

**EFFECTO DEL LIPOPOLISACARIDO (LPS) DE *E. COLI* SOBRE LA SECRECIÓN DE  
MUCINAS INTESTINALES EN LECHONES POST DESTETE.**

Deny Juliana Zapata Cardona

Director:  
Berardo de Jesús Rodríguez

Maestría en Ciencias Animales Profundización Patología

Universidad de Antioquia  
2013

## **Dedicatoria**

### ***A mi familia:***

Que me apoyó siempre incondicionalmente, me alivió la carga y me perdonó el distanciamiento.

### ***A mis Maestros:***

Que me dieron la motivación, las herramientas y la oportunidad de formarme con su insuperable conocimiento de la vida y la patología.

### ***A mis Amigos:***

Que siguen siendo amigos pese al tiempo que les he restado, me han dado la confianza para seguir avanzando.

## Tabla de contenido

1. Lista de tablas.....	4
2. Lista de Figuras .....	5
3. Resumen: .....	6
4. Introducción General .....	7
5. Objetivos.....	11
5.1. General: .....	11
5.2. Específicos:.....	11
6. Marco Teórico.....	12
6.1 El destete en la digestión de lechones.....	12
6.2 Destete y desarrollo enzimático .....	14
6.3 Desarrollo morfológico del sistema gastrointestinal del lechón.....	15
6.4 Desarrollo del sistema inmune .....	17
6.5 Componentes nutricionales de la dieta del lechón .....	18
6.7 Factores patogénicos productores de desórdenes intestinales .....	19
6.8 Efectos del LPS sobre la absorción de compuestos en el intestino delgado ...	23
7. Cuerpo del trabajo .....	28
7.1 Artículo para publicar: .....	28
8. Conclusiones Generales.....	47
9. Anexos.....	48
10. Referencias .....	49

## **1. Lista de tablas**

Tabla 1. Efecto del tiempo del destete sobre la secreción de mucinas intestinales en cerdos alimentados con dieta basal (Efecto del destete). Pág 36

Tabla 2. Efecto del tiempo del destete sobre la secreción de mucinas intestinales en los cerdos que recibieron las dietas experimentales. Pág 36

Tabla 3. Efecto de la dosis de LPS sobre el número de células caliciformes que secretaron los diferentes tipos de mucinas en intestinos de lechones postdeste. Pág 37

Tabla 4. Efecto del tiempo postdeste sobre la distribución de las mucinas en la vellosidad y la glándula del intestino delgado y grueso de cerdos sometidos a las dietas experimentales. Pág 38

## **2. Lista de Figuras**

Figura 1. Tinciones histoquímicas en intestino delgado, porción distal. Pág. 39

### 3. Resumen:

#### **Efecto del lipopolisacarido (LPS) de *E. coli* sobre la secreción de mucinas intestinales en lechones post destete.**

#### *Effect of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) on intestinal mucins secretion in pigs after weaning.*

Deny J Zapata<sup>1,2,4</sup>, MV, (c)MSc; Berardo de J Rodríguez<sup>2,4</sup>, MV, Esp Patol, PhD, Maria C Ramirez<sup>2,5</sup> MV, MSc, Albeiro López Herrera<sup>3,6</sup>, Zoot MV MSc DrSci; Jaime Parra Suescún<sup>3,6</sup>, Zoot MSc, PhD.

<sup>1</sup> Joven investigadora Colciencias.<sup>2</sup> Profesor, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. <sup>3</sup> Profesor, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, <sup>4</sup> Grupo de Investigación CENTAURO, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Colombia. <sup>5</sup> Grupo de Investigación en Patobiología QUIRON, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Colombia, <sup>6</sup> Grupo de Investigación BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia.

---

**Introducción:** En los cerdos, el destete precoz genera cambios morfológicos y fisiológicos en el intestino que predisponen al desarrollo de enteritis y que se han asociado con bacterias gram negativas como la *Escherichia coli* (*E.coli*), que posee LPS, un potente factor patogénico. En el intestino las células caliciformes producen mucinas, que forman un gel protector que media la interacción bacteria-hospedador, bacteria-bacteria; actualmente se desconoce el efecto del LPS de *E.coli* sobre la cantidad de células caliciformes y los tipos de mucinas secretadas en las diferentes porciones del intestino en cerdos y si estos cambios tienen relación con el desarrollo de enteritis en el periodo postdestete. Este conocimiento es necesario para desarrollar métodos alternativos para el manejo de la enteritis en el periodo postdestete. **Objetivo:** Determinar el efecto del LPS de *E.coli* sobre el número de células caliciformes y el tipo de mucina que se producen en el intestino delgado y grueso de lechones recién destetados. **Métodos:** Se realizó un estudio experimental con 52 lechones destetados a los 21 días, fueron alimentados con una dieta basal adicionada con cuatro niveles de LPS (0.0, 0.3, 0.5 y 1.0 µg/mg de alimento) durante 10 días. Los cerdos se sacrificaron los días 1, 5, 7 y 10 postdestete y se tomaron muestras de intestino

delgado y grueso; se realizaron coloraciones histoquímicas (PAS y Azul de alcian a pH 1.0 y pH 2.5) para determinar la cantidad de células caliciformes y la cantidad de mucinas neutras y ácidas, sulfatadas y no sulfatadas mediante un análisis computarizado de imágenes. Se realizó un arreglo factorial 4x4 y un análisis estadístico multivariado (GML) con un test de Duncan para comparar los tratamientos. **Resultados:** Con respecto al número de células caliciformes que expresaron mucinas ácidas en los diferentes tiempos evaluados del periodo postdestete, se observó que tanto aquellos animales que recibieron la dieta basal como los sometidos a las dietas experimentales presentaron una disminución de la secreción de mucinas ácidas el quinto día, con posterior recuperación de los parámetros para los días 7 y 10 postdestete, las mucinas neutras en cambio, incrementaron el día 5 con una posterior disminución para los días 7 y 10 postdestete; Al comparar las dietas experimentales, se observó una disminución del número de células caliciformes secretando los diferentes tipos de mucinas a dosis mayores de LPS, principalmente con la D2 (0.50 µg/mg de LPS). **Conclusiones:** Se determinó un efecto del tiempo postdestete y la dosis de LPS sobre el tipo de mucina secretado, siendo las mucinas ácidas las más afectadas. El efecto del destete sobre el tipo de mucinas expresado fue potenciado por el LPS, notándose un mayor efecto deletéreo sobre las células caliciformes con las dosis más altas. Estos cambios comprometen posiblemente la función protectora de las mucinas y afectan la integridad del epitelio con cambios en el número de células caliciformes; esto explica algunas de alteraciones que pueden derivar en el desarrollo del síndrome de diarrea postdestete.

**Palabras Claves:** Células caliciformes, histopatología , porcinos, postdestete, intestino.

### ***Summary:***

**Introduction:** In swine, early weaning generates morphological and physiological changes in the intestine that predispose to the development of enteritis and have been associated with gram negative bacteria such as *Escherichia coli*, which have LPS, a potent pathogenic factor. In the intestine, the goblets cells produce mucin, which forms a protective gel, mediates the bacteria-host and bacteria-bacteria interaction. Is currently unknown *E.coli* LPS effect on the number of goblets cells and the types of mucins secreted in different portions of the intestine of pigs and whether these changes are related to the development of post-weaning enteritis in this period. This knowledge is necessary to develop alternative methods for handling enteritis in postdestete

period. **Objective:** determine the effect of E. coli LPS on the number of goblet cells and the type of mucins produced in the small and large intestines of recently weaned piglets. **Methods:** We conducted an experimental study with 52 piglets weaned at 21 days, were fed a basal diet supplemented with four levels of LPS (0.0, 0.3, 0.5 and 1.0 mg / mg of food) for 10 days. Pigs were sacrificed on days 1, 5, 7 and 10 post-weaning and samples of small and large intestine were taken; histochemical stainings were made (PAS and Alcian blue at pH 1.0 and pH 2.5) to determine the number of goblet cells and amount of neutral and acidic mucins sulfated and non-sulfated by computerized image analysis. We conducted a 4x4 factorial multivariate statistical analysis (GML) with a Duncan test to compare treatments. **Results:** With regard to the number of goblet cells expressing different acidic mucin evaluated times postweaning period, it was observed that those animals that received both the basal diet as those subjected to the experimental diets had a decrease of the acid mucin secretion the fifth day, with subsequent recovery of the parameters for the 7 and 10 postdeste, whereas neutral mucins, increased on day 5 with a subsequent decrease for 7 to 10 postdeste; By comparing the experimental diets, there was a decrease of number of goblet cells to secrete mucins different types of LPS at higher doses, mainly with D2 (0.50 ug / mg of LPS). **Conclusions:** We found an effect of weaning time and dose of LPS on the secreted mucin, acidic mucins being the most affected. The effect of weaning on the type expressed mucin was enhanced by LPS, noting more deleterious effect on goblet cells with higher doses. These changes may compromise the protective function of mucins and affect the integrity of the epithelium with changes in the number of goblet cells, which explains some of alterations that can lead to the development of post-weaning diarrhea syndrome.

**Key words:** gobletcells, histopathology, intestine, posweaning , swine.

#### 4. Introducción General

El periodo postdestete en los cerdos, se considera una etapa crítica en la producción ya que se asocia con alteración de parámetros productivos como pérdida en la ganancia de peso y altas tasas de mortalidad (Reis *et al.*, 2007). En este periodo se producen un gran número de enfermedades de origen infeccioso que afectan principalmente las mucosas digestivas y respiratorias y generan grandes pérdidas económicas a la industria porcina (Campabadal *et al.*, 1994, Pluske 1997 y 2003).

Se ha demostrado que el destete causa cambios morfológicos e histopatológicos en el intestino de los cerdos, estos cambios incluyen la reducción de la altura de las vellosidades (un indicador de lesión epitelial) y una mayor profundidad de la lámina propia (un indicador de la profundidad de las criptas, la proliferación celular y la madurez de los enterocitos) (Parra *et al.*, 2011), que pueden afectar la función absorbiva del intestino y predisponer al desarrollo de enteritis.

En el lumen intestinal existe una estrecha relación entre bacterias Gram positivas (*Lactobacilos sp*, *Staphylococcus sp*, y *Streptococcus sp*) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*); El destete, provoca un periodo breve de ayuno y la desaparición de la población de lactobacilos predominante en intestino, favoreciendo el aumento de bacterias 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, que causa en el intestino incremento en el transporte paracelular indiscriminado de moléculas, la aparición de diarreas y alteraciones estructurales y funcionales (Zhenfeng *et al.*, 2008); También se ha reportado la capacidad del LPS para inducir cambios en las células caliciformes e incrementar la expresión de genes que determinan la composición proteica y

naturaleza bioquímica de las mucinas secretadas por estas células. (Enss *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 1996; Vente *et al.*, 2001).

Las mucinas son proteínas heterogéneas, glicosiladas, pesadas, que son producidas y secretadas por las células caliciformes (Moniaux *et al.*, 2001); constituyen una línea de barrera física entre el lumen y el epitelio, además son una importante base estructural para las interacciones bacteria/hospedador y bacteria/bacteria (bourlioux *et al.*, 2003). Se ha reportado que en los cerdos el número de células caliciformes y la producción de mucinas se reducen en el destete y comienzan a aumentar entre el día 3 y 15 post destete (Dunsford *et al.*, 1991).

Aunque la habilidad de las células caliciformes para responder a un amplio rango de agresiones intestinales mediante cambios en la producción y secreción de mucina, 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, los resultados reportados en los cerdos son escasos e inconsistentes (Brown *et al.*, 2006) y hasta donde conocemos, no existen reportes de investigaciones que estudien el efecto del LPS sobre la producción de mucinas en el periodo post destete en los cerdos.

Por todo lo anterior y considerando que un estudio reciente conducido por este grupo de trabajo (Parra *et al.*, 2011) mostró la capacidad del LPS de *E. coli* para inducir cambios en la arquitectura de las vellosidades y de las glándulas del intestino delgado de lechones post destete, se realizó este estudio con el objetivo de evaluar el efecto LPS de *E. coli* sobre el número de células caliciformes y los tipos de mucinas por ellas producidas durante este periodo, con el propósito de ampliar la comprensión de la fisiopatología del síndrome de la diarrea postdestete y propiciar el desarrollo de métodos alternativos de manejo, prevención y control de las alteraciones intestinales en este período.

## **5. Objetivos**

### **5.1. General:**

Determinar el efecto del LPS de *E. coli* sobre la cantidad de células caliciformes y el tipo de mucinas que se producen en las diferentes porciones del intestino delgado y grueso, en lechones recién destetados.

### **5.2. Específicos:**

- a. Comparar en cerdos expuestos a LPS de *E. coli* y en cerdos no expuestos, la cantidad de células caliciformes y los tipos de mucinas producidas en duodeno, yeyuno, íleon y colon en el período postdeste.
- b. Comparar en cerdos expuestos a LPS de *E. coli* y en cerdos testigo la distribución de las células caliciformes que expresan mucinas ácidas, neutras y sulfatadas en vellosidades y en glándulas de intestino delgado y grueso.
- c. Comparar en las dietas experimentales el efecto del LPS sobre el número de células caliciformes y el tipo de mucina que producen en las diferentes porciones de intestino delgado y grueso.

## **6. Marco Teórico**

### **6.1 El destete en la digestión de lechones**

El proceso digestivo es un conjunto de fenómenos cuyo objetivo es proporcionar nutrientes al animal y está compuesto por la ingestión de alimento, la secreción de ácido clorhídrico y enzimas, la hidrólisis de macromoléculas, la absorción de nutrientes, y la excreción de productos de desecho (Lizardo, 1997). La combinación de los procesos de digestión y absorción es conocida como la digestibilidad de un nutriente (Low, 1976) y está íntimamente relacionada con el valor nutritivo de los alimentos.

Según Noblet et al., (1994) en la especie porcina la digestibilidad de los alimentos está fuertemente influenciada por el estado fisiológico de los animales. Durante el período postnatal el tracto gastrointestinal del cerdo sufre numerosos cambios y estrés severo, particularmente al momento del nacimiento y al destete (Puskle et al., 1997). Al nacimiento, el tracto gastrointestinal debe estar preparado para el cambio de una nutrición parenteral como vía de entrada de los nutrientes al organismo, a una nutrición enteral (Sangil et al., 1999). Cuando los cerdos son destetados, están sujetos a un estrés de origen nutricional causado por el cambio de una dieta (leche) altamente digestible y muy bien adaptada a las enzimas presentes en el tubo digestivo, a una dieta sólida a base de cereales no siempre adecuada a las necesidades de un aparato digestivo todavía inmaduro y con baja capacidad digestiva (Fowler, 1980). Este estrés puede provocar una baja de la tasa de crecimiento de los cerdos después del destete e inducir la atrofia de las vellosidades. Se ha demostrado que la tasa de crecimiento y la eficiencia de la utilización de los alimentos de cerdos recién destetados, es mejor con alimentos basados en proteínas de la leche que con proteínas de origen vegetal (Li et al., 1991).

Los nutrimentos no digeridos o no absorbidos presentes en el lumen intestinal sirven de sustrato a las bacterias enteropatógenas (en su mayoría *E. coli*), y generan la proliferación de las mismas (McCracken y Kelly, 1993). En el intestino delgado a nivel

funcional y estructural se observan cambios que suceden dentro de las primeras 24 horas post destete y generalmente abarcan un decremento en la altura de las vellosidades, incremento en la profundidad de las criptas, reducciones en la actividad específica de las enzimas digestivas (lactasa y sacarasa), y una reducción en la capacidad de absorción (Reis et al., 2005).

Estudios morfológicos han demostrado que la hipersensibilidad transitoria y atrofia de la mucosa intestinal al momento del destete, reduce la capacidad de los animales para digerir alimentos de origen vegetal (Tamminga et al., 1995). Además algunas fuentes utilizadas para la elaboración de alimentos para cerdos, contienen factores antinutricionales que pueden afectar fisiológica e histológicamente el tracto digestivo (Carbonaro, 1997). El efecto combinado de todos los cambios al momento del destete se traduce en el bajo nivel de consumo voluntario, pobre crecimiento inicial o pérdida de peso y, en algunas instancias, diarrea, morbilidad y muerte. Esta disminución del crecimiento puede presentarse hasta los 14 días post destete, y representa un 25 a 40% de la reducción en el grado de crecimiento comparado con los cerdos que permanecen con su madre (Musgrave et al., 1991).

La habilidad del cerdo después del destete, para asimilar los nutrientes de las dietas basadas en compuestos diferentes a leche, dependerá de la pronta adaptación del tracto gastrointestinal para secretar la suficiente cantidad de enzimas para realizar los procesos digestivos (Caine et al., 1997b). Por otro lado, la ingestión de alimento sólido complementario durante la lactancia tiene efectos positivos en el desarrollo de la capacidad digestiva del lechón. La producción de ácido clorhídrico y la actividad proteolítica del contenido gástrico se desarrollan paralelamente a la ingestión del alimento complementario (Cranwell, 1985), y la acidez del estómago no llega a niveles apreciables hasta la tercera o cuarta semana postdestete. Este proceso de adaptación digestiva atenúa los efectos negativos del destete. En función de la baja capacidad digestiva del lechón recién destetado, los alimentos iniciadores deben ser altamente digestibles para que su utilización sea lo más eficiente posible (Partridge, 2001). En las últimas décadas, la industria ha desarrollado alimentos preiniciadores e iniciadores que

se asemejan en composición y digestibilidad a la leche de la cerda, disminuyendo los probables daños del alimento al aparato digestivo poco desarrollado del lechón.

## **6.2 Destete y desarrollo enzimático**

Otro aspecto importante para evaluar en conjunto con la digestibilidad de las materias primas, es el desarrollo del paquete enzimático del lechón, ya que resultados de diferentes investigaciones sugieren que el consumo de alimento seco por su composición y volumen tiene un papel amplificador dentro del desarrollo adaptativo. Las observaciones sobre el régimen alimenticio, sea en la secreción o en la actividad de las enzimas digestivas, varía según los investigadores y sus condiciones experimentales; sobre todo en relación con los lechones recién destetados, debido a la falta de información precisa sobre la adaptación enzimática a las raciones post destete (Lizardo, 1997). En la práctica, se constata en el período post destete una adaptación del animal y de su aparato digestivo, particularmente en sus secreciones a una nueva fuente de proteínas y carbohidratos. En este proceso adaptativo, el destete tiene una influencia decisiva, pues cuando este es realizado a una edad temprana puede producir algunas perturbaciones en el funcionamiento digestivo. La supresión de la leche no es inmediatamente compensada por un consumo adecuado de agua o por un aumento suficiente de las secreciones salivales o gastrointestinales. Además, el estrés ocasionado principalmente por el frío, puede provocar un aumento en el peristaltismo, y hasta una interrupción abrupta de la síntesis de algunas enzimas, lo que puede originar diarreas en el mismo día del destete. Así, el destete promueve una disminución en la actividad total y específica de las enzimas pancreáticas e intestinales en la semana posterior al destete (Cera et al., 1990). Entre los múltiples factores que interfieren con la secreción enzimática en los lechones, se destacan la composición de los alimentos y la edad del lechón. Generalmente, el aumento de la fibra cruda en las raciones post destete provoca una disminución en la digestibilidad total de los nutrientes (Lizardo, 1997). La introducción de grasa en las dietas post destete casi siempre disminuye la digestibilidad de los minerales (Reis de Souza, 1992). Las fuentes de proteína de origen vegetal se caracterizan por ser de menor digestibilidad que las de origen animal, debido a la presencia de factores antinutricionales o a la cantidad y tipo de

polisacáridos no amiláceos (PNA) (Salgado et al., 2002). Los inhibidores de las enzimas proteolíticas, los carbohidratos complejos insolubles y los constituyentes antigénicos son los responsables de la menor digestibilidad de la proteína. Sin embargo, el procesamiento tecnológico de las fuentes proteicas o de los cereales, generalmente mejora la digestibilidad de estos vegetales (Baidoo et al., 1998). Algunos autores reportan, que los subproductos proteicos refinados de soya (concentrado y aislado de proteína de soya) parecen ser tan digestibles como la proteína de la leche. Así mismo, el cambio de un ingrediente en la ración puede tener efectos contrarios en los patrones de secreción enzimáticos y digestibilidad. Los resultados de Cera et al., (1990) sugieren que los lechones jóvenes son más sensibles a los factores inhibidores del crecimiento cuando son comparados con los animales en crecimiento. Por lo anterior, las dos semanas posteriores al destete parecen ser el período más difícil para la utilización digestiva de los nutrimentos. Además, en este período es cuando los lechones son más sensibles a los diferentes factores que afectan las secreciones enzimáticas, y por tanto, la digestibilidad. En realidad, durante las primeras cuatro semanas que siguen al destete se observa un aumento gradual de la capacidad del lechón en digerir y absorber los lípidos y el nitrógeno, con una tendencia a alcanzar su máximo entre la tercera y cuarta semana post destete (Cera et al., 1990).

### **6.3 Desarrollo morfológico del sistema gastrointestinal del lechón**

El desarrollo del intestino delgado de lechones recién nacidos pasa por un proceso de desarrollo acelerado durante los primeros 10 días de vida, ocurriendo incrementos significativos en su peso, longitud y diámetro, que están asociados al aumento de peso de la mucosa intestinal, de la altura y diámetro de sus vellosidades, y de la población celular (Reis de Souza et al., 2005). Al inicio de la vida del cerdo las vellosidades tienen forma de dedos alargados y conforme avanza la edad éstas se van engrosando, presentando al final del día 49 de edad una apariencia en forma de lengua (Moran, 1982). Previo al destete, las vellosidades intestinales son largas, bien estructuradas, y muy eficientes en la absorción de nutrientes. Sin embargo, en el momento del destete, su longitud se reduce casi a la mitad y aumenta la profundidad de las criptas, provocando la aparición de una mayor proporción de enterocitos inmaduros en los

extremos de las vellosidades (Kelly et al., 1991; Pluske et al.1991). Para que los procesos de digestión y absorción se den de una manera satisfactoria, es necesario que se mantenga la integridad de la mucosa intestinal, la cual depende del recambio y renovación de enterocitos (Fan, 2002). La función digestiva (secreción de carbohidrasas y peptidasas) de los enterocitos y sus microvellosidades comienza solamente cuando se completa la diferenciación estructural de la mucosa, que generalmente ocurre durante el periodo de migración de las células sobre el primer tercio de las vellosidades. La digestión de los diferentes componentes alimenticios y la subsecuente absorción de nutrimentos ocurren principalmente en la parte superior y media del intestino delgado. La absorción de nutrimentos del intestino delgado ocurre a través de numerosas vellosidades microscópicas que cubren el intestino delgado. La absorción de azúcares y aminoácidos, empieza cuando el enterocito pasa la mitad de la vellosidad y continúa aumentando hasta que son descamados en la punta de ésta (Reis de Souza et al., 2005). Después del destete, los lechones manifiestan varios síntomas del estrés al que son sometidos en esta fase de su vida, que incluyen un periodo de subalimentación ocasionando atrofia de las vellosidades (Vente-Spreuwemberg et al., 2001), lo que resulta en una menor capacidad para digerir y absorber los nutrimentos, y muchas veces diarreas. Esta atrofia (reducción en el tamaño) de las vellosidades produce una disminución en el área de superficie para la digestión y absorción de nutrimentos 7 días a 14 días post destete y corresponde al tiempo en que se presenta el problema llamado caída del destete, caracterizado por problemas de reducción en la digestión y absorción de nutrimentos, problemas de deshidratación y diarreas. El desarrollo de estas vellosidades también se ve afectado después del destete por un cambio en la población microbial, por el consumo de alimento seco y por reacciones alérgicas. Si esas vellosidades son dañadas, baja la secreción de enzimas digestivas afectándose la absorción de nutrimentos y por ende el crecimiento de los cerdos (Mahan y Cera, 1993). Los cambios morfológicos de la mucosa intestinal observados en la fase postdestete son resultantes de la baja capacidad del tracto intestinal de adaptarse al nuevo ambiente nutricional que establece en su interior. Estos cambios microscópicos se relacionan con la edad y peso del lechón (Pluske et al., 1997), el bajo consumo de alimento (Vente- Spreuwemberg

et al., 2001), y con las materias primas que conforman el alimento consumido por los animales (McCracken et al., 1999).

#### **6.4 Desarrollo del sistema inmune**

El desarrollo del sistema inmune en el tracto gastrointestinal también tiene un efecto importante en el programa de alimentación post destete. Fowler (1995) establece que el desarrollo del sistema inmune en el tracto gastrointestinal es un proceso de educación. Al llegar el momento del destete, en el cual la dieta líquida se transforma en alimento seco, la falta de capacidad digestiva y el cambio a alimentaciones menos frecuentes y en mayor cantidad, afecta la digestión del alimento y gran cantidad de éste pasa sin digerir a través del intestino grueso, fermentándose y causando problemas de diarrea. Esta situación hace que muchos porcicultores, buscando evitar los problemas de diarrea, limiten el consumo de alimento al momento del destete (Campabadal y Navarro, 1994).

El lechón recién nacido depende de la inmunidad pasiva suministrada por la madre. Al nacer, el animal recibe inmunoglobulinas (Ig s) a través del calostro que son capaces de atravesar la pared intestinal durante las primeras horas de vida, pero su importancia disminuye con el tiempo. Posteriormente el animal recibe leche materna, que baña las paredes intestinales y proporciona cierta inmunidad local a través de la IgA (Pérez y Calvo, 1995; Horton, 1995). El lechón no es capaz de producir su propia actividad inmunológica en cantidades adecuadas hasta al menos 28-30 días de edad. Por tanto, cualquier estrés, bien sea digestivo, de manejo o combinado, va a afectar al lechón en momentos críticos desde un punto de vista inmunológico.

La exposición a antígenos activa el sistema de defensa que intenta neutralizarlos antes de que supongan un peligro para la vida del lechón. La activación del sistema inmune (SI) afecta a los procesos metabólicos y al crecimiento al menos de tres formas diferentes: i) interacción con el sistema nervioso central (eje hipotálamo-hipófisis); ii) interacción con el sistema endocrino, mediante la liberación de corticoesteroides y tiroxina y iii) liberación de citoquinas (péptidos inmunoreguladores) por los leucocitos (Klasing *et al.*, 1991). La activación del SI vía citoquinas produce hiperlipidemia y

aumenta el catabolismo proteico. Estos aminoácidos de origen muscular 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.

La activación del SI disminuye el crecimiento y empeora el índice de conversión en lechones, por lo que debe ser tenido en cuenta a la hora de diseñar los programas de alimentación (Sthaly, 1996). La baja activación del SI implica mayores requerimientos de aminoácidos (principalmente L-lisina) para una mayor deposición de tejido magro. Williams et al. (1997), observaron una mayor respuesta productiva al aumentar el nivel de L-lisina, en lechones con baja activación del SI. Maxwell y Sohn (1999), recomiendan niveles de L-lisina de hasta 1,6- 1,9% en lechones de alto potencial de crecimiento en buenas condiciones sanitarias.

### **6.5 Componentes nutricionales de la dieta del lechón**

Las dietas para lechones deberá estar constituida por fuentes de energía, proteína, minerales y vitaminas. La energía puede ser proporcionada por fuentes de grasa, carbohidratos y proteínas, sin embargo, la utilización de estas fuentes dependerá de su naturaleza, del desarrollo del sistema digestivo y proporción de éstas en la dieta. En la formulación de raciones para lechones estos factores son muy importantes, especialmente lo concerniente al uso de proteínas de origen vegetal y su relación con reacciones alérgicas; debido a lo anterior, los ingredientes que conforman las dietas de los lechones post destete deben ser de excelente calidad. Estos ingredientes son de alto costo, sin embargo, los rendimientos que se obtienen y el bajo consumo de alimento que tienen los lechones en esa etapa, justifican su utilización.

En esta etapa productiva del cerdo, las fuentes de energía deben ser cereales (avena, maíz o sorgo) procesados industrialmente (Hancock, 1995), sin embargo, las consecuencias del uso de estos cereales sobre la integridad intestinal todavía no están bien determinadas. Lo anterior es de gran importancia, ya que los cereales son los ingredientes presentes en mayor proporción en las dietas de iniciación (50-70%).

Las fuentes de proteína son las más problemáticas en las raciones de los lechones postdestete, debido a su efecto en reacciones alérgicas. La obtención de fuentes de proteína que no produzcan reacciones alérgicas a los lechones, se ve limitada por su disponibilidad y altos costos en el mercado. Las fuentes proteicas más fáciles de adquirir son los subproductos lácteos y las harinas de pescado, sin embargo, la calidad de éstas últimas muchas veces limitan su uso. Recientemente, los productos de soya han sido utilizados como la principal fuente de proteína en la alimentación de lechones. Varias investigaciones demostraron el efecto antigénico de las proteínas presentes en la harina de soya del 48% de proteína y su efecto negativo sobre el lechón. Sin embargo, en los últimos años se ha mejorado la tecnología del procesamiento de la soya (Easter, 1995). Estos procesos incluyen la remoción parcial de carbohidratos complejos, una destrucción más completa de los factores antinutricionales y una alteración de la organización estructural de las proteínas de la soya.

### **6.7 Factores patogénicos productores de desórdenes intestinales**

Con las modernas tendencias de la porcicultura, los lechones pueden ser destetados bruscamente a las tres semanas de edad. Sin embargo, el destete precoz de los lechones está siempre relacionado con una disminución del crecimiento y, con frecuencia con diarreas, de modo que esta práctica tiene implicaciones tanto sobre el bienestar del cerdo como sobre aspectos económicos.

El intestino está sujeto a infecciones por patógenos pero también contiene grandes cantidades de antígenos (inocuos) de alimentos y de bacterias comensales. Las células inmunitarias del intestino, por tanto, deben ser capaces de responder a organismos patógenos sin responder a los antígenos inocuos: debe haber un equilibrio correcto entre su función efectora y reguladora. Dado que el sistema inmunitario del lechón no está totalmente desarrollado hasta las 8 semanas después del nacimiento, la exposición a nuevos patógenos y antígenos inocuos durante este período de tiempo podría dar lugar a respuestas ineficaces a los patógenos o bien a perjudicar las respuestas inmunitarias al alimento y la flora comensal inocua.

El calostro proporciona cierta protección inmunológica en las primeras etapas de la vida, en especial cuando el número de células inmunitarias es bajo, por tanto, el calostro y la leche de la cerda pueden proporcionar protección al lechón, no sólo mientras el sistema inmunitario intestinal aumenta de tamaño, sino también mientras "aprende" a diferenciar los antígenos inocuos de los nocivos. Por tanto, la retirada de la leche en el destete puede provocar una reducción en la absorción de nutrientes debido a la presencia de infecciones e inflamaciones intestinales, y al subsecuente desarrollo de diarreas post-destete. Debido a esto, la composición de la dieta para lechones recién destetados tiene un papel central en la patogenia de las enfermedades entéricas, ya que afecta principalmente la morfología intestinal, la capacidad de digestión y absorción, la motilidad intestinal, el tiempo de tránsito y el crecimiento selectivo de la microflora (Pluske et al., 2003).

Además de las funciones digestivas, la pared intestinal actúa como una formidable barrera para impedir el paso de bacterias y endotoxinas del tracto gastrointestinal a la circulación sistémica. Sin embargo, la alteración de esta barrera durante ciertas condiciones patofisiológicas puede conducir al paso de bacterias del lumen intestinal a la circulación sanguínea (Ge et al., 2000). Ha sido demostrado que la sepsis afecta adversamente las funciones de barrera y metabólica del intestino, así como también reduce el flujo sanguíneo mesentérico (Sodeyama et al., 1993).

Generalmente, los cerdos poseen un número relativamente elevado de bacterias tanto en el estómago como en el intestino delgado distal en comparación con otras especies. Por este motivo, se producen fermentaciones microbianas tanto en el estómago como en el intestino delgado, especialmente en el íleon donde la velocidad de tránsito de la digesta se reduce y el número de bacterias es elevado (Jensen, 1998). Cuando el lechón está en etapa de lactancia las bacterias dominantes en el estómago e intestino delgado suelen ser lactobacilos y estreptococos, estando ambas bien adaptadas a utilizar el sustrato lácteo disponible. La microbiota que se desarrolla en el intestino grueso poco después del nacimiento está constituida por una extensa y variada selección de bacterias mayoritariamente anaerobias estrictas, incluyendo las especies *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium* y

*Clostridium* (Radecki y Yokoyama, 1991). Tras el destete, y en particular si este se realiza bruscamente, se produce un periodo breve de ayuno y el posterior consumo de una nueva ración sólida resulta en una alteración de la disponibilidad del sustrato específico para los microorganismos en todos los segmentos del tracto digestivo. La cantidad y el tipo de sustrato disponible en las diferentes partes dependen del tipo y la cantidad de alimento ingerido después del destete como de la capacidad funcional relativa del tracto digestivo del lechón tras el mismo. El destete brusco induce mortalidad de lactobacilos y estreptococos, debido a la ausencia de sustrato provocando la liberación de productos proinflamatorios desde sus paredes como los lipopolisacáridos (LPS); además, el destete induce cambios importantes en la estructura intestinal, que conllevan a la interrupción en su capacidad funcional, cuya recuperación total, eficiente y apropiada puede llevar varias semanas (van Beers-Schreurs, 1996; Pluske et al., 1997). Estas alteraciones intestinales también se reflejan en cambios en la cantidad, composición y complejidad de la microbiota intestinal. Jensen (1998) cuantificó los cambios que ocurren en las poblaciones bacterianas a lo largo del intestino de lechones una vez destetados a los 28 días de vida. En el intestino delgado, los lactobacilos, previamente dominantes, redujeron su número durante la primera semana post destete, mientras que el número total de bacterias y la proporción de coliformes, en especial de *E.coli*, aumentaron. Inmediatamente tras el destete, la mayor parte de las bacterias cultivables procedentes del lumen del intestino grueso son Gram negativas. En el estudio de Jensen (1998), la actividad microbiana en el intestino grueso no aumentó significativamente hasta 20 días después del destete, mientras que en el intestino delgado la población microbiana únicamente tardó una semana en establecerse y alcanzar la máxima fermentación. Transcurrido este periodo de cambios de la microbiota intestinal, se produce una re-estabilización de la misma.

Existe una amplia variedad de enfermedades que cursan con alteraciones de la permeabilidad intestinal. Dentro de los principales agentes causales de estas alteraciones se encuentran las bacterias Gram negativas, que incluyen varios géneros patógenos para el hombre y los animales: *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia*, entre otros. Generalmente, las bacterias Gram negativas son tóxicas; esta propiedad se

asocia al lípido A, uno de los componentes del LPS que forma parte de la pared externa de estas bacterias (Madigan et al., 1999).

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; Burell, 1994).

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).

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

La migración y activación de leucocitos es iniciada por el daño físico o una respuesta inmune local, o por ambas, y requiere una serie coordinada de señales. Una de las muchas vías de señalización implicadas es la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (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 E y Brown Z, 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).

## **6.8 Efectos del LPS sobre la absorción de compuestos en el intestino delgado**

Transporte de agua y electrolitos

Está claramente demostrado que la sepsis afecta adversamente a la integridad y funcionalidad intestinal. Existen diversos estudios que ponen de manifiesto el hecho de que los agentes infecciosos producen disfunción intestinal. Se han documentado anomalías en el transporte intestinal en estudios experimentales de enteritis viral (Butler DG *et al.*, 1974) y de infecciones por nematodos (Symons y Fairbairn , 1962).

Diversos estudios han mostrado que dosis no letales de endotoxina aumentan la permeabilidad intestinal en animales de laboratorio (Go et al., 1995; Dickinson et al., 1999), cerdos (Fink et al., 1991) y gatos (Jackman et al., 1996). Entre los mecanismos de esta disfunción mucosal inducida por la endotoxina, se cree que están implicadas la isquemia, metabolitos reactivos de oxígeno, neutrófilos, mediadores lipídicos y citoquinas (Fink et al., 1991).

Así mismo se han observado alteraciones en el transporte de iones inducidas por activación inmune, y está documentado que las endotoxinas modifican la absorción intestinal de agua y electrolitos (Theodorou et al., 1996; Grondahl et al., 1998; Hecht y Koutsouris, 1999). Por otra parte, la estimulación de la secreción transepitelial de cloro, parece ser la causante de las diarreas secretoras producidas por endotoxinas bacterianas. Se ha observado que *E. coli* induce la secreción electrogénica de Cl<sup>-</sup> e inhibe la absorción de NaCl en el intestino delgado de conejo y de cerdo (Grondahl et al., 1998). Otros estudios han mostrado que la endotoxemia producida por el LPS de *Salmonella enteritidis* causa una disminución en la absorción de agua en colon de rata; un estudio in vitro paralelo demostró que el tratamiento con LPS producía un aumento de la permeabilidad colónica, disminución de la absorción de Na<sup>+</sup> y una interrupción de la secreción epitelial mediada por AMPc (Ciancio et al., 1992).

### Transporte de nutrientes

El efecto del LPS en la absorción intestinal de nutrientes es menos conocido que su acción sobre los procesos de transporte de agua y electrolitos. En cuanto a los mecanismos de transporte de aminoácidos a través del epitelio intestinal, recientes trabajos han evidenciado que la absorción intestinal de L-leucina es inhibida por la adición al tejido de LPS de *E. coli* y que su efecto está mediado por la proteína quinasa C y el complejo calcio-calmodulina (Abad et al., 2001a; 2002a). Asimismo, se ha demostrado que la administración intravenosa de la endotoxina produce inhibición en la absorción intestinal del aminoácido siendo esta acción mediada por la citoquina TNF-alfa a través de los mediadores óxido nítrico y prostaglandinas (Abad et al., 2001b; 2002b).

En relación a la absorción de azúcares, el LPS ha sido descrito como un inhibidor de la absorción de D-glucosa en el intestino delgado de cerdo in vivo (Kanno et al., 1996). Asimismo, se ha observado inhibición en la absorción de D-glucosa y 3-o-metil D-glucosa in vivo e in vitro en conejos afectados por infección aguda con *Yersinia enterocolítica* (O Loughlin et al., 1988). Estudios han mostrado que la endotoxina en contacto directo con el tejido intestinal modifica la absorción de D-fructosa a través del yeyuno de conejo (García- Herrera et al., 2003); observándose los mismos efectos sobre la absorción intestinal del azúcar tras la administración intravenosa de TNF-alfa en conejos (García-Herrera et al., 2004).

El TNF-alfa ha sido involucrado en la disfunción mucosal intestinal inducida por el LPS (Mullin y Smock, 1990). Ensayos en sangre venosa hepática demuestran que los órganos esplácnicos son una fuente significativa de esta citoquina durante la endotoxemia (Fong et al., 1990). Además existe evidencia histológica de necrosis intestinal en ratas con shock inducido por la administración de dosis no letales de TNF-alfa recombinante humano (Tracey et al., 1986). Mueller et al., 1996, demostraron en un modelo felino que la administración sistémica de LPS y TNF-alfa causa disfunción mucosal del yeyuno proximal, por lo que se propone que esta citocina podría tener un papel primordial en la patogénesis de dicha alteración inducida por la endotoxina, y puesto que el TNF-alfa induce la liberación de diversos mediadores, éstos a su vez podrían contribuir a la disfunción mucosal producida. Se considera por tanto, que las citoquinas pueden actuar como reguladoras directas o indirectas del transporte iónico y la permeabilidad epitelial intestinal (McKay y Baird, 1999).

El TNF-alfa desempeña un papel central en la inflamación mucosal y se considera el inicio de la cascada inflamatoria en la enfermedad de Crohn en humanos (Murch et al., 1993). La regulación del TNF-alfa está interconectada con la vía de las MAPK, y en un estudio reciente en humanos con IBD se demostró que la secreción de TNF-alfa es regulada por activación de p38 MAPK y JNK (Waetzig et al., 2002)

Se ha demostrado que los tres principales miembros de la familia de las MAPK (p38 MAPK, JNK y p42/44 MAPK) controlan respuestas celulares a la inflamación in vitro. En

modelos humanos de endotoxemia experimental se ha comprobado fuerte activación, principalmente de p38 MAPK y de p42/44, después de una hora de la administración intravenosa de LPS, mientras que no fue detectada la activación de JNK bajo las mismas condiciones (Van den Blink et al., 2001). Sin embargo, en pacientes humanos con IBD se ha demostrado activación significativa de p38 MAPK, JNK1/2 y ERK1/2 (Waetzig et al., 2002).

## **6.9 Células Caliciformes y las Mucinas intestinales**

Las células caliciformes, están distribuidas entre las células de los epitelios de revestimiento, en particular los de los tractos respiratorio y gastrointestinal, secretan el moco que protege el epitelio de daños mecánicos, químicos y enzimáticos y juega un importante papel como mecanismo de defensa del huésped, generando una barrera físico-química evitando el acceso de bacterias y virus a la mucosa subyacente. Los principales componentes de moco son las Mucinas, proteínas heterogéneas, altamente glicosiladas y de alto peso molecular (Moniaux et al, 2001).

Las células caliciformes pueden secretar mucinas en respuesta a una amplia variedad de estímulos, incluyendo gases irritantes, estímulos neurológicos, especies reactivas de oxígeno, mediadores inflamatorios, alteraciones de la microbiota normal e infección bacteriana. La habilidad de las células caliciformes para responder a un amplio rango de agresiones intestinales mediante cambios en la producción y secreción de mucina, indica que estas células hacen parte de primera línea de defensa de las mucosas. (Deplancke et al, 2001, Rogers 1994). Sin embargo los mecanismos de respuesta de las células caliciformes a los diversos estímulos no están bien definidos (Deplancke et al, 2012).

Varios investigadores han demostrado la capacidad del LPS para inducir cambios morfológicos en las células caliciformes y en su proliferación en diferentes tipos de mucosa (Shimizu *et al.*, 1996; Enss *et al.*, 1996). También se comunicó que el LPS estimula la secreción de mucina in vitro en células de la vejiga urinaria (Choi *et al.*, 1999) e in vivo en epitelio de colon (Enss *et al.*, 1996), oído medio y nariz (Hunter *et al.*,

1999), y que incrementa su transcripción génica en las células epiteliales (Li *et al.*, 1997). Así, se ha encontrado que las células caliciformes actúan como células diana que responden a la estimulación de las endotoxinas bacterianas en los diferentes epitelios.

Como ya se ha mencionado las mucinas son heterogéneas, y varían en respuesta a múltiples estímulos dándole una naturaleza dinámica a la capa de moco. En los humanos se han identificado nueve genes MUC epiteliales que y se han dado avances en los mecanismos que derivan en su expresión (Gendler y Spicer 1995, Van Klinken *et al.*, 1995.) Sin embargo, múltiples estudios han hecho uso de la histoquímica, con tinciones como el azul de alcian y el PAS para valorar la expresión de las mucinas en las células caliciformes, estas tinciones permiten una valoración funcional y por medio de ellas las mucinas pueden clasificarse según su naturaleza bioquímica en neutras y ácidas, sulfatadas y no sulfatadas.

Aunque la relevancia fisiológica de los diferentes subtipos de mucina no es bien comprendida. Se sugiere que las mucinas ácidas protegen contra translocación bacteriana porque parecen ser menos degradables por glicosidasas bacterianas y proteasas del huésped (Fontaine *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 1997). Además las células caliciformes en las regiones intestinales densamente pobladas por microbios expresan mucinas ácidas predominantemente (Deplancke *et al.*, 2000). Las mucinas neutras, sin embargo, parecen responder a una naturaleza menos madura ya que este tipo de mucina se encuentra presente predominantemente en la vida fetal, y en el estómago después del nacimiento, en el intestino se observan ampliamente distribuidas, y en condiciones normales en menor número que las ácidas (Deplancke *et al.*, 2012).

## 7. Cuerpo del trabajo

El presente trabajo de investigación aportó varios productos. El primero de ellos, se formuló con unos resultados preliminares, que correspondían a una de las porciones del intestino (ileón), se escribió un resumen que fue presentado al Comité del XII Encuentro Nacional y V internacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias, ENICIP, 2013. El segundo producto corresponde a un artículo para publicar que incluye los resultados finales del trabajo. A continuación se dará cuenta de cada uno de ellos:

### 7.1 Resumen presentado al ENICIP:

#### **Histoquímica de las mucinas del ileón de lechones expuestos al lipopolisacárido de *Escherichia coli*.**

*Histochemistry of mucins ileum of piglets exposed to Escherichia coli lipopolysaccharide.*

Deny J Zapata<sup>1,4</sup>, MV, (c)MSc; Berardo de J Rodríguez<sup>2,4</sup>, MV, Esp Patol, PhD, Maria C Ramirez<sup>2,5</sup> MV, MSc, Albeiro López Herrera<sup>3,7</sup>, Zoot MV MSc DrSci; Jaime Parra Suescún<sup>3,7</sup>, Zoot MSc, PhD.

<sup>1</sup> Joven investigadora Colciencias. <sup>2</sup> Profesor, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. <sup>3</sup> Profesor, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, <sup>4</sup> Grupo de Investigación CENTAURO, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Colombia. <sup>5</sup> Grupo de Investigación en Patobiología QUIRON, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Colombia, <sup>6</sup> Grupo de Investigación BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia.

**Introducción:** Actualmente se desconoce el efecto del LPS de *Escherichia coli* sobre la población de células caliciformes y la secreción de mucinas en diferentes porciones del intestino en cerdos durante el periodo postdeste, además se desconoce si la distribución diferencial de estas mucinas tiene relación con el desarrollo de enteritis en este periodo. **Objetivo:** Determinar el efecto del LPS de *E.coli* sobre la secreción de mucinas en el intestino distal de lechones recién destetados. **Métodos:** Se realizó un estudio experimental con 52 lechones destetados a los 21 días. Los animales fueron alimentados con una dieta basal adicionada con tres niveles de LPS (0.0, 0.3, 0.5 y 1.0 µg/ml de alimento). Los cerdos se sacrificaron escalonadamente los días 1,5,7 y 10 post destete y se tomaron muestras de intestino delgado de las que fue seleccionada la porción del ileón. Estas muestras fueron procesadas y se realizaron coloraciones histoquímicas (Azul Alcían pH 1.0, 2.5 y PAS) para determinar la cantidad de células caliciformes y clasificar el tipo de mucinas por ellas producidas en ácidas sulfatadas, no sulfatadas o neutras, finalmente se realizó un análisis computarizado de imágenes. Se empleó un diseño estadístico de bloques al azar en un arreglo factorial 4x4, para el análisis se utilizaron anovas de una y dos vías del programa SPSS, y se utilizó una prueba tukey para comparar las medias de los tratamientos

( $p < 0.05$ ). **Resultados:** En los lechones alimentados únicamente con dieta basal se observó una disminución de las mucinas al día 5 y un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en los días 7 y 10 postdestete. Las mucinas neutras en cambio, presentaron un aumento para el día 5, con una posterior normalización de los parámetros para los días 7 y 10. En los lechones tratados con LPS se observó un efecto dependiente de la dosis sobre la secreción de las Mucinas ácidas, caracterizada por una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) asociado a las dosis mayores. **Conclusiones:** En este estudio se observó un efecto del destete y del LPS de *E.coli* sobre la cantidad de células caliciformes y sobre las mucinas ácidas en ileón. Los cambios observados sugieren una estrecha interacción entre el epitelio, la flora intestinal y la función protectora de las mucinas. Estos resultados evidencian la necesidad de otras investigaciones para establecer si la regulación controlada de las mucinas mediante la nutrición previene el síndrome postdeste asociado a LPS.

**Palabras Claves:** Células caliciformes, histopatología, intestino delgado, porcinos, postdeste.  
*Key words:* gobletcells, histopathology, Posweaning, swine, smallintestine.

## 7.2 Artículo para publicar:

### **Efecto del lipopolisacarido (LPS) de *E. coli* sobre la secreción de mucinas intestinales en lechones post destete.**

*Effect of E. coli lipopolysaccharide (LPS) on intestinal mucins secretion in pigs after weaning.*

Deny J Zapata<sup>1,2,4</sup>, MV0, (c)MSc; Berardo de J Rodríguez<sup>2,4</sup>, MV, Esp Patol, PhD, Maria C Ramirez<sup>2,5</sup> MV, MSc, Albeiro López Herrera<sup>3,6</sup>, Zoot MV MSc DrSci; Jaime Parra Suescún<sup>3,6</sup>, Zoot MSc, PhD.

<sup>1</sup> Joven investigadora Colciencias. <sup>2</sup> Profesor, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. <sup>3</sup> Profesor, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, <sup>4</sup> Grupo de Investigación CENTAURO, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Colombia. <sup>5</sup> Grupo de Investigación en Patobiología QUIRON, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Colombia, <sup>6</sup> Grupo de Investigación BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia.

---

#### **Resumen:**

**Introducción:** Actualmente se desconoce el efecto del LPS de *Escherichia coli* sobre la cantidad de células caliciformes y la secreción de mucinas en diferentes porciones del intestino en cerdos; además, si la distribución diferencial de estas mucinas tiene relación con el desarrollo de enteritis en el periodo postdestete. **Objetivo:** Determinar el efecto del LPS de *E. coli* sobre la secreción de mucinas en el intestino de lechones recién destetados. **Métodos:** Se realizó un estudio experimental con 52 lechones destetados a los 21 días, fueron alimentados con una dieta basal adicionada con cuatro niveles de LPS (0.0, 0.3, 0.5 y 1.0 µg/mg de alimento) durante 10 días. Los cerdos se sacrificaron los días 1,5,7 y 10 postdestete y se tomaron muestras de intestino delgado y grueso; se realizaron coloraciones histoquímicas (Azul alcian pH 1.0, 2.5 y PAS) para determinar la cantidad de células caliciformes y el tipo de mucinas por ellas producidas como ácidas sulfatadas, no sulfatadas

o neutras **Resultados:** Con respecto al número de células caliciformes que expresaron mucinas ácidas en los diferentes tiempos del periodo postdestete, se observó que tanto aquellos animales que recibieron la dieta basal como los sometidos a las dietas experimentales presentaron una disminución de la secreción de mucinas ácidas el quinto día, con posterior recuperación de los parámetros los días 7 y 10, las mucinas neutras en cambio, incrementaron el día 5 con una posterior disminución los días 7 y 10 postdeste; Al comparar las dietas experimentales, se observó una disminución del número de células caliciformes secretando los diferentes tipos de mucinas a dosis mayores de LPS, principalmente con la D2 (0.50 µg/mg de LPS). **Conclusiones:** El destete y el LPS de *E.coli* generan cambios en la secreción de mucinas, comprometiendo posiblemente su función protectora y afectan notablemente la integridad del epitelio con cambios en el número de células caliciformes; explicando algunas de alteraciones que pueden derivar en el desarrollo del síndrome de diarrea postdestete.

**Palabras Claves:** Células caliciformes, histopatología , porcinos, postdeste, intestino.

***Summary:***

**Introduction:** is currently unknown the effect of *Escherichia coli* LPS on goblet cell population and mucins secretion in different portions of the intestine of pigs and, as well as differential distribution of these mucins is relates to the development of enteritis in the postweaning period. **Objective:** determine the effect of *E. coli* LPS on mucins secretion in the intestine of newly weaned piglets. **Methods:** We conducted an experimental study with 52 piglets weaned at 21 days, were fed a basal diet supplemented with four levels of LPS (0.0, 0.3, 0.5 and 1.0 mg / mg of food) for 10 days. Pigs were sacrificed 1,5,7 and 10 days after weaning, and samples of small and large intestine were taken ; histochemical stainings were made (Alcian blue pH 1.0, 2.5 and PAS) to determine the number of goblet cells and the mucin type of produced by them how acidic, sulfated or unsulfated and neutral mucins. **Results:** respect to the number of goblet cells expressing acidic mucin in different times postweaning period, it was observed that those animals that received both the basal diet as those undergoing experimental diets showed a decrease of acidic mucin secretion the fifth day, with subsequent recovery of the parameters on days 7 and 10, whereas neutral mucins, increased on day 5 with a subsequent decrease from 7 to 10 postdeste; When comparing

diets experiments, we observed a decrease in the number of goblet cells to secrete mucins different types of LPS at higher doses, mainly with D2 (0.50 ug / mg of LPS).

**Conclusions:** Weaning and *E. coli* LPS generate changes in mucin secretion, possibly compromising its protective function and affects significantly the integrity of the epithelium with changes in the goblet cells number , explaining some of abnormalities that can lead to the development postweaning diarrhea syndrome.

**Key words:** gobletcells, histopathology, intestine, posweaning , swine.

### **Introducción:**

Durante el periodo postdestete se han descrito numerosas alteraciones en el epitelio intestinal que afectan su función absorptiva y predisponen al desarrollo de enteritis derivando en pérdida de peso y altas tasas de mortalidad.(Campabadal *et al.*, 1994; Pluske, 1997 y 2003; Reis *et al.*, 2007). Durante este periodo el intestino presenta cambios morfológicos e histológicos, tales como: atrofia de las vellosidades, aumento de la profundidad de las criptas y lesión de la barrera epitelial. (Parra *et al.*, 2011)

El epitelio gastrointestinal está cubierto por un moco protector compuesto predominantemente por mucinas, glicoproteínas que son sintetizadas y secretadas por las células caliciformes y que según su naturaleza bioquímica son clasificadas en mucinas neutras y ácidas, sulfatadas y no sulfatadas; éstas constituyen

un importante mecanismo de la respuesta inmunológica y su secreción se ha asociado a diferentes condiciones fisiológicas y patológicas. (Enss *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997)

En el lumen intestinal existe una estrecha relación entre bacterias Gram positivas (lactobacilos *sp*, *Staphylococcus sp*, y *Streptococcus sp*) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*); estas poblaciones bacterianas pueden incrementar la expresión de genes que determinan la composición proteica y naturaleza bioquímica de las mucinas secretadas por la células caliciformes (Vente *et al.*, 2001). El destete precoz 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, (Fan, 2002; García *et al.*, 2003; Zhenfeng *et al.*, 2008). 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 mucosa (Shimizu *et al.* 1996; Enss *et al.*, 1996).

Por todo lo anterior y considerando que un estudio reciente conducido por este grupo de trabajo (Parra *et al.*, 2011) mostró la capacidad del LPS de *E. coli* para inducir cambios en la arquitectura de las vellosidades y de las glándulas del intestino delgado de lechones post destete, buscamos evaluar el efecto LPS de *E. coli* sobre el número de células caliciformes y los tipos de mucinas por ellas producidas durante este periodo. La valoración de estos cambios es importante para comprender los mecanismos causantes de las alteraciones estructurales y funcionales en el intestino postdeste y facilitar el desarrollo de alternativas integrales de manejo, prevención y control.

## **Materiales y Métodos**

### ***Consideraciones éticas***

Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo a las guías propuestas por “The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals” (CIOMS, 1985). Los procedimientos experimentales efectuados con los animales fueron avalados por El Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (CEMED 001 del 26 de Enero de 2009).

### ***Ubicación***

El trabajo de campo se llevó a cabo en el Centro San Pablo de la Universidad Nacional de Colombia, Medellín, ubicado en el municipio de Rionegro, a una altitud de 2.100 metros sobre el nivel del mar, con temperaturas medias entre 12 y 18 °C, lo correspondiente a un área de bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB).

### ***Tipo de estudio***

Se realizó un estudio experimental con un diseño de bloques al azar (dos cuadras), en un arreglo factorial 4x4 (cuatro dietas experimentales y cuatro momentos del

período postdeste) (Steel y Torrie, 1985). A cada animal se le asignó uno de los 16 tratamientos, y cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones.

Los animales se sacrificaron a los días 1, 5, 7 y 10 postdeste. Las dietas experimentales consistieron en: una dieta control (dieta basal), y otras tres que contenían LPS de *E. coli*, serotipo 0111: B4 (Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), de la siguiente manera:

1. Dieta Basal (BD): sin LPS.
2. Dieta 1 (D1): BD más 0,3 mg de LPS / mg de alimento.
3. Dieta 2 (D2): BD más 0,5 mg de LPS / mg de alimento.
4. Dieta 3 (D3): BD más 1,0 mg de LPS / mg de alimento.

### ***Animales y dieta***

Se seleccionaron 52 cerdos, cruce de Duroc x Landrace que fueron destetados a los 21 días de vida, con un peso  $6,5 \pm 0,5$  kg. Los cerdos destetados fueron agrupados en grupos de ocho, con agua a voluntad, y con una temperatura controlada de  $26 \pm 3$  °C. la dieta básica consistía en leche y subproductos y fue enriquecida con vitaminas, minerales y lisina- HCL. Las dietas se formularon para cumplir con el

mínimo requisitos nutricionales propuestos por el NRC.

Las dietas experimentales fueron administradas durante los 10 primeros días del destete. Se suministraron 300 gr/día de alimento y se ofreció alimento adicional cuando fue necesario. Durante la lactancia los lechones no recibieron alimento sólido.

### ***Toma de muestras del intestino***

El sacrificio de los animales se realizó escalonadamente a los días 1, 5, 7 y 10 de periodo postdeste. Los animales fueron sedados por inhalación de dióxido de carbono durante 3 minutos y luego sacrificados por exsanguinación; luego fueron colocados en decúbito dorsal, se realizó una incisión abdominal y se retiró el intestino. Fueron identificadas las secciones (duodeno, yeyuno, íleon e intestino grueso) y se tomaron muestra de igual tamaño; se eliminó el contenido lavando con infusión de solución salina fría como se ha descrito previamente por Makkink et al. (1994), y Reis et al. (2005). Entonces, se tomarón submuestras de 1cm. Las muestras se conservaron en formalina tamponada al 10%.

### ***Procesamiento histotécnico***

Las muestras fueron procesadas y analizadas en el Laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Antioquia.

Los tejidos se cortaron a 4 micras de espesor, de cada muestra de intestino se montaron 3 placas para realizar tinciones histoquímicas e identificar los diferentes tipos de mucinas, así (figura 1):

Azul alcian pH1.0 – Mucinas ácidas intensamente sulfatadas

Azul de alcian pH 2.5 – Mucinas ácidas no Sulfatadas

PAS – Mucinas Neutras

### ***Evaluación microscópica y análisis morfológico de imágenes***

La evaluación cuantitativa de los cortes histológicos se realizó de la siguiente manera: para la identificación de las zonas tisulares se empleó un microscopio óptico Leica DMLB (Meyer Instruments, Houston, TX, USA), luego se capturaron las imágenes correspondientes con una cámara para microscopía digital instantánea Leica EC3 (Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) con resolución de tres megapíxeles, en aumentos de 200x, después se analizaron dichas imágenes con el programa de computador para tratamiento de imágenes ZEN (blue edition, Carl Zeiss,

2011) determinando un área circular de medida de 200µm y se realizaron 6 mediciones por pliegue circular de la mucosa así: 2 en el vértice, 2 en cada lado y 2 en el fondo; en cada caso, la primera en la porción de la vellosidad y la segunda en la glándula de la mucosa intestinal con el fin de valorar su distribución. Finalmente, se realizó un conteo semiautomático de las células caliciformes positivas a cada una de las tinciones.

### ***Análisis Estadístico***

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un modelo lineal general multivariado con el programa estadístico SPSS (versión 19, 2010) y se utilizó un test de Duncan para comparar las medias de los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### ***Resultados***

Durante el experimento, los cerdos alimentados con la dieta basal mostraron un buen estado de salud, mientras aquellos que recibieron dieta con adición de LPS a diferentes dosis mostraron aumento esporádico de la temperatura rectal (por encima de 38 ° C). Sin embargo, ninguno de los animales evidenció signos de enfermedad que obligara a su exclusión o sacrificio; en ningún caso se observó rechazo de la dieta.

Este estudio comparó inicialmente los datos obtenidos de los animales alimentados con la dieta basal (DB) con respecto a los días postdeste. El número de células caliciformes secretando mucinas ácidas sulfatadas y no sulfatadas mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los días 1 y 5 con respecto a los días 7 y 10 postdeste, mostrando una disminución hacia el quinto día postdeste, con una posterior recuperación de los parámetros para los días 7 y 10 (Tabla 1).

**Tabla 1. Efecto del tiempo del destete sobre la secreción de mucinas intestinales en cerdos alimentados con dieta basal (Efecto del destete).**

Variables	Periodo Postdeste				DS	EEM
	1	5	7	10		
<b>INTESTINO DELGADO</b>						
<b>Duodeno</b>						
MAS	335,8	308,5 <sup>a</sup>	362 <sup>a</sup>	366,75 <sup>a</sup>	26,4	6,6
MANS	342 <sup>a</sup>	300 <sup>a</sup>	354,5 <sup>a</sup>	358,75 <sup>a</sup>	26,3	6,6
MN	270,25 <sup>a</sup>	412,25 <sup>ab</sup>	357,25 <sup>ab</sup>	375,75 <sup>a</sup>	57,0	14,3
<b>Yeyuno</b>						
MAS	413 <sup>a</sup>	351,5 <sup>a</sup>	432,5 <sup>a</sup>	446,5 <sup>a</sup>	41,8	10,4
MANS	388 <sup>a</sup>	333,8 <sup>a</sup>	402,3 <sup>a</sup>	399,5 <sup>a</sup>	30,4	7,6
MN	289,8 <sup>a</sup>	380,8 <sup>a</sup>	351 <sup>a</sup>	365,5 <sup>a</sup>	37,5	9,4
<b>Ileon</b>						
MAS	413 <sup>a</sup>	336,3 <sup>a</sup>	427,5 <sup>a</sup>	437,8 <sup>a</sup>	47,3	11,8
MANS	387 <sup>b</sup>	362,8 <sup>a</sup>	436 <sup>ab</sup>	427,8 <sup>ab</sup>	28,4	7,1
MN	345,8 <sup>ab</sup>	425,8 <sup>a</sup>	377,8 <sup>ab</sup>	413,5 <sup>b</sup>	39,0	9,7
<b>INTESTINO GRUESO</b>						
MAS	433,5 <sup>b</sup>	408,75 <sup>a</sup>	475,5 <sup>ab</sup>	524,8 <sup>ab</sup>	49,6	12,4
MANS	431,75 <sup>b</sup>	390,8 <sup>a</sup>	448,8 <sup>ab</sup>	528,5 <sup>ab</sup>	54,8	13,7
MN	385,25 <sup>ab</sup>	478,5 <sup>a</sup>	388,5 <sup>ab</sup>	463,75 <sup>ab</sup>	45,4	11,4

MAS: Mucinas Acidas Sulfatadas

MANS: Mucinas Acidas no Sulfatadas

MN: Mucinas Neutras

<sup>ab</sup> Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )

DS: Desviación Estándar

EEM: Error estándar de la media

Las mucinas neutras en cambio, presentaron una tendencia inverso, incrementando el quinto día, con una posterior disminución para los días 7 y 10, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los días evaluados ( $p < 0,05$ ). Al comparar el efecto del tiempo postdeste en las dietas adicionadas con las diferentes dosis de LPS, se observó que el número de las células caliciformes y los tipos de mucinas secretadas presentaron una tendencia similar a lo descrito anteriormente para la dieta basal con respecto a los días 1, 5, 7 y 10 (Tabla 2).

**Tabla 2. Efecto del tiempo del destete sobre la secreción de mucinas intestinales en los cerdos que recibieron las dietas experimentales**

Variables	Periodo Postdeste				DS	EEM
	1	5	7	10		
<b>INTESTINO DELGADO</b>						
<b>Duodeno</b>						
MAS	335,8	315,7 <sup>a</sup>	329,4	335,9 <sup>a</sup>	32,7	8,2
MANS	342 <sup>a</sup>	282,9 <sup>ab</sup>	324,3 <sup>ab</sup>	331,3 <sup>ab</sup>	34,9	8,7
MN	270,3 <sup>a</sup>	337,8 <sup>a</sup>	320,1 <sup>a</sup>	339,9 <sup>a</sup>	45,9	11,5
<b>Yeyuno</b>						
MAS	413 <sup>a</sup>	346,2 <sup>ab</sup>	388,5 <sup>ab</sup>	403 <sup>b</sup>	47,6	11,9
MANS	388 <sup>a</sup>	319,3 <sup>ab</sup>	371,5 <sup>ab</sup>	374,4 <sup>b</sup>	37,2	9,3
MN	289,8 <sup>a</sup>	327 <sup>a</sup>	309,7 <sup>a</sup>	337,3 <sup>a</sup>	45,1	11,3
<b>Ileon</b>						
MAS	413 <sup>a</sup>	339,3 <sup>a</sup>	394,8 <sup>a</sup>	400,4 <sup>a</sup>	61,9	15,5
MANS	387 <sup>a</sup>	354,9 <sup>a</sup>	394,9 <sup>a</sup>	418,9 <sup>a</sup>	46,7	11,7
MN	345,8 <sup>a</sup>	376,9 <sup>ab</sup>	341,3 <sup>b</sup>	379,3 <sup>ab</sup>	41,6	10,4
<b>INTESTINO GRUESO</b>						
MAS	433,5 <sup>ab</sup>	384,1 <sup>a</sup>	390,8 <sup>b</sup>	484,1 <sup>ab</sup>	67,2	16,8
MANS	431,8 <sup>a</sup>	371,6 <sup>a</sup>	382,6 <sup>a</sup>	482,1 <sup>a</sup>	71,6	17,9
MN	385,3 <sup>a</sup>	407,3 <sup>a</sup>	331,9 <sup>a</sup>	448,4 <sup>a</sup>	72,7	18,2

MAS: Mucinas Acidas Sulfatadas

MANS: Mucinas Acidas no Sulfatadas

Para las mucinas ácidas se observó una disminución al día 5 y una posterior recuperación, y de manera contraria las mucinas neutras, se incrementaron al día 5 con una posterior disminución.

Al comparar el efecto de la dosis de LPS en el número de células caliciformes secretando los diferentes tipos de mucinas (Tabla 3), se observó un efecto deletéreo, dependiente de la concentración de LPS suministrada, principalmente sobre las mucinas ácidas, asociada a dosis mayores de LPS. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en todos los casos de la D2 y D3 con respecto a DB y D1, Sin embargo, la D2 fue la que presentó las mayores diferencias (Figura 1).

Adicionalmente, cuando se comparó la secreción de las mucinas en la vellosidad y la glándula de la mucosa intestinal, en todas las porciones de intestino se encontró que el número de células caliciformes que secretaban mucinas ácidas y neutras fue considerablemente menor a nivel de la vellosidad y este cambio se agudizó al día 5 del periodo postdeste (Tabla 4, Figura 1).

**Tabla 3. Efecto de la dosis de LPS sobre el número de células caliciformes que secretaron los diferentes tipos de mucinas en intestinos de lechones postdeste**

Variables	Periodo Postdeste				DS	EEM
	DB	D1	D2	D3		
<b>INTESTINO DELGADO</b>						
<b>Duodeno</b>						
MAS	343,3 <sup>ac</sup>	345,3 <sup>b</sup>	289,5 <sup>abc</sup>	327,3 <sup>ab</sup>	32,7	8,2
MANS	338,8 <sup>a</sup>	327,7 <sup>a</sup>	274,5 <sup>a</sup>	311,3 <sup>a</sup>	34,9	8,7
MN	353,9 <sup>ab</sup>	313,6 <sup>a</sup>	306,1 <sup>ab</sup>	329 <sup>a</sup>	45,9	11,5
<b>Yeyuno</b>						
MAS	410,9 <sup>a</sup>	404,3 <sup>b</sup>	322,2 <sup>ab</sup>	380,3 <sup>ab</sup>	47,6	11,9
MANS	380,9 <sup>a</sup>	372,5 <sup>b</sup>	315,3 <sup>ab</sup>	354,1 <sup>a</sup>	37,2	9,3
MN	346,8 <sup>a</sup>	349,4 <sup>b</sup>	257,6 <sup>ab</sup>	325,8 <sup>a</sup>	45,1	11,3
<b>Ileon</b>						
MAS	403,6 <sup>a</sup>	416 <sup>b</sup>	298,3 <sup>abc</sup>	397,8 <sup>c</sup>	61,9	15,5
MANS	403,4 <sup>a</sup>	415,8 <sup>b</sup>	335,8 <sup>ab</sup>	397,8 <sup>b</sup>	46,7	11,7
MN	390,7 <sup>a</sup>	355,3	340 <sup>a</sup>	362,5	41,6	10,4
<b>INTESTINO GRUESO</b>						
MAS	460,6 <sup>a</sup>	450,2 <sup>b</sup>	346,5 <sup>ab</sup>	412,3 <sup>ab</sup>	67,2	16,8
MANS	449,9 <sup>a</sup>	446,5 <sup>b</sup>	330,5 <sup>ab</sup>	415,3 <sup>ab</sup>	71,6	17,9
MN	429 <sup>a</sup>	424,4 <sup>b</sup>	318,9 <sup>ab</sup>	396,4 <sup>ab</sup>	72,7	18,2

MAS: Mucinas Ácidas Sulfatadas

MANS: Mucinas Ácidas no Sulfatadas

MN: Mucinas Neutras

<sup>abc</sup> Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )

DS: Desviación Estándar

EEM: Error estándar de la media

**Tabla 4. Efecto del tiempo postdeste sobre la distribución de las mucinas en la vellosidad y la glándula del intestino delgado y grueso de cerdos sometidos a las dietas experimentales**

Variables		Periodo Postdeste				DS	EEM	
		1	5	7	10			
<b>Duodeno</b>	Vellosidad	155 <sup>a</sup>	122,8 <sup>a</sup>	128,4	131,5	15,8	3,9	
	<b>MAS</b>	Glándula	194,8	185,8 <sup>a</sup>	201,0	204,4 <sup>a</sup>	23,5	5,9
	Total	335,8	308,5 <sup>a</sup>	362 <sup>a</sup>	366,8 <sup>a</sup>	26,4	6,6	
<b>MANS</b>	Vellosidad	141,8 <sup>a</sup>	115,7 <sup>a</sup>	129,3	129,1	16,5	4,1	
	Glándula	200,3 <sup>a</sup>	167,2 <sup>a</sup>	194,7 <sup>a</sup>	202,2 <sup>a</sup>	24,2	6,1	
	Total	342 <sup>a</sup>	300 <sup>a</sup>	354,5 <sup>a</sup>	358,8 <sup>a</sup>	26,3	6,6	
<b>MN</b>	Vellosidad	115,3 <sup>a</sup>	128,1 <sup>a</sup>	131,5 <sup>a</sup>	138,7 <sup>a</sup>	12,1	3,0	
	Glándula	155 <sup>a</sup>	209,8 <sup>a</sup>	188,6 <sup>a</sup>	201,2 <sup>a</sup>	31,0	7,7	
	Total	270,3 <sup>a</sup>	412,3 <sup>ab</sup>	357,3 <sup>ab</sup>	375,8 <sup>a</sup>	57,0	14,3	
<b>Yeyuno</b>	Vellosidad	185 <sup>a</sup>	143,1 <sup>a</sup>	164,9 <sup>a</sup>	165,9 <sup>a</sup>	25,5	6,4	
	<b>MAS</b>	Glándula	228,0	203,1 <sup>a</sup>	224,8	236,9 <sup>a</sup>	31,6	7,9
	Total	413 <sup>a</sup>	351,5 <sup>a</sup>	432,5 <sup>a</sup>	446,5 <sup>a</sup>	41,8	10,4	
<b>MANS</b>	Vellosidad	166,8	142,0	152,8	157,8	17,4	4,3	
	Glándula	221,3 <sup>a</sup>	178,6 <sup>a</sup>	218,7 <sup>a</sup>	216,6 <sup>a</sup>	33,6	8,4	
	Total	388 <sup>a</sup>	333,8 <sup>a</sup>	402,3 <sup>a</sup>	399,5 <sup>a</sup>	30,4	7,6	
<b>MN</b>	Vellosidad	109,5 <sup>a</sup>	138,3 <sup>a</sup>	131,3	141,1 <sup>a</sup>	25,4	7,6	
	Glándula	185,3	188,3	179,7	194,8	26,8	6,4	
	Total	289,8 <sup>a</sup>	380,8 <sup>a</sup>	351 <sup>a</sup>	365,5 <sup>a</sup>	37,5	6,7	
<b>Ileon</b>	Vellosidad	191 <sup>a</sup>	146,6 <sup>a</sup>	170,9	170,7	32,8	9,4	
	<b>MAS</b>	Glándula	222,0	192,7 <sup>a</sup>	223,9	229,4 <sup>a</sup>	36,2	8,2
	Total	413 <sup>a</sup>	336,3 <sup>a</sup>	427,5 <sup>a</sup>	437,8 <sup>a</sup>	47,3	9,0	
<b>MANS</b>	Vellosidad	149,5 <sup>b</sup>	153,8 <sup>a</sup>	175,3 <sup>ab</sup>	187 <sup>ab</sup>	27,7	11,8	
	Glándula	237,5 <sup>a</sup>	203,6 <sup>a</sup>	220,3	232 <sup>a</sup>	28,9	6,9	
	Total	387 <sup>b</sup>	362,8 <sup>a</sup>	436 <sup>ab</sup>	427,8 <sup>ab</sup>	28,4	7,2	
<b>MN</b>	Vellosidad	140,8 <sup>a</sup>	157,4 <sup>a</sup>	144,3	169,7 <sup>a</sup>	23,5	7,1	
	Glándula	205,0	219,5	197,6	209,6	25,7	5,9	
	Total	345,8 <sup>ab</sup>	425,8 <sup>a</sup>	377,8 <sup>ab</sup>	413,5 <sup>b</sup>	39,0	9,7	
<b>INTESTINO GRUESO</b>								
<b>MAS</b>	Vellosidad	182,0	156,5	165,6	204,2	33,6	8,4	
	Glándula	251,5	227,6	224,8	279,9	40,0	10,0	
	Total	433,5 <sup>b</sup>	408,8 <sup>a</sup>	475,5 <sup>ab</sup>	524,8 <sup>ab</sup>	49,6	12,4	
<b>MANS</b>	Vellosidad	187,8 <sup>a</sup>	163,6 <sup>a</sup>	167,2	200,8 <sup>a</sup>	32,8	8,2	
	Glándula	243,8 <sup>a</sup>	208 <sup>a</sup>	215,4	281,3 <sup>a</sup>	44,3	11,1	
	Total	431,8 <sup>b</sup>	390,8 <sup>a</sup>	448,8 <sup>ab</sup>	528,5 <sup>ab</sup>	54,8	13,7	
<b>MN</b>	Vellosidad	179,0	179,7	136,9	191,7	35,0	8,8	
	Glándula	206,3	230,1 <sup>a</sup>	194,9 <sup>a</sup>	255,7 <sup>a</sup>	43,4	10,8	
	Total	385,3 <sup>ab</sup>	478,5 <sup>a</sup>	388,5 <sup>ab</sup>	463,8 <sup>ab</sup>	45,4	11,4	

MAS: Mucinas Acidas Sulfatadas

MANS: Mucinas Acidas no Sulfatadas

MN: Mucinas Neutras

<sup>ab</sup> Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)

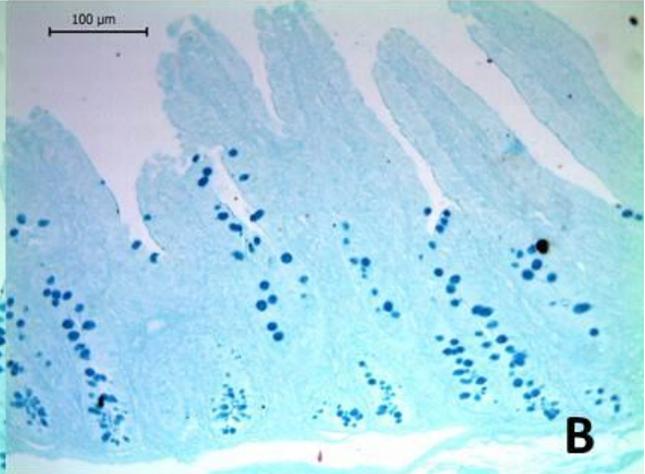
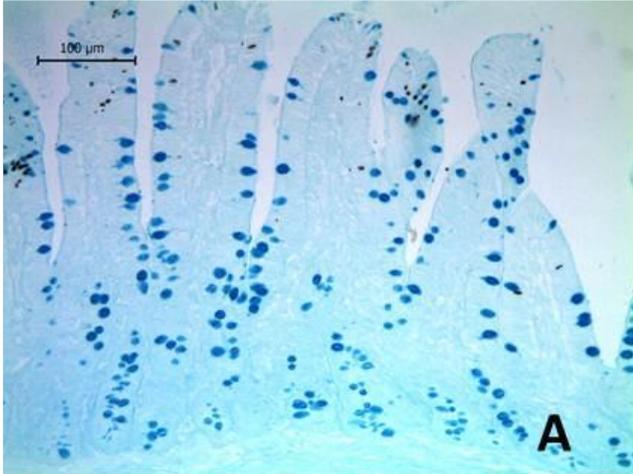
DS: Desviación Estándar

EEM: Error estándar de la media

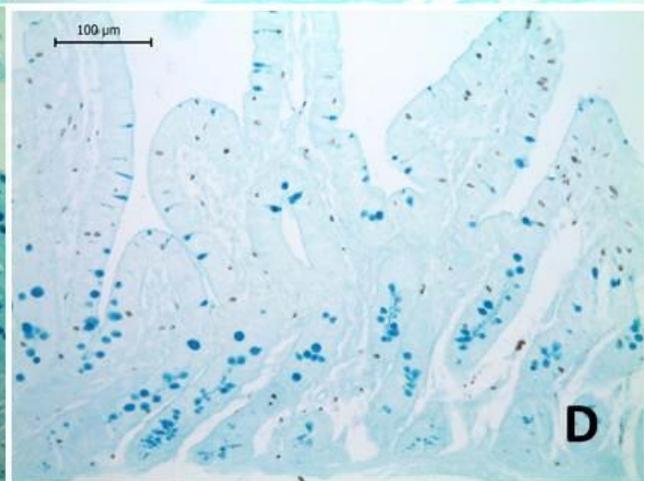
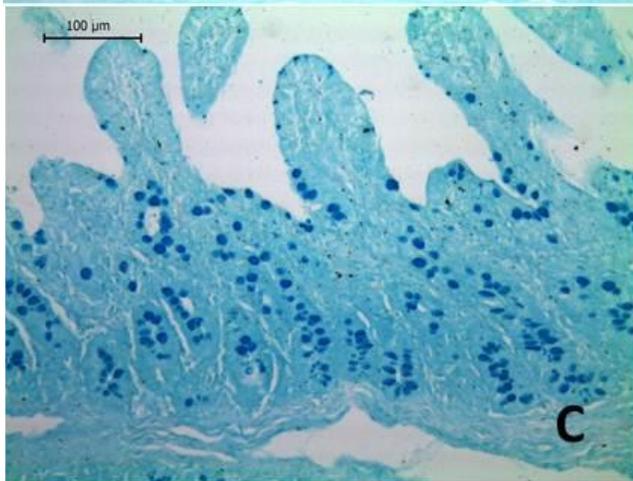
Dieta Basal

Dieta con Adición de LPS (D2)

A  
A  
p  
H  
1.0



A  
A  
p  
H  
2.5



P  
A  
S



**Figura 1.** Tinciones histoquímicas en intestino delgado, porción distal, Día 5 postdeste. **A.** Tinción AA pH 1.0, DB. **B.** Tinción AA pH 1.0, D2. **C.** Tinción AA pH 2.5, DB. **D.** Tinción AA pH 2.5, D2. **E.** Tinción PAS, DB. **F.** Tinción PAS, D2.

### ***Discusión:***

En el presente estudio se evidenció que el destete en los cerdos genera cambios en la secreción de Mucinas intestinales en las diferentes porciones de intestino delgado y grueso; Al evaluar la cantidad y tipos de mucinas secretado por las células caliciformes en lechones alimentados con una dieta basal (DB) se observó que las mucinas ácidas, sulfatadas y no sulfatadas, tienden a disminuir hacia el día 5 postdeste, con un posterior aumento hacia los días 7 y 10.

Estos hallazgos son similares a los descritos por otros investigadores (Dunsford *et al.*, 1991, Nabuurs *et al.*, 1993 Hedemann *et al.*, 2003) que sugieren que el número de células caliciformes en la mucosa intestinal disminuyen al inicio del destete; luego, hay una recuperación del crecimiento que se produce entre 5-8 días, para volver a los niveles normales entre los 9-14 días después del destete. Vente-Spreuwenberg *et al.*, 2004.)

La disminución observada de la secreción de mucinas ácidas al inicio del destete puede asociarse con los cambios en la citoarquitectura intestinal que han sido reportados para este periodo como: la

disminución de la altura y el área de las vellosidades y aumento en su ancho, así como la profundidad y ancho de las glándulas intestinales. (Nabuurs *et al.*, 1993; Parra *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2005). Estos cambios reflejan lesión epitelial, principalmente necrosis, que pueden ocasionar pérdida de células caliciformes que estarían expresando este tipo de mucina.

Se ha sugerido que las mucinas ácidas sulfatadas y no sulfatadas estarían involucradas en la protección frente a enfermedades entéricas en los lechones. (Strous *et al.*, 1992, Brunsgaard, 1997), por lo que un detrimento en la cantidad de células caliciformes secretando este tipo de mucinas en la mucosa intestinal tendría implicaciones en la protección de la mucosa y aumentaría susceptibilidad a infecciones entéricas como se ha observado en el destete.

Al evaluar el efecto del LPS, comparando las dietas experimentales en los diferentes días del periodo postdeste, observamos que tal como se reportó con la dieta basal, hay una disminución del número de células caliciformes secretando mucinas ácidas, sulfatadas y no sulfatadas para el día 5, y una posterior normalización de los parámetros para los días 7 y 10. Adicionalmente se comparó la distribución de las células

caliciformes en la mucosa, observando que las variaciones se dan predominantemente a nivel de la vellosidad.

Es posible que la disminución observada para el día 5 en las mucinas ácidas en los animales sometidos a las diferentes dietas experimentales esté asociada a los cambios en la cito-arquitectura intestinal como ya se ha mencionado, y que acarrea lesión del epitelio que puede afectar notablemente el número de células caliciformes secretando mucinas ácidas.

Lo anterior, es consistente con lo observado al comparar la distribución de las células caliciformes en la mucosa, ya que como se reportó, hay una notable disminución del número de células caliciformes principalmente a nivel de la vellosidad, porción de la mucosa que estaría más expuesta a los estímulos lesivos desde el lumen intestinal.

Sin embargo, el intestino puede responder al daño incrementando la tasa de renovación epitelial. (Gaskins, 1997). Por lo que se evidencia una recuperación del número de células caliciformes secretando mucinas ácidas para los días 7 y 10 del periodo postdeste.

Al evaluar la secreción de mucinas neutras en los diferentes días postdestete observamos que hay un incremento para el día 5, contrario a lo que sucede con las mucinas ácidas. Esto puede relacionarse inicialmente con su naturaleza menos madura, ya que este tipo de mucina se encuentra presente predominantemente en la vida fetal, y en el estómago después del nacimiento, en el intestino se observan ampliamente distribuidas, y en condiciones normales en menor número que las ácidas (Deplancke *et al.*, 2012). Las células caliciformes se diferencian desde células madre del endodermo que se encuentran profundamente en las criptas y cuando maduran migran a la superficie de la vellosidad (Dunsford *et al.*, 1991)

Por lo anterior, podemos sugerir que su aumento en el periodo postdeste se observa ligado a la alteración de la vellosidad y profundidad de las glándulas, lo que puede afectar la diferenciación y la maduración normal de las células caliciformes.

Cuando se evaluó el efecto del LPS comparando la dieta basal y las dietas experimentales, se observó un efecto deletéreo dependiente de la dosis de LPS el número de células caliciformes y la

secreción de los diferentes tipos de mucinas, especialmente la dieta D2. Mostrando de esta manera que el LPS potencia el efecto del destete sobre el número de células caliciformes en el intestino de los cerdos.

Estos resultados son consistentes con lo reportado por otros investigadores que han demostrado que las alteraciones en la flora intestinal durante el destete puede influenciar la composición de las mucinas en las células epiteliales (Sharma *et al.*, 1995; sharma and Schumacher., 1995; Brown *et al.*, 2006). Durante el destete se observan aumentos significativos en el número de coliformes potencialmente patógenas, así como *E. coli* hemolítica y rotavirus (hampson *et al.*, 1985), y la invasión del intestino por este tipo de patógenos puede ocasionar daño de células epiteliales. (Gaskins, 1997).

Se puede sugerir que el mayor efecto del LPS no se observó precisamente con la D3 de mayor concentración de LPS debido a que esta dosis pudo afectar desde el inicio el consumo de los animales, reflejando efectos menores a la evaluación final, o también, puede sugerirse que con esta dosis podrían saturarse los múltiples receptores que median la señalización celular inducida por LPS, que ya han sido identificados en otras investigaciones. (Gomes *et al.*, 2010, Yang *et*

*al.*, 1998)

Por lo descrito anteriormente, con el presente estudio se evidenció que el LPS de *E. coli* genera un efecto deletéreo en la secreción de todos los tipos de mucinas desde las células caliciformes en el intestino delgado grueso de los lechones; estos cambios pueden afectar la integridad de la mucosa intestinal, alterando la barrera física que constituye el moco, perturbando las interacciones con la flora residente en el lumen intestinal.

De este estudio se concluye que el LPS de *E.coli* potencia el efecto del destete en el intestino de los cerdo, generando no solo alteraciones morfológicas reflejadas en el número de células caliciformes y su distribución en la mucosa, sino que causa también alteraciones en la fisiología intestinal, evidente como variaciones en los tipos de mucinas secretadas durante el periodo postdeste.

Lo anterior es un indicador de la estrecha interacción que existe entre el epitelio y la flora intestinal y, de cómo los cambios asociados a la secreción de mucinas pueden comprometer su función protectora en la mucosa intestinal y la interacción bacteria-hospedador, dando paso a la presentación de enteritis y septicemia durante el periodo postdeste.

Los resultados obtenidos en este estudio aportan información para comprender el papel de las mucinas en el mantenimiento de la integridad intestinal durante el destete. Estos hallazgos sustentan la necesidad de realizar futuras investigaciones, que permitan avanzar y profundizar en la comprensión de los mecanismos involucrados para mantener regulada la secreción de las mucinas intestinales. Este conocimiento podría ayudar a diseñar estrategias de prevención y control de las enfermedades asociadas con este periodo crítico de la producción porcina.

### ***Agradecimientos***

Los autores agradecen el apoyo valioso para la realización del estudio a la bacterióloga María Idalba Morales y al personal del Laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Antioquia, a la Convocatoria Jóvenes investigadores de Colciencias 2011 y a la estrategia de sostenibilidad 2013 – 2014 de la Universidad de Antioquia por los recursos asignados.

### ***Referencias***

Amador P, Garcia-Herrera J, Marca MC, de la Osada J, Acin S, Navarro MA, Salvador MT, Lostao MP and Rodriguez-Yoldi MJ. Intestinal D-galactose transport in an endotoxemia model in the rabbit. *J Membr*

*Biol* 2007; 2153:125-133

Arbeláez G, Calderón D, Rincón M, Ángela L, Mercado M. Implementación de dos metodologías diagnósticas para la determinación del virus de la influenza porcina. *Universitas Scientiarum* 2008;13:65-74.

Bolduan, G., 1999. Feeding weaner pigs without in-feed antibiotics. *Biotechnology in the feed industry*. In: Lyons, T.P., Jacques, K.A. (Eds.), *Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 223–230.

Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., Braesco, V., 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine”. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 675–683.

Brunsgaard, G., 1997. Morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and crypt fission in cecum and colon of growing pigs. *Dig. Dis. Sci.* 42, 2384–2393.

Brown, D.C., Maxwell, C.V., Davis, M.E., Singh, S., 2002a. Effect of segregated early weaning on growth performance and immune parameters. *J. Anim. Sci.* 80 (Suppl. 1), 197 (Abstract).

Campabadal CM, Navarro H. Manejo y alimentación del lechón pre y postdestete. Asociación Americana de Soya. A.N. 1994; N°. 92:21 p.

Castillo JM, Chacón JA, Cortes LE, Gonzáles MY. Diagnóstico de circovirus porcino por histopatología e historia clínica en piaras del área metropolitana de Bucaramanga. Rev. Colomb Cienc Pecu 2007; 20:656-657.

Cohen, P.S., Rossoll, R., Cabelli, V.J., Yang, S.L., Laux, D.C., 1983. Relationship between the mouse colonizing ability of a human fecal *Escherichia coli* strain and its ability to bind a specific mouse colonic mucous gel protein. Infect. Immun. 40, 62–69.

Deplancke B, Gaskins, HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. Am J Clin Nutr 2012;73(suppl):1131S–41S.

Dunsford B, Haensly W, Knabe D. 1991. Effects of diet on acidic and neutral goblet cell populations in the small intestine of early weaned pigs. Am. J. Vet. Res. 52, 1743 - 1746.

Enss ML, Schmidt-Wittig U, Muller H. Mai UE, Coenen M, Hedrich HJ. Response of germfree rat colonic mucous cells to peroral endotoxin application. Eur. J. Cell Biol 1996;

71: 99–104

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

García-Herrera J, Abad B, Rodríguez-Yoldi MJ. Effect of lipopolysaccharide on D-fructose transport across rabbit jejunum. Inflammation Research. 2003; 52: 177-184.

Gaskins, H.R., 1997. Immunological aspects of host/microbiota interactions at the intestinal epithelium. In: Mackie, R., White, nB.A., Isaacson, R.E. (Eds.), Gastrointestinal Microbiology. Chapman & Hall, New York, NY, p. 537.

Gomes N, Brunialti M, Mendes M, Freudenberg M, Galanos C, Salomão R. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. Braz J Med Biol Res, September 2010, Volume 43(9) 853-859

Hampson, D.J., Hinton, M., Kidder, D.E., 1985. Coliform numbers in the stomach and small intestine of healthy pigs following weaning at three weeks of age. J. Comp. Pathol. 95, 353–362.

Hedemann MS, Hojsgaard s, Jensen BB. Small intestine morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2003; 87:32-41.

Hedemann MS, Eskildsen M, Lærke HN, Pedersen CJ, Lindberg E, Laurinen P, Bach KE. Fiber concentrations and ber properties Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting. *J Anim Sci* 2006; 84:1375-1386.

Hunter SE, Singla AK, Prazma J, Jewett BS, Randell SH. H.C. Pillsbury 3rd, Mucin production in the middle ear in response to lipopolysaccharides, *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1999; 120: 884–888.

Kindon, H., Pothoulakis, C., Thim, L., Devaney, K., Podolsky, D.K., 1995. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology* 109, 516–523.

Li JD, Dohrman AF, Gallup M, Miyata S, Gum JR, Kim YS, Nadel JA, Prince A., Basbaum CB. Transcriptional activation of mucin by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94: 967–972.

Lessard M, Dupuis M, Gagnon N, Nadeau É, Fairbrother J. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *J ANIM SCI*, 2009; 87 N.3: 922-934.

Mantle, M., Basaraba, L., Peacock, S.C., Gall, D.G., 1989. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. *Infect. Immun.* 57, 3292–3299.

Mack, DR, Michail S, Wei S, Mc-Dougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* 276 (Gastrointest. Liver Physiol. 39); G941–G950, 1999.

Miller, H.R., Huntley, J.F., Wallace, G.R., 1981. Immune exclusion and mucus trapping during the rapid expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from primed rats. *Immunology* 44, 419–429.

Nabuurs MJA, Hoogendoorn A, Van der Molen EJ, Van Osta LM. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Res Vet Sci* 1993; 55:78-84.

- Neutra MR, Forstner JF. Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion and function. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, 1987:975–1009.
- Parra J, Agudelo J, Ortiz L, Ramírez MC, Rodríguez B, López A. Lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* has detrimental effects on the intestinal morphology of weaned pigs. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2011; 24:598-608.
- Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest Prod Sci* 1997; 51:215-236.
- Reis de souza TC, Guerrero CMJ, Aguilera BA, Mariscal LG. Efecto de diferentes cereales sobre la morfología intestinal de lechones recién destetados. *Téc Pecu Mex*. 2005; 43 (3):309-321.
- Roomi, N., Laburthe, M., Fleming, N., Crowther, R., Forstner, J., 1984. Cholera-induced mucin secretion from rat intestine: lack of effect of cAMP, cycloheximide, VIP, and colchicines. *Am. J. Physiol.* 247, G140–G148.
- Sharma R, Schumacher U. Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats. *Dig Dis Sci* 1995;40:2532–9.
- Shimizu T, Takahashi Y, Kawaguchi S, Sakakura Y. Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 1412–1418.
- Steel RG, Torrie JH. *Principles and Procedures of Statistics: a biometrical approach*. 2 Ed. New York, US: McGraw-Hill Book Co.; 1985
- Strous, G.J., Dekker, J., 1992. Mucin-type glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27, 57–92.
- Vente-Spreuwenberg MAM, Verdonk AC, Gaskins HR, Verstegen MWA. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J Nutr* 2001; 131:1520-1527.
- Vente-Spreuwenberg MAM, Verdonk JMAJ, Bakker GCM, Beynen AC, Verstegen MWA. Effect of dietary protein source on feed intake and small intestine morphology in newly weaned piglets. *Livest Prod Sci* 2004a. 86:169-177.
- Yang B., Mark M., Gray Alane., Huang Arthur. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide induced cellular signaling. *Nature*, vol 395, 1998 284-28

## 8. Conclusiones Generales

Las mucinas son consideradas un importante indicador del estado de salud y enfermedad intestinal. Sin embargo, los reportes en cerdos sobre la expresión de mucinas durante el periodo postdestete son escasos e inconsistentes. De esto se deduce que existe un vacío en el conocimiento al respecto y que estudios enfocados a profundizar en su relevancia fisiológica pueden aportar nuevas alternativas para el manejo de la enteritis del síndrome postdestete.

El presente trabajo evidenció que el LPS de *E. coli* potencia el efecto deletéreo del destete en la secreción de los diferentes tipos de mucinas desde las células caliciformes en el intestino delgado grueso de los lechones y que estos cambios afectan la integridad de la mucosa intestinal, alterando la barrera física-química que constituye el moco, perturbando las interacciones con la flora residente en el lumen intestinal.

También se concluye que el destete y el LPS de *E. coli* generan no solo alteraciones morfológicas reflejadas en el número de células caliciformes y su distribución en la mucosa, sino también importantes alteraciones en la fisiología intestinal evidente con las variaciones en los tipos de mucinas secretadas durante el periodo postdestete.

Adicionalmente se evidenció la estrecha interacción que existe entre el epitelio y la flora intestinal y como los cambios asociados a la secreción de mucinas pueden comprometer su función protectora en la mucosa intestinal y la interacción bacteria-hospedador dando cabida a la presentación de enteritis.

En el presente estudio se constató que el destete en los cerdos, tiene un importante efecto en la fisiología y en la citoarquitectura intestinal. La información obtenida aporta información en la comprensión del papel de las mucinas en el mantenimiento de la integridad intestinal durante el destete. Estos hallazgos fundamentan la necesidad de realizar futuras investigaciones para avanzar en la identificación y en la comprensión de los mecanismos necesarios para mantener regulada la secreción de las mucinas intestinales, como estrategia de prevención y control de las enfermedades asociadas con este periodo.

## 9. Anexos

**Tabla 1.** Composición de la Dieta Basal.

<b>Ingredientes</b>	<b>%</b>
Leche en polvo	59,0
Caseína	6,05
Dairylac 80 (lactosa) <sup>A</sup>	15,0
Proliant 1000 (Suero de leche) <sup>B</sup>	8,0
Hemoglobina	2,50
Almidón de maíz	4,32
Aceite de palma	2,363
Sal de mar	0,203
Fosfato Monodivalente	0,314
Sal común	0,40
Lisina	0,439
Metiona	0,326
Treonina	0,279
Triptófano	0,061
Adsorbentes de Tóxicos <sup>C</sup>	0,05
Vitaminas <sup>D</sup>	0,36
Minerales <sup>E</sup>	0,12
Saborizantes <sup>F</sup>	0,217

**Tabla 2.** Análisis proximal de la dieta basal.

Proteína cruda (%)	21
Extracto etéreo (%)	8,35
Cenizas (%)	5,42
Humedad (%)	7
Energía bruta (Kcal / kg)	3708,8

<sup>A</sup>Dairylac 80 (Pro-Ag Products Ltd, Winnipeg, Canadá)

<sup>B</sup>Proliant 1000 (Alitecno S.A.C., Lima, Peru)

<sup>C</sup>Toxibond (Biomix, Medellín, Colombia)

<sup>D</sup> Composición por kg de alimento: vitamina A 1020 UI, vitamina D 198 UI, vitamina E 6 UI, vitamina K 1.20 mg, riboflavina 7.20 mg, vitamina B12 0.04 mg, colina 968.58 mg, niacina 36 mg, ácido pantoténico 16.55 mg, tiamina 30 mg, piridoxina 31 mg, biotina 0.08 mg, ácido fólico 0.75 mg.

<sup>E</sup> Composición por kg de alimento: Cobre 14.40 mg, Hierro 120 mg, manganeso 36 mg, selenio 0.30 mg, yodo 0.96 mg, zinc 144 mg.

<sup>F</sup>Dulce de vainilla, esencia de fruta (Prodia, Medellín, Colombia)

## 10. Referencias

- Abad B, Mesonero JE, Salvador MT, García-Herrera J, Rodríguez-Yoldi MJ. Effect of lipopolysaccharide on small intestinal L-leucine transport in rabbit. *Dig Dis Sci.* 2001(a); 46: 1113-1119.
- Abad B, Mesonero JE, Salvador MT, García-Herrera J, Rodríguez-Yoldi MJ. The administration of lipopolysaccharide, in vivo, induces alteration in L-leucine intestinal absorption. *Life Sci.* 2001(b); 70: 615-628.
- Abad B, Mesoreno JE, Salvador MT, García-Herrera J, Rodríguez-Yoldi MJ. Cellular mechanism underlying LPS-induced inhibition of in vitro L-leucine transport across rabbit jejunum. *J Endotoxin Res.* 2002(a); 8: 127-133.
- Abad B, Mesoreno JE, Salvador MT, García-Herrera J, Rodríguez-Yoldi MJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates inhibitory effect of lipopolysaccharide on L-leucine intestinal uptake. *Dig Dis Sci.* 2002(b); 47: 1316-1322.
- AFIP Armed Forces Institute of Pathology Laboratory Methods in histotechnology. Published: American Registry of Pathology . Washington D.C. 1994 p279.
- Amador P, Garcia-Herrera J, Marca MC, de la Osada J, Acin S, Navarro MA, Salvador MT, Lostao MP and Rodriguez-Yoldi MJ. Intestinal D-galactose transport in an endotoxemia model in the rabbit. *J Membr Biol* 2007; 2153:125-133
- Arbeláez G, Calderón D, Rincón M, Ángela L, Mercado M. Implementación de dos metodologías diagnósticas para la determinación del virus de la influenza porcina. *Universitas Scientiarum* 2008;13:65-74.
- Baidoo SK, Liu YG, Yungblut D. Effect of microbial enzyme supplementation on energy, amino acid digestibility and performance of pigs fed hullless barley based diets. *Can. J. Anim. Sci.* 1998;78: 625-631.
- Bolduan, G., 1999. Feeding weaner pigs without in-feed antibiotics. *Biotechnology in the feed industry.* In: Lyons, T.P., Jacques, K.A. (Eds.), *Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium.* Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 223–230.
- Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., Braesco, V., 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine". *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 675–683.
- Brunsgaard, G., 1997. Morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and crypt fission in cecum and colon of growing pigs. *Dig. Dis. Sci.* 42, 2384–2393.
- Brown, D.C., Maxwell, C.V., Davis, M.E., Singh, S., 2002a. Effect of segregated early weaning on growth performance and immune parameters. *J. Anim. Sci.* 80 (Suppl. 1), 197 (Abstract).
- Burrell R. Human responses to bacterial endotoxin. *Circ Shock.* 1994; 43: 137-153

- Butler DG, Gall DG, Kelly MH, Hamilton JR. Transmissible gastroenteritis. Mechanisms responsible for diarrhea in acute viral enteritis in piglets. *J Clin Invest.* 1974; 53: 1335 - 1342.
- Caine WR, Sauer WC, Tamminga S, Verstegen MWA, Schulze H. Apparent ileal digestibilities of amino acids in newly weaned pigs fed diets with protease-treated soybean meal. *J. Anim. Sci* 1997; 75:2962-2969.
- Campabadal CM, Navarro H. Manejo y alimentación del lechón pre y postdestete. *Asociación Americana de Soya. A.N.* 1994; N°. 92:21 p.
- Carbonaro M, Capelloni M, Nicoli S, Lucarini M, Carvonare E.. Solubility-digestibility relationship of legume proteins. *J. Agric. Food Chem.* 1997;45:3387-3394.
- Castillo JM, Chacón JA, Cortes LE, Gonzáles MY. Diagnóstico de circovirus porcino por histopatología e historia clínica en piaras del área metropolitana de Bucaramanga. *Rev. Colomb Cienc Pecu* 2007; 20:656-657.
- Cera KR, Mahan DC, Reinhart A. Evaluation of various extracted vegetable oils, roasted soybeans, medium chain triglyceride and animal-vegetable fat blend for postweaning swine. *J. Anim. Sci.* 1990; 68:384.
- Choi J, Klinkspoor JH, Yoshida T, Lee SP. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* stimulates mucin secretion by cultured dog gallbladder epithelial cells. *Hepatology* 1999; 29: 1352–1357.
- Ciancio MJ, Vitritti L, Dhar A, Chang EB. Endotoxin-induced alterations in rat colonic water and electrolyte transport. *Gastroenterology.* 1992;103: 1437-1443.
- Cranwell PD. The development of acid and pepsin secretory capacity in the pig; The effects of age and weaning. 1. Studies in anaesthetized pigs. *Br. J. Nutr.* 1985; 54: 305-320.
- Cohen, P.S., Rossoll, R., Cabelli, V.J., Yang, S.L., Laux, D.C., 1983. Relationship between the mouse colonizing ability of a human fecal *Escherichia coli* strain and its ability to bind a specific mouse colonic mucous gel protein. *Infect. Immun.* 40, 62–69.
- Darwich L, Pie´ S, Rovira A, Segale` s J, Domingo M, Oswald IP, Mateu E.. Cytokine expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting. *J. Gen. Virol.* 2003; 84: 2117 2125.
- Deplancke B, Hristova KR, Oakley HA, et al. Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2166–74
- Deplancke B, Gaskins, HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* 2012;73(suppl):1131S–41S.
- Deplancke B, Gaskins HR, Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer, *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2001) 1131S–1141S.

- Dickinson E, Tuncer R, Nadler E, Boyle P, Alber S, Watkins S, Ford H. A novel nitric oxide scavenger, reduces bacterial translocation in rats after endotoxin challenge. *Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol)* 1999; 40: 277: G1281-G 1287.
- Dozois CM, Oswald E, Gautier N, Serthelon J P, Fairbrother J M, Oswald IP. A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997; 58: 287 300.
- 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. *Am. J. Vet. Res.* 1991; 52: 1743–1746.
- Enss ML, Schmidt-Wittig U, Muller H. Mai UE, Coenen M, Hedrich HJ. Response of germfree rat colonic mucous cells to peroral endotoxin application. *Eur. J. Cell Biol* 1996; 71: 99–104.
- Easter, R. A. 1995. Growth, Body Composition and Nutrition. En: *Memorias Curso de Lance.* 1995. San José, Costa Rica, 17 p.
- Fan MZ. 2002. Growth and ontogeny of the gastrointestinal tract. In: Xu. RJ, Cranwell P editors. *The neonatal pig. Gastrointestinal physiology. and nutrition.* Nottingham University Press. 31-60.
- Fink MP, Antonsson JB, Wang HL, Rothschild HR. 1991. Increased intestinal permeability in endotoxic pigs. Mesenteric hypoperfusion as an etiologic factor. *Arch Surg.* 126: 211-218.
- Fong YM, Marano MA, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Kenney JS, Allison AC, Cerami A, Shires GT, Lowry SF. 1990. The acute splenic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans. *J Clin Invest.* 1896-1904.
- Fontaine N, Meslin JC, Lory S, Andrieux C. Intestinal mucin distribution in the germ-free rat and in the heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: effect of inulin in the diet. *Br J Nutr* 1996;75: 881–92.
- Fowler, V. Nutrition of the early weaning pig. 1995. In: *Proceedings of the Advance Swine Production Technology Course.* University of Illinois. 9p.
- Fowler, W.R. The nutrition of weaned pigs. *Pigs News and Information.* 1980;1:11.
- García-Herrera J, Abad B, Rodríguez-Yoldi MJ. Effect of lipopolysaccharide on D-fructose transport across rabbit jejunum. *Inflammation Research.* 2003; 52: 177-184.
- 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.
- Gaskins, H.R., 1997. Immunological aspects of host/microbiota interactions at the intestinal epithelium. In: Mackie, R., White, nB.A., Isaacson, R.E. (Eds.), *Gastrointestinal Microbiology.* Chapman & Hall, New York, NY, p. 537.

Ge Y, Ezzell RM, Warren HS. Localization of endotoxin in the rat intestinal epithelium. *J Infect Dis.* 2000; 182: 873-881.

Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* 1995;57:607–34..

Go LL, Healey PJ, Watkins SC, Simmons RL, Rowe MI. The effect of endotoxin on intestinal mucosal permeability to bacteria in vitro. *Arch Surg.* 1995;130: 53-58.

Goodlad RA, Levi S, Lee CY, Mandir N, Hodgson H, Wright NA. Morphometry and cell proliferation in endoscopic biopsies: evaluation of a technique. *Gastroenterology* 1991; 101: 1235 -1241.

Grondahl ML, Thorboll JE, Hansen MB, Skadhauge E. Regional differences in the effect of cholera toxin and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection on electrolyte and fluid transport in the porcine small intestine. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1998; 45: 369-381.

Hancock, J. D. Use of specially processed soy products to replace milk proteins in baby pig started diets. 1995. En: *Memorias Curso LANCE.* Atenas, Costa Rica.

Hampson, D.J., Hinton, M., Kidder, D.E., 1985. Coliform numbers in the stomach and small intestine of healthy pigs following weaning at three weeks of age. *J. Comp. Pathol.* 95, 353–362.

Hecht G, Koutsouris A. Enteropathogenic *E. coli* attenuates secretagogue-induced net intestinal ion transport but not Cl<sup>-</sup> secretion. *Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol* 39). 1999;.276: G781-G788.

Hedemann MS, Hojsgaard s, Jensen BB. Small intestine morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2003; 87:32-41.

Hedemann MS, Eskildsen M, Lærke HN, Pedersen CJ, Lindberg E, Laurinen P, Bach KE. Fiber concentrations and ber properties Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting. *J Anim Sci* 2006; 84:1375-1386.

Herlaar E, Brown Z. MAPK signaling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today.* 1999; 5: 439. p38

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 *J. Dairy Sci.* 1995; 78: 2584

Hunter SE, Singla AK, Prazma J, Jewett BS, Randell SH. H.C. Pillsbury 3rd, Mucin production in the middle ear in response to lipopolysaccharides, *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1999; 120: 884–888.

Invitrogen. Fecha de consulta: 25 de julio de 2009 URL:[  
[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/KSC4021\\_KSC4022%20pr066%20revA8%20jun1608%20\(Sw%20IFN-gamma\).pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/KSC4021_KSC4022%20pr066%20revA8%20jun1608%20(Sw%20IFN-gamma).pdf)]

Jackman B, Eades S, Moore J, Harmon B. 1996. Differential effects of an infusion of endotoxin on proximal and distal feline jejunal permeability. *J Endotoxin Res.* 3: 77-86.

Jergens AE, Dorn A, Wilson J, Dingbaum K, Henderson A, Liu Z, Hostetter J, Evans RB, Wannemuehler MJ. Induction of differential immune reactivity to members of the flora of gnotobiotic mice following colonization with *Helicobacter bilis* or *Brachyspira hyodysenteriae*. *Microbes and Infection* 2006; 8:1602-1610.

Jensen MS, Jensen SK, Jakobsen K. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. *J Anim Sci* 1997;75:437-445

Kanno S, Emil S, Kosi M, Monforte-Muñoz H, Atkinson J. Small intestinal absorption during endotoxemia in swine. *Am Surg.* 1996; 62: 793-799.

Kelly, D, Smyth, J A. & McCracken, K J. Digestive development of the early-weaned pig. 1. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning. *Br. J. Nutr.* 1991a ; 65: 169 180

Klasing KC, Johnstone,BJ, Benson BN. Implications on an immune response on growth and nutrient requirements of chickens. En: *Recent advances in animal nutrition.* Haresign, W. y Cole, D.J.A. (eds). Butterworths, London, RU, 1991.p. 135-146.

Kindon, H., Pothoulakis, C., Thim, L., Devaney, K., Podolsky, D.K., 1995. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology* 109, 516–523.

Leaver RE, Evans BJ and Corrin B. Identification of Gram-negative bacteria in histological sections using Sandiford's counterstain. *J Clin Pathol.* 1977; 30: 290–291.

Li DF, Nelssen JL, Reddy PG, Blecha F, Klemm RD, Giesting DW, Hancock JD, Allec GL, Goodband RD. Measuring suitability of soybean meal products for earlyweaned pigs with immunological criteria. *J. Anim. Sci.* 1991; 20:614.

Li JD, Dohrman AF, Gallup M, Miyata S, Gum JR, Kim YS, Nadel JA, Prince A., Basbaum CB. Transcriptional activation of mucin by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94: 967–972.

Lizardo R. Exploration de l'adaptation de la capacité digestive du porcelet après le sevrage : effets des facteurs antinutritionnels et des polysaccharides non amilacés sur l'activité des enzymes, la digestibilité et les performances zootéchniques. Thèse de doctorat, Université de Rennes I, 1997.158 p.

Low AG. Digestión and absorption of nutrients in growing pigs. Proc. Nutr. Soc. 1976., 35 :57.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. Microbiología de los Microorganismos. 8ª Ed. Prentice Hall. Madrid. 1999; 75-78.

Mahan, D.C. and K.R. Cera. Changes in intestinal morphology-A major reason for the growth check following weaning. Ohio Swine Research and Industry Report. 1992-1993. Ohio State University. 1993. P. 18-25.

Mantle, M., Basaraba, L., Peacock, S.C., Gall, D.G., 1989. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. Infect. Immun. 57, 3292–3299.

Mack, DR, Michail S, Wei S, Mc-Dougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. Am. J. Physiol. 276 (Gastrointest.Liver Physiol. 39); G941–G950, 1999.

Mccracken BA, Spurlock ME, Roos MA, Zuckermann MA, Gaskins H. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. J. Nutr. 1999; 129:613-619.

McCracken KJ, Kelly,D. Development of digestive function and nutrition/disease interactions in the weaned pig. In: Farrell, D.J, editors. Recent advances in animal nutrition in Australia. Department of Biochemistry, Microbiology and Nutrition, University of New England, Armidale, 1993.Australia.

McKay DM, Baird AW. Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. Gut. 1999; 44: 283-289.

Miller, H.R., Huntley, J.F., Wallace, G.R., 1981. Immune exclusion and mucus trapping during the rapid expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from primed rats. Immunology 44, 419–429.

Maxwell, C.V. Y Sohn, K.S. The Pros and Cons of SEW System (A review). Asian-Aus. J. Anim.Sci. 1999; 12: 226.

Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. Front Biosci. 2001; 6: D1192–D1206.

Moran E. T. Comparative nutrition of fowls and swine. The gastrointestinal system. Office for educational Practice. University of Guelph. Guelph, Ontario, 1982.p. 253.

Mueller POE, Eades SC, Moore JN, Barton MH. Contribution of tumor necrosis factor alpha to endotoxin-induced mucosal dysfunction in the feline jejunum. J Endotoxin Res . 1996; 3:323-332.

Mullin JM, Smock KV. Effect of tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability. Cancer Res. 1990; 50: 2172-2176.

Murch SH, Braegger CP, Wlaker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumor necrosis factor-a by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. Gut. 1993; 34: 1705.

Musgrave, K., Varley, M.A., Hughes, P.E., Ferlazzo, J., Pearce, G.P. The effects of weaning, moving and mixing on the growth and behavior of piglets after weaning. *Anim. Prod.* 1991; 52: 575-576 (Abstr.).

Nabuurs MJA, Hoogendoorn A, Vander Molen EJ, Van Osta LM. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Res Vet Sci* 1993; 55: 78-84

Neutra MR, Forstner JF. Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion and function. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, 1987:975–1009.

Noblet J, Shi XS, Fortune H, Dubois S, Lechevestrier Y, Corniaux C, Sauvan D, Henry Y.. *Journées Rech. Porcien en France* 1994; 26 :235-250.

NRC (National Research Council).. *Nutrient Requirements of Swine*. 10th ed. National Academy Press. Washington, DC. 1998. 211 p.

O'Loughlin EV, Pai CH, Gall DG.. Effect of acute *Yersinia enterocolitica* infection on in vivo and in vitro small intestinal solute and fluid absorption in the rabbit. *Gastroenterology*. 1988; 94: 664-672.

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

Parra JS, Ortiz L, Ramírez MC, Rodríguez B, Agudelo J, López Albeiro. El lipopolisacárido de *Escherichia coli* deteriora los parámetros morfológicos intestinales de lechones postdestete. . *Rev Colomb Cienc Pecu* 2011 artículo en revisión

Parillo, F., Gargiulo, A.M., Fagioli, O., Complex carbohydrates occurring in the digestive apparatus of *Umbina cirrosa* (L.) fry. *Veterinary Research Communication* 2004;28: 267–278.

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

Partridge, G. The weaner pig - enzyme and biotechnology for the future. In: Varley MA, Wiseman J, editors. *The weaner pig: nutrition and management*. New York: CABI Publishing. 2001;1 :123-152.

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

Pie´ S, Matsiota-Bernard P, Truffa-Bachi P, Nauciel, C. Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in innately susceptible and resistant mice during the early phase of *Salmonella typhimurium* infection. *Infect.Immun.* 1996, 64: 849-854.

Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest Prod Sci* 1997; 51:215-236.

Pluske JR, Hopwood DE, Hampson DJ. Relación entre la microbiótica intestinal, el pienso y la incidencia de diarreas, y su influencia sobre la salud del lechón tras el destete. Madrid, 23 y 24 de Octubre de 2003. .XIX curso de especialización FEDNA

Pluske JR, Williams IH, Aherne FX. Maintenance of villous height and crypt depth in the small intestine of weaned pigs. En: Manipulating pig production III. products with wheat gluten on digestibility of nutrients and growth performance in nurse piglets. J. Anim. Sci. 1991; 72:151-159.

Radecki SV, Yokoyama, MT.. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition.. in Swine Nutrition. E. R. Miller, D. E. Ullrey, and U. J. Lewis, ed. Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA. p. 439- 447.1991

Reis de souza TC, Guerrero CMJ, Aguilera BA, Mariscal LG. Efecto de diferentes cereales sobre la morfología intestinal de lechones recién destetados. Téc Pecu Mex. 2005; 43 (3):309-321.

Reis de Souza, T.C.. Consequences digestives, metaboliques et zootéchniques de l'incorporation des lipides dans la ration du porcelet au sevrage. Thèse de Doctorat, de L' Université de Rennes I. 1992; 154 p.

Roomi, N., Laburthe, M., Fleming, N., Crowther, R., Forstner, J.,1984. Cholera-induced mucin secretion from rat intestine: lack of effect of cAMP, cycloheximide, VIP, and colchicines. Am. J. Physiol. 247, G140–G148.

Rodríguez BJ, Aránzazu D, Giraldo GE, Álvarez LC., Cano EM, Isaza B. Prevalencia de enteropatía proliferativa porcina y caracterización histopatológica de las lesiones asociadas en cerdos sacrificados en el Matadero Municipal de Medellín, Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu 2004; 17: (1) 11-19.

Robertson AM, Wright DP. Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation. Can J Gastroenterol 1997;11:361–6.

Rogers DF, Airway goblet cells: responsive and adaptable frontline defenders, Eur. Respir. J. 7 (1994) 1690–1706.

Salgado P, Freire JPB, Mourato M, Cabral F, Toullec R, Lallès JP.. Comparative effects of different legume protein sources in weaned piglets: nutrient digestibility, intestinal morphology and digestive enzymes. Livest. Prod. Sci. 2002;74:191-202.

Sangil PT, Trahair JF, Loftager MK, Fowden AL. Intestinal macromolecule absorption in the fetal pig after infusion of colostrum in utero. Pediatr Res. 1999, 45 (4 Pt 1):595-602.

Sharma R, Schumacher U. Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats. Dig Dis Sci 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. Am. J. Respir. Grit. Care Med. 1996; 153: 1412–1418.

- 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. *Cell Immunol.* 2003; 221:42-49.
- Sodeyama M, Gardiner KR, Regan MC, Kirk SJ, Efron G, Barbul A. Sepsis impairs gut amino acid absorption. *Am J Surg.* 1993; 165: 150-154.
- Stahly T. Influencia de la activación del sistema inmunitario sobre la productividad y las características nutricionales de dietas para cerdos. En: *Avances en Nutrición y Alimentación Animal*. P.G. Rebollar, G.G. Mateos y C. de Blas (Eds.). FEDNA. Madrid, España, 1996.pp. 96
- Steel RG, Torrie JH. *Principles and Procedures of Statistics: a biometrical approach*. 2 Ed. New York, US: McGraw-Hill Book Co.; 1985
- Strous, G.J., Dekker, J., 1992. Mucin-type glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27, 57–92.
- Symons LEA, Fairbairn D. Pathology, absorption, transport and activity of digestive enzymes in rat jejunum parasitized by the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Federation Proc.*1962; 21: 913-918.
- Tamminga S, Schulze H, van Bruchem J, Huisman J.. The nutritional significance of endogenous N-losses along the gastro-intestinal tract of farm animals. *Arch. Anim. Nutr.* 1995; 48:9-22.
- Theodorou V, Fioramonti J, Buéno L. Integrative neuroimmunology of the digestive tract. *Vet Res.* . 1996; 27: 427-442.
- Touchette KJ, Carroll JA, Allee GL, Matter RL, Dyer CJ, Beausang, LA, Zannelli ME. Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: I. Effects on the immune axis of weaned pigs. *J Anim Sci.* 2002; 80: 494-501.
- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ 3rd, Zentella A, Albert JD. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science.* 1986.; 234: 470-474.
- Ulevitch RJ, Mathison JC, Schumann RR, Tobias PS.. A new model of macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharide. *J Trauma.* 1990; 30 (suppl.): 189s-192s.
- van Klinken BJ, Dekker J, Buller HA, Einerhand AW. Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *Am J Physiol*1995;269:G613–27
- Van Beers-Schreurs HMG. The changes in the function of the large intestine of weaned pigs. PhD thesis, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands. 1996
- Van den Blink B, Branger J, Weijer S, Van Deventer SJH, Van der Poll T, Peppelenbosch MP. Human endotoxemia activates p38 MAP kinase and p42/44 MAP kinase, but not c-Jun N-terminal kinase. *Moll Med.* 2001; 755-760.
- Vente-Spreeuwenberg MAM, JMAJ, Verdonk AC, Gaskins HR, Verstegen MWA. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J nutr.* 2001; 131; 1520-1527.

Vente-Spreuwenberg MAM, Verdonk JMAJ, Bakker GCM, Beynen AC, Verstegen MWA. Effect of dietary protein source on feed intake and small intestine morphology in newly weaned piglets. *Livest Prod Sci* 2004a. 86:169-177

Waetzig GH, Segert D, Rosentiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen activated protein kinase is activated and linked to TNF- $\alpha$  signaling in inflammatory bowel disease. *J. Immunol.* 2002; 168: 5342-5351.

Williams NH, Stahly TS, Zimmerman DR. Effect of chronic immune system activation on the growth and dietary lysine needs of pigs fed from 6 to 112 kg. *J. Anim.Sci.*, 1997; 75: 2481-2492.