, G. L. Zhou, F. Chen, y S. T. Zou. 2009. Effects of dietary glycyl-glutamine on growth performance, small intestinal integrity, and immune responses of weaning piglets challenged with lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.* 87:4050-4056.
- Jin, Y., Y. Hu, D. Han, y M. Wang. 2011. Chronic heat stress weakened the innate immunity and increased the virulence of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 in mice. *J. Biomed. Biotechnol.* doi:10.1155/2011/367846.
- Johnson, J. S., R. L. Boddicker, M. V. Sanz-Fernandez, J. W. Ross, J. T. Selsby, M. C. Lucy, T. J. Safranski, R. P. Rhoads, L. H. Baumgard. 2013. Effects of mammalian in utero heat stress on adolescent body temperature. *Int J Hyperthermia.* 29(7): 696-702.
- Kim, J.C., B. P. Mullan, B. Frey, H. G. Payne, y J. R. Pluske. 2012. Whole body protein deposition and plasma amino acid profiles in growing and/or finishing pigs fed increasing levels of sulfur amino acids with and without *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge. *J. Anim. Sci.* 90:362-365.
- Lambert, G. P. 2009. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J. Anim. Sci.* 87(E. Suppl.):E101-E108.
- Le Bellego L., J. van Milgen, y J. Noblet. 2002. Effect of high temperature and low-protein diets on the performance of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 80:691-701.

- Lee, D. Y., Y. W. Cho, S. G. Kang, N. R. Shin, I. S. Choi, S. J. Shin, y H. S. Yoo. 2004. Quantitative analysis of interleukin-6 expression in porcine spleen cells and alveolar macrophages using real-time PCR. *Vet. Res. Commun.* 28(6): 503-513.
- Liu, F., J. Yin, M. Du, P. Yan, J. Xu, X. Zhu, y J. Yu. 2009. Heat-stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with down regulation of epithelial growth factor signaling. *J. Anim. Sci.* 87:1941-1949.
- Mackowiak, P. A. 1998. Concepts of fever. *Arch Intern Med.* 158(17):1870-81.
- Martínez, S. S., F. Tecles, M. D. Parra, J. J. Cerón. 2001. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. *An. Vet. (Murcia)* 17: 97-114.
- McGlone, J. J., J. L. Salak, E. A. Lumpkin, R. I. Nicholson, M. Gibson, y R. L. Norman. 1993. Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers. *J. Anim. Sci.* 71:888-896.
- Méndez, V., E. Avelar, A. Morales, M. Cervantes, A. Araiza, y D. González. 2011. A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genet. Mol. Res.* 10: 3251-3255.
- Merck. 2012. El manual Merck de veterinaria. 10ª ed. Ed. Océano. Barcelona, España. 2455 p.
- Morales A., F. Grageola, H. García, N. Arce, B. Araiza, J. Yáñez, y M. Cervantes. 2013. Performance, serum amino acid concentrations and expression of selected genes in pair-fed growing pigs exposed to high ambient temperatures. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98: 928-935.
- Morrow-Tesch, J. L., J. J. McGlone, y J. L. Salak-Johnson. 1994. Heat and social stress effects on pig immune measures. *J. Anim. Sci.* 72: 2599-2609.
- Netea, M. G., B. J. Kullberg, L. A. B. Joosten, T. Sprong, I. Verschueren, O. C. Boerman, F. Amiot, W. B. Van den Berg y J. W. M. Van der Meer. 2001. Lethal *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* endotoxemia is mediated through different pathways. *Eur. J. Immunol.* 31: 2529-2538.
- NRC, 1998: Nutrient Requirements of Swine, 10th revised edn. National Academy Press, Washington, DC.
- Palomo, G. I., V. A. Ferreira, C. C. Sepulveda, S. M. Roseblatt, y C. U. Vergara. 2009. Fundamentos de inmunología básica y clínica. Universidad de Talca. Talca-Chile. Colección e-book. 808 p.
- Parham, P. 2005. Inmunología. 2a ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 560 p.

- Pearce, S. C., V. Mani, R. L. Boddicker, J. S. Johnson, T. E. Weber, J. W. Ross, R. P. Rhoads, L. H. Baumgard, y N. K. Gabler. 2013b. Heat stress reduces intestinal barrier integrity and favors intestinal glucose transport in growing pigs. *PLoS ONE* 8(8): e70215.
- Pearce, S. C., N. K. Gabler, J. W. Ross, J. Escobar, J. F. Patience, R. P. Rhoads, y L. H. Baumgard. 2013a. The effects of heat stress and plane of nutrition on metabolism in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 91: 2108-2118.
- Pearce, S. C., V. Mani, R. L. Boddicker, J. S. Johnson, T. E. Weber, J. W. Ross, L. H. Baumgard, y N. K. Gabler. 2012. Heat stress reduces barrier function and alters intestinal metabolism in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 90:257-259.
- Peters, S. O., H. H. Gunn, I. G. Imumorin, B. O. Agaviezor, y C. O. Ikeobi. 2011. Haematological studies on frizzled and naked neck genotypes of Nigerian native chickens. *Trop Anim Health Prod.* 43(3): 631-638.
- Rakhshandeh, A., y C. F. M. de Lange. 2012. Evaluation of chronic immune system stimulation models in growing pigs. *Animal* 6 (2): 305-310.
- Regueiro, G., J. R., L. C. López, R. S. González, y N. E. Martínez. 2010. *Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario*. 4a ed. Editorial Medica Panamericana. Madrid. 257 p.
- Renaudeau, D., C. Anais, L. Tel, y J. L. Gourdiere. 2010. Effect of temperature on thermal acclimation in growing pigs estimated using a nonlinear function. *J. Anim. Sci.* 88:3715-3724.
- Rojas, C. N. 1995. El lipopolisacárido bacteriano: Una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 16 (3): 71-84.
- Salak-Johnson, J. L. y J. J. McGlone. 2007. Making sense of apparently conflicting data: Stress and immunity in swine and cattle. *J. Anim. Sci.* 85(E. Suppl.):E81-E88.
- Sambrook, J. y D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. 999 p.
- Santos, M. F., R. R. C. New, G. R. Andrade, C. Y. Ozaki, O. A. Sant'Anna, L. Mendona-Previato, L. R. Trabulsi, y M. O. Domingos. 2010. Lipopolysaccharide as an antigen target for the formulation of a universal vaccine against *Escherichia coli* O111 strains. *Clin. Vaccine Immunol.* 17 (11): 1772-1780.
- Sonna, L. A., J. Fujita, S. L. Gaffin, y C. M. Lilly. 2002. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* 92: 1725-1742.
- St-Pierre, N. R., B. Cobanov, y G. Schnitkey. 2003. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *J. Dairy Sci.* 86(E-Suppl.):E52-E77.

- Straw, B. E., J. J. Zimmerman, S. D'Allaire y D. J. Taylor. 2006. Veterinary practice. In: Disease of swine. 9a ed. Blacwell Publishing. U. S. A. 1153 p.
- Sun, X., H. Zhang, A. Sheikhahmadi, Y. Wang, H. Jiao, H. Lin, y Z. Song. 2014. Effects of heat stress on the gene expression of nutrient transporters in the jejunum of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Int. J. Biometeorol.* doi10.1007/s00484-014-0829-1.
- Suradhat, S. 2005. Relationships between the immune system and stress reactivity in pig: Visualizing the immuno-neuroendocrine framework in action. *TJVM* 36(1): 9-18.
- Sutherland, M. A., S. R. Niekamp, S. L. Rodriguez-Zas, y J. L. Salak-Johnson. 2006. Impacts of chronic stress and social status on various physiological and performance measures in pigs of different breeds. *J. Anim. Sci.* 84:588-596.
- Tizard, R. I. 2009. *Inmunología veterinaria*. 6a ed. Elsevier. España. 592 p.
- Triantafilou, K., M. Triantafilou, S. Ladha, A. Mackie, N. Fernandez, R. L. Dedrick, y R. Cherry. 2001. Fluorescence recovery after photobleaching reveals that LPS rapidly transfers from CD14 to hsp70 and hsp90 on the cell membrane *J. Cell. Sci.* 114: 2535-2545.
- Triantafilou, M. y Triantafilou, K. 2004. Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochemical Society Transactions* 32 (4): 636-639.
- Tripathi, M. K., D. Mondal, y S. A. Karim. 2008. Growth, hematology, blood constituents and immunological status of lambs fed graded levels of animal feed grade damaged wheat as substitute of maize. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 92: 75-85.
- van Heugten, E., J. W. Spears, y M. T. Coffey. 1994. The effect of dietary protein on performance and immune response in weanling pigs subjected to an inflammatory challenge. *J. Anim. Sci.* 89:4286-4293.
- Waltz, X., M. Baillot, P. Connes, B. Bocage, y D. Renaudeau. 2014. Effects of hydration level and heat stress on thermoregulatory responses, hematological and blood rheological properties in growing pigs. *PLoS ONE* 9(7): e102537.
- Wan, J. M. F., M. P. Haw, y G. L. Blackburn. 1989. Nutrition, immune function and inflammation: An overview. *Proc. Nutr. SOC.* 48:315.
- Wang, A., H. Yu, X. Gao, X. Li, y S. Qiao. 2009. Influence of *Lactobacillus fermentum* I5007 on the intestinal and systemic immune responses of healthy and *E. coli* challenged piglets. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:89-98.
- Wang, X. y P. J. Quinn. 2010. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog. Lipid Res.* 49: 97-107.

- Weber, T. E. y B. J. Kerr. 2008. Effect of sodium butyrate on growth performance and response to lipopolysaccharide in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 86:442-450.
- Weiss, G. y L. T Goodnough. 2005. Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* 352:1011-1023.
- Welc, S. S., T. L. Clanton, S. M. Dineen, y L. R. Leon. 2013. Heat stroke activates a stress-induced cytokine response in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 115: 1126-1137.
- Welch, W.J. y C. R. Brown. 1996 Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones* 1(2): 109-115.
- Williams, P. N., C. T. Collier, J. A. Carroll, T. H. Welsh Jr., y J. C. Laurenz. 2009. Temporal pattern and effect of sex on lipopolysaccharide-induced stress hormone and cytokine response in pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 37:139-147.
- Wolp, R. C., N. E. B. Rodrigues, M. G. Zangeronimo, V. S. Cantarelli, E. T. Fialho, R. Philomeno, R. R. Alvarenga, L. F. Rocha. 2012. Soybean oil and crude protein levels for growing pigs kept under heat stress conditions. *Livestock Science* 147:148-153.
- Xin, H. y J. D. Harmon. 1998. "Livestock industry facilities and environment: Heat stress indices for livestock". Agriculture and environment extension publications. Book 163.
- Yates, D. T., C. A. Loest, T. T. Ross, D. M. Hallford, B. H. Carter, y S. W. Limesand. 2011. Effects of bacterial lipopolysaccharide injection on white blood cell counts, hematological variables, and serum glucose, insulin, and cortisol concentrations in ewes fed low- or high-protein diets. *J. Anim. Sci.* 89:4286-4293.
- Zuckerman, H. S., J. Shellhas, y L. Buttler. 1989. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis: effects of endogenous and exogenous glucocorticoids and the role of the pituitary-adrenal axis. *Eur. J. Immunol.* 19: 301-305.
- Zumbach, B., I. Misztal, S. Tsuruta, J. P. Sanchez, M. Azain, W. Herring, J. Holl, T. Long, y M. Culbertson. 2008. Genetic components of heat stress in finishing pigs: Development of a heat load function. *J. Anim. Sci.* 86:2082-2088.

ANEXOS

Anexo 1. Composición nutricional de la dieta utilizada para la alimentación de los cerdos en tratamiento

| Energía, proteína y composición de aminoácidos (%) | |
|--|-------|
| Energía neta, KJ/kg | 10122 |
| Proteína cruda | 19.92 |
| Arginina | 1.12 |
| Histidina | 0.44 |
| Isoleucina | 0.69 |
| Leucina | 1.23 |
| Lisina | 1.23 |
| Metionina | 0.38 |
| Metionina + Cisteína | 0.69 |
| Fenilalanina | 0.83 |
| Treonina | 0.75 |
| Triptófano | 0.22 |
| Valina | 0.77 |
| Total AA-N | 2.31 |
| Calcio | 0.75 |
| ATTD P | 0.29 |
| Total N | 3.19 |

Anexo 2. Hemograma de los cerdos pre y pos desafío con LPS en confort y calor (desafío 1 y 2)

| Día | Confort | | Confort+LPS | | EC | | EC + LPS | | EE ² | Valor de P ¹ | | | | |
|------------------------------|---------|--------|-------------|--------|--------|--------|----------|--------|-----------------|-------------------------|--------------|-------|--------------|-------|
| | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 |
| Desafío 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| VPC ² (L/L) | 0.27 | 0.30 | 0.32 | 0.31 | 0.28 | 0.28 | 0.29 | 0.29 | 0.016 | 0.193 | 0.560 | 1.000 | 0.884 | 0.770 |
| ERIT (x10 ¹² g/L) | 4.47 | 4.87 | 5.30 | 5.20 | 4.73 | 4.73 | 4.70 | 4.62 | 0.285 | 0.327 | 0.805 | 1.000 | 0.837 | 0.790 |
| HB (g/L) | 86.33 | 95.00 | 104.67 | 98.33 | 92.33 | 92.33 | 92.33 | 91.33 | 5.126 | 0.239 | 0.388 | 1.000 | 0.891 | 0.927 |
| VCM (fL) | 59.85 | 61.60 | 61.12 | 59.62 | 60.00 | 60.00 | 61.75 | 62.20 | 1.122 | 0.277 | 0.350 | 1.000 | 0.778 | 0.827 |
| CCMH (g/L) | 323.28 | 318.20 | 323.68 | 317.30 | 325.80 | 325.80 | 318.60 | 318.67 | 4.033 | 0.215 | 0.121 | 1.000 | 0.987 | 0.165 |
| PLAQ (x10 ⁹ /L) | 272.17 | 320.17 | 287.17 | 259.67 | 257.33 | 257.33 | 294.17 | 279.17 | 35.373 | 0.343 | 0.586 | 1.000 | 0.766 | 0.956 |
| PPLAS (g/L) | 47.00 | 56.33 | 49.67 | 51.00 | 53.33 | 53.33 | 48.33 | 51.33 | 2.386 | 0.009 | 0.695 | 1.000 | 0.379 | 0.050 |
| Desafío 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| VPC ² (L/L) | 0.30 | 0.30 | 0.32 | 0.31 | 0.29 | 0.30 | 0.29 | 0.29 | 0.011 | 0.834 | 0.405 | 0.676 | 0.754 | 0.638 |
| ERIT (x10 ¹² g/L) | 4.90 | 4.78 | 5.23 | 4.83 | 4.82 | 4.79 | 4.83 | 4.57 | 0.235 | 0.727 | 0.236 | 0.929 | 0.427 | 0.228 |
| HB (g/L) | 95.67 | 95.33 | 105.33 | 100.17 | 94.33 | 96.17 | 94.33 | 91.33 | 4.153 | 0.955 | 0.384 | 0.757 | 0.612 | 0.574 |
| VCM (fL) | 61.37 | 62.12 | 61.87 | 64.43 | 61.00 | 62.42 | 60.88 | 62.65 | 1.232 | 0.669 | 0.149 | 0.421 | 0.317 | 0.070 |
| CCMH (g/L) | 318.82 | 321.38 | 325.43 | 323.00 | 322.77 | 322.17 | 322.70 | 288.10 | 11.499 | 0.875 | 0.882 | 0.971 | 0.040 | 0.287 |
| PLAQ (x10 ⁹ /L) | 300.67 | 298.00 | 218.33 | 322.50 | 320.83 | 346.67 | 399.50 | 274.00 | 33.037 | 0.955 | 0.032 | 0.583 | 0.011 | 0.984 |
| PPLAS (g/L) | 52.67 | 52.00 | 51.33 | 52.33 | 48.33 | 52.00 | 53.00 | 53.00 | 2.560 | 0.855 | 0.784 | 0.317 | 1.000 | 0.584 |

¹ C1: confort, 0 vs 3; C2: confort + LPS, 0 vs 3; C3: Calor, 0 vs 3; C4: Calor + LPS, 0 vs 3; C5: interacción LPS y TA

² Error estándar de la media.

³ VPC: volumen del paquete celular (L/L: Litro/Litro), ERIT: eritrocitos (g/L: gramos/Litro), HB: hemoglobina (g/L: gramos/Litro), VCM: volumen corpuscular medio (fL: femtolitros), CCHM: concentración de hemoglobina corpuscular media (g/L: gramos/Litro), PLAQ: plaquetas (x10⁹ L: Litro), PPLAS: proteínas plasmáticas (g/L: gramos/Litro).

Anexo 3. Expresión relativa de genes en órganos del sistema inmune de cerdos bajo estrés por calor y desafiados con LPS

| | Confort | Confort+LPS | EC | EC+LPS | EE | Valor de P= | | | | |
|--------------|---------|-------------|-----------|--------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | | | | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 |
| Bazo | | | | | | | | | | |
| IL- 6 | 0.561 | 0.359 | 0.71 1 | 0.600 | 0.094 | 0.06 0 | 0.12 4 | 0.63 6 | 0.15 6 | 0.42 4 |
| IL-10 | 0.150 | 0.097 | 0.20 4 | 0.133 | 0.023 | 0.07 5 | 0.02 0 | 0.72 1 | 0.12 6 | 0.05 2 |
| IFN α | 0.000 | 0.002 | 0.00 1 | 0.001 | <0.00 1 | 0.15 5 | 0.04 9 | 0.04 9 | 0.00 9 | 1.00 0 |
| Timo | | | | | | | | | | |
| IL- 6 | 0.031 | 0.039 | 0.05 9 | 0.056 | 0.009 | 0.02 5 | 0.77 6 | 0.55 6 | 0.53 8 | 0.82 7 |
| IL-10 | 0.040 | 0.021 | 0.02 0 | 0.015 | 0.004 | 0.00 7 | 0.01 0 | 0.08 6 | 0.00 5 | 0.42 6 |
| IFN α | 0.923 | 1.192 | 1.78 3 | 1.581 | 0.667 | 0.36 7 | 0.96 1 | 0.73 0 | 0.78 0 | 0.83 4 |
| HSP90 | | | | | | | | | | |
| Músculo LD | 0.629 | 0.343 | 0.48 2 | 0.459 | 0.148 | 0.92 6 | 0.36 7 | 0.44 1 | 0.24 4 | 0.92 3 |
| Hígado | 0.925 | 1.172 | 1.23 1 | 0.748 | 0.165 | 0.69 7 | 0.44 2 | 0.03 0 | 0.26 2 | 0.04 0 |

¹ P-valor, contrastes: C1=Confort vs Estrés por calor (EC); C2= Sin LPS vs LPS; C3= Interacción TA y LPS; C4= Confort vs Confort+LPS; C5= EC vs EC + LPS