

**EFECTO DEL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) DE *E. coli* SOBRE LA CANTIDAD DE
CÉLULAS CALICIFORMES, LEUCOCITOS Y SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE
MUCINAS EN EL PULMÓN DE CERDOS POSTDESTETE.**

Por:

JULIÁN DAVID MUÑOZ DUQUE

Médico Veterinario

Director

BERARDO DE JESÚS RODRÍGUEZ

Médico Veterinario, Esp Patólogo, PhD

Comité tutorial

MARIA CONSUELO RAMÍREZ ROJAS, MV, MSc

JAIME E. PARRA SUESCÚN, Zoot, MSc, PhD

**MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS
PROFUNDIZACIÓN EN PATOLOGÍA VETERINARIA**

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

2014

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mi gran apoyo y motivación.

Al grupo de trabajo del laboratorio de Patología de la Universidad de Antioquia, por su generosidad para compartir sus conocimientos y su tiempo.

A mi tutor, por su gran acompañamiento tanto académico como personal durante este proceso formativo.

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen	Pag 5
2. Abstract	8
3. Introducción	10
4. Objetivos	15
4.1. Objetivo general.....	15
4.2. Objetivos específicos.....	15
5. Marco teórico	16
5.1. Generalidades Del destete en lechones	16
5.2. Sistema inmunológico del lechón.....	17
5.3. Factores patogénicos causantes de enfermedad intestinal en el lechón	19
5.4. Factores patogénicos causantes de enfermedad respiratoria en el lechón.....	20
5.5. Generalidades del LPS.....	21
5.5.1. Estructura del LPS.....	22
5.5.2. Funciones del LPS en las bacterias.....	23
5.5.3. Mecanismos de acción del LPS.....	23
5.6. Secreción de moco y mucinas.....	25
5.6.1. Estructura de las mucinas.....	26
5.6.2. Mecanismo de secreción de mucinas.....	26
5.6.3. Mucinas y agentes infecciosos.....	28
5.6.4. Importancia clínica de las mucinas.....	29
5.6.5. Identificación histoquímica de giucocomponentes.....	30
6. Cuerpo del trabajo	32
6.1. Artículo para publicación.....	32
7. Conclusiones generales	51
8. Bibliografía	53

LISTA DE TABLAS

- **Tabla 1.** “Number of leukocytes in the post-weaning period in pigs fed the basal diet (weaning effect)”. Página 37.
- **Tabla 2.** “Effect E.coli LPS on the number of leukocytes at different post-weaning periods”. Página 37.
- **Tabla 3.** “Effect of E. coli LPS dose on the number of leukocytes at different post-weaning periods”. Página 38.
- **Tabla 4.** “Effect of LPS on the expression of different types of mucins in post-weaning piglets (cells/mm²)”. Página 40.

LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1.** “Effect of diets on the average number of goblet cells (GC)”, Página 41.
- **Figura 2.** “Decreases in the number of goblet cells with different concentrations of LPS”. Página 42
- **Figura 3.** “Histochemical stainings in bronchi of control pigs (Basal Diet) and treated with D2 (0.5µg LPS/mg)”. Página 43.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA 1.0: Azul de Alcían pH 1.0.

AA 2.5: Azul de Alcían pH 2.5.

CC: Células caliciformes.

DB: Dieta Basal.

D1: Dieta 1 (LPS de *E. coli* a 0.3, µg/mg de alimento).

D2: Dieta 2 (LPS de *E. coli* a 0.5, µg/mg de alimento).

D3: Dieta 3 (LPS de *E. coli* a 1.0, µg/mg de alimento).

TNF: Factor de Necrosis tumoral.

H-E: Hematoxilina Eosina.

ICAM: del inglés, Intercellular Adhesión Molecule (Molécula de adhesión intercelular).

Ig: Inmunoglobulina.

IL: Interleucina.

LPS: Lipopolisacárido.

MA: Mucinas ácidas.

MAPK: Proteínas activadas por mitógeno.

MN: Mucinas neutras.

MUC: Gen asociado a mucina.

PAS: del inglés, Periodic acid schiff.

SI: Sistema Inmune.

TLR: del inglés Toll Like Receptor.

1. RESUMEN

Introducción: El periodo postdestete en los cerdos está caracterizado por una serie de alteraciones orgánicas de tipo estructurales y funcionales, que predisponen al desarrollo de enfermedades entéricas y del tracto respiratorio. Un agente patógeno importante en este periodo es la *Escherichia coli*, una bacteria gram negativa que posee en su pared celular lipopolisacárido (LPS), factor patogénico importante en la presentación de procesos endotóxicos e importante activador de la respuesta inmune innata. Actualmente se desconoce el efecto de LPS sobre la distribución de mucinas en el tracto respiratorio de los cerdos y su relación con la presentación de procesos inflamatorios en el pulmón. **Objetivo:** determinar el efecto del LPS de *E. coli* sobre la distribución de las mucinas en el pulmón de lechones postdestete. Además se espera establecer el efecto de LPS sobre la respuesta leucocitaria. **Metodología:** Para este estudio se utilizaron tejidos incluidos en parafina obtenidos de una investigación anterior que se encuentran almacenados en el Laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Antioquia. Las muestras se obtuvieron en un estudio experimental previo que se realizó con 52 lechones destetados a los 21 días de edad. Los animales fueron alimentados con una dieta basal adicionada con cuatro niveles de LPS (0.0, 0.3, 0.5 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de alimento) durante 10 días. Los cerdos se sacrificaron escalonadamente los días 1, 5, 7 y 10 postdestete y se tomaron muestras de pulmón. En estas muestras se efectuaron cortes histológicos de 4 μm de espesor y se realizaron coloraciones histoquímicas para determinar la cantidad de células caliciformes expresando mucinas ácidas, neutras y sulfatadas y el tipo de infiltrado leucocitario, todo lo anterior mediante análisis computarizado de imágenes. Para el análisis estadístico se empleará el diseño bloques al azar en un arreglo factorial 4 x 4. **Resultados y discusión:** En los lechones testigo se observó una disminución en el número de células caliciformes en bronquios y bronquiolos, con una recuperación de los valores para el día diez, el LPS inhibió dicha recuperación de esta estirpe celular, y de las mucinas neutras producidas por ellas. En todas las unidades experimentales las mucinas ácidas aumentaron en los bronquios en el día 5 postdestete y no hubo mucinas ácidas en sus bronquiolos. Por otro lado la mayor

concentración de LPS causó una disminución en el número de neutrófilos en el día diez y no produjo efectos sobre la cantidad de los otros leucocitos. **Conclusión:** El LPS afecta la recuperación de las células caliciformes del epitelio de las vías respiratorias del pulmón y disminuye la cantidad de neutrófilos, alterando la inmunidad innata en el destete precoz, lo que puede favorecer el ingreso de patógenos y la sensibilización a alérgenos.

2. ABSTRACT

Introduction: The postweaning period in pigs is characterized by a series of organic alterations of functional and structural type, which predispose to the development of enteric and respiratory tract diseases. An important pathogen in this period is the *Escherichia coli*, a gram-negative bacterium that has in its cell wall lipopolysaccharide (LPS), which is an important pathogenic factor in endotoxic processes and a potent activator of the innate immune response. The effect of LPS on the mucin distribution in the respiratory tract of pigs and their relationship with the presentation of inflammatory processes in the lung is unknown. **Objective:** To determine the effect of LPS of *E. coli* on the distribution of mucins in the lung of piglets after weaning. It is also expected to establish the effect of LPS on leukocyte response. **Methodology:** For this study, paraffin-embedded tissues obtained from a previous study were used. These tissues were stored at the Laboratory of Animal Pathology, University of Antioquia. The samples were obtained in a previous experimental study conducted with 52 piglets weaned at 21 days of age. The animals were fed a basal diet supplemented with four levels of LPS (0.0, 0.3, 0.5 and 1.0 ug / mg of food) for 10 days. Pigs were sacrificed stepwise days 1, 5, 7 and 10 post-weaning and lung samples were taken. In these samples, histological sections were made with a thickness of 4 um and histochemical stainings were performed to determine the number of goblet cells expressing neutral and acid mucins and the type of leukocyte infiltration, using a computerized image analysis. For statistical analysis the random block design was used on a 4 x 4 factorial arrangement. **Results and discussion:** In control piglets was observed a decrease in the number of goblet cells in bronchi and bronchioles, with a recovery of values for the tenth day, the LPS inhibited this recovery of this cell line and neutral mucins produced by them. In all experimental units increased acidic mucin in the bronchi on day 5 postweaning and no acidic mucins were observed in their bronchioles. In addition the higher concentrations of LPS caused a decrease in the number of neutrophils on day tenth and no effects on the amount of other leukocytes. **Conclusions:** LPS affects the recovery of goblet cells in the airway epithelium of the lung and decreases the number

of neutrophils, altering the innate immunity in early weaning, which may favor the entry of pathogens and allergen sensitization.

3. INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los países productores de carne de cerdo, la práctica más habitual es destetar a las tres o cuatro semanas de edad, cuando los lechones alcanzan más de 6 kilogramos, sin embargo en otros países, como es el caso de los Estados Unidos, es habitual el destete antes de tres semanas de edad. El principal motivo expuesto para realizar un destete precoz es aumentar los parámetros productivos y minimizar la transferencia de enfermedades de la cerda, pero los lechones con menor peso requieren un nivel superior de manejo, una mejor nutrición y unas mejores condiciones ambientales (Pluske 2006).

El lechón posee la capacidad de crecer de manera extremadamente rápida después del destete, aunque hay una serie de factores que limitan el grado en el que se expresa este potencial. El peso del lechón al destete, su nutrición e índice de crecimiento en el periodo posterior al destete, así como el ambiente físico, microbiológico y social, son factores que interactúan para determinar la ingesta de alimento y el subsiguiente crecimiento (Pluske *et al* 2006).

A nivel histológico, se ha demostrado que el destete causa cambios en la morfología del intestino delgado de los cerdos (Hampson 1986, Parra *et al* 2011), estos cambios incluyen la reducción de la altura de las vellosidades (un indicador de la muerte de enterocitos), una mayor profundidad de la lámina propia (un indicador de la profundidad de las glándulas, la proliferación celular y la madurez de las vellosidades de los enterocitos), reducción de la concentración y actividad de enzimas intestinales y disminución de la absorción (Ospina *et al* 2012).

La relación entre la función de la mucosa como barrera epitelial y la atrofia de las vellosidades en el destete no está bien entendida actualmente. La alteración de la morfología intestinal posiblemente aumenta la permeabilidad paracelular. Con el aumento de la permeabilidad intestinal pueden ingresar a circulación general y por ende a los tejidos extra-intestinales toxinas, compuestos alergénicos o agentes

patógenos, lo que resulta en respuestas inflamatorias o inmunológicas adversas (Deitch 1993, Wang 1995).

Como consecuencia de lo anterior, al momento del destete los lechones son más susceptibles a retos antigénicos nutricionales y microbiológicos potenciales, provocando la reducción en el crecimiento y el aumento en la tasa de mortalidad (Reis *et al* 2005).

Algunos autores argumentan que el destete estimula cambios negativos en intestino, que pueden ser de tipo microbiológicos, inflamatorios, morfológicos y enzimáticos (Parra *et al* 2011, Ospina *et al* 2012), pudiéndose presentar enfermedades de origen infeccioso que afectan principalmente las mucosas digestivas y respiratorias y a su vez generan pérdidas económicas a la industria porcina (Pluske *et al* 2006).

Adicionalmente, en el destete se provoca un periodo breve de ayuno y la desaparición de la población de lactobacilos predominante en estómago e intestino, favoreciendo el aumento de la población de bacterias gram negativas como *E. coli*, que liberan lipopolisacáridos (LPS) desde sus paredes (Amador *et al* 2007).

El LPS es un agente patogénico importante, que actúa como un estimulador potente de la inmunidad innata y de la inflamación, causante de incremento en el transporte paracelular indiscriminado de moléculas en el intestino, aparición de diarreas, alteraciones estructurales y funcionales (Zhenfeng 2008); que acopladas inducen un déficit en los procesos de absorción y aprovechamiento de nutrientes (Pitman 2000, Fan 2002, García-Herrera 2004).

La hipersecreción de moco, como parte de la respuesta de las células epiteliales de los tractos gastrointestinal, respiratorio, reproductivo y urinario, se ha asociado con la inflamación causada por infección bacteriana y constituye un mecanismo importante de defensa del hospedero, ya que actúa como barrera fisiológica para prevenir el acceso de agentes infecciosos a la mucosa (Burgel 2006). Los componentes viscosos y elásticos más importantes del moco son las mucinas, proteínas heterogéneas,

glicosiladas, de alto peso molecular, que son producidas y secretadas por las células caliciformes en dichos epitelios (Moniaux 2001).

Estudios de otros investigadores demostraron la capacidad del LPS para inducir cambios morfológicos en las células caliciformes y en su proliferación en diferentes tipos de mucosas (Shimizu 1996, Enss 1996). También se ha reportado que el LPS estimula la secreción de mucina *in vitro* en células de la vejiga urinaria (Choi *et al* 1999) e *in vivo* en el epitelio del colon (Enss 1996), oído medio (Hunter 1999) y cavidad nasal. Además incrementa la transcripción génica de las mucinas en las células epiteliales (Li 1997, Hauber *et al* 2007).

La habilidad de las células caliciformes para responder a un amplio rango de agresiones, mediante cambios en la producción y secreción de mucinas indica que estas células hacen parte de la primera línea de defensa de las mucosas y si bien, las mucinas son consideradas un factor importante y determinante del estado de salud intestinal en varias especies animales, los resultados reportados en los cerdos al respecto son escasos e inconsistentes (Brown *et al* 2006). Para el caso específico del sistema respiratorio no existe información suficiente que explique el efecto del LPS de *E. coli* sobre la producción de mucinas en el epitelio de las vías respiratorias, y su relación con el desarrollo del complejo respiratorio porcino.

Adicionalmente, en cerdos se ha reportado que el número de células caliciformes y la producción de mucinas en el intestino delgado, se reducen en el destete y comienzan a aumentar entre el día 3 y 15 postdestete (Dunsford 1991). En un estudio realizado por Hooper y Gordon (2001), se encontró que las bacterias residentes en la mucosa envían mensajes a las células del hospedero interfiriendo la expresión y la actividad de las glicosiltransferasas celulares, lo que induce cambios en el repertorio de carbohidratos de las mucinas. Esos cambios pueden ser benéficos o desfavorables para el hospedero dependiendo de los tipos de bacterias que se adhieran a los nuevos sitios en el epitelio (Hooper 2001). Aunque se ha comunicado la existencia de un efecto del LPS sobre la cantidad de células caliciformes y el tipo de mucinas secretadas en el intestino de lechones destetados precozmente (Zapata *et al* 2013, sin publicar), se desconoce si el LPS absorbido en el intestino puede provocar

alteraciones en las células caliciformes y la secreción de mucinas en el pulmón. La obtención de esta información permitiría una mejor comprensión de la fisiopatología de las enfermedades respiratorias en lechones en ese periodo crítico del desarrollo.

Otros estudios como el de Brown et al en 2006 sugieren que las alteraciones en la microbiota intestinal de los lechones, inducida por el tipo de alojamiento puede influenciar la composición de las mucinas en el epitelio; es así que se propone que cambios en las poblaciones de células caliciformes con secreción de mucinas ácidas y sulfatadas podrían servir como protección adicional al lechón contra las infecciones entéricas; información como la anterior acerca de la distribución de las mucinas en las vías respiratorias y la forma como esta se altera en respuesta a agresiones directas por algunos agentes, o por el tipo de alojamiento, aún no ha sido presentada. Dicha información ayudaría a determinar posibilidades terapéuticas y de manejo que puedan prevenir la presentación de enfermedades que intervengan en el desarrollo del complejo respiratorio porcino.

Por lo anterior y considerando que algunos autores han encontrado cuadros sépticos y alteraciones multiorgánicas, específicamente en el pulmón, al administrar LPS de *E. coli* en lechones postdestete (Zuluaga *et al* 2010), se desconoce su efecto sobre el pulmón, específicamente, sobre la distribución de mucinas en el epitelio respiratorio.

Por todo lo anterior, en esta investigación se propone la siguiente hipótesis:

El LPS de *E. coli*, adicionado oralmente, puede afectar el número de células caliciformes y las mucinas expresadas por ellas y la respuesta leucocitaria en el pulmón de lechones destetados precozmente.

Con este proyecto se pretende generar información sobre los mecanismos del LPS de *E. coli* para la inducción de afecciones en el sistema respiratorio. Esta información podría servir a los productores porcinos y a los profesionales del sector pecuario, para implementar medidas de manejo en cerdos que permitan prevenir dichos efectos y mejorar los estándares productivos que puedan estar afectados. Más aún

considerando que tanto el destete precoz, como la presencia de *E. coli*, han sido relacionados con pérdidas económicas importantes para la industria porcina.

Este estudio es una continuación del trabajo titulado “Efecto del Lipopolisacárido de *E. coli* sobre las características clínicas, productivas y fisiológicas a nivel intestinal de cerdos destetos”, en el que se realiza un trabajo interdisciplinario entre el grupo BIOGEM de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y el grupo de investigación en patobiología QUIRÓN de la Universidad de Antioquia, con el que se viene generando información sobre la fisiopatología del LPS de *E. Coli* en cerdos postdestete. Se espera que los resultados de este estudio aporten información relevante sobre los efectos de las enterobacterias en tejidos extra intestinales, con el objetivo de mejorar los estándares productivos, sanitarios y el bienestar animal en la producción porcina.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Determinar el efecto de la adición oral LPS de *E. coli* sobre la cantidad de células caliciformes, la distribución de mucinas y la respuesta leucocitaria el pulmón de lechones postdestete.

4.2. Objetivos específicos:

- ▶ Determinar el efecto de la adición de LPS de *E. coli* sobre el número de células caliciformes y la distribución y el tipo de mucinas estimuladas en el pulmón.
- ▶ Determinar el efecto del LPS de *E. coli* sobre la cantidad de leucocitos en el pulmón de lechones postdestete.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Generalidades del destete en lechones

En la actualidad, la tendencia en la porcicultura es realizar un destete temprano, que incluso puede ser a las tres semanas de edad. Sin embargo el destete precoz implica una disminución del crecimiento del lechón y la presentación de entidades patógenas, principalmente del tracto gastrointestinal y respiratorio. Debido a lo anterior esta práctica afecta la eficiencia productiva, teniendo un impacto no solo sobre el rendimiento económico, sino además bien sobre el bienestar animal (Aldaz 2002, Pluske *et al* 2006).

En condiciones naturales, el destete del lechón se realiza aproximadamente a las 22 semanas, donde éste comienza a variar su dieta por alimento sólido, constituido principalmente por insectos, larvas, algunos follajes entre otros, siendo este un cambio gradual que permite la adaptación del medio intestinal a otras fuentes nutricionales. Por otro lado en condiciones de explotación porcina el destete se pueda dar de dos formas, el destete tradicional que puede hacerse a los 28 ó 35 días, y el destete precoz que se puede realizar incluso desde los 7 a los 21 días de edad (Gomez *et al* 2008).

El destete precoz permite mejorar el nivel sanitario del lechón, el rendimiento productivo de las cerdas, (garantizando un mayor número de partos por año) y reduce el costo en instalaciones (Touchette *et al* 2002). Pero a nivel de granjas poco tecnificadas el destete puede causar problemas que afectan negativamente su desempeño productivo (souza *et al* 2005).

En el destete que se realiza precozmente hay varios factores que intervienen para afectar negativamente la salud del lechón, estos cambios son de tipo nutricional, al realizarse un cambio en el sustrato alimenticio; medioambientales, como lo son el

cambio de instalaciones; y psicológicos, donde juega un papel clave el reagrupamiento y las interacciones sociales (Reis 2005, Gomez *et al* 2008).

5.2. Sistema inmunológico del lechón

El lechón en sus primeras semanas de vida depende de la inmunidad pasiva suministrada por la madre a través de la lactancia, más específicamente la inmunidad es conferida en forma de inmunoglobulinas (Ig's) a través del calostro, estas moléculas atraviesan la pared intestinal en las primeras horas de vida, llegando a circulación para proveer inmunidad sistémica, sin embargo los niveles de estas Ig's sistémicas descienden en el tiempo. Posterior a esto el animal continúa consumiendo leche materna, la cual se encuentra enriquecida con IgA, encargada de proporcionar inmunidad local (Pesta *et al* 2007).

El lechón no es capaz de producir su propia actividad inmunológica en cantidades adecuadas hasta alcanzar al menos 28-30 días de edad. Por tanto, cualquier estrés, bien sea digestivo, de manejo o combinado, puede afectar al lechón en momentos críticos de su vida (Vente-Spreewenbergh *et al* 2004). Niekamp en 2006 refuerza lo anterior argumentando que una respuesta de estrés agudo puede ser provocadas por repentinos cambios sociales, nutricionales y ambientales durante el destete, y esto puede alterar la homeostasis y por tanto poner en peligro el bienestar del animal. La exposición a nuevos patógenos y a antígenos inocuos en este momento puede dar lugar a respuestas inmunitarias indeseadas, pues el reto de un sistema inmunitario intestinal capacitado debe ser el de mantener un equilibrio entre su función reguladora y efectora ante los organismos patógenos y los antígenos inocuos (Vente-Spreewenbergh *et al* 2004).

La pared intestinal representa una barrera física de defensa, que evita el ingreso de agentes patógenos y compuestos tóxicos a la circulación sanguínea, que puedan afectar de forma sistémica al animal. Al tener contacto con uno de esos agentes las células epiteliales pueden activar la respuesta inmune innata y adquirida a través de la producción de citoquinas, las cuales tienen un rol vital en el reclutamiento y activación de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T y B (Wang 1995, Pié *et al* 2004).

La exposición a antígenos activa el sistema de defensa para intentar neutralizarlos antes de que pongan en peligro el bienestar del lechón. La activación del sistema inmune (SI) afecta tanto los procesos metabólicos como el crecimiento por medio de la interacción con el sistema nervioso central (eje hipotálamo-hipófisis); interacción con el sistema endocrino, mediante la liberación de corticoesteroides y tiroxina; y liberación de citoquinas proinflamatorias por medio de los leucocitos (Klasing y Johnstone 1991). Estas citoquinas tienen la capacidad de producir hiperlipidemia y aumentar el catabolismo proteico, lo que permite la formación de péptidos, generalmente de origen muscular que son utilizados para la síntesis de proteínas de fase aguda, para la gluconeogénesis y para la actuación de células T y B del SI y la producción de inmunoglobulinas (Wang 1995).

Aunque algunas citoquinas son expresadas en condiciones normales durante el destete, hay una sobreexpresión de ellas durante el periodo postdestete (Pié *et al* 2004).

Todo lo anterior implica una fuerte demanda y competencia entre los diferentes tipos de células y tejidos por nutrientes, principalmente aminoácidos (Pluske *et al* 2006). Otro factor importante es que la activación y posterior respuesta del sistema inmune ante dichas agresiones puede disminuir algunas funciones productivas del animal, como su desarrollo y crecimiento (Klasing y Johnstone 1991). Lo anterior se verá reflejado en la disminución del bienestar y salud animal y por lo tanto, en pérdidas económicas para el productor.

Tras el destete, se produce un periodo de ayuno y un cambio radical de tipos de alimento, pasando de una dieta líquida a una sólida y desconocida, que resulta en una alteración de la disponibilidad de sustrato específico para microorganismos normales en todos los segmentos del tracto digestivo. Debido a lo anterior, el destete estimula la disminución e incluso la desaparición de lactobacilos y estreptococos que son predominantes en estómago e intestino delgado (Dauphinee y Karsan 2006, Parra *et al* 2011). La insuficiente producción de ácido gástrico resulta en una insuficiente barrera ácido-protectora, provocando la llegada masiva de patógenos al intestino

delgado, principalmente *E. coli*, el cual posee en su membrana externa lipopolisacárido (Amador et al 2007), este lipopolisacárido o LPS estimula la producción citoquinas proinflamatorias que alteran la funcionalidad intestinal. Los agentes productores de LPS son bacterias gram-negativas, por ejemplo *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia* (Dauphinee y Karsan 2006) y tienen en común que son patógenos para el hombre y una amplia variedad de especies animales.

La característica que permite que el LPS sea capaz de ser reconocido por cualquier hospedero mamífero, es a través de sus receptores ubicados en las superficies celulares de éstos, donde puede inducir cambios estructurales que influirán en su función (Amador et al 2007). Esta propiedad está dada por la estructura propia del LPS, específicamente su lípido A que se estudiara en fases posteriores de esta revisión

5.3. Factores patogénicos causantes de enfermedad intestinal en lechones

Debido al fuerte cambio que sufre el lechón en el periodo postdestete, más aún si éste se realiza precozmente, el tracto digestivo se ve retado por una amplia variedad de agentes infecciosos que pueden desencadenar una reacción inflamatoria, causar una enfermedad clínica e incluso provocar a la muerte (Pluske et al 2006).

Los agentes que comúnmente se encuentran asociados a enfermedad digestiva, generalmente acompañada de diarrea (el signo clínico más claro), son los causantes de colibacilosis, coccidiosis, clostridiosis, salmonelosis, ileitis y disentería porcina, además, de agentes virales rotavirus y coronavirus porcino. (Plonait y Bickhardt 2001).

En la etapa de lactancia el lechón posee una población bacteriana en estómago e intestino delgado que se encuentra representada principalmente por *Lactobacilos* y *Streptococos*, las cuales se encuentran adaptadas al sustrato de origen lácteo, mientras que en el intestino posterior hay una gran variedad de bacterias, generalmente anaerobias, donde se incluyen bacterias de tipo *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* y *Bacterioides*. Cuando se presenta un cambio en el sustrato alimenticio estas poblaciones bacterianas se ven afectadas, causando

principalmente muerte de lactobacilos y promoviendo la llegada de agentes patógenos a los tractos anteriores, específicamente de *E. coli*, quien de acuerdo a su cepa, puede patogenizar y causar enfermedad clínica aguda (Plonait y Bickhardt 2001, Pluske *et al* 2006).

5.4. Factores patogénicos causantes de enfermedad respiratoria en lechones

De todos los sistemas orgánicos, el tracto respiratorio puede ser único en su vulnerabilidad a agentes injuriantes, la exposición por las vías aerógena o por ventilación y cardiogénica, establece dos fuentes determinantes en la expresión de enfermedad pulmonar (Caswell y Williams 2007).

Aunque desde principios de la década de los 80 han aparecido agentes virales que afectan el aparato respiratorio y que son nuevos para el cerdo, como es el caso del PRRSv (causante del síndrome respiratorio y reproductivo porcino), la mayoría de patógenos que afectan este sistema son bien conocidos históricamente. Las enfermedades emergentes están en plena actualidad y gran cantidad de estudios están siendo realizados para intentar comprender y resolver los problemas de campo (Thacker Sin año, Aldaz 2002).

A pesar de que los patrones clínicos clásicos de las enfermedades respiratorias han cambiado con respecto a los reportados históricamente, Aldaz (2002) reportó que los agentes que se encuentran en el medio y afectan las poblaciones porcinas siguen siendo los mismos. Entre los agentes bacterianos más comúnmente relacionados con infección respiratoria se encuentran *Mycoplasma hiopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *bordetella bronchiseptica*, *pasterella multocida*, *salmonela cholerasuis*, *streptococcus suis*; entre los agentes virales se hallan, PRRS, circovirus, influenza porcina y el virus de Aujeszki, además, se encuentran neumonías parasitarias causadas por *Metastrongylus*, *Ascaris* y *Toxoplasma* (Taylor 1999, ICA, ACP y FNP 2000, Aldaz 2002). Comúnmente se encuentran asociados dos o más agentes dentro de un mismo proceso patológico, generando el llamado complejo respiratorio porcino.

Las enfermedades de tipo neumónico no se manifiestan en una granja como un problema individual, existiendo factores predisponentes y desencadenantes de los que dependerá su prevalencia y severidad. Muchos de esos factores relacionados con el mencionado complejo respiratorio son de origen multifactorial, siendo eventos estresantes aunados a agentes bacterianos, virales, parasitarios, alimenticios y de manejo, algunos de los más importantes; los cuales se encuentran asociados a un agente etiológico causante de un comportamiento patológico predominante (Taylor 1999).

En los animales en crecimiento hay mayor probabilidad de agudización de problemas sanitarios, debido a que los lechones son reagrupados y mezclados, son sometidos a diferentes niveles y fuentes de estrés, comenzando a perder su inmunidad pasiva, muchas veces resultando en casos de neumonía de dos a tres semanas después del destete (Taylor 1999, Aldaz 2002)

En ese periodo de transición ha comenzado a aumentar la incidencia de enfermedades como la producida por circovirus tipo II (PCV II), este agente tiene la capacidad de generar co-infecciones con otros agentes virales como influenza, parvovirus, PRRS; y bacterianos como *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* (Plonait y Bickhardt 2001, Caswell y Williams 2007). En el periodo postdestete la mortalidad de los cerdos aumenta cuando PCV II se encuentra asociado con *M. hyopneumoniae* e influenza porcina (Aldaz 2002).

Aunado a lo anterior, hay algunos agentes capaces de causar una respuesta sistémica sin importar su vía de ingreso; en el caso de las bacterias gram negativas, potenciales productoras de respuestas endotóxicas, usan al LPS para desencadenar una respuesta local o sistémica en el hospedero. Se estudiarán las características de esta molécula en general y más específicamente la que compone a *E. coli*.

5.5. Generalidades de LPS

El LPS es una molécula exclusiva de la lámina externa de la membrana externa de las bacterias gram negativas, a quien se le atribuye gran parte del potencial patogénico

de este tipo de bacterias; además puede interactuar directamente con el hospedero y se considera un potente activador de respuesta inmune innata (Dauphinee y Karsan 2006).

5.5.1. Estructura del LPS

Las bacterias gram negativas presentan una envoltura celular compuesta por una doble membrana, donde la membrana externa está formada por una bicapa lipídica, organizada de forma que su cara interna está compuesta por fosfolípidos, mientras que la cara externa está compuesta principalmente por moléculas de LPS (Llompart 2009).

El lipopolisacárido es un glicolípido complejo que está compuesto por varias regiones o dominios: un lípido A, un núcleo polisacárido y un antígeno O (Choi et al 1999, Caroff 2003, Llompart 2009).

El lípido A es una región hidrofóbica, es idéntica para todas las bacterias Gram-negativas y está formado por un disacárido (dos unidades de glucosamina). Este compuesto es el responsable de las propiedades fisiopatológicas de las endotoxinas y se encuentra unido covalentemente a un polisacárido hidrofílico, que es quien está compuesto por el núcleo y el antígeno O específico (Erridgea et al 2002, Llompart 2009).

El núcleo, también llamado oligosacárido medular, es la porción del polisacárido que protruye de la membrana externa, se divide en dos regiones principales, una externa denominada core externo, conformado por hexonas, que proveen adhesión al antígeno O y una región interna o core central formada por heptosas, con la cual se une al Lípido A. Finalmente el core se encarga de unir el antígeno O al lípido A (Erridgea y Poxton 2002).

El antígeno O, está conformado por un polisacárido repetitivo de unidades tri, tetra o pentasacáridas, que se proyecta hacia el exterior celular, es de carácter hidrofílico y constituye la porción inmunodominante de la molécula LPS (Caroff 2003).

5.5.2. Funciones del LPS en las bacterias

El LPS cumple una amplia variedad de funciones, es un componente esencial de la membrana externa de bacterias gram negativas, y que constituye su capacidad endotóxica. Su lípido A es responsable de la resistencia física a disolventes orgánicas y a moléculas antibióticas hidrofóbicas y proporciona estabilidad a la membrana externa (Erridge et al 2002).

El antígeno O es quien condiciona la virulencia de las bacterias gram negativas patógenas y se ha reportado quien confiere las propiedades necesarias para realizar una interacción hospedero – parásito (Choi et al 1999).

La administración de LPS de *E. coli* es un modelo apto y ampliamente empleado en el estudio de procesos infecciosos agudos, ya que tiene acciones reproducibles y carece de los efectos asociados a las infecciones crónicas y efectos adversos diferentes a los esperados.

5.5.3. Mecanismo de acción de LPS

El LPS es un agente causante de sepsis y reconocido por cualquier hospedero mamífero como una entidad patogénica importante. La administración de LPS de *E. coli* es uno de los modelos más empleados en estudios de procesos infecciosos agudos, ya que tiene acciones altamente reproducibles y carece de los efectos secundarios asociados a las infecciones crónicas. Una vez que se inicia la cascada de reacciones que conducen a un estado séptico, sobreviene una respuesta sistémica no regulada que puede progresar a fallo orgánico múltiple. El fallo orgánico múltiple inducido por la sepsis está asociado a una alta mortalidad en humanos y se caracteriza por severa disfunción pulmonar, cardiovascular, renal y gastrointestinal (Hewett y Roth 1993, Parra et al 2011, Ospina et al 2012).

Aunque las consecuencias de la exposición al LPS pueden variar bajo diversas condiciones, está claro que muchos de sus efectos adversos son dependientes de

mediadores endógenos generados por el hospedero en respuesta a la endotoxina. Una gran cantidad de mediadores han sido implicados incluyendo mediadores lipídicos como el ácido araquidónico y el factor de activación plaquetario, citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interferón gamma (IF-gamma), e Interleuquinas (ILs), y metabolitos de oxígeno reactivo, particularmente superóxido, óxido nítrico y sus derivados. Así mismo, factores derivados de los sistemas de coagulación y del complemento pueden contribuir al daño tisular bajo ciertas condiciones (Ulevitch et al 1990).

Tanto la inflamación aguda como la crónica tienen un papel central en la patogénesis de muchas enfermedades, tales como enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, entre otras (Waetzig et al 2002). El lugar y las características de la respuesta inflamatoria podrían ser diferentes en cada una de estas enfermedades y de los sistemas orgánicos, pero tienen en común la infiltración de leucocitos en el foco del daño tisular, y la activación de células inflamatorias y del sistema inmune (Ono y Han 2000).

La migración y activación de leucocitos es iniciada por el daño físico o una respuesta inmune local, o ambas, y requiere una serie coordinada de señales y de vías de señalización. Una de las muchas vías implicadas es la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógeno o MAPK (Herlaar y Brown 1999). Los mediadores liberados durante las enfermedades inflamatorias activan cascadas de señalización intracelulares reguladas por enzimas quinasas y fosfatasas, siendo la familia de las MAPK parte de tales cascadas, a las cuales convergen diversos estímulos extracelulares para iniciar respuestas biológicas en las células (Ono y Han 2000). En los mamíferos las MAPK desempeñan un papel central en la regulación de una variedad de respuestas inflamatorias, entre las que se encuentran la expresión de mediadores proinflamatorios como el TNF-alfa y las interleucinas (Herlaar y Brown 1999).

Las MAPK son un grupo de serina/treonina quinasas presentes en todas las células eucariotas y participan en múltiples procesos celulares (Waetzig et al 2002). Son activadas en respuesta a una gran variedad de estímulos y median señales de

transducción desde la superficie celular al núcleo. En combinación con algunas otras vías de transducción de señales, pueden alterar diferencialmente el estado de fosforilación de otras quinasas o proteínas nucleares tales como factores de transcripción situados en el citoplasma o en el núcleo (Waetzig et al 2002), esto puede conducir a un incremento o disminución en la expresión de ciertos genes que desencadenan una respuesta biológica (Herlaar y Brown 1999).

Un estudio realizado por Smirnova *et al* 2003, demostró por medio de investigaciones *in vitro* el efecto de LPS en los procesos moleculares en las células caliciformes humanas, determinando que el LPS estimula la expresión de mucinas y mRNA de citoquinas, como lo es interleucina 8 (IL 8), de manera dependiente del tiempo y de concentración. Estos autores sugirieron que la secreción de mucinas estimulada por LPS, puede ocurrir en parte gracias a la vía de IL 8.

5.6. Secreción de moco y mucinas

El moco es una secreción adherente y viscosa sintetizada por las células caliciformes en el epitelio cilíndrico que rodea todos los órganos que son expuestos a ambientes externos; estos incluyen el tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal, el tracto reproductivo y los tractos óculo-rino-laríngeo. Este moco tiene diferentes funciones de acuerdo a su localización, entre las que se encuentran lubricación, mantenimiento de la hidratación del epitelio, una barrera contra patógenos y sustancias nocivas; además como un gel permeable que contribuye con el intercambio de gases y nutrientes para el epitelio subyacente (Rama y Bradley 2006).

El moco está compuesto primordialmente de agua (aproximadamente 90%) pero también contiene sales, lípidos tales como ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol. Aunque contiene gran cantidad de proteínas, como son las lisozimas, inmunoglobulinas, defensinas, factores de crecimiento, entre otros, el principal componente que es responsable de su viscosidad y propiedades elásticas similares a un gel, son las mucinas (Rama y Bradley 2006, Pierre-Regis y Nadel 2008). Las mucinas son definidas como una amplia familia de glicoproteínas de alto peso molecular y altamente glicosiladas.

Históricamente se reconocieron las mucinas como sólo una parte estructural del moco, sin embargo, nuevos conocimientos relacionados con la biología molecular de las mucinas indica que algunas mucinas están adicionalmente involucradas en vías de señalización que llevan a la coordinación de respuestas celulares tales como proliferación celular, diferenciación, apoptosis y secreción de productos celulares especializados (Farzana 2011).

5.6.1. Estructura de las mucinas

La estructura básica de las mucinas se basa en la presencia de un dominio central polimórfico, el cual está compuesto de un variable número de motivos repetidos ricos en residuos de serina, treonina y prolina (Farzana 2011). El peso molecular de las mucinas es aproximadamente de 200 kD y están representadas como unidas a membrana o mucinas secretadas, ambas contienen carbohidratos en un 80% aproximadamente conformados por N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fructosa, galactosa, ácido N-acetilneuramínico o derivados del ácido siálico y algunas trazas de manosa. Además se pueden encontrar usualmente azúcares sulfatadas (Olof y Thomas 2010). Los oligosacáridos están organizados en cadenas moderadamente ramificadas con 2 a 15 monómeros ligados a la cadena de polipéptidos por medio de grupos hidroxilo en serina y treonina. En los extremos de la proteína hay presencia de regiones de aminoácidos que recuerdan proteínas globulares con relativamente poca glicosilación y altas cantidades de cisteína, las cuales demuestran similitudes composicionales con dominios del factor de Von Willebrand C y D y con el factores de crecimiento (Pierre-Regis y Nadel 2008, Olof y Thomas 2010).

5.6.2. Mecanismos de secreción de mucinas

La producción de mucinas está principalmente atribuida a las células caliciformes, que componen algunos epitelios, ante estímulos nocivos estas células se ven aumentadas en número (Farzana 2011). Los principales estímulos identificados y que pueden causar metaplasia de células caliciformes y sobre-regulación de producción de

mucinas en el tracto respiratorio, incluyen presencia de alérgenos, estrés oxidativo y actividad neutrofílica, humo (hidrocarburos, cigarrillo), heridas mecánicas en las vías aéreas, infecciones virales y bacterianas y moléculas como PAF (factor activador de plaquetas), elastasa y acroleína, entre otras (Pierre-Regis y Nadel 2008).

La red de sucesos regulatorios que media la respuesta de las células caliciformes a diferentes señales es pobremente definida. Se han reconocido dos escenarios que pueden estar relacionados. La microbiota propia del hospedero puede directamente afectar a dichas células a través de liberación local de factores bioactivos. Alternativamente, la función de las células caliciformes puede verse alterada en respuesta a factores bioactivos, generados por las células epiteliales o su lámina propia subyacente después de su contacto con otras bacterias (Deplancke y Gaskins 2012).

En el pulmón del humano adulto normal, se han identificado ocho genes asociados a la producción de mucinas, MUC1, 2, 4, 5A, 5B, 7, 8 y 13, que son expresados como mRNA. Usando hibridación *in situ*, el patrón de expresión normal de diferentes genes MUC son restringidos a tipos específicos de células en el epitelio del tracto respiratorio inferior y superior. MUC 1 y MUC4 están presentes en todas las células superficiales de las vías aéreas. MUC2 está presente en los niveles bajos de las vías respiratorias superficiales, MUC5AC se encuentra predominantemente expresada en las células caliciformes. MUC5B es expresada en las células mucosas de las glándulas submucosas. MUC7 se ha encontrado expresada en las células serosas de las glándulas submucosas (Voynow 2002, Degroote et al 2003).

Las mucinas además han sido clasificadas en dos subtipos; ácidas y neutras, el subtipo ácido se puede subdividir en mucinas sulfatadas (sulfomucinas) y no sulfatadas (sialomucinas). Las mucinas neutras son predominantemente expresadas en la mucosa gástrica. Las mucinas ácidas han sido reconocidas en el epitelio intestinal y predominan en el intestino grueso (Deplancke y Gaskins 2012). La relevancia fisiológica de los distintos subtipos de mucinas no es bien entendida, pero se ha creído que las mucinas ácidas protegen contra translocación bacteriana, debido

a que las mucinas sulfatadas parecen ser menos degradables por glicosilasas bacterianas y proteasas de bacterias del hospedero (Deplancke y Gaskins 2012).

5.6.3. Mucinas y agentes infecciosos

La naturaleza protectora de las mucinas radica en su capacidad de atrapar agentes patógenos. Se ha sugerido que la diversidad de los residuos de azúcares en las mucinas, está implicada en la unión a macromoléculas presentes en agentes bacterianos y virales; por lo tanto, se considera que tienen un papel en los mecanismos de defensa del organismo (Parillo *et al* 2009).

Deplanckem y Gaskins (2012) afirman que la composición de las comunidades bacterianas intestinales están fuertemente relacionadas con la distribución de las mucinas en el epitelio de ese órgano, además debido a que los patógenos son típicamente residentes del intestino, una estrategia defensiva consiste en la producción por parte del hospedero de epítopes de carbohidratos capaces de unirse a las adhesinas patógenas.

Smirnova *et al* (2003) demostraron que la exposición a diferentes concentraciones de LPS en 24 horas estimuló a las células caliciformes para la secreción de mucinas de manera directamente proporcional a la concentración de LPS inoculado, tanto por estímulo a MUC5AC como a MUC5AB. Además, encontraron que LPS estimula expresión de mRNA de IL 8.

En otro estudio realizado en ratas, donde se administró lipopolisacárido de *E. coli*, se encontró un incremento de las mucinas neutras en colon, lo que mejoró la adhesión a ellas de la bacteria, reflejando su habilidad para alterar la estructura química de las mucinas, probablemente para su propio beneficio (Deplancke y Gaskins 2012).

A nivel del tracto respiratorio, se encontró que la mucosa respiratoria de cerdos no infectados tenía una menor expresión de mucinas tanto secretadas como unidas a membrana, mientras que los que presentaban bronconeumonía inducida por *A.*

pleuropneumoniae incrementaron la expresión de MUC2, MUC5AB, MUC5AC y MUC4 (Chung et al 2012).

Por otra parte se ha demostrado que la acción de neutrófilos, específicamente su secreción de elastasa incrementa MUC4 y MUC5AC, en células epiteliales humanas (Park et al 2005, Voynow 2002). En el estudio realizado por Chung *et al* (2012), se encontró una fuerte inmuno-reactividad de mucinas detectadas en los bronquiolos y bronquiolos respiratorios, que poseían neutrófilos en su luz, mucho mayor que en los bronquiolos donde se encontró ausencia de neutrófilos, con lo que los autores sugirieron que la expresión de mucinas puede ser causada secundariamente por el efecto de los neutrófilos.

Se esperaría entonces que cualquier agente que tenga la capacidad de estimular la llegada de neutrófilos a la luz bronquiolar provoque un cambio en la composición de mucinas de manera secundaria.

Algunos autores expresan que la sobre-regulación de la expresión de mucinas por agentes infecciosos es benéfica para el hospedero. La producción de moco es un mecanismo adaptativo que funciona para proveer una barrera entre las células pulmonares y los patógenos bacterianos (McNamara y Basbaum 2001, Chung *et al* 2012,). La importancia clínica de las mucinas se estudiará en la siguiente sección.

5.6.4. Importancia clínica de las mucinas

La Infección bacteriana del tracto respiratorio es comúnmente asociada con hipersecreción de mucinas (Voynow 2002, Chung et al 2012). Bacterias y productos de la pared celular de las bacterias, tales como LPS pueden llevar a inflamación y sobre-regulación de genes relacionados con mucinas (Chung *et al* 2012).

Ejemplos bien conocidos de agentes patógenos que pueden tener efectos directos sobre la secreción de moco son entre otros *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el tracto respiratorio (Chung et al 2012), *Entamoeba histolytica* en el tracto gastrointestinal; toxina colérica de *Vibrio cholerae*, que activa el mecanismo

dependiente de cAMP, además se han realizado estudios con bacterias tanto gram positivas como gram negativas en los que se ha demostrado que hay sobre-regulación sobre genes MUC en células epiteliales, como lo son *Staphylococcus aureus* y *epidermidis*, *streptococcus pyogenes*, *pseudomona aeruginosa* y *escherichia coli* (Deplancke y Gaskins 2012).

Más específicamente se ha comprobado que LPS de bacterias gram negativas tiene la capacidad de inducir cambios morfológicos en células caliciformes y estimular su proliferación en diferentes mucosas tanto *in vitro*, en cultivos de células transicionales del epitelio de la vejiga urinaria, como *in vivo* en colon, oído medio y epitelio nasal (Smirnova *et al* 2003).

Hipersecreción crónica de moco ha sido también asociada en humanos con disminución en la función pulmonar y morbilidad en enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La producción de esputo asociada con obstrucción de moco juega un papel importante en la patogenia de fibrosis quística y asma severo y fatal, en el caso de la primera siempre acompañado de inflamación neutrofílica (Voynow 2002).

5.6.5. Identificación histoquímica de glucocomponentes

Para la identificación de glucocomponentes, se cuenta con una variedad de tinciones histoquímicas (Arias y Zuluaga 2010), las cuales también pueden ser usadas para determinar el subtipo de mucina expresada en los diferentes tejidos, de acuerdo a su clasificación en mucinas neutras y ácidas sulfatadas y no sulfatadas, la cual se planteó en secciones anteriores en la presente revisión.

Las mucinas neutras están constituidas por un azúcar y acetilglucosamina, que con frecuencia se hallan unidas a una proteína formando glicoproteínas o mucoproteínas. Estas sustancias son Periodic Acid Schiff (PAS) positivas. La técnica del PAS consiste en oxidar los tejidos mediante el ácido periódico para incrementar el número de carbonilos (aldehídos o cetonas) presentes en ellos, de forma que puedan ser demostrados posteriormente mediante el reactivo de Schiff, el cual al reaccionar con grupos aldehídicos contiguos rodeados por los correspondientes grupos OH, aparece

de nuevo el doble enlace (grupo cromóforo) y con él, la coloración rojo fucsia característica (García del Morral 1993, Prophet et al 1995).

Para el caso de las mucinas ácidas no sulfatadas, las cuales pueden contener ácido siálico en combinación con los grupos carboxilo, casi todas son lábiles frente a la neuraminidasa y resistentes a la acción de la hialuronidasa. Estos compuestos son positivos para tinción de PAS, reaccionan frente al Azul de Alcían a pH de 2.5, pueden ser coloreadas además con el método de hierro coloidal y son metacromáticos frente al azul de toluidina (García del Morral 1993, Lev y Spicer 1964).

Los mucopolisacáridos ácidos sulfatados contienen ésteres sulfatados y son resistentes a la acción de la hialuronidasa. Este grupo de glucopolisacáridos generalmente se muestran PAS negativos y reaccionan frente a azul de alcían a pH de 1, y es metacromático frente al azul de toluidina (García del Morral 1993).

El azul de alcían es un compuesto químico derivado del grupo de las ftalocianinas, las cuales tienen un átomo de cobre central en torno al cual se disponen rodeándolo, cuatro anillos aromáticos nitrogenados. En general todas estas sustancias son básicas y se ligan a los grupos ácidos de los mucopolisacáridos dando lugar a la formación de un compuesto salino entre ambos, principalmente cuando el nivel del pH es suficientemente ácido. Se ha comprobado que usando en condiciones de pH en torno a 2,4-2,6, el azul de alcían no sólo colorea los mucopolisacáridos ácidos sulfatados, sino también los grupos carboxílicos de los ácidos urónicos. Si por el contrario se emplea a un pH alrededor de 1, los grupos sulfatados siguen siendo fácilmente ionizables, mientras que los mucopolisacáridos ácidos no sulfatados pierden esa capacidad, de forma que únicamente se colorearán los sulfatados (García del Morral 1993, Scott 1982).

Por otra parte la técnica del hierro coloidal, consiste en ligar el compuesto (hierro férrico) a los mucopolisacáridos ácidos mediante un mecanismo de atracción electrostática, luego se realiza la técnica de azul de Perls para el revelado de los depósitos férricos (Gil Nam *et al* 2006).

6. CUERPO DEL TRABAJO

De la presente investigación se derivó un artículo para publicación que incluye los resultados finales del trabajo. A continuación se presenta dicho artículo:

Effect of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) on the distribution of mucins in the lungs of weaning piglets.

Muñoz, J.D.^{1,3}, Rodríguez, B.^{1,3}, Ramirez, M.C.^{1,3}, López, A.^{2,4}, Parra, J.E.^{2,4}

¹Professor, Faculty of Agricultural Sciences, Universidad de Antioquia. ² Professor, Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. ³Pathobiology Research Group QUIRON, Faculty of Agricultural Sciences, Universidad de Antioquia, Colombia. ⁴ Research Group BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

Abstract:

Introduction: Currently, little is known about the effect of lipopolysaccharides (LPS) derived from *E. coli* on the number of goblet cells and the type of mucins secreted in the airways of piglets. Likewise, the differential distribution of these mucins and their relationship with the development of respiratory infections in the post-weaning period is not well understood.

Objective: This study aimed to evaluate the effect of the oral intake of *E.coli* LPS on the mucins distribution and the number of leukocytes in the lungs of early weaned piglets. **Methods:** 52 piglets weaned at 21 days were used. Animals were fed a basal diet with four levels of LPS (0.0, 0.3, 0.5, and 1.0µg /mg feed) for 10 days. Pigs were sequentially slaughtered on days 1, 5, 7, and 10 after weaning. Lung samples were taken for histochemical stainings (H-E, Alcian blue pH 1.0, 2.5, and PAS) in order to determine the amount and type of leukocytes as well as the number of goblet cells and their type of mucins produced. Mucins were classified according to their biochemical structure as: acidic sulfated, non-sulfated, and neutral, all by computerized image analysis. The statistical design used was a randomized blocks in a 4x4 factorial arrangement (four experimental diets and four days post-weaning). **Results and discussion:** Results showed a decrease in the number of goblet cells and neutral mucins in both bronchi and bronchioles in the control piglets, followed by a recovery in day 10 post-weaning. In groups

with LPS such recovery was inhibited. In all study groups acidic mucins increased in bronchi on day five. There were no acidic mucins in their bronchioles. Moreover, the treatment with the higher concentration of LPS caused a decrease in the number of neutrophils on day 10 and had no effects on the amount of other leukocytes. **Conclusions:** LPS affects the recovery of goblet cells in the lung airway epithelium and decreases the number of neutrophils altering the innate immunity in early weaning. Consequently, it may facilitate the entry of pathogens and an allergen sensitization.

Keywords: goblet cells, histochemistry, swine, weaning.

Introduction

The swine industry has advanced in the development of enhanced genetic lines with better production rates and has standardized management protocols in which early weaning can fall between seven and 21 days of age (Gomez et al., 2008). The pig immune response can be negatively compromised due to stressful practices including abrupt nutritional alterations, housing modifications, and animal regrouping (Dunlop and Malbert, 2007). Consequently, these changes are associated with predisposition to gastrointestinal and respiratory diseases, evidenced by a decrease in weight gain (Plonait and Bickhardt, 2001; Pluske et al., 2006).

Early weaning causes a short period of fasting and a diminution of the beneficial lactobacilli populations, allowing an increase in the pathogenic enterobacteria populations, specially *E. coli*, causing the release of lipopolysaccharide (LPS) from their cell wall (Amador et al., 2007; Parra et al., 2011).

The LPS is a pathogenic compound that stimulates innate immunity and inflammatory response (Zhan et al, 2008). Some studies have shown that it can induce changes in the morphology of goblet cells and thus the expression of mucins in different epithelia (Smirnova et al., 2003; Hauber et al., 2007).

Mucins are highly glycosylated proteins, which forms a barrier that protects epithelial cells from noxious agents (Deplancke and Gaskins, 2001). Mucins are produced by goblet cells and are an important component of mucus (Farzana, 2011). According to their biochemical nature,

mucins can be classified as neutral and acidic, and at the same time acidic mucins can be sulfated and non-sulfated. The physiological application of the different subtypes of mucins is not well understood, but it is considered that acidic mucins, mainly sulfated, protects against bacterial translocation since they are less degradable by glycosylases and bacterial proteases (Deplancke and Gaskins, 2001; Machado-Neto et al., 2013).

The effects of *E. coli* LPS on the normal distribution of the different types of mucins in the lung of the post-weaned pig is currently unknown. Understanding the effect of LPS on mucins distribution is of great importance for the pathophysiology of respiratory diseases in the weaning period and also it can contribute in knowing the effects of management practices on these diseases.

The following study aims to evaluate the effect of weaning and *E. coli* LPS on mucins distribution in the lungs of weaning piglets and aims to provide a methodology for the study of cell populations in the lung.

Materials and Methods

Ethical considerations

All experimental procedures were conducted according to guidelines suggested by "The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" (CIOMS, 1985). The experimental procedures were approved by the Experimentation Ethics Committee for Animals of the Universidad Nacional de Colombia, Medellín (CEMED 001del January 26, 2009).

Location

Fieldwork was conducted in the San Pablo Experimental Unit, of the Universidad Nacional de Colombia, Medellín, located in the municipality of Ríonegro, at an altitude of 2100 meters above the sea level, with average temperatures between 12 and 18°C, corresponding to an area of very humid low montane forest (bmh-MB).

Type of study

Four experimental diets were evaluated: a control diet (basal diet), and three others containing LPS from *E. coli*, serotype 0111: B4 (Sigma- Aldrich, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), as follows:

1. Basal Diet (BD): without LPS.
2. Diet 1 (D1): BD plus 0.3 μ g of LPS/mg of feed.
3. Diet 2 (D2): BD plus 0.5 μ g of LPS/mg of feed.
4. Diet 3 (D3): BD plus 1.0 μ g of LPS/mg of feed.

Animals and diet

A total of 52 crossbred pigs (Duroc x Landrace) with an initial body weight of 6.5 ± 0.5 kg and an age of 21 days were used. Animals were randomly allotted in groups of eight with water *ad libitum* and with a controlled temperature of 26 ± 3 °C. The basal diet consisted of milk and milk by-products enriched with vitamins, minerals, and lysine HCL. Pigs were fed based on the NRC (2012) nutritional requirements. The experimental diets were fed during the first 10 days of weaning at a rate of 300g/day. During lactation no solid food was offered to the piglets.

Sampling

Throughout the experiment, animals were slaughtered sequentially, as follows: the first day (day of weaning, day 1), four piglets representing the reference or control group for all diets studied were sacrificed. On days 5, 7 and 10 post weaning four pigs from each diet were sacrificed, so a total of 52 pigs were used during the experimental phase. Sedation was performed by inhalation of carbon dioxide for three minutes with subsequent exsanguination. Pigs were placed in supine position, the chest cavity was exposed, and lung tissue was extracted by taking fragments of 1cm long and 0.5cm thick. The airways were clearly visible in the extracted tissue. Samples were preserved in 10% buffered formalin.

Histotechnical procedures

Samples were processed and analyzed in the Laboratory of Animal Pathology at the Universidad de Antioquia. Tissues were paraffin-embedded by standard techniques and sliced to 4 μ m thick cuts. Four glass microscope slides of each sample were mounted for histochemical staining with Hematoxylin-eosin (H-E) for goblet and white blood cell count (neutrophils, macrophages, lymphocytes, eosinophils, plasma cells, and globular leukocytes); Alcian Blue pH 2.5 was used for identification of acid mucins; Alcian blue pH 1.0 for the identification of

sulfated acidic-mucins; finally, PAS staining was used to identify neutral mucins; according to the method by Armed Forces Institute of Pathology (AFIP, 1994).

Microscopic evaluation and morphometric analysis of images

For quantitative evaluation of histological sections an optical microscope Leica DMLB (Meyer Instruments, Houston, TX, USA) was used, then the corresponding images were captured using a digital camera for instant Leica EC3 microscopy (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland). Images were analyzed with the image processing software ZEN (blue edition, Carl Zeiss, 2011). The procedure was performed as follows: For leukocytes identification and counting per mm² with the H-E stain, three assessments by slide were carried with a 1000X magnification evaluating a total area of 90mm². For goblet cells and mucins analysis a contour was performed, using the program Zen® 2011, of three bronchial and three bronchioles epithelium per slide. Goblet cell counting (cells/mm²) was performed on slides stained with H-E. Identification of mucins was done with the previously described histochemical staining procedure. A total area of 6mm² for bronchial and bronchiole epithelium was analyzed. Margins were determined by the apical and basal limits of these structures.

Statistical analysis

The experiment was conducted as a randomized block design in a 4x4 factorial arrangement (four experimental diets and four periods after weaning) (Steel and Torrie, 1985). Each animal was assigned one of 16 treatments, and each treatment had four replicates. Experimental data was analyzed by a multivariate general linear model with the statistical program SPSS® (version 19, 2010). Duncan test was used to compare treatment means (p<0.05).

Results

Pigs fed the basal diet showed good health, whereas those receiving LPS showed sporadic increases in rectal temperature (above 38 °C). However, animals did not show severe clinical manifestations that would force their exclusion from the study. No diet rejection was observed during the experiment. In order to determine the effect of early weaning on each of the variables, and to define a baseline to compare with data obtained from animals with LPS, a comparison between the different days of animals consuming the basal diet (BD) was conducted. In day “zero” a baseline leukocyte population was found. The number of neutrophils increased to day seven and decreased (p<0.05) at day 10 post-weaning. Macrophages significantly increased

($P < 0.05$) at day five compared to the weaning day. There was absence of plasma cells in all evaluated slides. Also lymphocytes, eosinophils, and globular leukocytes counts were not significantly different ($p > 0.05$) between the evaluated groups (Table 1).

Table 1. Number of leukocytes in the post-weaning period in pigs fed the basal diet (weaning effect)

Variable	Post-weaning period (cells/mm ²)				
	Day 1	Day 5	Day 7	Day 10	SEM
Neu	0.345 ^a	0.365 ^a	0.425 ^a	0.275 ^b	0.016
Macro	1.725 ^a	2.028 ^b	1.633 ^a	1.368 ^a	0.066
Linf	0.175	0	0.158	0.425	0.135
Eos	0.008	0	0.008	0.018	0.005
Leucglob	0.255	0	0	0	0.063

Neu: neutrophils; Macro: macrophages; Linf: lymphocytes; Eos: eosinophils; leucglob: globular leukocytes.

^{abc} Means with a different super index within the same row are statistically significant differences ($p < 0.05$).

SEM: Standard Error of the Means.

In animals treated with LPS, the number of neutrophils showed a similar behavior to the basal diet but with a greater decrease ($P < 0.05$) at day 10. Other leukocytes did not show a significant difference ($P > 0.05$) compared to the basal diet (Table 2). Animals on D3 showed the major decrease in the number of neutrophils ($P < 0.05$) (Table 3). No statistical interaction was observed between the LPS concentrations and postweaning periods for any of the studied variables. Therefore, it was not necessary to analyze or break down said factors independently.

Table 2. Effect *E.coli* LPS on the number of leukocytes at different post-weaning periods.

Variable	Weaning period (cells/mm ²)				
	Day 1	Day 5	Day 7	Day 10	SEM
Neu	0.335 ^a	0.365 ^a	0.440 ^a	0.288 ^b	0.0419
Macro	1.715 ^a	2.023 ^b	1.900 ^b	1.536 ^a	0.0386
Linf	0.043	0	0.056	0.087	0.0077
Eos	0.002	0.002	0.010	0.008	0.0052
Leucglob	0.002	0.066	0.188	0.333	0.0642

Neu: neutrophils; Macro: macrophages; Linf: lymphocytes; Eos: eosinophils; leucglob: globular leukocytes.

^{abc} Means with a different super index within the same row are statistically significant differences ($p > 0.05$).

SEM: Standard Error of the Means.

Table 3. Effect of *E. coli* LPS dose on the number of leukocytes at different post-weaning periods.

Variable	Diets with LPS (cells/mm ²)				SEM
	BD	D1	D2	D3	
Neu	0.335 ^a	0.360 ^a	0.414 ^a	0,128 ^b	0.0149
Macro	1.710	1.900	1.836	1.8367	0.0385
Linf	0.043	0.075	0.043	0.0250	0.0078
Eos	0.002	-	0.003	0.0217	0.0024
Leucglob	0.002	0.182	0.167	0.2167	0.0642

Neu: neutrophils; Macro: macrophages; Linf: lymphocytes; Eos: eosinophils; leucglob: globular leukocytes.

^{abc} Means with a different super index within the same row are statistically significant differences ($p < 0.05$).

SEM: Standard Error of the Means.

In animals fed only the BD, a significant decrease ($P < 0.05$) was observed in the number of goblet cells on days five and seven, while on day 10 reached similar values to the baseline levels (Figure 1). With the different doses of LPS, the behavior was similar to the basal diet until day seven, however by day 10 values decreased significantly compared to day one ($P < 0.05$).

Both in the bronchus and in the bronchioles, all doses of LPS caused a significant decrease ($P < 0.05$) in the number of goblet cells compared to the group of control animals (Figure 2), except for the diet 2 in the bronchus ($P > 0.05$).

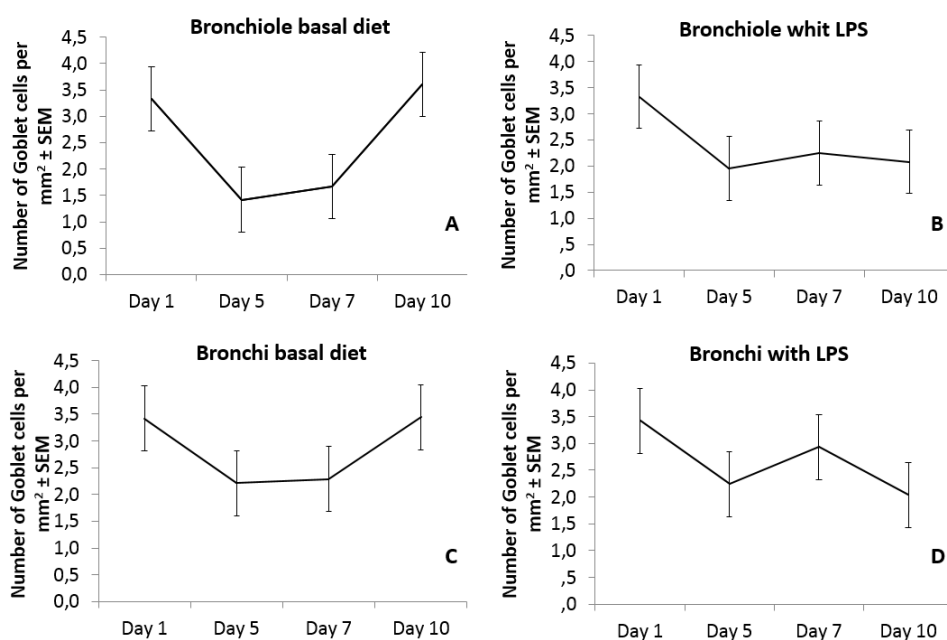


Figure 1. Effect of diets on the average number of goblet cells (GC). (A) Basal diet on bronchiole: GC average decreased on days five and seven, followed by an increase in day 10. (B) Diet with LPS in bronchiole: GC average did not increased in day 10. (C) Basal diet on bronchus: showed a similar behavior as BD on bronchiole. (D) Diet with LPS in bronchus: GC average did not increased in day 10 (SEM: standar error of the means).

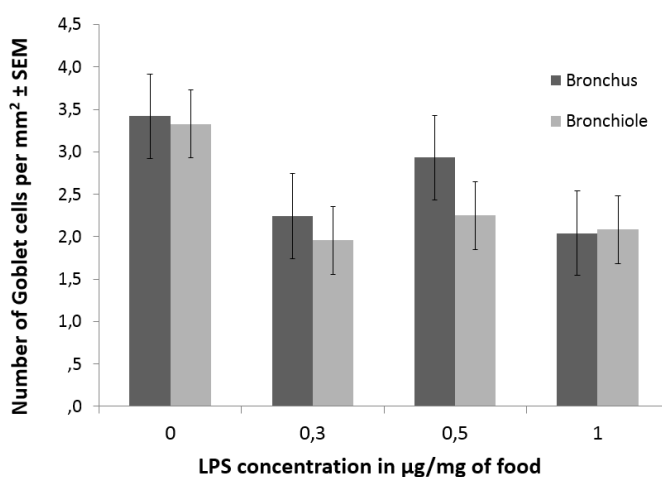


Figure 2 Decreases in the number of goblet cells with different concentrations of LPS. In the bronchiole significant decrease was observed in all doses compared with the basal diet. In the bronchus there was no significant reduction with dose 2.

In the bronchioles of all study units no goblet cells were observed expressing acidic mucins, this means that were not positive for Alcian Blue staining. Bronchioles were only positive for

PAS staining (neutral mucins). Neutral mucins count in the BD had no significant differences until day seven, but increased by day 10 ($p < 0.05$). In contrast, the different doses of LPS showed no increase at day 10 and no differences were found between any of the remaining days (Table 3). When comparing between LPS treatments, no statistically differences ($p > 0.05$) were found.

Table 4. Effect of LPS on the expression of different types of mucins in post-weaning piglets (cells/mm²).

Variable	Post-weaning period (basal diet)				
	Day 1	Day 5	Day 7	Day 10	SEM
NM BI	5.52 ^a	5.49 ^a	4.37 ^a	7.55 ^b	0.35
NM Br	4.75 ^a	4.61 ^a	3.87 ^a	6.33 ^b	0.26
AM	2.58 ^a	6.0 ^b	4.33 ^c	4.44 ^c	0.30
ASM	2.66 ^a	4.89 ^b	3.54 ^a	3.55 ^a	0.21
Variable	Diets with LPS				
	Day 1	Day 5	Day 7	Day 10	SEM
MN BI	5.52 ^a	5.40 ^a	4.46 ^b	5.44 ^a	0.162
MN Br	4.75 ^a	5.06 ^a	3.51 ^b	3.14 ^b	0.185
AM	2.58 ^a	4.58 ^b	2.95 ^a	3.86 ^{ab}	0.171
ASM	2.66	3.51	2.75	3.34	0.214

NM BI: Bronchiole neutral mucins; NM Br: bronchial neutral mucins; AM: Acidic Mucins; ASM: acidic-sulfated mucins.

^{abc} Means with a different super index within the same row are statistically significant differences ($p > 0.05$).

SEM: Standard Error of the Means.

The bronchi were positive for all types of evaluated mucins. The number of neutral mucins (positive for PAS) in the BD showed a similar behavior to the bronchiole, in contrast, diets with LPS showed a significant decrease ($p < 0.05$) on day 10 compared to day one (table 3).

BASAL DIET (BD)

DIET 2 (0,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$)

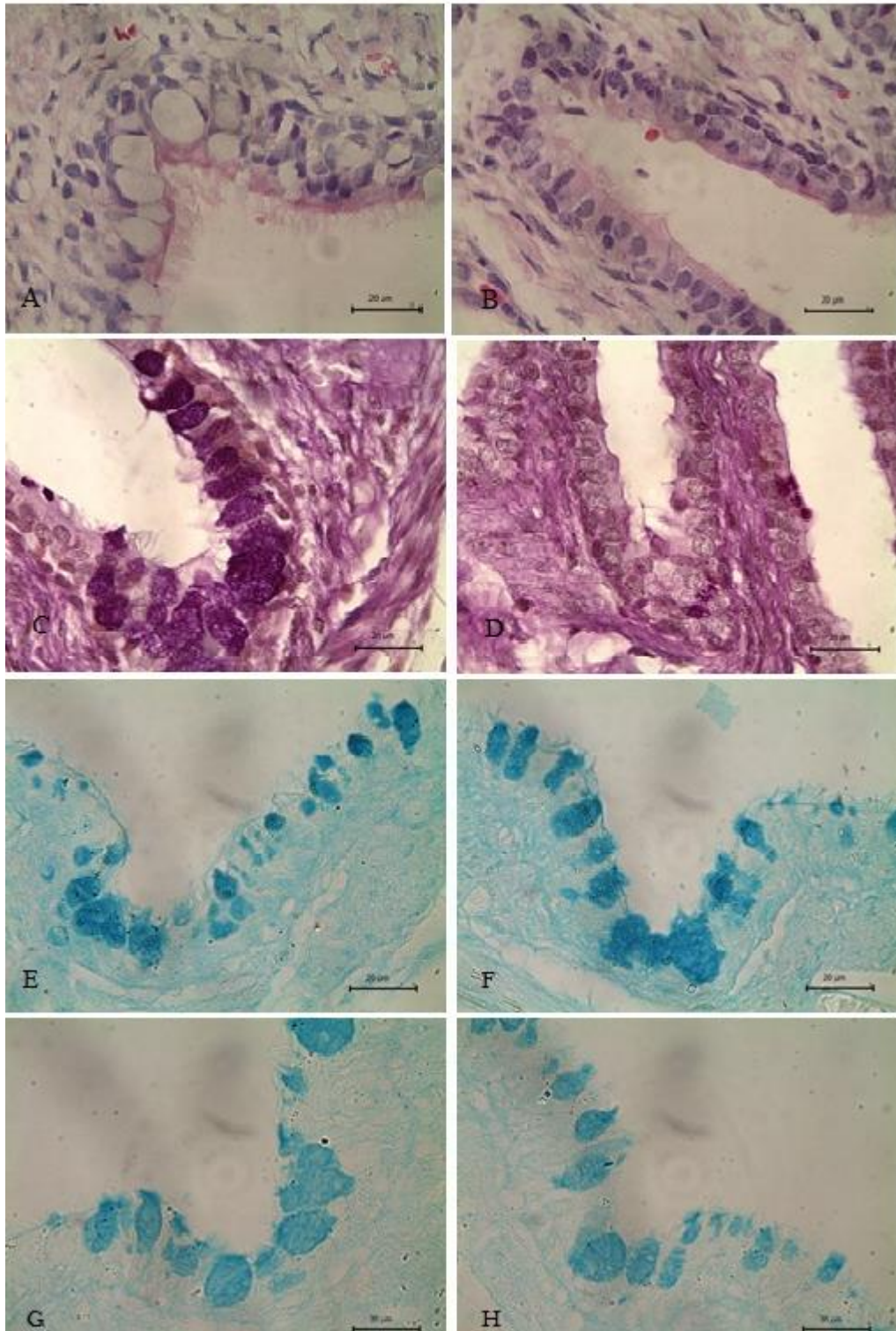


Figure 2. Histochemical stainings in bronchi of control pigs (Basal Diet) and treated with D2 (0.5 μg LPS/mg). A decrease in the number of GC with H-E (B) and PAS (D) staining's at day 10 was observed in LPS-treated animals compared to control animals (A and C). There was no difference between the number of goblet cells expressing acidic mucins (A.A 2.5 and A.A 1.0) between the control animals (E and G) and LPS-treated animals (F and H).

In the basal diet (weaning effect), acidic mucins stained with A.A 2.5 showed a significant increase at day five ($p < 0.05$), with a subsequent decrease for days seven and 10 post-weaning ($p < 0.05$). Acidic-sulfated mucins (positive for A.A 1.0) showed a similar behavior to the acidic mucins (positive for A.A 2.5); however, no significant differences ($p > 0.05$) were found for days seven and 10 compared to day one.

With the different LPS treatments, goblet cells stained with both AA 2.5 and AA 1.0, had a similar behavior compare to the basal diet, with an overall decrease in cells number, but without significant differences ($p > 0.05$).

Discussion

This study shows that *E. coli* LPS, after early weaning, affects the recovery of goblet cells in airway epithelium and the number of neutrophils in the interstitium of the lung.

In terms of leukocyte response, it was observed that during weaning there is a resident population of leukocytes in the lung interstitium (granulocytes), lymphocytes appeared and increased over time, whereas plasma cells were not observed in the evaluated period. Time of exposure of LPS caused a gradual decrease in the number of neutrophils in the lung interstitium. These findings are similar to those found by Kandasamy et al. (2012), who demonstrated that after intravenously and aerogenous administration of LPS in pigs, the sequestration of neutrophils in the intravascular space of the lung increased. This is due because LPS alters homing receptors expression and vascular addressins such as P-selectin and the ICAM 1 (Basit et al., 2006; Kathirvel et al., 2012). Additionally, other reports suggest that leukocyte retention is jgreater in the interior of the capillary of the pigs' lung due to its little deformability (Doerschuk, 2001).

Moreover, it has been proposed that a sustained exposure to LPS can decrease the expression of some cytokines such as Il 1B and Il 8 (Yi-Hong et al., 2012), thereby inhibiting chemotactic stimuli and depressing the antimicrobial effect of neutrophils and macrophages. This phenomenon and the effect of pre-exposure to LPS, which reduces sensitivity to subsequent challenges, have been termed LPS tolerance (Cagiola et al., 2006). Some human and murine studies have associated LPS tolerance with a marked imbalance in the production of inflammatory mediators derived from leukocytes. It has been reported that deregulation of

TNF α and a reduced expression of the Toll Like Receptor 4 (TLR4) in the cell membrane are the characteristics of the LPS tolerance (Cavaillon et al., 2003; Cagiola et al., 2006).

The gradually appearance of lymphocytes and the absence of plasma cells during the study suggests that an adaptive immune response has not been established in tissue. It also suggests that the effects of LPS in the post-weaning period are given exclusively by stimulation and alteration of the innate immune responses.

Furthermore, early weaning also caused a decrease on the number of goblet cells in the airways of control animals, in which a recovery in the last period was seen. Goblet cells stained with H-E behave similar to the goblet cells expressing neutral mucins (PAS). In both cases the LPS showed an inhibitory effect on the recovery of the number of goblet cells producing neutral mucins. LPS caused no variations on the acidic mucins in control animals.

Some authors have reported that both LPS and early weaning have negative effects on intestinal epithelial cells, causing damage to the intercellular junctions and allowing the passage of harmful agents through the epithelial barrier (Parra et al., 2011). Moreover, this effect is enhanced when the two factors (LPS and weaning) act in combination (Hoang et al., 2010; Dänicke et al., 2013). Even though the effect of LPS on non-digestive organs epithelium cells is not determined, the present study showed a marked decrease in the number of goblet cells in the respiratory epithelium after early weaning. The pathogenic mechanisms by which occurs this diminution on goblet cells are not well understood, but it is suggested that the early weaned animals can suffer the effects from the LPS that enters via systemic and airborne ways (Dänicke et al., 2013) and also that LPS may induce apoptotic activation pathways in some cells (Ansari et al., 2011; Dholakiya and Benzeroual, 2011); however, the specific effects on the goblet cells are to be determined.

Goblet cells have a fundamental role in innate defense, they are responsible for mucus and mucins production which is a protection against biological, enzymatic, chemical, and mechanical hazards of the respiratory tract (Smirnova et al., 2003; Pierre-Regis and Nadel, 2008). Also, goblet cells produce proteins of the trefoil factor family that promotes epithelialization and epithelial renewal after erosion (Brown et al., 2007). Therefore, a decrease

of goblet cells in the post-weaning period in conjunction with the negative effects of LPS in the recovery of cell number, could indirectly affect epithelial renewal against damage.

A profound description of the genes that are expressed in the respiratory mucosa and are involved in mucins production has been made (Degroote et al., 2003; Pierre-Regis and Nadel, 2008). But a description of the distribution according to their biochemical nature has not been yet well defined, considering that it varies according to posttranslational changes (Olof and Thomas, 2010). However, some reports suggest that LPS up-regulates the expression of genes associated with mucins in goblet cells (Smirnova et al., 2003). In the present study it was observed that LPS had an effect on the diminution in the number of goblet cells and the expression of neutral mucins. Similarly, there are reports suggesting that the action of bacteria, both gram positive and gram negative, up-regulate mucins production in the human respiratory tract (McNamara and Basbaum, 2001), but there is not clear information on its biochemical nature. Studies by Lo-Giudice et al. (1997) and Degroote et al. (2003) demonstrated that the predominant mucins in patients with chronic bronchitis and bacterial infections were acidic sulfates. However, these studies analyzed the material exuded from the patient and were not a histopathological study. These findings suggested that after bacterial infection sulfated acidic-mucins are stimulated; this is consistent with reports founds in the gastrointestinal tract (Deplancke and Gaskins, 2001).

In a study conducted by coworkers, they evaluated the effect of weaning and different diets containing *E. coli* LPS on pigs intestines. They observed that there was a decrease in acidic mucin-producing cells during the weaning period and an increase, in similar proportions, of neutral mucins. These effects were enhanced by the effect of LPS (Zapata et al., 2013, forthcoming). Deplancke and Gaskins (2001), suggested that the radius of neutral to acidic mucins in the intestine, generally increases between birth and weaning and decreases thereafter. Our findings show that after early weaning there is a decreasing tendency of goblet cells expressing neutral mucins, but in day 10 there is a significant increase, which could explain that neutral-mucins may have a different behavior in the respiratory tract compared to the intestinal tract during weaning period. However, it is necessary to perform additional studies to describe the normal distribution of the different types of mucins in the respiratory tract of the pigs.

The results of this study and the mechanisms mentioned in this discussion suggest that *E. coli* LPS reduces the innate immune response in the airways and may favor pathogen infection and allergen sensitization. Additionally, it is suggested that early weaning itself can generate this effect and that the presence of LPS have synergistic effects on the response.

Acknowledgments

Authors are thanks the technical group of the pathology laboratory of the University of Antioquia, especially the bacteriologist and histotechnologist Idalba Morales Uribe.

References

AFIP, Armed Forces Institute of pathology. «Laboratory Methods in histotechnology.» American Registry of Pathology, 1994: p279.

Aldaz, Á. «Enfermedades respiratorias del cerdo: algunos aspectos prácticos a considerar en el diagnóstico y control para la resolución de casos clínicos.» Anaporc, 2002.

Amador, P., García-Herrera, J., Marca, M.C., Osada, de la J., Acín, S., Navarro, M.A. «Intestinal d-galactose transport in an endotoxemia model in the rabbit.» J Membr Biol., 2007: 125-133.

Ansari, N., Khodagholi, F., Amini, M. and Shaerzadeh, F. "Attenuation of LPS-induced apoptosis in NGF-differentiated PC12 cells via NF-kB pathway and regulation of cellular redox status by an oxazine derivative." Biochimie, 2011: 899-908.

Basit, A., Reutershan, J, Morris, M.A, Solga, M, Rose, C.E and Ley, K. «ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space. .» Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 2006: 291, L200–L207.

Blecha, F., Pollmann, D.S., Nichols D. A. «Weaning Pigs at an Early Age Decreases cellular immunity.» J. Anim. Sci., 1983: 395-393

Brown, C., Baker, D. and I Brker, I. «Alimentary system.» En Pathology of Domestic Animals, de G Maxie, 2, 68-69. Philadelphia: Elsevier, 2007.

Brown, D.C., Maxwell, C.V., Erf, G. F., Davis, M.E., Singh, S., Johnson, Z.B. «The influence of different management systems and age on intestinal morphology, immune cell numbers and mucin production from goblet cells in post-weaning pigs.» Veterinary Immunol. Immunopathol., 2006: 187–198.

Cagiola, M., Severi, G., Menichelli, M., Forti, K., Petrucci, P., Agostino, M., Pasquali, P., «In vitro down regulation of proinflammatory cytokines induced by LPS tolerance in pig CD14+ cells.» Vet. Immunol. Immunopathol, 2006: 316–320.

Caswell, J., Williams, K. «Respiratory Sistem.» En Pathology of Domestic Animals, de Grant Maxie, 523-655. Philadelphia: Saunders, 2007.

Cavaillon, J.M., Adrie, C., Fitting, C., Adib-Conquy, M.A. «Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance?» J. Endotox. Res., 2003: 101–107.

Chung Hyum Kim, Yeonsu Oh, Kiwon Han, Hwi Won Seo, Duyeol Kim, Ikjae Kang, Changhoon Park, Ki Young Jang, Sung-Hoon Kim, Chanhee Chae«Expression of secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6) and membrane-bound mucin (MUC4) in the lungs of pigs experimentally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae.» Research in Veterinary Science., 2012: 486–491.

Choi, J, Klinkspoor, J.H., Yoshida, T., Lee, S.P. «Lipopolysaccharide from Escherichia coli stimulates mucin secretion by cultured dog gallbladder epithelial cells.» Hepatology, 1999: 29: 1352–1357.

Dauphinee, M.S., Karsan, A. «Lipopolysaccharide signaling in endothelial.Cells.» Lab. Invest., 2006: 86: 9–22.

Degroote, S., Maes, E., Pascale, H., Delmotte, P., Lamblin, G., Roussel, P. «Sulfated oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a secretor patient suffering from chronic bronchitis.» *Biochimie*, 2003: 369-379.

Deplancke, B., Gaskins, H.R. «Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer.» *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001: 1131-1141.

Dholakiya, S., Benzeroual, K. "Protective effect of diosmin on LPS-induced apoptosis in PC12 cells and inhibition of TNF- α expression." *Toxicol. In Vitro*, 2011: 1039–1044.

Doerschuk, C.M. «Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs.» *Microcirc Endothelium Lymphatics*, 2001: 8, 71–88.

Dunlop, R., Malbert C.H.. *Fisiopatología Veterinaria*. Minnessota: Acribia Ed, 2007.

Dänicke, S., Brosig, B., Kersten, S., Kluess, J., Kahlert, S., Panther, P., Diesing, A.K., Rothkötter H.J. «The Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) modulates the LPS induced acute phase reaction in pigs.» *Toxicol Lett.*, 2013: 172– 180.

Farzana, M. «Recent advances in mucin immunohistochemistry in salivary gland tumors and head and neck squamous cell carcinoma.» *Oral Oncology*, 2011: 797–803.

Gomez, A.S., Vergara, D., Argote, F. «Effect of diet and age of weaning on piglet digestive physiology. .» *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agronindustrial.*, 2008: 6:32-41.

Hauber, H.P., Goldmann, T., Vollmer, E., Wollenberg, B., Hung. H.L., Levitt, R.C., Zabel, P. «LPS-induced mucin expression in human sinus mucosa can be attenuated by hCLCA inhibitors.» *J. Endotoxin. Res.*, 2007: 2 109-116.

Hoang, V.C., Williams, M.A., Simpson H.V. "Effects of weaning and infection with *Teladorsagia circumcincta* on mucin carbohydrate profiles of early weaned lambs." *Vet. Parasitol.*, 2010: 354–360.

Kenworthy, R. «Observations on the effects of weaning in the young pig. Clinical and histopathological studies of intestinal function and morphology.» *Res. Vet. Sc.*, 1976: 69-75.

Kandasamy, K., Sahu, G., Parthasarathi, K. «Real-time imaging reveals endothelium-mediated leukocyte retention in LPS-treated lung microvessels.» *Microvasc. Res.*, 2012: 323–331.

Lo-Guidice J.M., Herz H., Lamblin, G., Plancke, Y., Roussel P., Lhermitte M. «Structures of sulfated oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor patient suffering from chronic bronchitis.» *Glycoconj J.* 1997 Jan;14 (1):113-25.

Machado-Neto, R., Pontin M.C.F., Nordi, W.M., Lima, A.L., Moretti, D.B. «Goblet cell mucin distribution in the small intestine of new born goat kids fed lyophilized bovine colostrum.» *LivestockScience*157, 2013: 125–131.

McNamara, N., Basbaum, C. «Signaling networks controlling mucin production in response to Gram-positive and Gram-negative bacteria.» *Glycoconj J.* 2001 Sep;18(9):715-22.

Mejía-Medina, J., Rincón-Ruiz, J., Gutiérrez-Vergara, C., Correa-Londoño, G., «Valoración de parámetros clínicos y lesiones en órganos de cerdos durante el período posdestete.» *Acta Agronómica*, 2011: 61-68.

Olof, S., y Arnebrant T. «Mucin layers and multilayers — Physicochemical properties and applications.» *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010: 395–405.

Ospina, D., Rodríguez, B., López, A., Parra, J. «Efecto de la inflamación causada por el Lipopolisacarido (LPS) de *E. coli* sobre la morfología y actividad enzimática de las vellosidades en lechones recién destetados.» *PANVET*, 2012.

Parra, J., Agudelo, J., Ramírez, M.C., Ortiz, L., Rodríguez, B., López, A. «Lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* has detrimental effects on the intestinal morphology of weaned pigs.» *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 2011: 598-608.

Pierre-Regis, B., Nadel, J.A. «Mucus and Mucin-Secreting.» En *Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, de Barnes, P., Drazen, J.M., Rennard, S.I, Neil C. Thomson, N.C., 153-187. Omaha, USA: Alpha, 2008.

Plonait, Hans, y Klaus Bickhardt. *Manual de las Enfermedades del Cerdo*. Segunda Edición. Zaragoza: Acribia, 2001.

Pluske, J. R., Le Dividich, J., Verstegen, M. *El destete en el ganado porcino*. Zaragoza: España, 2006.

Reis de Souza, T.C., Guerrero, C.M.J., Aguilera, B.A., Mariscal, LG. «Efecto de diferentes cereales sobre la morfología intestinal de lechones recién destetados.» *Téc Pecu Mex*, 2005: 309-321.

Smirnova, M.G., Guo, L., Birchall, J.P., Pearson, J.P. «LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells.» *Cell Immunol*. 2003 Jan;221(1):42-9.

Touchette, K.J., Carroll, J.A., Allee, G.L., Matteri, R.L., Dyer, C.J., Beausang, L.A., Zannelli, ME. «Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: Effects on the immune axis of weaned pigs.» *J Anim Sci*. 2002 Feb;80(2):494-501.

Voynow, J. «What does Mucin have to do with lung disease.» *Pediatric respiratory reviews*, 2002: 98-103.

Wu Y.H., Chuang S.Y., Hong W.C., Lai Y.J., Chang Y.L., Pang, J.H. «In vivo and in vitro inhibitory effects of a traditional Chinese formulation on LPS-stimulated leukocyte–endothelial cell adhesion and VCAM-1 gene expression.» *J Ethnopharmacol*. 2012 Mar 6;140(1):55-63.

Supplementation

Zhan, Z., Ou, D., Piao, X., Kim, S.W., Liu, Y., Wang, J. «Dietary Arginine Affects Microvascular Development in the Small Intestine of Early-Weaned.» *J Nutr*. 2008 Jul;138(7):1304-9.

Zuluaga, C.A., Ortiz, L. Rodríguez, B. Ramirez, M.C. López, A., Parra, J. «Alteraciones histopatológicas multiorgánicas en lechones postdestetos causadas por LPS de Escherichia coli.» Enicip, 2010.

7. CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo se realizó una descripción del número de células caliciformes y la distribución de los diferentes tipos de mucinas con respecto a su clasificación bioquímica en las vías respiratorias de pulmones de cerdos tras realizar un destete precoz, estos conocimientos sirven como base para nuevos estudios con miras a describir la distribución de mucinas y el número de células caliciformes durante todo el ciclo productivo del cerdo. Esta información es relevante para diseñar estrategias de diagnóstico, prevención y control de las enfermedades respiratorias porcinas.

Adicionalmente se encontró que LPS tiene un efecto deletéreo sobre la inmunidad innata, representada en la disminución del número de células caliciformes en las vías respiratorias y de Neutrófilos en el parénquima pulmonar, esto significa una deficiencia en la respuesta protectora en el pulmón contra diferentes noxas. Lo anterior justifica diseñar de pautas de bioseguridad y de manejo que permitan mantener el equilibrio de las mucinas en el tracto respiratorio de los cerdos con el propósito de disminuir las enfermedades de este sistema orgánico, en el periodo postdestete.

Nuestros resultados sugieren que el mecanismo por el cual LPS disminuye el número de células caliciformes es la activación de vías apoptóticas, como sucede en otras células y tejidos. Las vías por las cuales se da este proceso aún no están bien entendidas, lo que resalta la necesidad de futuras investigaciones al respecto.

Los resultados de este estudio evidencian efectos negativos del destete precoz sobre el tracto respiratorio, que son intensificados con la exposición a LPS. Esto contradice lo expuesto por algunos autores, que consideran el destete precoz como un manejo zootécnico beneficioso desde el punto de vista sanitario y productivo..

Adicionalmente los resultados antes mencionados pueden motivar la realización nuevos estudios con el fin de complementar los conocimientos sobre la fisiopatología de los cuadros digestivos y respiratorios en el periodo postdestete y su relación con el

LPS de *E.coli*. Algunos de esos estudios pueden ser la evaluación de los niveles de LPS en sangre en relación con el número de células caliciformes y de leucocitos en el pulmón; la medición de inmunoglobulinas asociadas a la mucosa y la medición de las citoquinas expresadas en el pulmón; entre otros trabajos.

En el presente estudio se implementó un modelo animal in vivo y técnicas histoquímicas para estudiar algunos aspectos de la fisiopatología de las enfermedades respiratorias en el destete precoz en los cerdos y su asociación con LPS *E. coli*. Este modelo podrá utilizarse posteriormente para evaluar esquemas de manejo y estrategias terapéuticas que beneficien al sector porcícola en lo referente a mejorar los estándares sanitarios y productivos.

Este modelo fue adecuado para caracterizar poblaciones de células caliciformes en las vías respiratorias del pulmón, adicionalmente permitió evaluar la positividad de estas células a las diferentes técnicas histoquímicas. El modelo podrá adaptarse en nuevas investigaciones para caracterizar las poblaciones de células caliciformes en las vías respiratorias del cerdo y otras especies.

8. BIBLIOGRAFÍA

AFIP, Armed Forces Institute of pathology. "Laboratory Methods in histotechnology." *American Registry of Pathology*, 1994: p279.

Aldaz, Álvaro. "Enfermedades respiratorias del cerdo: algunos aspectos prácticos a considerar en el diagnóstico y control para la resolución de casos clínicos." *Asociación Nacional de Porcicultura Científica* 2002.

Arias, M. P, y D. A. Zuluaga. «Evaluación histoquímica preliminar para determinar la presencia de algunos glucocomponentes de la mucosa de las bolsas gutrales de los equinos.» *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2010: 37-43.

Amador, P, J García-Herrera, MC Marca, J de la Osada, S Acín, and MA Navarro. "Intestinal d-galactose transport in an endotoxemia model in the rabbit." *Journal Membrane Biology*, 2007: 125-133.

Blecha, F. Pollmann, D.S and Nichols D. A. "Weaning Pigs at an Early Age Decreases cellular immunity." *Journal of Animal Science*, 1983: 395-393.

Brown, D.C. Maxwell, C.V. Erf, G.F. Davis, M.E. Singh, S. Johnson, ZB. "The influence of different management systems and age on intestinal morphology, immune cell numbers and mucin production from goblet cells in post-weaning pigs." *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006: 187–198.

Burgel, Pierre-Regis and Jay A. Nadel. "Mucus and Mucin-Secreting." In *Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2006.

Campabada, I CM. Navarro, H. " Manejo y alimentación del lechón pre y posdestete." *Asociación Americana de Soya. A.N.*, 1994: 21- 92.

Caroff, M. Karibian, D. "Structure of bacterial lipopolysaccharides." *Carbohydrate Research*, 2003: 338: 2431-2447.

Caswell, Jeff, and Kurt Williams. "Respiratory System." In *Pathology of Domestic Animals*, by Grant Maxie, 523-655. Philadelphia: Saunders, 2007.

Choi, J. Klinkspoor, JH. Yoshida, T. Lee, SP. "Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* stimulates mucin secretion by cultured dog gallbladder epithelial cells." *Hepatology*, 1999, 1352–1357.

Chung, Hyun Kim. Yeonsu, Oha. Kiwon, Han. Hwi Won, Seo. Duyeol, Kim. Ikjae, Kang. Changhoon, Park. Ki Young, Jang. Sung-Hoon, Kim. Chanhee, Chae. "Expression of secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6) and membrane-bound mucin (MUC4) in the lungs of pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*." *Research in Veterinary Science.*, 2012: 486–491.

Dauphinee, MS, and A. Karsan. "Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells." *Laboratory Investigation*, 2006: 86: 9–22.

Degroote, Sophie. Maes, Emmanuel. Pascale, Humbert. Delmotte, Philippe. Lamblin, Geneviève. Roussel, Philippe. "Sulfated oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a secretor patient suffering from chronic bronchitis." *Biochimie*, 2003: 369-379.

Deitch, E. A. "Nutrition and the gut mucosal barrier." *Current Opinion in General Surgery*. 1993: 85-91.

Deplanckem, Bart. Gaskins, H Rex. "Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer." *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2012: 1131-1141.

Dunsford, B.R., Haensly, W.E., Knabe, D.A. "Effects of diet on acidic and neutral goblet cell populations in the small intestine of early weaned pigs." *American Journal of Veterinary Research*. 1991: 52: 1743–1746.

Enss, ML. Schmidt-Wittig, U. Muller, H. Mai, UE. Coenen, H. Hedrich, HJ. "Response of germfree rat colonic mucous cells to peroral endotoxin application." *European Journal of Cell Biology*. 1996: 71: 99–104.

Erridgea, C, E Bennett-Guerrero, and RI. Poxton. "Structure and function of lipopolysaccharides." *Microbes and Infection.*, 2002: 4:837–851.

Fan, MZ. "Growth and ontogeny of the gastrointestinal tract. In: Xu. RJ, Cranwell P editors. The neonatal pig. Gastrointestinal physiology and nutrition." *Nottingham University Press.*, 2002: 31-60.

Farzana, Mahomed. "Recent advances in mucin immunohistochemistry in salivary gland tumors and head and neck squamous cell carcinoma." *Oral Oncology*, 2011: 797–803.

García-Herrera, J. Navarro, MA. Marca, MC. Osada, J. Rodríguez-Yoldi, MJ. "The effect of tumor necrosis factor on D-fructose intestinal transport in rabbits." *Citokine.*, 2004: 25: 21- 30.

Gomez, IAS, D Vergara, and F Argote. "Efecto de la dieta y edad del destete sobre la fisiología digestiva del lechón." *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agronindustria*, 2008: 32-41.

Gutierrez, Cristian, Lopez Albeiro, Parra, Jaime. "Relación entre la expresión de TNF- α , activación de las MAPK y absorción lisina en lechones que presentan inflamación por lipolisacáridos de E. coli ." *PANVET*, 2012.

Hampson, D. J. "Attempts to modify changes in the piglet small intestine after weaning. ." *Research in Veterinary Science*. 1986: 40: 313–317.

Herlaar, E. Brown, Z. "MAPK signaling cascades in inflammatory disease." *Molecular Medicine Today*. 1999: 5: 439. p38

Hewett, JA. Roth, RA. "Hewett JA, Roth RA. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides." *Pharmacobiol Rev*. 1993: 45: 382-411.

Hooper, L.V. Gordon, J.I. "Commensal host-bacterial relationships in the gut." *Science*. 2001: 292: 1115–1118.

Horton, B. "Commercial Utilization of Minor Milk Components in the Health and Food Industries." *Journal of Dairy Science*. 1995: 78: 2584.

Hunter, SE. Singla, AK. Prazma, J. Jewett, BS. Randell, SH. H.C. "Mucin production in the middle ear in response to lipopolysaccharides." *Otolaryngology. Head and Neck Surgery*. 1999, 884–888.

ICA, ACP, and FNP. *Manual de Enfermedades Porcinas*. 2000.

Kelly, D Smyth, and J.A. McCracken. "Effecto of continous nutrient supply on the development of the digestive tract ando on changes indigestive enzyme activiti during the first week post-veaning." *British Journal of nutrition*. 1991: 169-180.

Klasing, KC, and BJ Johnstone. "Implications on an inmune response on growth and nutrient requeriments of chickens." *Recent advances in animal nutrition.*, 1991: 135-146

Llompart, VCM. "Papel de la cadena O del lipopolisacárido en la regulación de factores de virulencia de *Yersinia enterocolitica.*, , . ." Tesis Doctoral., Departament de Biologia, Universitat De Les Illes Balears, Palma de Mallorca , 2009, 203 pag.

Mejía-Medina, Julian¹, Juan Rincón-Ruiz¹, Cristian Gutiérrez-Vergara^{2,4}, Guillermo Correa-Londoño^{3,4},. "Valoración de parámetros clínicos y lesiones en órganos de cerdos durante el período posdestete." *Acta Agronómica*, 2011: 61-68.

Moniaux, N. Escande, F. Porchet, N. Aubert, JP. Batra, SK. "Structural organization and classification of the human mucin genes. ." *Frontiers in Bioscience*. 2001: 6: D1192–D1206.

Niekamp, S.R., Sutherland, M.A., Dahl G.E, and Salak-Johnson J.L. "Immune responses of piglets to weaning stress: Impacts of photoperiod." *Journal Of Animal Science*, 2006: 93-103.

Olof, Svensson. Thomas, Arnebrant. "Mucin layers and multilayers — Physicochemical properties and applications." *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010: 395–405.

Ono, K. Han, J. "The p38 signal transduction pathway activation and function." *Cell Signaling research*. 2000: 12: 1-13.

Ospina, Daniel, Rodríguez, Berardo, López, Albeiro Parra, Jaime. "Efecto de la inflamación causada por el Lipopolisacarido (LPS) de E. coli sobre la morfología y actividad enzimática de las vellosidades en lechones recién destetados." *PANVET*, 2012.

Parra, Jaime, Zoot, MSc, PhD(c), Zoot, PhD Jorge Agudelo, MV, MsC María C Ramírez⁴, MV, MS Laura Ortiz, MV, Esp, PhD Berardo Rodríguez⁴, and Zoot, MV, MSc, DrSci Albeiro López Herrera⁵. "Lipopolysaccharide (LPS) from E. coli has detrimental effects on the intestinal morphology of weaned pigs." *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2011: 598-608.

Parillo, F., Stradaioli, G., Verini Supplizi, A.,. "Glycoconjugates in small antral ovarian follicles of the River buffalo (*Bubalus bubalis* L.)." *Acta Histochemica*, 1998: 100: 1–15.

Parillo, F, M.P. Arias, y A Verini Supplizi. «Glycoprofile of the different cell types present in the mucosa of the horse guttural pouches.» *Tissue and Cell*, 2009: 257–265.

Perez, M.D, and M. Calvo. "Interaction of b-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review." *Journal of Dairy Science*. 1995: 78, 978 988.

Pesta, GR, Meyer-Pittroff, and W Russ. ". Utilization of Whey. Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry." 2007: 193-207.

Pié, S, SP Lallès, F Blazy, J Laffitte, B Sève, and IP. Oswald. "Weaning Is Associated with an Upregulation of Expression of Inflammatory Cytokines in the Intestine of Piglets." *Journal of Nutrition*. 2004: 134: 641–647.

Pierre-Regis, Burgel, Jay A. Nadel. "Mucus and Mucin-Secreting." In *Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, by DM, DSc, FRCP, FMedSci, FRS, Jeffrey M. Drazen, MD, Stephen I. Rennard, MD, and Neil C. Thomson, MD, FRCP eter J. Barnes, 153-187. Omaha, USA: Alpha, 2008.

Pitman, R. S. Blumberg, R. S. "First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. ." *Journal of Gastroenterology*. 2000 : 35:805 – 814. .

Plonait, Hans, and Klaus Bickhardt. *Manual de las Enfermedades del Cerdo*. Segunda Edición. Zaragoza: Acribia, 2001.

Pluske, J. R, J Le Dividich, and Verstegen M. W. A. *El destete en el ganado porcino*. Zaragoza: España, 2006.

Rama, Bansil. Bradley, S. Turner. "Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications." *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2006: 164 – 170.

Reis, de souza, TC. Guerrero, CMJ. Aguilera, BA. Mariscal, LG. "Efecto de diferentes cereales sobre la morfología intestinal de lechones recién destetados." *Revista Técnica Pecuaria Mexico*, 2005: 309-321.

Sharma, R. Schumacher, U. "Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats." *Dig Dis Sc*, 1995: 40: 2532-2539.

Shimizu, T. Takahashi, Y. Kawaguchi, S. Sakakura, Y. "Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1996: 153: 1412–1418.

Smirnova, Marina. Guo, Li. Birchall, John. Pearson, Jeffrey P. "LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells." *Cellular Immunology*, 2003: 42–49.

Smirnova, MG. Guo, L. Birchall, JP. Pearson, JP. "LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells." *Cellular Immunology*. 2003: 221:42-49.

souza, Reis de, T.C Guerrero, BA Aguilera, and LG. Mariscal. "Efecto de diferentes cereales sobre la morfología intestinal de lechones recién destetados." *Revista Técnica Pecuaria Mexico*, 2005: 309-321.

Taylor, D. J. *Pig Diseases*. Seventh edition. 1999.

Thacker, Brad. "La Enfermedad Respiratoria Porcina, un desafío constante a la rentabilidad de la producción." *Swine Production Medicine Iowa State University*, Sin año.

Touchette, KJ, JA Carroll, GL Allee, RL Matter, CJ Dyer, and LA Beausang. "Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: Effects on the immune axis of weaned pigs." *Journal of Animal Science*. 2002: 494-501.

Ulevitch, RJ. Mathison, JC. Schumann, RR. Tobias, PS. "A new model of macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharide." *Journal of Trauma*. 1990: 189-192.

Vente-Spreuwenberg, MAM, JMAJ Verdonk, GCM Bakker, AC Beynen, and MWA. Verstegen. "Effect of dietary protein source on feed intake and small intestine morphology in newly weaned piglets." *Livestock Production Science*. 2004: 169-177.

Gutierrez, Cristian, Román, Yony, Pelaez, Carlos, and Ciro, Johana. "Efecto de la Adición ex vivo del Lipopolisacárido de Escherichia coli sobre la Absorción de Lisina en Cerdos Destete." n.d.

Voynow, Judith. "What does Mucin have to do with lung disease." *Pediatric respiratory reviews*, 2002: 98-103.

Waetzig, GH. Segert, D. Rosentie, I P. Nikolaus, S. Schreiber, S. "p38 mitogen activated protein kinase is activated a linked to TNF-a signaling in inflammatory bowel disease." *Journal of Immunology*. 2002: 168: 5342-5351.

Wang, Q. "Pathologically and Experimentally Induced Intestinal Barrier Changes Evaluated by Permeability Measurements Lund." Doctoral thesis, University Lund, Sweden, 1995.

Zhenfeng, Z. Deyuan, O. Xiangshu, P. Sung, WK. Yanhong, L. Junjun, W. "Dietary Arginine Supplementation Affects Microvascular Development in the Small Intestine of Early-Weaned." *Pigs Journal of Nutrition*. 2008: 138:1304-1309.

Zuluaga, CA. Ortiz, L.Rodríguez, B. Ramirez, MC. López Herrera, A. Suescún, JE,. "Alteraciones histopatológicas multiorgánicas en lechones postdestetos causadas por LPS de Escherichia coli*." *Enicip*, 2010.