

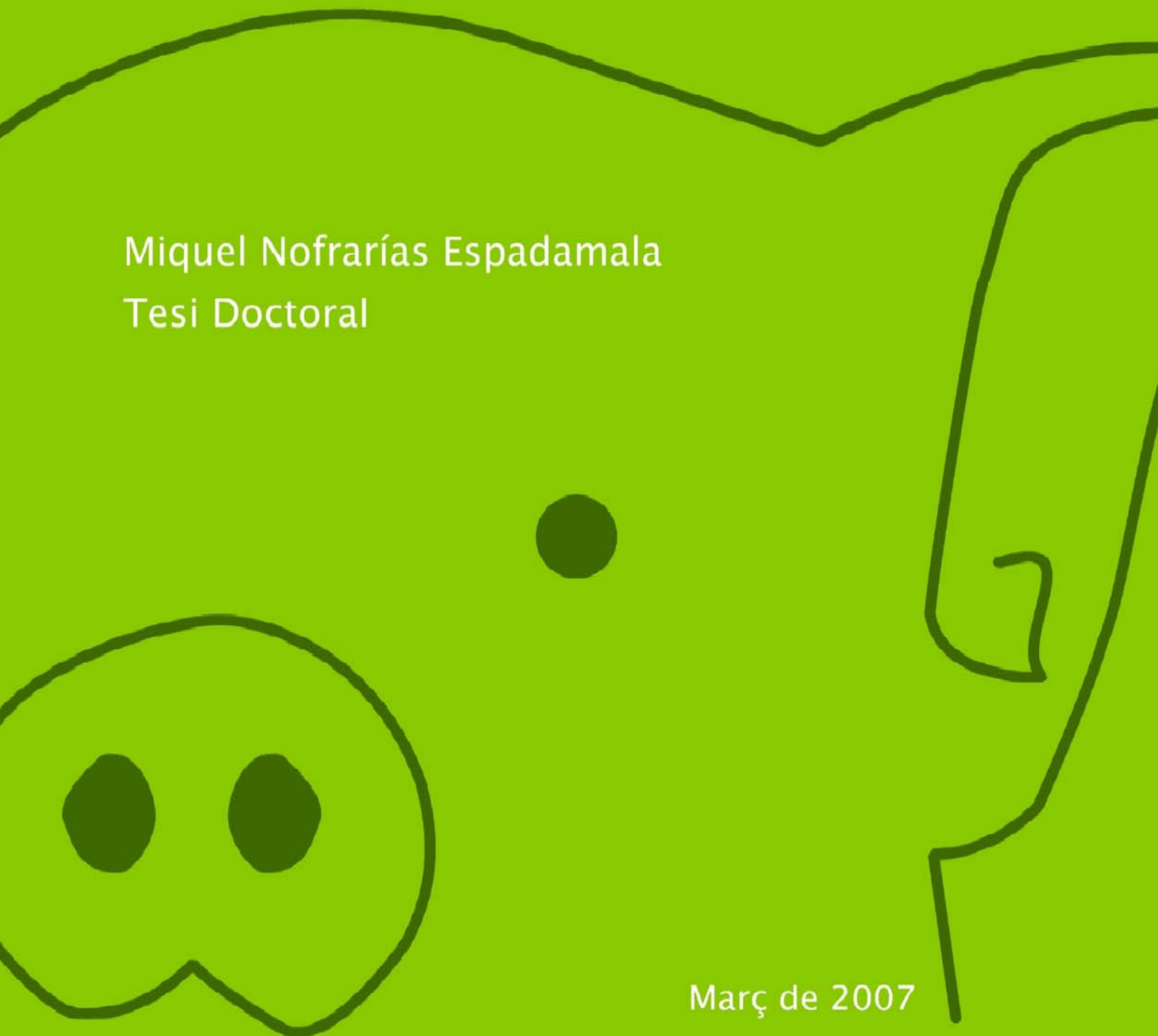


Universitat Autònoma de Barcelona

Efecte de diferents components de la dieta sobre l'estructura i sistema immunitari intestinals en el porc

Miquel Nofrarías Espadamala
Tesi Doctoral

Març de 2007





Universitat Autònoma de Barcelona

*Efecte de diferents components de la dieta sobre l'estructura
i sistema immunitari intestinals en el porc*

TESI DOCTORAL PRESENTADA PER MIQUEL NOFRARÍAS I ESPADAMALA

PER ACCEDIR AL GRAU DE DOCTOR EN VETERINÀRIA

DINS DEL PROGRAMA DE DOCTORAT DE MEDICINA I SANITAT ANIMALS,

DE LA FACULTAT DE VETERINÀRIA DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA,

SOTA LA DIRECCIÓ DE LA DRA. NATÀLIA MAJÓ I MASFERRER

Bellaterra, 2007



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

NATÀLIA MAJÓ I MASFERRER, professora titular del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

Certifica:

Que la memòria titulada, **“Efecte de diferents components de la dieta sobre l'estructura i sistema immunitari intestinals en el porc”** presentada per Miquel Nofrarias Espadamala per optar al grau de Doctor en Veterinària, ha estat realitzada sota la meua direcció i, considerant-la acabada, autoritza la seva presentació per tal de ser jutjada per la comissió corresponent.

I perquè consti als efectes oportuns, signa la present a Bellaterra, a 22 de març de 2007.

Dra. Natàlia Majó Masferrer

Aquest treball ha estat finançat pel projecte CICYT AGL2001-2621-C02-01.

L'autor va gaudir d'una beca del Departament de Universitats, Recerca i Societat de la Informació (DURSI) de la Generalitat de Catalunya per aquest estudi durant l'any 2002. A partir del 2003, l'autor ha estat treballant d'investigador al Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA).

Agraïments

*No aprenem gràcies a l'escola, sinó gràcies a la vida (L.A. Séneca). En aquests últims anys he tingut la sort, perquè no es pot dir d'una altra manera, de compartir camí amb un munt de gent de qui he après molt, sempre i contínuament, i en algun cas fins i tot alguna cosa positiva. **Gràcies!***

Perquè si som el que som, depèn del que fem i amb qui estem. Així, aquí vull recordar totes aquelles persones que, en el camp professional però especialment en el personal, m'han fet viure recentment la vida en amplada i profunditat (que és el que s'ha de fer, quan no es pot decidir sobre la seva llargada).

Primer, m'agradaria deixar clar que aquesta tesi és sens dubte fruit d'un treball en equip. I no és cap frase complimentosa. Recordo que algú va dir que allò que és digne de ser fet, és digne que es faci bé. Doncs bé, no sóc ningú per dir si la dignitat passa per l'interès o els resultats d'aquest treball, però si que passa per l'esforç i la feina ben feta (que no té fronteres, que deia aquell) de tothom que hi ha participat.

Al capdavant de tot això hi ha hagut la Natàlia Majó. A ella agraeixo aquella proposta deshonestament feta en un cafè de Vic que m'ha permès ser aquí (no sé si se'n penedeix) i la seva confiança i afecte. Compaginar inquietuds de tots els participants, grips, família i doctorands no ha sigut tasca fàcil. Però seria injust no donar les gràcies aquí a l'altra persona que, malgrat no figurar formalment, és amb la seva envejable antropia personal el co-director espiritual (i material!) d'aquesta tesi: en Joan Pujols. Gràcies al dos per l'esforç.

Això, però, només ha sigut possible gràcies a l'inestimable treball de llargues jornades ("tanganes") de citometria de la Núria Navarro, en Xavi Gibert i en Gustavo, i als talls histològics fets per la Mònica (ja m'agradaria a mi tenir mans com les d'ells). La peça clau que tanca l'equip és la companya i amiga de vicissituds: l'alegre Mercè Roca.

Tanmateix, aquesta història en el món de la ciència i la nutrició no s'explica sense els companys i amics de Nutrició de l'autònoma. Amb ells (els de nutri), i de la mà d'en

Josep, vaig començar en el camp de la investigació durant l'últim any de carrera, del qual guardo molts bons records. Després, hem pogut continuar disfrutant plegats amb aquest d'avui i d'altres projectes comuns, amb en Dani, l'Edgar, en Francisco, la Montse, la Marisol, la Susana,... Si alguna cosa sé dels pinsos, és gràcies a ells.

L'altra gran sort que he tingut ha sigut poder treballar fent recerca durant els últims 5 anys al CReSA. Això m'ha permès treballar en molts camps de la sanitat animal i poder superar així aquella màxima que diu que la tesi és "everything of nothing, and nothing of everything". Primer, gràcies a l'oportunitat que em va donar en Mariano i a la confiança de l'incombustible Quim i la Maria. Després, dia a dia, amb el bo i millor: la sempre Marina, el Dr. Olvera, Monsenyor Grau, la Maria, Rousie, Nilsa, A. Alba, en Sergio, Laura, Eva, Jordi, Jennifer, Alberto, Lorenzo, Fer, Vicky, Xavi, Enric, Jordi, Ignasi, l'Olga i la Montse, Stel·la, David, Valentí, Ivan, Merche, Eva, Maribel, Txell, Elisa, Óscar, Bernat, Nitú, Víctor, Rosa, Núriessss, i un llarg etcètera amb el que acabariem tota l'onomàstica (ja gairebé som 100!). Amb tots ells he compartit un munt d'anècdotes i llargues i afectuoses hores.

Abans del CReSA, vam trobar el caliu en els acol·lidors despatxos d'anatomia patològica i la seva gent: la Mar, la Blanca, l'Alberto, en Toni, la Dolors, la Mar, la Carme, la Sandra, Paquita, l'Anna i la Sònia, els que ja van marxar -Carles, Francesca, Albert...-, i els que van venir -quin un l'Humberto!-.

Més enllà d'aquesta gran família veterinària, he tingut els bons amics que des de Vic (Kamel, Verda, Enric, Fary, Kiko, Galli, Robert,...), altres indrets de Catalunya (Anna i Pitu a l'Escala, els de Sabadell, Jordi, Esther, Litus,...) o Balears (Miquel -bàsic!- i companyia) han mostrat sempre una preocupació divertidament desenfadada.

Però per més amunt que arribi un arbre i perdurable que sigui la seva existència, és des de les arrels des d'on sempre creix i s'alimenta. Sóc gràcies, i en sóc agraït, als meus pares i germanes, que des de sempre m'han donat la seva estima i suport incondicional.

A la última branca de l'arbre hi descansa una nina, que en el seu equipatge guarda el mapa de la insaciable lluita i estima constant, amb el que afortunadament ha guiat i confiadament escriurem els camins dia rere dia.

A les àvies, a en Ramon i la Mercè. Els de sempre.

A la Nuri i família; sempre atents i cada dia més..

A les nenes de casa i a l'encara supervivent, per la seva companyia.

A les correctores, Gemma i Teresa, i a la dissenyadora de la portada, la Núria.

Al Vic ecològicament sostenible; el món aniria millor amb gent així.

Al bosc, i als de vora-bosc.

A tothom amb qui penso però me'n oblidó, perquè un ja té una edat (i qui no?).

Tallo i tanco..

ÍNDEX

CAPÍTOL 1. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA.....	21
1.1. Estructura normal del tracte intestinal del porc.....	23
1.1.1. Intestí prim.....	23
<i>1.1.1.1. Anatomia macroscòpica.....</i>	<i>23</i>
<i>1.1.1.2. Estructura microscòpica.....</i>	<i>24</i>
1.1.2. Intestí gros.....	27
<i>1.1.2.1. Anatomia macroscòpica.....</i>	<i>27</i>
<i>1.1.2.2. Estructura microscòpica.....</i>	<i>28</i>
1.1.3. Paràmetres d'estudi per avaluar l'estructura intestinal.....	30
1.2. El sistema immunitari intestinal del porc.....	33
1.2.1. Breu descripció del sistema immunitari del porc.....	33
1.2.2. El sistema immunitari intestinal del porc.....	39
<i>1.2.2.1. El teixit limfoide associat a l'intestí (GALT).....</i>	<i>40</i>
<i>1.2.2.2. La resposta immunitària intestinal.....</i>	<i>45</i>
1.3. Nutrició: efectes sobre l'estructura i el sistema immunitari intestinals.....	50
1.3.1. Macronutrients.....	52
<i>1.3.1.1. Compostos nitrogenats: proteïnes i aminoàcids.....</i>	<i>52</i>
<i>1.3.1.2. Lípids.....</i>	<i>54</i>
<i>1.3.1.3. Carbohidrats.....</i>	<i>56</i>
1.3.2. Micronutrients i additius.....	63
<i>1.3.2.1. Vitamines i minerals.....</i>	<i>64</i>
<i>1.3.2.2. Prebiòtics i probiòtics.....</i>	<i>65</i>
<i>1.3.2.3. Acidificants.....</i>	<i>68</i>
<i>1.3.2.4. Extractes de plantes.....</i>	<i>68</i>

1.3.2.5. Plasma animal.....	71
1.3.2.6. Altres additius.....	74
CAPÍTOL 2. OBJECTIUS I HIPÒTESI.....	77
CAPÍTOL 3. Experiment I	
Efecte del deslletament en l'estructura i la immunitat intestinals en porcs...	81
CAPÍTOL 4. Experiment II	
Efecte del plasma porcí assecat i d'un extracte de plantes sobre l'estructura intestinal i les poblacions leucocitàries en porcs deslletats.....	95
CAPÍTOL 5. Experiment III	
Efecte del blat de moro groller, la polpa de remolatxa i el segó de blat sobre l'estructura del colon i el sistema immunitari en porcs d'engreix.....	113
CAPÍTOL 6. Experiment IV	
Efecte del consum prolongat de midó resistent de patata sobre l'estructura i teixits limfoides intestinals, i les poblacions leucocitàries sanguínies en porcs d'engreix.....	141
CAPÍTOL 7. DISCUSSIÓ GENERAL.....	163
7.1. L'etapa crítica del deslletament.....	165
7.1.2. Els additius en el pinso de post-deslletament: el plasma porcí assecat per polvorització i l'extracte de plantes XTRACT™.....	167
7.2. El consum de fibra alimentària en els porcs de transició-engreix.....	172
CAPÍTOL 8. CONCLUSIONS.....	183
CAPÍTOL 9. BIBLIOGRAFIA.....	187

ABREVIATURES

ADV	<i>Aujeszký Disease Virus</i> ; Virus de la malaltia d'Aujeszký
AGV	Àcids grassos volàtils
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> ; Cèl·lules presentadores d'antigen
BM	Blat de moro
Casp3	Caspasa-3 activada
CM	Cèl·lules mononuclears
CT	Control
CH	Carbohidrats
DESL	Garrins deslletats alimentats amb pinso comercial
DF	<i>Dietary Fibre</i> ; Fibra alimentària
FAO	<i>Food Agriculture Organization of the United Nations</i>
FCM	<i>Flow Cytometry Medium</i> ; Medi de citòmetre
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> ; Isotiocianat de fluoresceïna
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i> ; Teixit limfoide associat a l'intestí
GI	Gastrointestinal
GRO	Mòlta grollera del blat de moro
IEL	<i>Intraepithelial Lymphocytes</i> ; Limfòcits intraepitelials
IFN- γ	Interferó γ
Ig	Immunoglobulina
IG	Intestí gros
IL	Interleucina
INIA	<i>Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria</i>
IP	Intestí prim
LACT	Garrins lactants
LN	Gangli limfàtic (<i>Lymph Node</i>) ileocòlic
LP	Làmina pròpia
LPS	Lipopolisacàrid
MCP	Midó cru de patata
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> ; Complex major d'histocompatibilitat
MR	Midó resistent
NK	<i>Natural Killer</i> ; Cèl·lules assassines o agressores naturals

Abreviatures

OIE	<i>International Organization for Animal Health</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> ; Tampó fosfat salí
PCNA	<i>Proliferate cell nuclear antigen</i> ; Antigen nuclear de proliferació cel·lular
PE	<i>Phycoerythrin</i> ; Ficoeritrina
PHA	Fitohemaglutinina
PNA	Polisacàrids no amilacis
POLPA	Polpa de remolatxa
PP	Placa de Peyer (il-PP; Placa de Peyer ileal)
SBA	<i>Southern Biotechnology Associates</i>
SDAP	<i>Spray Dried Animal Plasma</i> ; Plasma animal assecat per polvorització
SDPP	<i>Spray Dried Porcine Plasma</i> ; Plasma porcí assecat per polvorització
SEGÓ	Segó de blat
SI	Sistema immunitari
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i> ; Factor de creixement transformant- β
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> ; Factor de necrosi tumoral- α
VMRD	<i>Veterinary Medical Research and Development</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
XT	Extracte de plantes comercial que conté carvacrol, cinnamaldehyd i oleoresina de capsicum

RESUM

La producció porcina ha sofert importants avenços en els últims anys. Tanmateix, encara s'observen, de forma freqüent, problemes digestius durant el creixement dels animals; especialment durant el període crític posterior al deslletament dels garrins, però també durant l'adaptació a la dieta d'engreix. A més, cal considerar que aquesta situació podria empitjorar amb les recents i les previsiblement futures prohibicions dels antibiòtics com a promotors del creixement.

L'objectiu general d'aquest treball va ser estudiar l'efecte de diferents components de la ració sobre el tracte intestinal del bestiar porcí, a fi i efecte de millorar el coneixement sobre la funcionalitat intestinal porcina i determinar alguns elements per avaluar-la i optimitzar-la. En particular, el treball pretenia aprofundir en l'estudi de l'estructura i sistema immunitari intestinals, i específicament en dos moments concrets, el deslletament i la fase de creixement-engreix. Per assolir aquests objectius es va plantejar un treball en etapes, amb el disseny i realització de 4 estudis experimentals: dos durant la fase de deslletament (experimentes I i II) i dos durant la de creixement-engreix (experimentes III i IV). Així mateix, aquesta tesi va permetre adaptar i estandarditzar tècniques histològiques i immunològiques per a l'estudi de l'estructura intestinal i les poblacions leucocitàries en sang perifèrica i en el GALT.

L'**Experiment I** es va dissenyar amb l'objectiu de caracteritzar els canvis que tenien lloc en l'estructura i en el sistema immunitari intestinals durant el deslletament dels garrins en condicions convencionals. Per això, es van deslletar 6 garrins i se'ls va administrar un pinso convencional, mentre que 6 garrins més es van mantenir amb la mare. Al cap d'una setmana, se'n va avaluar l'estructura microscòpica intestinal, tant a l'intestí prim com a l'intestí gros. En aquest estudi es va observar un menor creixement en els garrins recent deslletats. Això coincidia amb una atròfia de les vellositats i una hiperplàsia de les criptes del jejú en aquests animals. En el cec, i coincidint amb l'increment de l'activitat fermentativa en aquest compartiment, es va observar una disminució del nombre de les cèl·lules caliciformes a les criptes, que s'acompanyava d'una resposta inflamatòria i una major renovació epitelial. En conjunt, aquestes observacions són indicatives que el deslletament pot comprometre la estructura i funcionalitat intestinal, tant a l'intestí prim com a l'intestí gros.

A l'**Experiment II** es va avaluar si la incorporació d'alguns additius a la dieta, durant aquesta fase de deslletament, com és un 6% de plasma porcí assecat per polvorització (SDPP) o un 0.03% d'un preparat d'extractes de plantes comercial que contenia carvacrol, cinamaldehyd i oleoresina de capsicum (XT) podien modular l'estructura intestinal i les poblacions leucocitàries del teixit limfoide associat a l'intestí i de sang perifèrica. Per això, es van deslletar 24 garrins als quals se'ls va administrar durant 21 dies una d'aquestes dues dietes o una dieta control. La incorporació de 6% de SDPP en els porcs deslletats va incrementar la seva eficiència alimentària, alhora que reduí els percentatges de poblacions cel·lulars immunitàries en la sang i en els teixits limfoides associats a l'intestí (placa de Peyer ileal i ganglis limfàtics ileocòlics), així com el nombre de limfòcits a l'epiteli i a la làmina pròpia, suggerint una menor activació del sistema immunitari. En canvi, l'addició de XT a la dieta, tot i que va modular les poblacions leucocitàries a nivell intestinal i sistèmic, ho va fer de forma poc consistent.

L'**Experiment III** es va dissenyar amb l'objectiu de determinar els canvis que es produïen en les característiques del contingut digestiu i en l'estructura del colon i les poblacions i les respostes immunitàries a nivell local i sistèmic, amb la incorporació de diferents tipus de fibra alimentària en la dieta dels porcs durant la primera fase del període d'engreix. Per això es van alimentar 96 porcs durant 6 setmanes amb 4 dietes experimentals que contenien diferents fonts de fibra alimentària: dieta control, dieta amb blat de moro (54% de la dieta) molt de forma grollera com a font de midó resistent, i dieta amb un 8% de polpa de remolatxa o amb un 10% de segó de blat com a font de PNA solubles i insolubles, respectivament. L'adaptació a les diferents dietes es va estudiar als dies 7, 21 i 42. La incorporació de fibra, en general, va incrementar el pes del tracte GI, i especialment del seu contingut, alhora que podia provocar, en un inici, cert grau de colitis al colon proximal i un increment de l'activitat de les cèl·lules immunitàries enfront a mitògens bacterians. Tanmateix, amb el temps, la incorporació de polpa de remolatxa va reduir la presència de cèl·lules immunitàries als diferents compartiments de la mucosa intestinal, facilitant l'adaptació dels porcs d'engreix a la nova dieta. En canvi, amb la inclusió del segó de blat la resposta inflamatòria va ser més prolongada, amb una important immunomodulació de les poblacions leucocitàries del teixit limfoide associat a l'intestí i amb increments dels macròfags sistèmics. Els canvis observats amb la molta grollera del blat de moro sobre l'estructura i sistema immunitari de l'intestí gros van ser marginals.

Per últim, l'**experiment IV** es va dissenyar amb l'objectiu d'estudiar també els efectes de la fibra alimentària, però en aquest cas a més llarg termini i amb l'administració prolongada i copiosa de midó resistent en porcs d'engreix, com a model animal potencialment utilitzable per a nutrició humana. Per això es van utilitzar 16 porcs que es van alimentar durant 14 setmanes amb 2 dietes: una dieta amb midó de blat de moro i una dieta amb midó cru de patata com a font de midó resistent. Durant les 8 primeres setmanes les dietes contenien un 25% de midó afegit i durant les 6 següents el percentatge es va augmentar a 35%. Al final del període experimental es va avaluar l'efecte d'aquestes dietes sobre les propietats fisicoquímiques del contingut del colon i la seva fermentació, així com sobre la morfologia intestinal, incloent-hi la infiltració limfocitària, l'activitat proliferativa i l'apoptosi. Els paràmetres hematològics i immunològics també es van avaluar al llarg de l'experiment en sang perifèrica. Els resultats d'aquest estudi indicaven que el consum prolongat de midó cru de patata de la dieta (25-35%), com a font de midó resistent, incrementa la sulfatació de les mucines i redueix la concentració de magnesi i l'activitat proliferativa de l'epiteli al colon. Alhora, la dieta rica en midó resistent va reduir el nombre de cèl·lules T a sang i a l'epiteli del colon, així com la presència de nòduls limfàtics a la mucosa del colon i l'apoptosi en els teixits limfoides intestinals i a la mucosa colònica. En conjunt, aquests resultats suggereixen una major integritat i protecció de la mucosa del colon, així com una menor activació limfocitària en els animals alimentats amb midó cru de patata.

Des d'un punt de vista metodològic, existeix una progressió pel que fa a les tècniques utilitzades al llarg d'aquesta tesis, d'acord amb els objectius de cada experiment. A l'experiment I es van aplicar les tècniques histològiques, prèviament posades a punt tant per l'intestí prim com per a l'intestí gros. L'experiment II es van aplicar aquestes mateixes tècniques, però a més tècniques de citometria de flux, estandarditzades prèviament, que permeten la determinació de les poblacions leucocitàries tant del GALT (gangli limfàtic ileo-còlic i placa de Peyer ileal) com de sang perifèrica. A l'experiment III s'utilitzen pràcticament les mateixes tècniques que a l'estudi anterior, però intentant fer un pas més determinant la capacitat de resposta dels leucòcits amb proves de resposta cel·lular. Per últim, l'experiment IV incorpora tècniques immunohistoquímiques de proliferació i apoptosi, alhora que es fa un seguiment hematològic i immunològic a nivell sistèmic (a llarg termini).

El treball d'aquesta tesi ha estat publicat o està pendent de publicar-se en els següents articles:

Nofrarías, M., Gibert, X. Majó, N., Segalés, J., Manzanilla, E.G., Pujols, J. (2004) Variaciones de las poblaciones celulares mononucleares, en la sangre de lechones, desde el destete hasta las 6 semanas de edad. *Laboratorio Veterinario*, 27, 7-13

Nofrarías M., Manzanilla, E.G., Pujols, J., Gibert, X., Majó, N., Segalés, J., Gasa, J. (2006) Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs. *J Anim Sci* 84, 2735-2742.

Manzanilla, E.G., **Nofrarías, M.**, Anguita, M., Castillo, M., Perez, J.F., Martin-Orue, S.M., Kamel, C., Gasa, J. (2006) Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J Anim Sci* 84, 2743-2751.

Anguita, M., Gasa, J., **Nofrarías, M.**, Martín-Orúe, S.M., Pérez, J.F., (2007) Effect of coarse ground corn, sugar beet pulp and wheat bran on voluntary intake and physicochemical characteristics of digesta of growing pigs. *Livest Sci* 107, 182-191.

Martínez-Puig, D., Castillo, M., **Nofrarías, M.**, Creus, E., Pérez, J.F. Long-term effects of feeding large amounts of resistant starch on the digestive tract: a study in pigs. *J Sci Food Agr* (Accepted).

Nofrarías, M., Manzanilla, E.G., Pujols, J., Gibert, X., Majó, N., Segalés, J., Gasa, J. (2007) Spray-dried porcine plasma affects intestinal morphology and immune cell subsets of weaned pigs. *Livest Sci*, 108, 299-302.

Roca-Canudas, M., Anguita, M., **Nofrarías, M.**, Majó, M., Pérez de Rozas, A.M., Martín-Orúe, S.M., Pérez, J.F., Pujols, J., Segalés, J., Badiola, I. (2007) Effects of different types of dietary non-digestible carbohydrates on the physico-chemical properties and microbiota of proximal colon digesta of growing pigs. *Livest Sci*, 109, 85-88.

Castillo, M. Martín-Orúe, S.M., **Nofrarías, M.**, Manzanilla, E.G., Gasa, J. Changes in caecal microbiota and mucosal morphology in weaned pigs. *Vet micro* (Accepted).

Nofrarías, M., Martínez-Puig, D., Pujols, J., Majó, N., Pérez, J.F. Long-term intake of resistant starch improves colonic mucosal integrity, and reduces gut apoptosis and blood immune cells. *Nutrition* (Submitted).

Nofrarías, M., Anguita, M., Pujols, M., Papaterra, G., Pérez, J.F., Roca, M., Segalés, J., Majó, N. Effect of coarse grinding, sugarbeet pulp or wheat bran on the colonic morphology and immunological parameters of growing pigs. *Livest Sci* (Submitted).

S'ha presentat a les següents comunicacions o pòsters a congressos:

Nofrarías, M., Gibert, X. Majó, N., Segalés, J., Manzanilla, E.G., Pujols, J. (2002) Variaciones de las poblaciones celulares mononucleares, en la sangre de lechones, desde el destete hasta las 6 semanas de edad. VIII Symposium de AVEDILA, Barcelona.

Manzanilla, E.G., Castillo, M., **M. Nofrarías, M.**, Anguita, M., Martín-Orue, S.M., Gasa, J. (2003) Avilamicin, plant extracts and butyrate vary microbial mass distribution and crypt depth in the hindgut of early-weaned piglet". 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Banff, Alberta, Canada. Vol. 2, p. 268.

Nofrarías, M., Martínez-Puig, D., Creus, E., Majó, N., Pérez, J.F. (2004) Adaptive responses to long term resistant potato starch consumption of growing pigs. International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, Hamburg, Germany. Vol.2, p. 754.

Manzanilla, E.G., **Nofrarías, M.**, Anguita, M., Castillo, M., Pérez, J.F., Kamel, C., Gasa, J. (2005) Effects of sodium butyrate, avilamycin, and a combination of plant extracts on the productive performance and intestinal equilibrium of early-weaned pigs. BOKU-Symposium Tierernährung, Viena, Austria.

Nofrarías, M., Manzanilla, E.G., Anguita, M., Pujols, J., Segalés, J., Majó, N. (2006) Avilamycin, sodium butyrate and spray dried porcine plasma improve pig performance after weaning, although with different intestinal effects. 19th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, Copenhagen, Dinamarca. Proceedings, p. 638.

Nofrarías, M., Manzanilla, E.G., Pujols, J., Gibert, X., Majó, N., Segalés, J., Gasa, J. (2006) Effects of dietary spray-dried porcine plasma on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs. 10th International Symposium on Digestive physiology in pigs, Vejle, Denmark. Proceedings, p.43.

Roca-Canudas, M., Anguita, M., **Nofrarías, M.**, Majó, M., Pérez de Rozas, A.M., Martín-Orúe, S.M., Pérez, J.F., Pujols, J., Segalés, J., Badiola, I. (2006) Effects of different types of dietary non-digestible carbohydrates on the physico-chemical properties and microbiota diversity of proximal colon digesta in growing pigs. 10th International Symposium on Digestive physiology in pigs, Vejle, Denmark. Proceedings, p.62.

Nofrarías, M., Martínez-Puig, D., Pujols, J., Majó, N., Pérez, J.F. Long-term consumption of resistant starch reduces T cell population and apoptosis in pig colon. (Accepted to the American Society of Animal Science annual meeting, 2007, July 8-12, San Antonio, USA)

Nofrarías, M., Anguita, M., Pérez, J.F., Roca, M., Majó, N. Effect of coarse ground corn, sugar beet pulp and wheat bran on the colonic morphology in growing pigs. (Accepted to the American Society of Animal Science annual meeting, 2007, July 8-12, San Antonio, USA)

Capítol 1

REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

1. REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

1.1. Estructura normal del tracte intestinal del porc

L'intestí és la part del tub digestiu que va des del pílor fins a l'anus. Es divideix en intestí prim, que té una funció secretora i d'absorció, i en intestí gros, que té la funció de reabsorció d'aigua i de formació de la femta (D.E.M., 2000).

1.1.1. Intestí prim

1.1.1.1. Anatomia macroscòpica

L'intestí prim (IP) es troba localitzat a la part dorsal dreta de l'abdomen i s'estén caudalment i ventralment a l'esquerra del colon (Cook, 1996). L'IP es manté en aquesta posició gràcies a l'acció del mesenteri, que està ancorat dorsalment entre els dos ronyons a la línia mitja sub-lumbar. Els seus límits proximal i distal són el pílor gàstric i la unió ileocecal, respectivament. La seva longitud, de 15 a 22 m, i el seu pes, de 0.3 a 1 kg, varia en funció de l'edat, però també d'altres factors com el deslletament i la dieta (Stanogias i Pearce, 1985; Pluske *et al.*, 1997; Spreeuwenberg, 2002; Vente-Spreeuwenberg *et al.*, 2003; Hedemann *et al.*, 2005). En el porc adult, el diàmetre de l'IP és de 2 a 5 cm, amb una paret de 2 a 7 mm de gruix, que es redueix quan l'intestí es contrau o es distén a causa del seu contingut.

A la part més proximal de l'IP hi trobem el duodè (~60 cm de longitud) que és on desemboquen els conductes biliar i pancreàtic (a 3 i 12 cm del pílor, respectivament). A continuació, es troben el jejú (de 13 a 20 m de longitud) i l'ili (de 0.4 a 1 m de longitud) que constitueixen la major part de l'intestí i que presenten un aspecte corbat característic en forma de nanses intestinals (Sisson, 1975).

Al llarg de tot l'IP, i també de l'intestí gros, s'observa macroscòpicament la presència de nòduls limfàtics solitaris (1 mm de diàmetre) o agregats de nòduls limfàtics (plaques de Peyer). Les plaques de Peyer (PP) es troben en nombre variable, entre 16 i 38 a l'IP, i la seva àrea està compresa entre els 0.24 cm² de les PP duodenals fins als 180 cm² de la PP

ileal en porcs de 8 setmanes d'edat (Chu *et al.*, 1979). Aquesta última, pot representar fins un 75 % de la superfície total del conjunt de les PP.

El gangli limfàtic mesentèric és el més visible i drena la limfa de tot el jejú i de l'ili, mentre que la limfa duodenal drena el gangli limfàtic pancreàtic-duodenal. El grup de ganglis limfàtics ileocòlics drenen la limfa de l'ili i de l'intestí gros proximal (Dyce *et al.*, 2002).

1.1.1.2. Estructura microscòpica

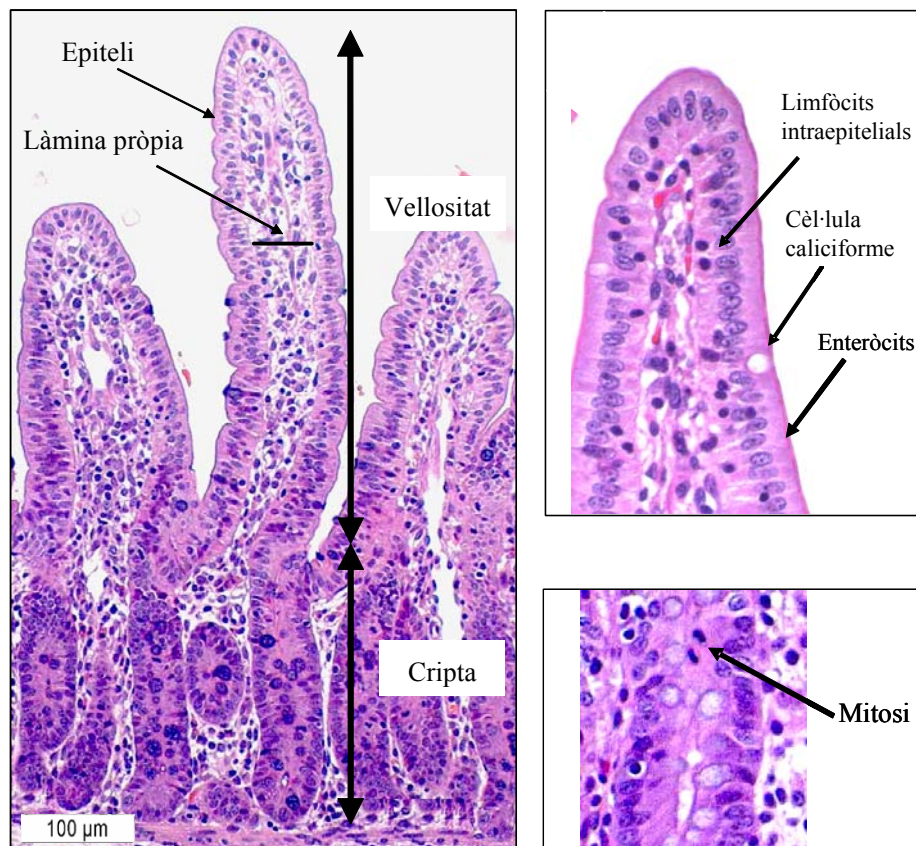
La paret de l'IP està formada per quatre capes: la túnica mucosa, la túnica submucosa, la túnica muscular i la túnica serosa (Titkemeyer i Calhoun, 1955; Cook, 1996).

La **túnica mucosa**, la capa més interna, comprèn la làmina epitelial superficial, la làmina pròpia (LP) i la capa muscular de la mucosa. La làmina epitelial està constituïda per un epiteli simple cilíndric, format bàsicament per enteròcits, que són les cèl·lules capacitades per l'absorció, i cèl·lules caliciformes secretores de mucus. També a l'epiteli es troben, però en menor nombre, les cèl·lules enteroendocrines (enterocromafins o argentafins) productores d'hormones digestives (secretina, colecistocinina, etc.) reguladores de les activitats motores, secretores i tròfiques de l'aparell digestiu (Banks, 1993). Les cèl·lules de Paneth, abundants a l'IP dels equins, no s'observen en els porcs, ni tampoc en els gossos ni en els gats (Banks, 1993).

Cal remarcar que per sobre d'aquesta túnica mucosa, es troba una capa de moc o capa mucosa que té funció protectora, lubricant i de transport. La quantitat i composició de la capa mucosa s'adapta a diferents condicions, com ara l'edat de l'animal (Brunsgaard, 1997; McCulloch *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2006b), la dieta (Sharma i Schumacher, 2001; Piel *et al.*, 2005; Tanabe *et al.*, 2005) i la composició de la microbiota intestinal (Sharma i Schumacher, 1995; Fontaine *et al.*, 1996; Sharma i Schumacher, 2001; Gaskins, 2003). La capa mucosa, secretada per les cèl·lules caliciformes, està formada bàsicament per aigua (95%) però les seves propietats característiques deriven bàsicament de les glicoproteïnes anomenades mucines que poden ser neutres, àcídiques (sialomucines) o àcídiques-sulfatades (sulfomucines) (Fontaine *et al.*, 1996).

La unitat estructural d'aquest sistema epitelial-mucós és el complex vellositat-cripta (Figura 1.1.). La longitud de les vellositats sol estar entre els 400 i els 1000 μm i la de les glàndules intestinals o criptes de Lieberkühn entre els 100 i els 300 μm (Cook, 1996). Els enteròcits de la vellositat presenten, en el seu pol apical, una important diferenciació cel·lular que són les microvellositats (0.1 per 1 μm). Aquestes formen un cantell en raspall que conté carbohidrases, peptidases i lipases que completen els processos digestius, així com receptors específics per pèptids, monosacàrids, triglicèrids, vitamines hidrosolubles i ions Ca^{2+} . Les cèl·lules indiferenciades de la base de les criptes proliferen, migren, es diferencien i adquireixen funcionalitat (absorció, digestió,..) per reemplaçar els enteròcits, les cèl·lules caliciformes o les enteroendocrines. Aquest procés de renovació de l'epiteli intestinal generalment triga entre 3 i 4 dies, tot i que és més lent (de 7 a 10 dies) en garrins de fins a 3 setmanes d'edat, i és una conseqüència de l'equilibri dinàmic entre la producció de cèl·lules a la cripta i la descamació i/o mort de les cèl·lules madures a la vellositat, bàsicament per apoptosi (Clarke, 1973; Hall i Byrne, 1989). Les cèl·lules de les criptes no tenen enzims digestius però és el principal lloc de secreció d'aigua i d'electròlits (Banks, 1993).

Figura 1.1. Imatge de l'estructura microscòpica del complex vellositat-cripta de l'intestí prim.



A part dels enteròcits i les cèl·lules caliciformes i enteroendocrines, a les vellositats i a les criptes intestinals s'observa també la presència aïllada de limfòcits intraepiteliais (IEL; *intraepithelial lymphocytes*) (Banks, 1993). D'altra banda, associades a les plaques de Peyer, s'observa la presència de cèl·lules M a l'epiteli, de les quals en parlarem més endavant. Quant a la LP és un teixit conjuntiu lax ric en fibres de col·làgena, vasos sanguinis i limfàtics (lacteals) i cèl·lules leucocitàries disperses o formant agregats (Banks, 1993; Cook, 1996). Aquesta capa dóna forma a la vellositat i està delimitada, basalment, per una fina capa de múscul llis, la *muscularis mucosae* o capa muscular de la mucosa.

La **túnica submucosa** és una làmina de teixit conjuntiu lax que conté feixos de col·làgena i fibres elàstiques, nòduls limfàtics, nombrosos vasos sanguinis i les fibres i ganglis nerviosos parasimpàtics que formen el plexe nerviós submucós de Meissner (Cook, 1996). També s'observa la presència de glàndules de Brunner, de secreció serosa, que s'estenen als primers 4 m de l'intestí (Titkemeyer i Calhoun, 1955).

La **túnica muscular** consta d'una capa circular interna i d'una capa longitudinal externa de múscul llis, separades per teixit conjuntiu que conté fibres i ganglis nerviosos parasimpàtics que formen el plexe nerviós mientèric d'Auerbach (Cook, 1996).

Per últim, la **túnica serosa o adventícia** és la capa més externa formada per teixit conjuntiu lax i teixit adipós, cobert per una única capa de cèl·lules mesotelials a la superfície peritoneal.

Malgrat que aquesta estructura bàsica que acabem de descriure es manté a tot l'IP, existeixen algunes diferències segons zones anatòmiques, i també segons edat o règim alimentari (Pluske *et al.*, 1997; Spreeuwenberg, 2002; Vente-Spreeuwenberg *et al.*, 2003; Hedemann *et al.*, 2005). Quant a zones anatòmiques, al duodè abunden els plects, les vellositats i criptes a la mucosa, les cèl·lules endocrines i les glàndules de Brunner a la submucosa; en canvi, el teixit limfàtic és reduït. Al jejú, hi ha menys vellositats però més llargues, amb presència de glàndules de Brunner només a l'inici. La presència de nòduls limfàtics mucosals i submucosals és evident. L'ili queda clarament diferenciat per la presència de la PP ileal (al marge antimesentèric). Així, pràcticament no hi ha plects intestinals, hi ha menor nombre d'IEL i les vellositats i criptes són de menor

longitud. En canvi, abunden les cèl·lules caliciformes, que incrementen en nombre caudalment. Amb l'edat, s'observa un augment del nombre d'IEL a jejú i ili, i nivells de cèl·lules caliciformes variables en funció del moment productiu de l'animal (Jaeger *et al.*, 1989; Chae i Lee, 1995; Rothkotter *et al.*, 1999a; Gu *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2006a). Pel que fa als aspectes nutricionals, hi ha nombrosos exemples que demostren que tant el nivell d'ingesta com la composició de la dieta alteren la morfologia intestinal (veure apartat 1.3. d'aquesta revisió bibliogràfica). Això és possible gràcies a l'elevada capacitat d'adaptació de la mucosa intestinal als canvis del contingut luminal (Jenkins i Thompson, 1994).

1.1.2. Intestí gros

1.1.2.1. Anatomia macroscòpica

L'intestí gros (IG) es troba localitzat a la part caudomedial de l'abdomen, lleugerament a l'esquerra, sobretot el cec, i ventral a causa del seu pes (McOrist i Neef, 1996). El colon disminueix de diàmetre gradualment i forma tres dobles espirals (colon descendent, colon transvers i colon ascendent) enroscades entre elles en el mesenterí ventral. Distalment, el colon es converteix en recte quan travessa la pelvis i deixa la forma espiral. El cec i el colon tenen dues o tres bandes fibromusculars longitudinals (*taeniae coli*) en la seva paret. La PP ileal fa prominència cap al cec i el colon, formant un engruiximent notable de la mucosa anomenat tonsil·la cecal.

En el porc en creixement, el cec fa normalment de 20 a 30 cm de longitud, de 5 a 10 cm d'ample i pesa de 0.07 a 0.1 kg buit i entre 0.5 a 0.9 kg ple. El colon mesura uns 3 a 6 m de longitud, fa uns 5 cm de diàmetre disminuint caudalment fins als 2 cm i pesa entre 0.5 a 1.3 kg buit i de 2.5 a 5 kg si es pesa ple (Stanogias i Pearce, 1985; McOrist i Neef, 1996). Les parets del cec i el colon són d'aproximadament 2 mm de gruix, mentre que les del recte d'uns 3 a 4 mm (McOrist i Neef, 1996). En animals lactants l'IG és proporcionalment molt més petit i s'expandeix considerablement després del deslletament (Yu i Chiou, 1997).

Malgrat la longitud de l'IG sigui una quarta part de la de l'IP, aquest té una gran capacitat física. L'IG té una àrea saculada i amb moviments peristàltics que afavoreixen un temps de trànsit prolongat (la digesta és retinguda durant 20-40 hores). Això incrementa el temps d'absorció i la fermentació microbiana amb un alt nombre de bacteries viables (10^{10} - 10^{11}) que gràcies al seu metabolisme permeten l'aprofitament energètic de les substàncies no digerides.

Els nòduls limfàtics solitaris (de 2 a 3 mm de diàmetre) són molt abundants al llarg de tot l'IG i se'n comptabilitzen aproximadament uns 600 al naixement fins a més de 1000 als 3 mesos d'edat (Liebler-Tenorio i Pabst, 2006). A més a més, també s'observa la presència, menys abundant, d'agregats de nòduls limfàtics anomenats complexos limfoglandulars que fan prominència a la superfície mucosa. Els limfàtics del cec i del colon drenen als ganglis limfàtics ileocòlic, còlics (localitzats entre els bucles colònics) i mesentèric caudal (McOrist i Neef, 1996).

1.1.2.2. Estructura microscòpica

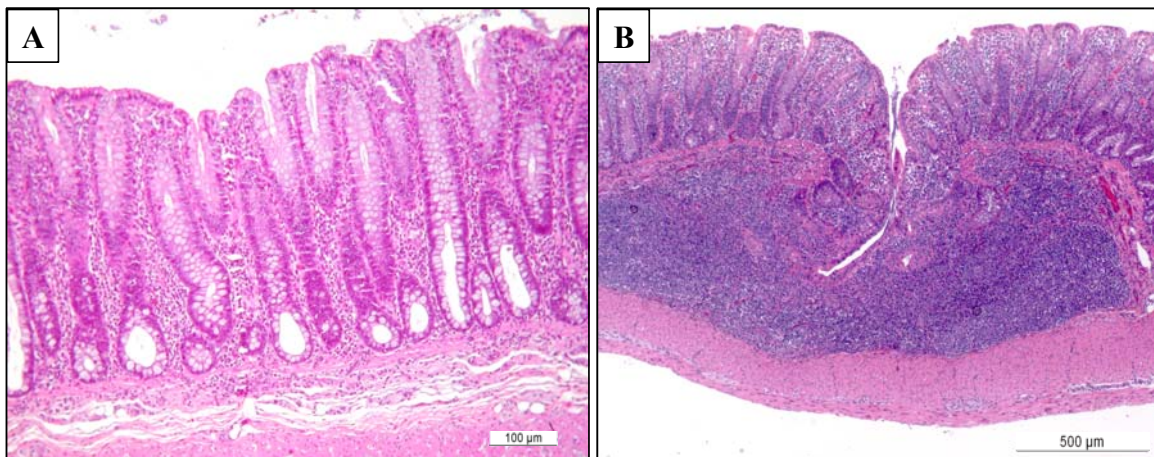
Histològicament, l'IG està format per les mateixes quatre làmines que l'IP, però no té vellositats i les criptes són estructures tubulars rectes (Figura 1.2. A).

La **túnica mucosa** també comprèn la làmina epitelial, la LP i la capa muscular de la mucosa (McOrist i Neef, 1996). La làmina epitelial també està formada per un epiteli simple cilíndric amb enteròcits o colonòcits que presenten microvellositats i gran capacitat d'absorció d'aigua, electròlits i àcids grassos volàtils (Banks, 1993; Stevens i Hume, 1998; Spreeuwenberg, 2002; Hedemann *et al.*, 2005). Les cèl·lules que proliferen i entren en mitosi estan normalment a la base de les criptes. En canvi, els limfòcits intraepiteliais i les cèl·lules enteroendocrines estan escampades per tot l'epiteli (Banks, 1993; Barker *et al.*, 1993; Cook, 1996). Les cèl·lules caliciformes secretores de mucines són nombroses a les criptes, una cada 3 o 10 colonòcits (Brunsgaard, 1997). La làmina pròpia, similar a l'IP, és un teixit conjuntiu lax ric en fibres de col·làgena, vasos sanguinis i limfàtics (lacteals) i cèl·lules leucocitàries disperses o formant agregats (Banks, 1993; Barker *et al.*, 1993; Cook, 1996).

La resta de túniques tenen una estructura pràcticament idèntica a la descrita per l'IP. Una fina làmina contínua de múscul llis, la capa muscular de la mucosa o *muscularis mucosae*, separa la mucosa de la submucosa. La **túnica submucosa** conté vasos sanguinis i limfàtics, teixit conjuntiu, fibres nervioses i nombrosos adipòcits. La **túnica muscular** consta també d'una capa circular interna i d'una capa longitudinal externa de múscul llis, amb ganglis nerviosos parasimpàtics i ganglis nerviosos del plexe mientèric enmig d'aquestes dues làmines (McOrist i Neef, 1996). La **túnica serosa**, a la superfície peritoneal, està formada per teixit conjuntiu lax cobert per una única capa de cèl·lules mesotelials.

Els nòduls limfàtics solitaris estan normalment restringits a la LP i a la part més superficial de la submucosa. En canvi, els complexos limfoglandulars (Figura 1.2. B) estan formats per agregats de fol·licles limfàtics adjacents a la *muscularis mucosae*, entre mucosa i submucosa, envaïts per criptes amb epiteli parcialment modificat (Barker *et al.*, 1993; McOrist i Neef, 1996; Liebler-Tenorio i Pabst, 2006).

Figura 1.2. Imatge microscòpica d'una secció del colon (A) i de l'estructura microscòpica d'un complex limfoglandular (B). Ambdues són seccions de colon de porc fixades en formol, incloses en parafina i tenyides amb hematoxilina-eosina.



Gràcies a la seva estructura microscòpica i macroscòpica, l'IG pot desenvolupar les seves funcions fisiològiques principals, que són: conservació/absorció d'aigua i electròlits, provisió d'una ruta per a l'excreció de productes i substàncies tòxiques, contenció de microorganismes i aprofitament d'energia i nutrients (Cummings, 1983; Ramakrishna *et al.*, 1990).

Com en el cas de l'IP, també a l'IG existeixen diferències estructurals segons les zones anatòmiques, l'edat o la dieta (Banks, 1993; Spreeuwenberg, 2002; Hedemann *et al.*, 2005). En general, les criptes són més profundes, més espaiades i la renovació és més freqüent a les parts distals del colon. A més a més, al colon distal i recte, les cèl·lules caliciformes són més abundants i secreten mucines més àcides en comparació amb les del cec que tenen un pH més neutre. En canvi, els nòduls limfàtics solitaris són més freqüents al cec i els complexos limfoglandulars al colon transvers. Amb l'edat, la longitud de l'IG incrementa, i encara que creixi de forma més lenta que a l'IP, ho pot continuar fent durant varis anys (McCance, 1974). Durant els primers mesos de vida, però no més endavant, s'observa un increment de la profunditat de les criptes, el nombre de mitosis, la secreció de mucines (especialment mucines àcides sulfatades) i el nombre de nòduls limfàtics a l'IG (Brunsgaard, 1997). Pel que fa a la dieta, a l'apartat 1.3. es revisen de forma detallada els potencials efectes dels diferents components de la dieta sobre l'estructura macroscòpica i microscòpica de l'intestí. En humans i animals de laboratori el coneixement és molt més ampli, però en els porcs se sap que, per exemple, els carbohidrats afecten el desenvolupament del tracte gastrointestinal (Jorgensen *et al.*, 1996), així com l'estructura de la túnica mucosa, la proliferació epitelial i la producció i les característiques de les mucines (Brunsgaard *et al.*, 1995; Brunsgaard, 1998).

1.1.3. Paràmetres d'estudi per avaluar l'estructura intestinal

Jensen *et al.* (2003) van enumerar les variables més importants que es poden estudiar en el tracte GI en relació a la funció intestinal: morfologia, motilitat, producció i característiques del mucus, permeabilitat transepitelial, immunitat, enzims, secrecions pancreàtiques i microbiota. De forma similar, pel que fa a la integritat intestinal, els indicadors més comunament utilitzats són: l'alçada de vellositat, la profunditat de cripta, el nombre de cèl·lules caliciformes i la producció de mucines, la permeabilitat transepitelial, la inflamació i l'activitat enzimàtica a les microvellositats (Spreeuwenberg, 2002).

Recentment, Montagne *et al.* (2007) en un estudi espai-temporal han definit els principals marcadors associats amb els canvis que tenen lloc en l'arquitectura i en la funció intestinals en els garrins recent deslletats. Després d'analitzar 69 variables associades amb la morfologia, fisiologia i ecologia del tracte GI, proposa l'alçada de les vellositats, l'activitat de la lactasa, el flux de macromolècules en el jejú o la colecistoquinina plasmàtica, com a marcadors de la fase aguda que té lloc just després del deslletament (5 dies). En la fase posterior d'adaptació, el factor principal a considerar és el procés de realimentació que es relaciona amb el pes de l'estómac, la massa de l'IP i l'activitat de la tripsina i la teofilina. Com a marcadors de la maduració de l'intestí proposa l'activitat de la maltasa, l'absorció de glucosa i la resistència basal a l'ili, els lactobacils i enterococs del colon i el pH del contingut colònic i cecal.

Pel que fa a la morfologia intestinal, aquesta es pot caracteritzar tant a nivell macroscòpic com microscòpic. L'estudi de l'estructura microscòpica normalment es realitza sobre teixit fixat en formol, inclòs en parafina i tenyit amb hematoxilina-eosina, a través d'un microscopi òptic. No obstant, en funció del/s paràmetre/s a avaluar, també es poden utilitzar altres mètodes de fixació (altres aldehyds -glutaraldehyd, acroleïna-, agents oxidants -tetròxid d'osmi, dicromat potàssic-, àcid acètic, metanol, etanol, clorur de mercuri, fixador a base de zinc, etc.), tècniques histològiques convencionals (tinció d'àcid periòdic de Schiff, blau alcià a diferents pH, mètode de Masson Fontana, etc.), així com tècniques immunohistològiques per determinar la proliferació cel·lular (BrdU, Ki-67, PCNA, etc.), l'apoptosi (TUNEL, caspasa-3 activada) o les poblacions leucocitàries (CD3, CD79 α , Lisozima, SLA-DQ,...), per exemple. D'altra banda, la quantificació morfològica es pot realitzar mitjançant diferents dispositius incorporats al microscopi òptic, encara que també es poden usar sistemes de captació i/o anàlisi d'imatge. En algun cas, s'ha utilitzat la microscopia electrònica de rastreig, per valorar bàsicament l'estat de les vellositats i microvellositats (Francesc *et al.*, 2002).

Condicionants tals com l'edat, el deslletament, la dieta i la microbiota intestinal poden produir canvis en la mucosa (especialment en la morfologia de les vellositats i les criptes) i en el teixit limfoide intestinals similars a aquelles alteracions produïdes per processos patològics (Cook, 1996). A la taula 1.1. es mostren els paràmetres més usats per diferents autors per a l'estudi de dietes experimentals (Hampson, 1986; Hall i Byrne, 1989; McCracken *et al.*, 1995; Key *et al.*, 1996; Brunsgaard, 1997; Pluske *et al.*,

1997; McCullogh *et al.*, 1998; Rothkotter *et al.*, 1999a; Jiang *et al.*, 2000; Van Dijk *et al.*, 2001; Spreeuwenberg, 2002; Mentschel i Claus, 2003; Wong i Gibson, 2003; Domeneghini *et al.*, 2004; Ishizuka *et al.*, 2004; Hedemann *et al.*, 2006; Anguita *et al.*, 2007). Dels estudis revisats, paràmetres tals com l'alçada de les vellositats i la profunditat de les criptes, les cèl·lules caliciformes i l'activitat mitòtica són els que s'usen més comunament per caracteritzar la morfologia microscòpica de l'intestí. Tanmateix, n'existeixen d'altres, poc explotats encara, com per exemple la quantificació i tipificació dels limfòcits de l'epiteli i de la làmina pròpia, que permetrien, mitjançant tècniques histològiques de fàcil aplicació, una caracterització de la resposta immunitària intestinal a una determinada dieta o component de la dieta.

Taula 1.1. Paràmetres morfomètrics a avaluar en l'estudi de dietes experimentals a l'intestí prim i a l'intestí gros.

	Túnica mucosa		Túnica submucosa	Túnica muscular	
	Epiteli	Làmina pròpia			
Estudi histològic	Vellositats	{ Alçada			
		{ Amplada			
		{ Superfície			
	Profunditat de criptes				
	Raó vellositat:cripta				
	Cèl·lules caliciformes	Cèl·lules totals			
		- Nombre			
		- Tipus		Arterioles	Gruix de les làmines musculars
	- Capa de moc	Limfòcits o altres leucòcits	Plexe nerviós		
	Limfòcits intraepitelials	- Nombre	Nòduls limfàtics	Plexe mientèric	
		- Tipus			
	Cèl·lules argentafins				
	Activitat mitòtica				
	Activitat apoptòtica				
Densitat de criptes					
Criptes ramificades					
Estudi macroscòpic	Pesos i longituds dels diferents segments intestinals				

L'alçada i la forma de la vellositats és un indicador del nombre de cèl·lules epitelials, i per tant una mesura indirecte de la capacitat de digestió i absorció (Hampson, 1986; Barker *et al.*, 1993). **La profunditat de les criptes i el seu diàmetre**, així com el nombre de cèl·lules mitòtiques, és un indicador de la producció cel·lular a la cripta i, per tant, del probable grau de maduració i capacitat funcional de les cèl·lules de la vellositat. En general, les agressions sobre l'epiteli intestinal promouen i incrementen la seva renovació (**proliferació**) a fi i efecte de mantenir l'estructura intestinal (Govers *et al.*, 1993; Pluske *et al.*, 1997). Els canvis adversos més marcats en el complex vellositat-cripta tenen lloc durant el deslletament; inclouen una reducció de l'alçada de les vellositats i un increment de la profunditat de criptes (Hampson, 1986; Kelly *et al.*, 1991a; Nabuurs *et al.*, 1993; Pluske *et al.*, 1997; McCracken *et al.*, 1999), però també una reducció de la presència de cèl·lules caliciformes a les criptes de l'IP (Dunsford i Haensly, 1991). De fet, la producció i alliberació de moc així com el **nombre i tipus de cèl·lules caliciformes**, regulats tant per factors microbians com de l'hoste (Deplancke i Gaskins, 2001), són paràmetres rellevants alhora d'avaluar la funcionalitat intestinal ja que són indicatius del grau de protecció de l'epiteli intestinal front als atacs de les proteases i les bacteries (Fontaine *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2006b).

1.2. El sistema immunitari intestinal del porc

1.2.1. Breu descripció del sistema immunitari del porc

El sistema immunitari (SI) és el principal responsable de la defensa de l'organisme enfront d'agents potencialment nocius, tant d'origen extern (virus, bacteries, paràsits,...) com intern (cèl·lules neoplàsiques o autoreactives,...). Les respostes immunitàries es classifiquen generalment en dos tipus: innates (naturals o inespecífiques) o adquirides (adaptatives o específiques) (Janeway, 2001). La immunitat innata està constituïda per mecanismes existents amb anterioritat al desenvolupament del primer contacte/infecció i capaçs d'establir respostes ràpides. La immunitat adquirida es caracteritza per una especificitat extraordinària per a diferents molècules i per la memòria, que li permet respondre amb major intensitat després d'exposicions repetides a un mateix microorganisme. Els components i les cèl·lules que formen aquests dos grans mecanismes de resposta es presenten a la taula 1.2.

Taula 1.2. Components del sistema immunitari del porc (adaptat de Schley i Field, 2002).

	Defenses	Components	Funcions
Immunitat innata	Barreres físiques	Pell i mucoses	Eviten l'entrada d'antígens a la circulació sistèmica
	Barreres cel·lulars	Cèl·lules fagocitàries Cèl·lules inflamàtores Cèl·lules assassines naturals Cèl·lules dendrítiques	Destrucció d'antígens estranys Producció de mediadors de la inflamació Destrucció de cèl·lules neoplàsiques o infectades Presentació antigènica
	Factors solubles	Citocines Complement Proteïnes de fase aguda	Activació/proliferació/reclutament d'altres cèl·lules Destrucció de patògens Inici dels canvis vasculars de la inflamació Augment de la fagocitosi Estímul de la reparació cel·lular
Immunitat adquirida	Limfòcits B	Cèl·lules plasmàtiques	Secreció d'immunoglobulines
	Limfòcits T	Cèl·lules T CD4+	Inducció de l'activació dels limfòcits Respostes cel·lulars (Th1) Respostes humorals (Th2)
		Cèl·lules T CD8+	Destrucció de cèl·lules neoplàsiques o infectades Supressió de l'activitat dels limfòcits
		Cel·lules T $\gamma\delta$	Modulació de les cèl·lules T i B Funcions efectores (Th1, activació granulòcits,...) Homeostasi tissular

Igual que la resta de mamífers domèstics, el SI del porc està constituït per cèl·lules, teixits, òrgans i factors solubles (proteïnes de fase aguda, el sistema del complement, immunoglobulines, histamina, interleucines, citocines,...). No obstant, aquesta espècie presenta una sèrie de diferències morfològiques i funcionals pròpies: ganglis limfàtics amb estructura invertida (còrtex interior/medul·la exterior), absència gairebé completa de cèl·lules en la limfa eferent i un elevat nombre de cèl·lules limfoides circulants, entre d'altres.

Els **òrgans limfoides** es divideixen en primaris o secundaris, segons la seva funció (Janeway, 2001). Els primaris (medul·la òssia i timus) són el principal lloc de producció i diferenciació de cèl·lules limfoides. En el porc, els limfòcits T maduren al timus i els limfòcits B al fetge fetal o a la medul·la òssia. En els òrgans limfoides secundaris, sistèmics (melsa i ganglis limfàtics) o associats a les mucoses (tonsil·la, plaques de Peyer, nòduls limfàtics,...), és on els limfòcits immunocompetents interaccionen entre sí

i amb els antígens prèviament captats, a fi i efecte de generar una resposta immune adequada.

Les **cèl·lules que formen el SI porcí** són molt variades tant en la seva estructura com en la seva funció, malgrat derivin totes elles d'una mateixa cèl·lula mare pluripotencial de la medul·la òssia. Bàsicament, se'n diferencien dues línies: la línia mieloide que dona lloc als granulòcits, als monòcits/macròfags i a les cèl·lules presentadores d'antigen pròpiament dites (APC; *antigen presenting cells*) i la línia limfoide de la qual deriven els diferents limfòcits (T, B i $\gamma\delta$) i les cèl·lules assassines naturals.

Els granulòcits o cèl·lules polimorfonuclears (**neutròfils, eosinòfils i basòfils/mastòcits**) són part essencial de la resposta innata i els primers en actuar durant la resposta immunitària. De tots ells, els neutròfils són els més abundants (90% dels leucòcits circulants en sang), portant a terme com a principal funció la fagocitosi. Els eosinòfils només representen un 2-5 % dels leucòcits circulants i la seva funció primordial és la de combatre les infestacions parasitàries, tot i que també participen en reaccions al·lèrgiques (Janeway, 2001). Els basòfils (en sang) i els mastòcits (en les mucoses) es troben en nombre molt limitat; actuen com a promotors de la resposta inflamatòria i són claus durant les respostes immunitàries de tipus al·lèrgic.

Els **monòcits** (en sang) i els **macròfags** (en els teixits) formen l'anomenat sistema mononuclear fagocític. Tenen un paper clau en la resposta immune ja que intervenen tant en la iniciació, amplificació i regulació de la inflamació (no específica), com en la iniciació, regulació i fase efectora de resposta immune específica (Solbach *et al.*, 1991; Guilford *et al.*, 1996). Les funcions del sistema mononuclear fagocític són nombroses. Les més primordials són: formació d'una extensa xarxa de captura d'antígens, fagocitosi, activitat proinflamatròria (secreció de mediadors de la inflamació: factors quimiotàtics, factors del complement,..) i activitat en la immunitat específica (presentació d'antígens, activació de limfòcits T i secreció de citocines i interleucines).

En els **limfòcits** recau la resposta immune adquirida o específica. Els **limfòcits T** dirigeixen i regulen la resposta immunitària específica, i es caracteritzen per ser capaços de reconèixer antígens associats a complexos majors d'histocompatibilitat (MHC; *Major Histocompatibility Complex*) de classe I o II. Dins la població de limfòcits T, se'n

reconeixen diferents subtipus classificats en funció de les característiques fenotípiques, funcionals i del procés de maduració que pateixen. En funció del receptor per antigen que posseeixin, $\alpha\beta$ -TCR o $\gamma\delta$ -TCR, es diferencien en dos grans grups, els limfòcits T $\alpha\beta$ i els T $\gamma\delta$, respectivament (Yang i Parkhouse, 1996).

Els limfòcits T $\alpha\beta$ madurs es divideixen generalment en dos grans subtipus: limfòcits T CD4⁺ i limfòcits T CD8⁺ (revisat per Zuckermann, 1999). La subpoblació CD4⁺ conté la majoria de les cèl·lules T cooperadores o inductores, són dependents de la presentació via MHC II i tenen la funció d'activar, potenciar i dirigir la resposta immune (Delves i Roitt, 2000a). En funció de les citocines que secreten, la resposta es pot classificar en Th1 (resposta inflamatòria mediada per cèl·lules; IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF- α), Th2 (resposta humoral; IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10), Th3 (possiblement de tolerància) o Th0 de funció encara desconeguda (Delves i Roitt, 2000b). En contrast, les cèl·lules CD8⁺ reconeixen els antígens associats a MHC I, secreten citocines (IFN- γ) i són capaces de desenvolupar una funció citotòxica (Miceli i Parnes, 1993). En els porcs, existeix també una població de cèl·lules dobles positives (CD4⁺CD8⁺) de cèl·lules T de memòria, derivades de CD4⁺, que incrementen amb l'edat i que són restringides per MHC II amb l'habilitat de respondre a antígens presentats amb anterioritat. D'altra banda, la molècula CD8 consisteix en un homodímer $\alpha\alpha$ o un heterodímer $\alpha\beta$ que es presenta a la superfície de les cèl·lules T amb densitat baixa o alta, respectivament, donant lloc a dues subpoblacions de cèl·lules CD8⁺: CD8^{low}⁺ o CD8^{high}⁺ (Lunney i Pescovitz, 1987; Saalmuller *et al.*, 1987; Pescovitz *et al.*, 1994b). Les cèl·lules CD8^{high}⁺ són generalment limfòcits T citotòxics, mentre que el CD8 s'expressa en baixes densitats conjuntament amb el CD4 (CD4⁺CD8^{low}⁺) en les cèl·lules amb memòria immunològica i en algunes cèl·lules $\gamma\delta$ i cèl·lules assassines naturals (Pescovitz *et al.*, 1994b; Yang i Parkhouse, 1996).

Les cèl·lules $\gamma\delta$ són normalment cèl·lules CD4⁻CD8⁻ no restringides pel MHC i particularment abundants en individus joves, en superfícies mucoses i en animals domèstics (remugants, porcs i aus) en comparació amb els humans. Les cèl·lules $\gamma\delta$ intervenen en un gran nombre de funcions immunes efectores caracteritzades per una activitat citolítica i/o Th1, regulació tant de limfòcits B com T $\alpha\beta$, estimulació de macròfags i granulòcits a través de citocines i producció factors de creixement epitelial (Hayday *et al.*, 2000). Això fa que aquestes cèl·lules tinguin un paper important en la

modulació de les inflamacions cròniques, en la immunitat de les mucoses o en el manteniment de la homeostasi tissular i la integritat epitelial (Boismenu i Havran, 1994; Hayday *et al.*, 2000; Holtmeier *et al.*, 2002).

En el porc, els **limfòcits B** tenen com a funció principal la producció de immunoglobulines (Ig), les quals poden actuar associades a la membrana de les cèl·lules B (com a receptors antigènics específics) o de forma soluble (com anticossos que s'uneixen a partícules foranies, facilitant la fagocitosi). Les cèl·lules B activades s'expandeixen clonalment davant d'antígens T dependents i independents, però requereixen la cooperació de cèl·lules T per a la diferenciació cap a cèl·lules plasmàtiques productores d'Ig A i G. Algunes d'elles també actuen com a cèl·lules de memòria (per aquesta diferenciació necessiten de la cooperació amb limfòcits T). Els limfòcits B també produeixen i responen a citocines, actuant a més com a APC (Pistoia, 1997).

Les **cèl·lules assassines** o **agressores naturals** (NK; *Natural Killer*) no estan restringides per MHC i tenen com a principal funció la destrucció de cèl·lules infectades i algunes cèl·lules tumorals. En el porc, aquestes cèl·lules, juntament amb els neutròfils, són especialment importants en animals joves (Evans i Jaso-Friedmann, 1993).

L'estudi de les característiques fenotípiques de les diferents poblacions de cèl·lules immunitàries es realitza mitjançant l'estudi de proteïnes de superfícies localitzades a les membranes cel·lulars. L'ús d'anticossos monoclonals i de diferents tècniques laboratorials (citometria de flux, immunohistoquímica,...) ha permès definir els grups de diferenciació que es corresponen a poblacions o subpoblacions fenotípicament diferents. A continuació, a la taula 1.3., es detallen alguns d'aquests marcadors cel·lulars.

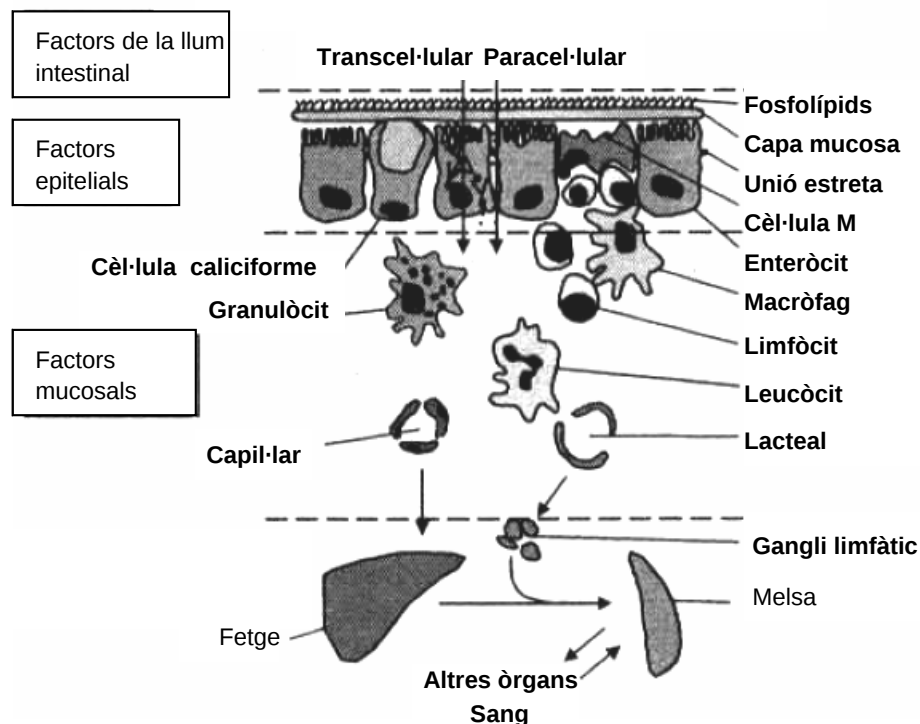
Taula 1.3. Antígens de superfície utilitzats de forma usual per caracteritzar les diferents subpoblacions cel·lulars del sistema immunitari porcí (adaptat de Chianini, 2001).

Grups	Antigen de superfície	Tipus cel·lular	Referència
Línia mieloide	SWC3 (CD172)	Macròfags/monòcits i granulòcits	Alvarez <i>et al.</i> , 2000
	SWC9	Macròfags madurs	Dominguez <i>et al.</i> , 1998
	CD14	Cèl·lules mielomonocítiques	Dominguez <i>et al.</i> , 1998
	CD16	Neutròfils, macròfags i cèl·lules NK	Saalmuller <i>et al.</i> , 1998
	MAC 387	Macròfags/monòcits i granulòcits	Evensen, 1993
Línia limfoide	CD2	Limfòcits T i cèl·lules NK. Cèl·lules B madures (probable)	Pescovitz <i>et al.</i> , 1994a
	CD3	Limfòcits T	Pescovitz <i>et al.</i> , 1998
	CD4	Limfòcits T cooperadors	Pescovitz <i>et al.</i> , 1984
	CD5	Limfòcits T	Saalmuller <i>et al.</i> , 1994
	CD8	Limfòcits T citotòxics	Pescovitz <i>et al.</i> , 1984
	CD21	Limfòcits B	Denham <i>et al.</i> , 1998
	CD79 α i β	Limfòcits B	Tanimoto i Ohtsuki, 1996
	$\gamma\delta$ TCR	Subpoblació limfòcits T	Davis <i>et al.</i> , 1998
	$\alpha\beta$ TCR	Subpoblació limfòcits T	Saalmuller <i>et al.</i> , 1991
Altres	CD25	Cèl·lules T activades, cèl·lules B activades i macròfags activats que expressen el receptor de IL-2	Denham <i>et al.</i> , 1994; Sinkora <i>et al.</i> , 2001
	CD45	Tots els leucòcits (antigen comú leucocitari)	Bullido <i>et al.</i> , 1997
	CD45RO	Limfòcits B i T de memòria, macròfags/monòcits	Bullido <i>et al.</i> , 1997
	CD45RA	Limfòcits B, limfòcits T no activats i macròfags/monòcits	Bullido <i>et al.</i> , 1997
	SLA I	Cèl·lules nucleades que expressen MHC classe I	Lunney, 1994
	SLA II DQ	Cèl·lules presentadores d'antigen que expressen MHC classe II	Bullido <i>et al.</i> , 1997
	SLA II DR	Cèl·lules presentadores d'antigen que expressen MHC classe II	Bullido <i>et al.</i> , 1997

1.2.2. El sistema immunitari intestinal del porc

Durant el procés de digestió i absorció de nutrients, l'intestí està exposat a una àmplia varietat d'antígens i microorganismes patògens procedents dels aliments, així com de bacteris residents, als quals cal limitar l'entrada. En aquest sentit, cal remarcar que el tracte GI proporciona una extensa àrea superficial ($\sim 100\text{-}400\text{ m}^2$) de contacte íntim entre l'organisme i les substàncies de la dieta, microorganismes, paràsits i toxines exògenes. Per això, a part de les funcions de digestió i absorció, el tracte GI desenvolupa importants **funcions de defensa i barrera protectora**, que han de permetre a l'intestí la captació de substàncies cap a la circulació sistèmica, però al mateix temps excloure als components patògens (Baumgart i Dignass, 2002). El sistema intestinal consisteix en una xarxa rica d'interaccions recíproques i finament orquestrades entre cèl·lules immunitàries, epitelials, endotelials, mesenquimatoses, nervioses i la matriu extracel·lular (Figura 1.3.). Qualsevol alteració a nivell de la mucosa que afecti la funció de barrera intestinal pot resultar en inflamació o dany tissular (Baumgart i Dignass, 2002). Això ha generat un interès creixent per la biologia de la mucosa intestinal, així com els estudis que investiguen el rol de les variables nutricionals sobre la seva integritat (Deitch, 1993).

Figura 1.3. Esquema de l'intestí vist com a barrera protectora i dels factors involucrats en aquesta funció (adaptat de Spreeuwenberg, 2002, en Wang, 1995).



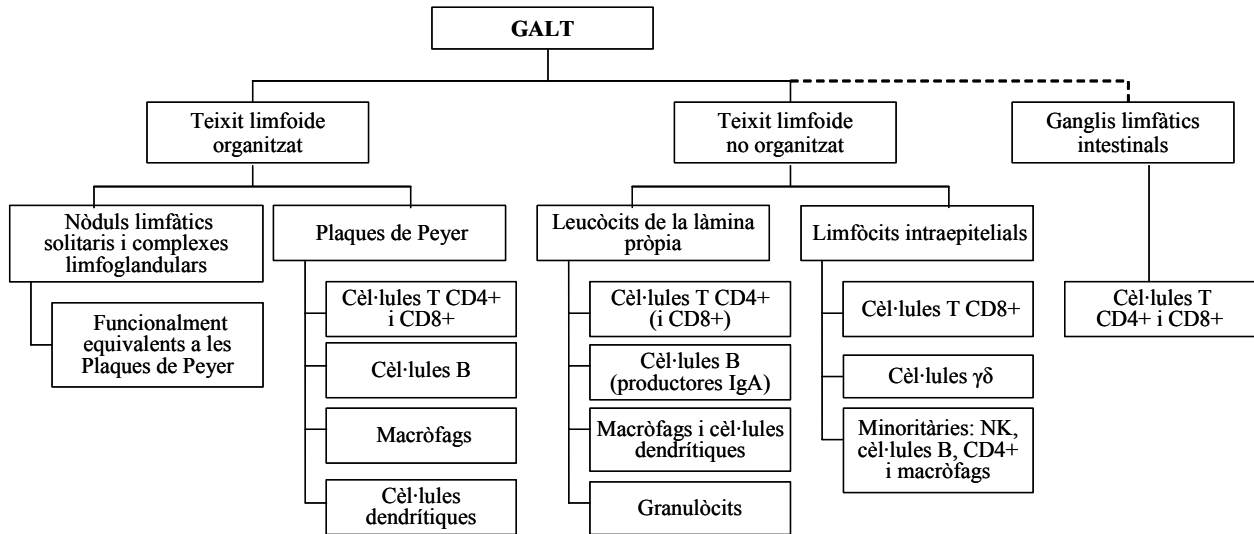
Els mecanismes de defensa de què disposa el tracte GI són múltiples i variats, tant no-immunitaris com immunològics (Spreeuwenberg, 2002). La defensa inespecífica inclou: la producció d'àcid gàstric, el peristaltisme, la capa mucosa, les unions estretes entre enteròcits (*zona ocludens*), la descamació epitelial, la proteolisi, la resistència front la colonització bacteriana i l'eix enterohepàtic. La defensa immunitària inclou la producció d'Ig així com les funcions desenvolupades per les cèl·lules M, els limfòcits i les altres cèl·lules del SI (Madara, 1989; Walker i Owen, 1990; Deitch, 1993; Schley i Field, 2002).

1.2.2.1. El teixit limfoide associat a l'intestí (GALT)

El sistema immunitari de les mucoses, que conté elements tant del SI innat com de l'adquirit, està estratègicament ubicat en àrees on els antígens i patògens externs poden accedir a l'organisme (Schley i Field, 2002). Aquest, inclou el teixit limfoide associat a les mucoses dels tractes respiratori, urinari i reproductiu, i també el que protegeix el tracte intestinal (GALT; *gut-associated lymphoid tissue*). Encara que no es disposa de moltes dades, s'estima que el GALT conté 60 bilions de cèl·lules, representa el 25% de la massa intestinal i el 50-70% de tot el teixit limfoide de l'organisme (James, 1993; Kagnoff, 1993; Gaskins, 1998).

El GALT (Figures 1.4. i 1.5.) està compost per teixit limfàtic organitzat en ganglis limfàtics intestinals, plaques de Peyer, nòduls limfàtics i en cèl·lules leucocitàries no-organitzades (teixit limfoide difús) a la LP i en el compartiment epitelial de l'intestí (Langkamp-Henken *et al.*, 1992; Mowat i Viney, 1997; Pabst i Rothkotter, 1999; Stokes i Bailey, 2000). Per una banda, el GALT organitzat és el responsable de la inducció de la resposta immunitària. Per l'altra, el GALT difús constitueix el lloc efector de la resposta immunitària.

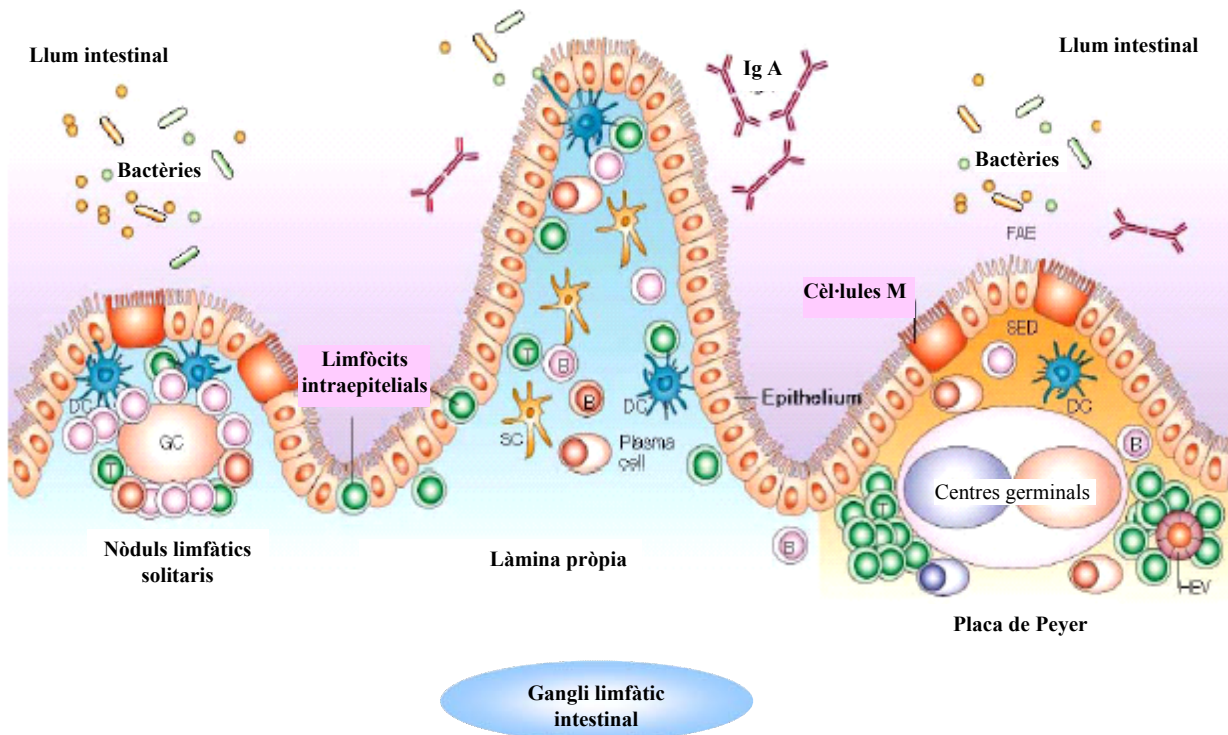
Figura 1.4. Components del teixit limfoide associat a l'intestí (GALT) (adaptat de Schley i Field, 2002).



Les **plaques de Peyer** madures consisteixen principalment en fol·licles rics en cèl·lules B, envoltats per àrees interfol·liculars riques en cèl·lules T, on hi ha nombroses vènules endotelials altes, que permeten la migració cel·lular i la recirculació limfocítica, i una cúpula o volta subepitelial o *dome* que està immediatament a sota de l'epiteli (Kelsall i Strober, 1996). L'epiteli associat al fol·licle, que recobreix les PP, és un teixit epitelial modificat amb presència d'un elevat nombre de cèl·lules M. La característica principal d'aquestes cèl·lules és la seva elevada capacitat de transport transepitelial d'antígens (proteïnes i pèptids) per endocitosi fins a espais subepitelials, on són captats i processats per les APC. La volta subepitelial que hi ha just a sota és una zona de teixit conjuntiu lax on es troben les cèl·lules dendrítiques (MHC II+) amb la funció principal de captació i presentació d'antígens a les cèl·lules T cooperadores (Langkamp-Henken *et al.*, 1992; Kagnoff, 1993). També conté macròfags, cèl·lules plasmàtiques i limfòcits T i B. En estret contacte amb aquesta zona, es troba l'estructura principal de les PP, els fol·licles, que contenen bàsicament cèl·lules B Ig M+, així com algunes cèl·lules dendrítiques fol·liculars i alguns limfòcits T CD4+ encarregats de col·laborar en el canvi d'isotip cap a Ig A (Kagnoff, 1993). A la zona més basal d'aquests fol·licles hi trobem els centres germinals de les PP, formats bàsicament per centròcits i centroblasts (Spencer *et al.*, 1986), la immensa majoria dels quals expressen l'Ig A (Weinstein i Cebra, 1991). Les zones interfol·liculars estan caracteritzades per una important

presència de cèl·lules T (bàsicament CD4+, però també CD8+, CD4+CD8+ i CD25+), però també hi ha cèl·lules dendrítiques interfol·liculars, macròfags i una petita quantitat de limfòcits B. L'àrea fol·licular rica en cèl·lules B i la zona interfol·licular rica en cèl·lules T se superposen en algunes regions i són un lloc important per a les interaccions inicials entre les cèl·lules T i B (MacLennan *et al.*, 1997).

Figura 1.5. Esquema dels diferents components del teixit limfoide associat a l'intestí (GALT) (adaptat de Fagarasan i Honjo, 2004).



En conjunt, les PP representen el major punt de captació d'antígens intestinals, servint també de lloc d'inducció de respostes de cèl·lules T i B (Stokes i Bailey, 2000; Schley i Field, 2002). Un gran nombre de les respostes específiques de l'Ig A secretora són generades en les PP. Els limfòcits T i B específics d'antigen deixen la PP, migren als ganglis limfàtics regionals on proliferen i maduren, i finalment entren a la circulació sistèmica, des d'on podran tornar a repoblar específicament el teixit limfoide intestinal (Rothkotter *et al.*, 1999b). Entre les diferents PP del porc existeixen diferències regionals. Les PP jejunals tenen una mida més discreta però més constant al llarg de la vida de l'animal i una major proporció i tràfic de limfòcits T (Zuckermann i Gaskins, 1996; Pabst i Rothkotter, 1999).

Els **nòduls limfàtics solitaris** o **els complexos limfoglandulars**, sovint microscòpics, són agregats limfoides formats per fol·licles que són estructuralment i funcionalment molt similars als fol·licles que formen les PP. Es creu que són un sistema equivalent o complementari a les PP per a la inducció de les respostes generades a la mucosa intestinal (Hamada *et al.*, 2002).

Quant als **leucòcits** presents a la **làmina pròpia**, s'observa una predominància de cèl·lules B i plasmàtiques (el 90% secretores d'Ig A) a la base de les criptes, i de limfòcits T a la part mitja i apical que bàsicament són CD4+, però també hi ha CD8+ situats pròxims a l'epiteli (Langkamp-Henken *et al.*, 1992; Stokes i Bailey, 2000; Schley i Field, 2002). La població d'eosinòfils i mastòcits residents no és menyspreable, així com la d'APC (macròfags i cèl·lules dendrítiques) i de neutròfils que incrementen el seu nombre en resposta a patògens (King *et al.*, 2003). A part de la funció principal d'elaboració de respostes actives enfront antígens (funció efectora), a la LP, i en particular a la població de cèl·lules T, se li atribueix la funció de regulació i manteniment de l'homeostasi mucosal (Bailey *et al.*, 1998; Stokes i Bailey, 2000). L'anàlisi de la població de limfòcits T, les citocines que produeixen (IL-4 i IL-10) i la major susceptibilitat a l'apoptosi suggereix que hi ha un clar biaix a favor de la tolerància antigènica evitant una sobreacció als antígens de la llum intestinal (Stokes i Bailey, 2000; King *et al.*, 2003). Això té lloc fins i tot en els casos on hi ha hagut una resposta activa inicial a la PP o al gangli limfàtic (Bailey *et al.*, 2001).

La població heterogènia de **limfòcits intraepitelials** (un de cada 6-10 enteròcits) representa el 50% de tots els limfòcits intestinals (Vega-Lopez *et al.*, 1993; Vega-Lopez *et al.*, 2001) i el *pool* de cèl·lules immunocompetents més gran de l'organisme (Langkamp-Henken *et al.*, 1992). Aquestes cèl·lules són diferents de la població limfocítica de la circulació sistèmica i dels limfòcits de la LP. El seu nombre depèn de l'influx des d'altres òrgans, de l'emigració cap a la llum intestinal, i de l'apoptosi o la proliferació local (Jaeger *et al.*, 1989; Chae i Lee, 1995; Rothkotter *et al.*, 1999a; Gu *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2006a). Encara que la majoria d'IEL són bàsicament cèl·lules T CD3+, majoritàriament CD8+ (50-80%), destaca la presència de limfòcits T $\gamma\delta$ (Hayday *et al.*, 2000; Solano-Aguilar *et al.*, 2001). De fet, del total d'IEL, els limfòcits T $\gamma\delta$ representen entre un 5 i un 20% (Beagley *et al.*, 1995). Una particularitat que mostren

els limfòcits T $\gamma\delta$ és que poden respondre a diferents antígens bacterians sense requerir-ne la seva presentació, fet que suggereix que aquestes cèl·lules estan implicades en la defensa innata (Williams, 1998). Els limfòcits T $\gamma\delta$ també contribueixen a la reparació del teixit i a la regeneració cel·lular després de la resolució de la resposta immunitària, mitjançant la producció de citocines i factors de creixement (Boismenu i Havran, 1994), ajuden a la producció d'Ig A i a la regulació de les respostes sistèmiques enfront els aliments via IFN- γ (Mowat i Viney, 1997). Com ja s'ha comentat, la major part dels limfòcits T intraepiteliais són CD8+, i d'aquests, una gran part presenta l'homodímer CD8 $\alpha\alpha$ (Guy-Grand i Vassalli, 1991). La presència de limfòcits T amb aquest homodímer és característica d'aquest compartiment intraepitelial tot i que se'n desconeix la seva funció. Al compartiment intraepitelial també hi ha cèl·lules NK que poden arribar a representar fins al 25 % de tots els IEL i la majoria d'elles expressen el receptor per a la IL-2, que és un indicador d'activació cel·lular (Van Parijs *et al.*, 1997; Todd *et al.*, 1999). Els limfòcits T CD4+, les cèl·lules B i els macròfags són poblacions molt minoritàries en aquest compartiment. Malgrat que les funcions biològiques no estiguin del tot establertes, la seva localització en contacte directe amb la llum intestinal, suggereix que els IEL poden ser el primer compartiment del SI que respon als antígens intestinals. En concret se'ls atribueix una potent capacitat citolítica i al mateix temps immunoreguladora/supressora capaç de mantenir la integritat epitelial o induir tolerància oral (Guilford *et al.*, 1996; Hayday *et al.*, 2000; Schley i Field, 2002; King *et al.*, 2003).

Encara que no estan situats a la mucosa intestinal, els **ganglis limfàtics mesentèric, ileocòlic i colònics** són considerats també part del GALT i tenen la mateixa estructura que la resta de ganglis limfàtics perifèrics (Guilford *et al.*, 1996; Hayday *et al.*, 2000; Schley i Field, 2002; King *et al.*, 2003). Estan formats tant per cèl·lules limfàtiques que deixen o entren a l'intestí, com aquelles cèl·lules que formen part de la circulació perifèrica (Rothkotter *et al.*, 1999b). Se'ls atribueix dues funcions principals: per una banda, actuar com a filtre per als antígens i microorganismes, mitjançant les cèl·lules fagocítiques, i per l'altra, la presentació d'antígens al SI. Histològicament, en el porc, la seva estructura i circulació és invertida respecte la resta de mamífers. Així, a la perifèria, per on entra la limfa eferent, hi ha la medul·la, rica en macròfags, APC, cèl·lules plasmàtiques i fibres de teixit connectiu, però sense formació de sinus ni cordons (Ramos, 1989; Chianini, 2002; Pappaterra, 2002). Interiorment, trobem el

còrtex, format per fol·licles primaris i secundaris bàsicament de cèl·lules B. Els fol·licles primaris contenen principalment limfòcits B madurs, mentre que els secundaris (que contenen centres germinals) són llocs d'intensa proliferació de cèl·lules B amb la consegüent síntesi de cèl·lules B memòria que es queden al fol·licle i de cèl·lules plasmàtiques secretores d'Ig que van a la circulació sanguínia i es distribueixen per l'organisme. El teixit limfoide difús que els envolta (paracòrtex) és una àrea rica en cèl·lules T, dendrítiques i macròfags (Chianini *et al.*, 2001).

1.2.2.2. La resposta immunitària intestinal

Els trets diferencials de la resposta immunitària intestinal són: i) preponderància de la secreció d'Ig A, ii) tendència a generar una resposta immunitària dominada per les cèl·lules T supressores, iii) xarxa immunològica mucosal i migració limfocitària (Guilford *et al.*, 1996).

La resposta immunitària intestinal que es genera a les estructures limfoides organitzades del GALT es basa en dos fets importants: el desenvolupament de cèl·lules B capaces de produir Ig i l'activació i diferenciació de cèl·lules T. Ambdues poblacions posteriorment migraran fora del GALT i aniran tant a les superfícies mucoses com a la circulació perifèrica (Maloy i Powrie, 2001). Per tant, els canvis immunomodulatoris intestinals poden visualitzar-se tant en els paràmetres immunitaris del GALT, com dels òrgans limfoides secundaris o la circulació perifèrica (Schley i Field, 2002).

L'entrada dels antígens i dels microorganismes a la mucosa intestinal indueix una resposta immunitària mucosal. Els antígens poden entrar a través de les cèl·lules M, cèl·lules epitelials especialitzades en la captació i el transport d'antígens luminals, o a través dels enteròcits que poden actuar com a APC no professionals. Els antígens migren a les àrees T interfol·liculars i/o als fol·licles de cèl·lules B de les PP, on són presentats als limfòcits immunocompetents. Seguidament, els limfòcits T activats secreten TGF- β , que inhibeix la producció d'Ig G i d'Ig M i indueix als limfòcits B a realitzar un canvi d'isotip a Ig A. Les cèl·lules T precursors específiques d'antigen, i les cèl·lules B precursors de cèl·lules plasmàtiques productores d'Ig A abandonen la PP i migren als ganglis mesentèrics, on maduren i pateixen una expansió clonal (Mowat i Viney, 1997). Aquestes cèl·lules entren a la circulació sistèmica a través del conducte

toràcic i retornen a l'epiteli intestinal i altres zones mucosals, on exerciran la seva funció com a cèl·lules efectores. Les cèl·lules B arriben a la LP on, sota la influència de cèl·lules T i de citocines secretades, completen la seva diferenciació a cèl·lules plasmàtiques productores d'Ig A, en resposta a la reintroducció d'un antigen (Kagnoff, 1993; King *et al.*, 2003). Aquestes Ig confereixen protecció ja que eviten l'adherència de toxines i bacteries a epiteli i són mediadores de la citotoxicitat cel·lular (Gaskins, 1998). Els limfòcits T activats migren a les zones efectores de la mucosa intestinal (GALT difús; epiteli i LP) gràcies a complexos interaccions entre selectines i integrines de la seva membrana i els seus lligands presents a la superfície de les cèl·lules endotelials de la LP (Kelsall i Strober, 1996).

▪ **Ontogènia i modulació de la resposta immunitària intestinal**

El SI porcí està en **contínua evolució** mentre els animals van creixent, tant pel que fa l'expressió fenotípica de les cèl·lules que el configuren com a la seva capacitat de resposta (Solano-Aguilar *et al.*, 2001; Manzano *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2006b). Aquests canvis, juntament amb els observats en la morfologia intestinal, podrien explicar l'augment de la supervivència enfront els desafiaments antigènics que té lloc a mesura que incrementa amb l'edat dels animals (Brunsgaard, 1997; Brown *et al.*, 2006b). Per tant, és essencial el coneixement de l'evolució del SI intestinal i sistèmic per determinar quins dels elements d'aquest complex sistema són claus per a respondre eficientment i incrementar la taxa de supervivència de l'organisme.

Els garrins **recent nascuts** es poden considerar immunoincompetents, a causa del baix nombre de cèl·lules presentadores d'antigen (MHC II+) intestinals i de limfòcits CD4+ i CD8+ necessaris per induir una resposta immunitària activa (Bianchi *et al.*, 1992; Vega-Lopez *et al.*, 1995; Pabst i Rothkotter, 1999). Per tant, depenen de la transferència d'anticossos materns a través del calostre i la llet ja que no desenvolupen una immunitat activa fins a les 4-7 setmanes de vida (Bailey *et al.*, 2001). Aquest desenvolupament està influenciat per un ventall de factors ambientals que inclou els antígens o anticossos derivats de la mare, la microbiota comensal i els patògens, entre d'altres (Bailey *et al.*, 2005). En ambients convencionals, el desenvolupament té lloc ràpidament a través de diferents fases definides (Taula 1.4.; Bailey *et al.*, 2001).

Taula 1.4. Etapes en el desenvolupament del sistema immunitari mucosal en garrins.

Etapla	Edat	Observacions
Etapa 1	Recent nascuts	Plaques de Peyer rudimentàries, baix nombre de cèl·lules T i cèl·lules presentadores d'antigen a la mucosa.
Etapa 2	1 dia – 2 setmanes	Expansió no específica de les PP i de les cèl·lules B. Aparició d'algunes cèl·lules T CD4+ activades. Influx de cèl·lules MHC II+.
Etapa 3	2 – 4 setmanes	Aparició de cèl·lules T CD4+ madures.
Etapa 4	4 – 6 setmanes	Expansió del repertori de cèl·lules B. Aparició de les cèl·lules CD8+.

En el moment del **deslletament** (3-4 setmanes d'edat), el garrí és exposat a una gran quantitat d'estímuls antigènics bacterians i de la dieta que poden activar sobtadament el seu SI. Després del deslletament, s'han descrit increments en l'expressió de citocines a l'intestí i de diferents poblacions de cèl·lules T a la LP de l'IP, i també increments dels nivells plasmàtics d'IL-1 i fibrinogen (McCracken *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000; Spreewenbergh, 2002; King *et al.*, 2003; Pie *et al.*, 2004). King *et al.* (2003) proposa dues hipòtesis que explicarien aquesta activació del SI: i) l'anorèxia i el dejú prolongat comprometen la integritat intestinal permetent la penetració d'antígens intestinals a l'interior de l'organisme, iniciant així una resposta immunitària, ii) el SI del garrí és encara immadur i no és capaç de distingir entre antígens innocus i nocius, i mostra una resposta exacerbada.

Les influències ambientals, en un sentit ampli, poden accelerar o alentir el desenvolupament o, en alguns casos, pertorbar el balanç cap a una funció efectora o reguladora excessiva, amb implicacions sobre la salut humana i animal (Bailey *et al.*, 2005). **La dieta i les condicions ambientals i d'allotjament** condicionen clarament el nivell de noxes i d'exposició antigènica de l'intestí, provocant una considerable variació en les respostes immunes i en l'estructura histològica intestinal (McOrist i Neef, 1996). Els desafiaments naturals inclouen tant el propi creixement bacterià i els productes derivats de la fermentació bacteriana, com els antígens alimentaris de certes dietes (veure apartat 1.3.) o el dany causat pel fregament mecànic del propi aliment (Wyatt *et al.*, 1988).

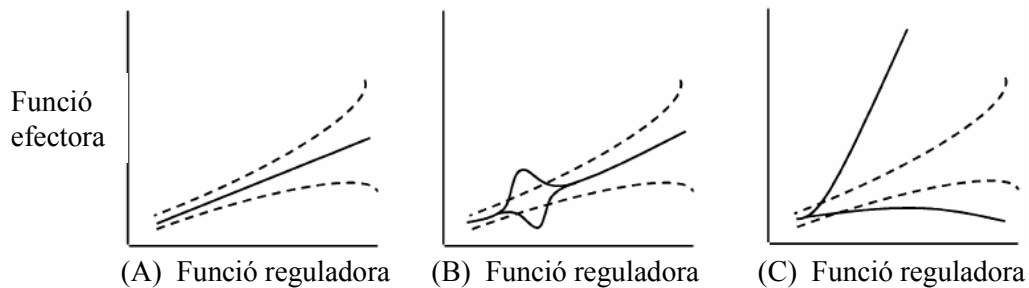
Per una banda, estudis que comparen animals convencionals respecte animals lliures de gèrmens han demostrat que l'evolució de la immunitat intestinal i sistèmica està clarament afectada per la **microbiota intestinal** (Cebra, 1999). Així, els animals convencionals presenten una major renovació cel·lular, major nombre de cèl·lules a la LP, major secreció d'Ig A i PP més grans i amb poblacions diferents (Gaskins, 2003). És més, aquestes diferències tenen lloc independentment de l'exposició a antígens de la dieta, fet que indica el paper principal que juga la microbiota en la maduració del SI intestinal, més que no pas la pròpia dieta en sí. A més, si les bactèries o altres agents nocius travessen la primera línia de defensa i arriben a la LP, els seus metabòlits o els mediadors alliberats pel propi organisme (majoritàriament per part dels enteròcits) poden desencadenar una resposta immunitària o evocar una resposta inflamatòria (Baumgart i Dignass, 2002). Malgrat que la invasió per bactèries pot generar una resposta immunitària, aquesta penetració de la barrera epitelial generalment no és suficient per ella mateixa per induir inflamació evident a la mucosa intestinal (Berkes *et al.*, 2003). No obstant això, i en contraposició als potencials efectes nocius i pro-inflamatoris provocats per la translocació bacteriana, alguns productes derivats de la fermentació microbiana, com ara els AGV, podrien afavorir el tropisme i la integritat epitelial i actuar amb propietats antiinflamatòries (Sakata, 1987; Soergel, 1994; Cavaglieri *et al.*, 2000; Cavaglieri *et al.*, 2003).

D'altra banda, la discriminació entre agents innocus d'aquells que són patògens és essencial. Així, és necessària la tolerància enfront agents innocus (la majoria dels de la dieta i els microorganismes sapròfits) ja que si la resposta immunitària no es desenvolupa correctament pot conduir a una inflamació inapropiada en el tracte GI (Strobel i Mowat, 1998; Bailey *et al.*, 2001). De totes formes, malgrat hi hagi tolerància local enfront les bactèries comensals que es troben en altes densitats a la llum intestinal, Macpherson *et al.* (2005) han demostrat recentment que si aquestes travessen la barrera epitelial i assoleixen els llocs inductors de la resposta immunitària intestinal, poden generar una resposta immunitària efectiva a nivell sistèmic, que de forma normal roman no estimulada enfront bactèries residents.

El SI es desenvolupa amb l'edat en equilibri entre els components efectors i els reguladors de la resposta immunitària intestinal (Figura 1.5.; Bailey *et al.* 2005). La integritat de la mucosa, especialment en nounats, depèn del manteniment de l'equilibri

entre determinats límits a fi i efecte d'evitar respostes inapropiades. La pertorbació d'aquest balanç per influències ambientals (deslletament, infecció) acaba desembocant en una resposta immunitària transitòria inapropiada a antígens inofensius (per exemple la soja al deslletament) o en una susceptibilitat transitòria a la malaltia (per exemple *E. coli* al deslletament). Influències inespecífiques del medi resulten en un desequilibri entre les funcions efectores i reguladores; aquests animals estan permanentment predisposats a respostes immunes desregulades (al·lèrgia o les infeccions cròniques).

Figura 1.5. (A) Desenvolupament del SI amb l'edat en equilibri entre les funcions efectores i reguladores (—) dins els límits segurs (-----). (B) Pertorbació d'aquest balanç per influències ambientals que desemboca en una resposta immunitària transitòria inapropiada. (C) Influències inespecífiques del medi resulten en un desequilibri permanent entre les funcions efectores i reguladores (adaptat de Bailey *et al.*, 2005).



En animals, la majoria d'estudis referents a la resposta immunitària del GALT s'han focalitzat a l'IP i en les primeres edats. En els últims anys, però, l'interès creixent per les malalties inflamàtores cròniques del budell (malaltia de Crohn, colitis ulcerosa) i el càncer de colon en humans ha permès incrementar el coneixement de la patofisiologia de l'IG. Tot i que en línies generals els principis immunoinflamatoris de l'IP valen per l'IG (Barker *et al.*, 1993), tal i com s'ha comentat anteriorment, hi ha trets estructurals i funcionals que diferencien aquests dos compartiments. Per exemple, a l'IG, la microbiota, la concentració de components de la dieta i de substrats no digerits, l'aigua, els productes de fermentació i la producció de mucines, entre d'altres, estableixen les característiques físicoquímiques de l'ambient intestinal al qual s'exposa la mucosa colònica, determinen la integritat de la mucosa i modulen les respostes immunitàries (Brunsgaard, 1998; Schley i Field, 2002).

1.3. Nutrició: efectes sobre l'estructura i el sistema immunitari intestinals

El programa d'alimentació dels porcs consta de diferents pinsos segons el pes, l'edat i l'estat fisiològic dels animals (Taula 1.5.). Com a animals monogàstrics, on la digestió és principalment enzimàtica, les dietes són riques en midó, proteïna, greix i pobres en fibra. En condicions convencionals, els porcs s'alimenten amb pinsos compostos, complets i formulats en base a la matèria fresca.

Taula 1.5. Programa d'alimentació típic del porcí: requeriments nutricionals (en matèria fresca) i característiques de les dietes (ISU, 1996; NRC, 1998).

Pes viu (kg)	Deslletament / Transició		Creixement / Engreix		
	6-12	12-20	20-60	40-60	60-100
Energia metabolitzable, Kcal/kg	3200	3250	3200	3100	3000
Proteïna bruta, %	18-22	18-20	15-20	14-18	12-16
Fibra bruta, %	< 3	3-4	4-6	4-6	4-6
Extracte eteri, %	4-10	4-8	< 8	< 8	< 8
Lysina, %	> 1.5	> 1.2	> 1.1	> 0.85	< 0.7
Peculiaritats	Ric en lactosa i ingredients d'alta qualitat. Alta digestibilitat. Additius		Moderat en lactosa. Additius	Poques limitacions en ingredients	

El tracte gastrointestinal (GI) té com a funció principal la de transformar aquests aliments ingerits en nutrients que puguin ser posteriorment absorbits i disponibles per l'organisme. A més, en els primers estadis del creixement, l'intestí també absorbeix macromolècules que són importants per al creixement i desenvolupament de l'individu, com són diferents factors de creixement (Weaver *et al.*, 1990) i Ig procedents de la llet materna (Simister i Rees, 1985). Morfològicament, l'intestí, especialment l'IP, ha desenvolupat estructures per augmentar l'àrea de superfície de contacte entre el medi extern i intern: les nanses intestinals que permeten una elevada longitud, els plects intestinals de mucosa i submucosa que incrementen tres vegades la superfície si es compara amb un tub cilíndric, les vellositats intestinals que incrementen de 7 a 14 vegades la superfície, i les microvellositats que incrementen de 15 a 40 vegades la superfície d'absorció i secreció (Banks, 1993; Barker *et al.*, 1993; Cook, 1996). Els

nutrients poden ser absorbits des de la llum intestinal a través de dues rutes: la via paracel·lular a favor de gradient i sense despesa energètica i la via transcel·lular per proteïnes transmembrana de les membranes cel·lulars, si bé hi ha una part que travessa la bicapa lipídica per difusió simple (Woudstra i Thomson, 2002).

La ingestió d'aliment per via enteral *per se* i el nivell de consum d'aliment afecten l'estructura intestinal i la seva funció (Spreeuwenberg, 2002); però també les propietats funcionals que puguin tenir els mateixos aliments. Des d'un punt de vista nutricional les estratègies per millorar la funcionalitat intestinal dels porcs inclouen: i) modificacions en el processat o l'estructura de l'aliment (grau de mòlta, processat tèrmic, alimentació líquida fermentada), ii) canvis en els ingredients (tipus de cereal, fonts de proteïna, nivell i tipus d'ingredients fibrosos,...), iii) la utilització d'additius en els pinsos (Pluske *et al.*, 1998; Canibe i Jensen, 2003; Jensen *et al.*, 2003; Mikkelsen *et al.*, 2004; Hedemann *et al.*, 2005). Moltes d'aquestes estratègies adquireixen rellevància després de la prohibició de l'addició d'antibiòtics al pinso com a promotors del creixement. Després de cinc dècades d'ús, les inquietuds sobre les generació de resistències bacterianes (WHO/OIE/FAO, 2003) han motivat la prohibició progressiva a partir de 1999 de l'ús d'aquests productes i amb aquesta finalitat en animals a la Unió Europea (Reglament 2821/98/CE); l'última al 2006.

A part, recentment, està incrementant l'interès dels anomenats aliments funcionals que, segons l'*International Life Science Institute*, són aquells ingredients que més enllà de la seva aportació nutricional habitual han demostrat científicament comptar amb beneficis fisiològics i/o de reducció del risc de patir determinades patologies. Entre d'altres, s'hi inclouen determinats additius (anomenats nutracèutics, cas de parlar del producte purificat) o ingredients rics en determinats compostos (àcids grassos, fibra, carotens, fenols,...) amb propietats funcionals. Nogensmenys, en aquests casos, i tractant-se de nutrició humana, el fonament científic esdevé l'aspecte indispensable alhora de realitzar declaracions nutricionals i de propietats saludables dels aliments (Reglament (CE) núm. 1924/2006).

Les relacions entre els diferents components de la dieta i la funcionalitat intestinal són molt complexes i de caràcter multifactorial. Una anàlisi exhaustiva de tots ells i de les seves interaccions s'escapa de l'objectiu d'aquesta revisió. A continuació, s'intentarà

remarcar els aspectes més destacats de cadascun d'ells, fent especial èmfasi en els que formen part dels quatre estudis experimentals d'aquesta tesi (capítols 3, 4, 5 i 6).

1.3.1 Macronutrients

1.3.1.1. *Compostos nitrogenats: proteïnes i aminoàcids*

Els compostos nitrogenats inclouen els aminoàcids i les proteïnes i la fracció minoritària de nitrogen no proteic (amines, amides, amoníac, nitrats, àcid úric, vitamines del grup B, purines, etc.). En porcí, les fonts més importants de proteïna són els suplementes proteics (farines de peix, concentrats vegetals [de soja, patata,...], pèptids intestinals, etc.), seguits de les lleguminoses, els cereals i de forma residual els productes fibrosos. La digestió proteica per enzims gàstrics (pepsina), pancreàtics (tripsina), per l'àcid clorhídric, i per les aminopeptidases de les microvellositats genera aminoàcids i oligopèptids, l'absorció dels quals es produeix majoritàriament a l'ili (Banks, 1993).

Nivells alts de proteïna (34%), respecte nivells normals (13-20%), poden provocar un increment de la massa gastrointestinal, a part d'incrementar la massa d'altres vísceres en rates i porcs d'engreix (Pond *et al.*, 1989), amb efectes negatius sobre l'eficiència productiva. Però nivells alts de proteïna també podrien tenir conseqüències negatives sobre la fisiologia intestinal. Així, dietes baixes en proteïna (< 17%) ajuden a mantenir la salut intestinal dels garrins recent deslletats ja que eviten que se sobrepassi la capacitat digestiva enzimàtica de l'IP, disminuint així la presència de proteïna no digerida a trams posteriors que pot estimular la fermentació proteica, el creixement de bacteris patògens i/o la producció de metabòlits tòxics bacterians com ara l'amoníac (Nyachoti *et al.*, 2006).

A la bibliografia, hi ha múltiples treballs comparant l'efecte de la proteïna de soja intacta respecte proteïnes de soja tractades o proteïnes de la llet, en particular durant la fase post-deslletament, que és on s'observa una incidència més elevada de diarrees. Les dietes de deslletament basades en proteïnes de soja poden augmentar l'atròfia de les vellositats i l'hiperplàsia de les criptes, sense afectació del nombre de cèl·lules caliciformes (Dunsford *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1990a; Li *et al.*, 1991). A part, alguns dels seus components, tals com la glicinina i β -conglucanina, poden provocar reaccions

d'hipersensibilitat tant a nivell local (increment de la densitat intestinal de cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺ i cèl·lules plasmàtiques) com sistèmic (increment dels anticossos circulants i major reactivitat als tests intradèrmics), amb efectes negatius sobre els rendiments productius (Dunsford *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1990a; Li *et al.*, 1991; Dreau *et al.*, 1994; Dreau *et al.*, 1995). En la patogènia del procés sembla determinant el grau d'immaduresa del SI intestinal dels animals recents deslletats, que podrien no regular correctament les respostes immunitàries als antígens i provocar dany tissular, una absorció deficient i comprometre la tolerància sistèmica (tolerància oral) a les proteïnes de la dieta (Newby *et al.*, 1979; Bailey *et al.*, 1993; King *et al.*, 2003). Aquest fet és especialment rellevant si es té en compte que en les primeres setmanes posteriors al deslletament, igual que en altres espècies, quantitats significants de proteïna són absorbides de forma intacte a través de la mucosa intestinal (Wilson *et al.*, 1989). Aquesta hipersensibilitat es pot contrarestar amb l'ús de proteïnes de soja hidrolitzades (McCracken *et al.*, 1998; Spreeuwenberg, 2002).

A part de la soja, els efectes d'altres fonts proteïques sobre l'estructura intestinal han estat menys descrites a la literatura. Makkink *et al.* (1994) van comparar diferents fonts de proteïna (llet en pols, concentrat de proteïna de soja, farina de soja i farina de peix), observant efectes en el nivell d'ingesta, pH gàstric i secrecions enzimàtiques, però sense efectes destacables en l'arquitectura de l'IP. Només la presència de factors antinutricionals (inhibidors de la tripsina, hemoaglutinines, glucòcids [saponines i isoflavones], alcaloids, lectines, tanins, ...), que poden causar una major duració del període d'atròfia que té lloc després del deslletament o una disminució de la digestió de nutrients, han rebut relativa atenció (Allee i Touchette, 1999). Per exemple, el nivell d'ingestió de l'inhibidor de la tripsina (present també en la proteïna de soja) està inversament relacionat amb el guany mig i l'alçada de les vellositats en porcs deslletats.

Certs aminoàcids podrien tenir un rol específic en la regulació de la integritat i funcionalitat intestinals (Wu, 1998). En suport a aquesta hipòtesi, dietes baixes en proteïna però suplementades amb aminoàcids tenen resultats similars a les dietes amb nivells proteics normals (Kerr *et al.*, 2003). La glutamina (aminoàcid no essencial però substrat energètic preferencial dels enteròcits, macròfags i limfòcits) evita l'atròfia de les vellositats intestinals i incrementa el número d'IEL i macròfags intestinals (Allee i Touchette, 1999). Així, la glutamina (~1%) podria millorar la recuperació la mucosa de

l'IP i mantenir la resposta immunitària en fases crítiques, encara que aquests efectes no siguin clars en garrins no desafiats (Spreeuwenberg, 2002). En canvi, l'addició d'arginina (0.5-1 %) no mostraria aquests efectes. La treonina també és un aminoàcid important per l'intestí ja que ~60% és consumit per la mucosa intestinal i podria incrementar la protecció de l'epiteli ja que és factor determinant en la producció de les mucines intestinals (Stoll *et al.*, 1998; Law *et al.*, 2007). Recentment, s'ha observat que l'addició del triptòfan (0.5%) podria millorar la raó vellositat:cripta, alhora que estimula el consum d'aliment (Koopmans *et al.*, 2006). No es disposen d'estudis sobre l'efecte de la suplementació d'aspartat, glicina, cisteïna, prolina o altres aminoàcids sobre la morfologia o la immunologia intestinals.

Les proteïnes de la llet són precursors de diversos pèptids biològicament actius (pèptids opiòids, transportadors de minerals, antimicrobians, antitrombòtics, immunoestimulants, etc.). S'ha vist que pèptids de la caseïna estimulen la proliferació de limfòcits en humans i l'activitat fagocitària dels macròfags (Meisel, 1997).

El plasma animal deshidratat és una altra important font de proteïnes ja que s'inclou a nivells que van del 5 al 15% (Gatnau i Zimmerman, 1991). A més, el seu ús a la Unió Europea ha estat recentment reautoritzat (Reglament 1292/2005/CE). Malgrat no ser considerat un additiu, els potencials efectes de l'administració d'aquest producte es discutiran en el capítol 1.3.2.6. ja que majoritàriament és considerat un probable substitutiu dels antibiòtics que s'havien utilitzat com a promotors del creixement.

1.3.1.2. Lípids

Els lípids, siguin greixos o olis, s'inclouen a la dieta a nivells variables, entre el 4 i 10%. Estan compostos per una àmplia gamma de substàncies: àcids grassos, acilglicèrids o grasses, fosfolípids, esfingolípids, glicolípids, colesterol i ceres, entre d'altres; lògicament, amb propietats funcionals diferenciades. A l'intestí, els lípids s'emulsionen amb sals biliars i són digerits per lipases pancreàtiques i de les microvellositats. Posteriorment, es formen micel·les que permeten l'absorció per difusió o transició a través de l'epiteli intestinal (Banks, 1993).

Dos factors determinen el rol dels lípids en la salut intestinal i en la malaltia: la composició i la quantitat de greix incorporat a la dieta (Calder, 1998). En general, l'addició de greix a la dieta, per exemple un 5-10% d'oli de soja o de coco en porcs (Li *et al.*, 1990b) o un 8% d'oli de blat de moro en rates (Pell *et al.*, 1992), incrementa la profunditat de les criptes i podria disminuir l'alçada de les vellositats intestinals. No obstant, components concrets del greix podrien tenir efectes positius en el manteniment de la integritat intestinal, com ara l'addició d'un 1% de colesterol en incrementar l'alçada de les vellositats i el número de cèl·lules caliciformes durant el deslletament (Dunsford i Haensly, 1991). Altres estudis han observat que la suplementació amb àcids grassos poliinsaturats podria afavorir la recuperació de l'IP després d'una fase de dejú (Lopez-Pedrosa *et al.*, 1999), encara que alguns d'ells, com l'àcid linoleic, podrien incrementar la susceptibilitat a l'oxidació dels lípids de la mucosa i la descamació de les cèl·lules epitelials del jejú (Lopez Bote *et al.*, 2001). L'efecte estimulants dels lípids sobre la proliferació de la mucosa de l'IP podria ser atenuat per la presència de bacteries (Pell *et al.*, 1995).

Canvis en la quantitat i el tipus de greix ingerit tenen un impacte sobre diferents aspectes de la resposta immune en limfòcits, monòcits i neutròfils (Kelley i Daudu, 1993). En humans i en alguns animals, dietes riques en greix disminueixen la proliferació de limfòcits T i l'activació de cèl·lules NK quan es comparen amb dietes amb menor nivell de greix (Calder, 1998). Això és particularment evident en àcids grassos poliinsaturats, capaços d'induir apoptosi en limfòcits, monòcits, colonòcits i altres línies cel·lulars (Sweeney *et al.*, 2005). Tanmateix, existeix variabilitat entre els diferents tipus de greix. Calder (1998) proposa la següent gradació pel que fa a la potència antiinflammatòria en animals: greix ric en àcids grassos saturats (oli de palma o de coco) < olis rics en àcids grassos ω -6 (oli de morenc, girasol o soja) < oli d'oliva < oli rics en àcids grassos ω -3 (oli de lli, oli i farina de peix). Per una banda, la suplementació amb àcids grassos poliinsaturats ω -3 alleugereixen la inflamació i les malalties autoimmunes ja que inhibeixen la síntesi d'eicosanòids; però en animals no sempre és així (Kelley i Daudu, 1993). De fet, altres autors (Kastel *et al.*, 1999) han observat que l'addició d'oli ric en ω -3 incrementa el número de monòcits i cèl·lules CD8⁺ circulants, l'activitat fagocítica i la producció d'Ig M en porcs. Spreuwenberg (2002) conclou que l'addició d'àcids grassos ω -3 podria tenir efectes beneficiosos especialment en fases d'anorèxia i quan les condicions higièniques són subòptimes.

D'altra banda, els àcids grassos poliinsaturats ω -6 són precursors de l'àcid araquidònic i estimulen la producció d'eicosanòids. Malgrat que no siguin els més potents, disminueixen certes funcions immunes quan s'ingereixen en altes quantitats. Així, per exemple, en porcs amb colitis induïda per *Brachyspira hyodysenteriae* la suplementació amb àcid linoleic conjugat (ω -6) va disminuir el dany de la mucosa perquè va mantenir el perfil d'IFN- γ i IL-10, i la distribució de limfòcits CD4+ i CD8+ (Hontecillas *et al.*, 2002). Tanmateix, dietes riques en oli de blat de moro (font de àcid linoleic; ω -6) o variacions en el coeficient ω -6: ω -3 no han comportat diferències apreciables en la resposta immunitària en porcs desafiats amb lipopolisacàrid d'*Escherichia coli* (Spurlock *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2003).

1.3.1.3. Carbohidrats

El terme "carbohidrat" inclou un ampli nombre d'estructures amb diferent composició i complexitat. Una definició formal de carbohidrat, acceptada pels químics, és "polihidroxi aldèhids, cetones, alcohols, àcids, els seus derivats simples i els seus polímers que contenen enllaços polimèrics de tipus acetat" (Pigman i Horton, 1972). Els carbohidrats (CH), hidrats de carboni o glúcids, representen entre un 50 i un 65% de la ració i estan constituïts per quantitats relativament baixes de monosacàrids (glucosa, galactosa, fructosa, xilosa, arabinosa, manosa; ~1-2%), disacàrids (sucrosa, maltosa, lactosa, cel·lubiosa; ~1-5%;) i oligosacàrids (1-10%), i en major mesura de polisacàrids: midó (~40-70%) i polisacàrids no amilacis (~10-50%) de les parets vegetals (revisat per Pérez i Gasa, 2002). Els monosacàrids, disacàrids i el midó són relativament ben digerits a l'IP. La proporció de tots aquests components varia lògicament entre ingredients, però també entre les diferents parts de grans i llavors, i entre parts similars de diferents ingredients. Això implica que, a part de la inclusió de cada ingredient concret, el seu fraccionament i tractament tèrmic pot proporcionar racions clarament diferenciades.

La digestió i l'absorció de la major part dels CH es realitza principalment al jejú, tot i que la resta de segments de l'intestí també presenten mecanismes per absorbir-los. Els CH de la dieta són digerits a molècules senzilles (monosacàrids), majoritàriament D-glucosa, D-galactosa i D-fructosa, per sacaridases endògenes (α -amilasa de la saliva i pancreàtica; β -galactosidasa i α -glucosidasa pancreàtiques; sucrasa, lactasa, maltasa i

altres enzims de les microvellositats) o enzims microbians (β -glucanasa, arabinoxilanasas, cel·lulases, heminopectinasas, etc.) que incrementen distalment (Castillo *et al.*, 2005). Dels polisacàrids, el midó es digereix majoritàriament a la porció anterior del tracte digestiu mitjançant enzims propis de l'animal (Bach Knudsen *et al.*, 2000). En canvi, el porc no té enzims propis per digerir la fracció de polisacàrids no amilacis, tot i que una part considerable, variable en funció del tipus, pot desaparèixer a l'IP per digestió microbiana (Mathers, 1991). Així doncs, existeix una porció dels CH que no és digerida ni absorbida a l'IP i que assoleix l'IG, on pot ser aprofitada per la microbiota per al seu propi manteniment i proliferació. Durant aquest procés fermentatiu, s'alliberen productes a l'IG que un cop absorbits poden representar fins el 25% de les necessitats energètiques de manteniment del porc (Bergman, 1990).

Els CH representen la font més important d'energia dels animals remugants i dels no remugants. Malgrat això, encara manquen molts coneixements sobre la seva composició, digestió, metabolisme i interacció amb altres components de la dieta (Anguita, 2006). Encara menys es coneixen les conseqüències que els CH de la dieta poden tenir sobre les característiques físicoquímiques de la digesta, l'estructura i la funcionalitat de la mucosa intestinal o la patofisiologia de l'animal.

▪ **Sucres i oligosacàrids**

Dels **sucres**, la sucrosa i la lactosa tenen un paper rellevant en la nutrició porcina en les primeres edats. Per exemple, la lactosa, principal CH de la llet i font energètica dels enteròcits i, probablement la sucrosa, podrien contribuir a mantenir la integritat intestinal si s'administren després del deslletament (Pluske *et al.*, 1996b), encara que no sempre és així (Dunsford i Haensly, 1991; Spreeuwenberg, 2002).

Alguns **oligosacàrids**, per la seva estructura, són resistents a l'acció dels enzims digestius i arriben pràcticament intactes a l'IP distal i a l'IG on seran substrats per la microbiota bacteriana. En especial, alguns d'ells són un bon substrat per *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus faecium* i *Pediococcus* spp. (Santomá, 1998). Per tant, alguns oligosacàrids podrien tenir propietats prebiòtiques (apartat 1.3.2.2.).

▪ **Polisacàrids: midó i polisacàrids no amilacis**

El **midó** és la major font de polisacàrids de les plantes (Hizukuri, 1996) i, amb l'excepció de les dietes d'iniciació que inclouen sèrum de llet, representa la major font de CH en les dietes porcines (Björck, 1996). El midó, format per amilosa i amilopectina, s'acumula en els grànuls de l'endosperma i es considera altament digestible. Tant la proporció de cada component com les característiques dels grànuls varien entre les diferents fonts botàniques, i en algun cas també entre varietats (revisat per Martínez-Puig, 2006). El midó és generalment ben digerit i absorbit a l'IP, però una certa quantitat de midó pot resistir a la digestió enzimàtica (midó resistent; MR), per ser físicament inaccessible (granulat groller de grans i llavors; Tipus I), per la compactació de la seva estructura granular (patata crua o plàtan verd; Tipus II), per la seva retrogradació després del tractament tèrmic (patates cuites i refredades, pa o flocs; Tipus III), o perquè ha estat modificat químicament (midons esteritzats o esterificats; Tipus IV) (Englyst *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1995). Aquest MR és part de la fibra alimentària.

Juntament amb el MR, els **polisacàrids no amilacis** (PNA) constitueixen el principal substrat que assoleix l'IG. La composició i estructura dels PNA és molt variada i determinen les seves propietats físiques (solubilitat, retenció d'aigua, viscositat) i la seva major o menor resistència a la fermentació microbiana (Bach Knudsen *et al.*, 2000). En general, quant més alta la solubilitat i la capacitat de retenció d'aigua, més extensa és la fermentació (McBurney *et al.*, 1985). En els cereals, els principals PNA són els β -glucans, els arabinoxilans i la cel·lulosa (Bach Knudsen, 1997). En el cas de les lleguminoses i altres suplementes proteics, la composició de PNA inclou, a més de la cel·lulosa, també quantitats significatives de galactomanans, arabinogalactans i sobretot pectines (Ouhida *et al.*, 2002; Anguita, 2006). Dels PNA, els components més abundants en les dietes més utilitzades en nutrició porcina són: la cel·lulosa, els β -glucans, els pentosans i les pectines. Alguns d'aquests polisacàrids també podrien tenir propietats immunoestimulants, com per exemple el fruit del garrofer (Pirvulescu *et al.*, 2002), ric amb determinats polisacàrids amb efectes d'exclusió en infeccions per *Salmonella spp.* en pollastres en el cas de la goma de garrofi (Lima, 1997) o de la reducció de la incidència de diarrees en la fase posterior al deslletament utilitzant farina de polpa de garrofa (Lizardo *et al.*, 2001).

▪ La fibra alimentària

El terme fibra alimentària (DF; *dietary fibre*) fa referència a les parts comestibles de les plantes que resisteixen la digestió i l'absorció a l'IP, però que poden ser totalment o parcialment fermentades per la microbiota (AACC, 2001). La DF inclou una àmplia varietat de substàncies amb diferents propietats físiques i efectes fisiològics. Els components més importants de la DF són el MR i els PNA, i en molt menor quantitat alguns oligosacàrids.

El contingut i tipus de DF influeixen molts processos del tracte GI (Cummings i Englyst, 1995), així com les característiques fisicoquímiques de la digesta (Mikkelsen *et al.*, 2004; Anguita, 2006), la morfologia i la integritat intestinal (Goodlad *et al.*, 1995; Jorgensen *et al.*, 1996; Brunsgaard, 1998; McCulloch *et al.*, 1998), la funcionalitat (Roediger, 1982; Tappenden *et al.*, 1997; Correa-Matos *et al.*, 2003) i la immunitat intestinals (Lim *et al.*, 1997; Cavaglieri *et al.*, 2000; Schley i Field, 2002). En general, un consum elevat de DF s'ha relacionat amb diferents efectes fisiològics i metabòlics positius (Buddington i Weiher, 1999; Dongowski *et al.*, 2003), encara que en animals joves podria tenir propietats antinutritives (Piel *et al.*, 2005). Tanmateix, un supòsit general sobre els efectes de la DF en els animals no seria vàlid ja que la fracció carbohidratada dels ingredients fibrosos presenta una composició altament complexa.

La fibra és fermentada majoritàriament a l'IG i genera, predominantment (~70%), **àcids grassos volàtils** (AGV) com l'acètic, el propiònic i el butíric, però també àcids orgànics (làctic, fòrmic) i gasos (H₂, CO₂ i metà) (revisat per Williams *et al.*, 2001; Anguita, 2006). La concentració d'AGV a l'IG (170-230 µmol/g) és especialment alta al cec i al colon (Imoto i Namioka, 1978), sobretot en comparació amb les parts més proximals del tracte GI (20 µmol/g en IP) (Clemens *et al.*, 1975). No obstant, a mesura que els CH disminueixen a causa del procés fermentatiu, la fermentació a l'IG esdevé més proteolítica i la concentració d'AGV ramificats (isovalèric i isobutíric) que provenen de la fermentació d'alguns aminoàcids incrementa (Piva *et al.*, 1996). Al mateix temps, la fermentació proteolítica s'associa amb la formació de metabòlits potencialment tòxics (NH₃, amines, fenols volàtils i indols) que poden ser perjudicials per la mucosa (Vissek, 1984; Bingham, 1990). La quantitat i el perfil dels productes derivats de la fermentació depèn bàsicament del substrat fermentat (Taula 1.6.). En general, les dietes riques en DF

incrementen els AGV derivats de la fermentació dels CH, amb potencials efectes beneficiosos sobre la incidència de malalties colòniques (Velazquez *et al.*, 1997). En particular, les dietes riques en MR, sembla que incrementen la producció de butirat a l'IG (van Munster *et al.*, 1994; Noakes *et al.*, 1996; Martínez-Puig *et al.*, 2003), que podria tenir un efecte protector front el càncer colorectal o la malaltia inflamatòria crònica del budell (Roediger i Millard, 1995; Topping i Clifton, 2001; Cavaglieri *et al.*, 2003; Claus *et al.*, 2003; Mentschel i Claus, 2003).

Taula 1.6. Quantitat d'àcids grassos volàtils (mmol/g substrat) produïts després de fermentar *in vitro* diferents substrats (adaptat d'Anguita, 2006).

Substrat	Acetat	Propionat	Butirat	Total	Referència
Midó (total)	4.13	1.76	2.39	8.27	Englyst i Macfarlane, 1987
Midó resistent	1.16	0.72	0.94	2.82	Casterline <i>et al.</i> , 1997
Pectines	5.18	0.76	0.57	6.51	Englyst i Macfarlane, 1987
β -glucans	2.41	1.69	1.44	5.54	Casterline <i>et al.</i> , 1997
Arabinogalactans	3.14	2.70	0.45	6.30	Englyst i Macfarlane, 1987
Xilans	6.94	1.35	0.23	8.52	Englyst i Macfarlane, 1987
<i>Ingredients vegetals</i>					
Blat de moro	0.76	0.21	0.16	1.13	Casterline <i>et al.</i> , 1997
Ordi	1.32	0.96	0.38	2.66	Casterline <i>et al.</i> , 1997
Soja	1.19	1.14	0.22	2.55	Casterline <i>et al.</i> , 1997
Polpa de remolatxa	1.07	0.07	0.01	1.15	Titgemeyer <i>et al.</i> , 1991

La DF és necessària per l'estimulació de la motilitat del tracte GI (Tabeling *et al.*, 2003) i, en general, incrementa el volum i la longitud dels compartiments del tracte GI (Stanogias i Pearce, 1985; Jin *et al.*, 1994; Jorgensen *et al.*, 1996). Però també n'incrementa el seu pes, ple i buit, a causa d'un increment del tamany o per estimulació del creixement de les túniques muscular i/o mucosa (Goodlad *et al.*, 1995; Stark *et al.*, 1995; Rijnen *et al.*, 2000), alhora que estimula la circulació de la sang a la mucosa i l'activitat motora (McCullogh *et al.*, 1998). A part, l'addició de fibra a la dieta pot revertir l'atròfia de la mucosa de l'IG observada durant el consum de dietes altament digestibles (Janne *et al.*, 1977; Goodlad i Wright, 1983). L'administració de dietes amb nivells alts de DF incrementa la profunditat de les criptes i la proliferació cel·lular a l'IP i al colon (Jin *et al.*, 1994; Brunsgaard, 1998; McDonald *et al.*, 2001; Wong i Gibson, 2003), encara que altres treballs no han trobat aquests efectes (Pell *et al.*, 1992; Glitso *et*

al., 1998). Les discrepàncies entre experiments podrien estar relacionades amb la quantitat i la composició de la fibra utilitzada.

El mecanisme pel qual la DF actua sobre la proliferació de la mucosa sembla ser diferent quan es consideren els diferents trams del tracte GI. A l'estómac i a l'IP, l'efecte de la fibra sembla ser un efecte físic directe (Wyatt *et al.*, 1988) i possiblement vinculat a un increment de la viscositat de la digesta (Pell *et al.*, 1995), més que no pas per increment de la producció d'AGV (Key *et al.*, 1996). De forma contrària, l'efecte sobre la mucosa colònica podria ser mediat per la presència d'abundant microbiota (10^{10} - 10^{11} bacteries/ml digesta) i dels seus productes derivats (Goodlad *et al.*, 1989). Alguns dels productes de la fermentació del CH, en general els AGV, i en especial el butirat com a substrat preferencial dels colonòcits (Roediger, 1982), s'ha demostrat que tenen un efecte tròfic sobre la mucosa (Roediger i Millard, 1995; Topping i Clifton, 2001; Claus *et al.*, 2003; Mentschel i Claus, 2003). És més, la DF també contribueix a protegir la mucosa indirectament, a través de la dilució de compostos amb efectes nocius i/o citotòxics, com són àcids biliars o productes derivats de la fermentació proteica, o reduint-ne de la seva producció (Newmark i Lupton, 1990; Govers *et al.*, 1999).

Totes les fibres alimentàries, fins i tot aquells substrats no fermentables, poden incrementar la secreció de mucines al llarg de tot l'intestí. Això és conseqüència, alhora, de la producció d'AGV i de l'estimulació mecànica (Schmidt-Wittig *et al.*, 1996; Barcelo *et al.*, 2000; Guarner, 2006). Brunsgaard (1998) va demostrar que un increment en la mida de la partícula de l'aliment, més que el tipus de cereal de la dieta (ordi o blat en aquest cas), estimula la proliferació epitelial i la producció de mucines a l'IG, i en modifica la seva composició, fet que millora la protecció d'aquests porcs enfront infeccions intestinals. En el cas dels garrins, l'ús de cereals extrusionats ajuda a mantenir l'estructura intestinal, amb criptes poc profundes i un alt número de cèl·lules argentafins a l'IP, cosa que en podria estimular el creixement (Lawlor *et al.*, 2000). En canvi, altres estudis no han trobat cap efecte de la quantitat o el tipus de DF sobre l'arquitectura intestinal (Brunsgaard *et al.*, 1995; Hedemann *et al.*, 2005).

Hi ha una creixent evidència que la fibra de la dieta pot afectar la composició, el metabolisme i la funció de les cèl·lules del sistema immunitari (Lim *et al.*, 1997; Cavaglieri *et al.*, 2000; Schley i Field, 2002). Field *et al.* (1999) van observar que gossos alimentats amb fibra altament fermentable (polpa de remolatxa, oligofructosa i goma aràbica) tenien proporcions de cèl·lules T CD4+ i CD8+ més altes, major resposta a mitògens a les zones T-depenents del GALT i respostes disminuïdes en aquelles àrees dominades per cèl·lules B. Resultats similars han estat descrits en rates alimentades amb dietes riques en cel·lulosa (Lim *et al.*, 1997) o polpa de remolatxa (Nagai *et al.*, 2000). Augmentant el nivell de DF o canviant-ne el tipus també s'han descrit increments d'Ig mucosals i sistèmiques (Lim *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 1997; Kudoh *et al.*, 1999), alteració de la producció de citocines (Lim *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 1997) o canvis en el nombre de cèl·lules immunitàries a l'epiteli intestinal (Ishizuka *et al.*, 2004).

Els mecanismes pels quals la DF afecta la funció immune de l'intestí encara no estan del tot establerts. Schley i Field (2000) proposen diferents vies no excloents: i) promoció de determinades poblacions bacterianes i contacte directe d'aquestes bactèries o parts de bactèries (parets cel·lulars o components citoplasmàtics) amb cèl·lules immunitàries de l'intestí, ii) producció d'AGV per fermentació de la fibra, iii) modulació de la producció de mucines.

Per una banda, la microbiota intestinal és la major font de material antigènic per l'animal, i la fibra pot modular el creixement de determinades bactèries residents, especialment en el colon. Així doncs, alguns autors consideren que la majoria de DF que es fermenta a l'IG es pot considerar com un prebiòtic (Schley i Field, 2002; Lim *et al.*, 2005). A més, si el que estimula la DF és el creixement de lactobacils i bifidobactèries, llavors l'efecte sobre el sistema immune podria ser equiparable al que s'observa en els probiòtics, però més permanent (apartat 1.3.2.2.). A part de les bactèries àcid làctiques, caldria considerar altres components microbians ja que encara hi ha moltes bactèries intestinals desconegudes i moltes d'elles no cultivables (Leser *et al.*, 2002). Així, la DF pot modificar el perfil de la microbiota intestinal, avaluat amb tècniques moleculars, sense afectar els principals grups bacterians del tracte GI (Castillo, 2006). D'altra banda, els AGV derivats de l'acció fermentativa de la microbiota, acetat, butirat i propionat, inhibeixen *in vitro* la proliferació dels limfòcits, promovent un ambient antiinflamatori (Franklin *et al.*, 1991; Curi *et al.*, 1993; Wajner

et al., 1999; Cavaglieri *et al.*, 2003). De tots ells, el butirat és el que té una acció antiinflamatòria més marcada ja que també pot inhibir *in vitro* la producció d'IL-2 i IFN- γ i la funció estimuladora de les APC (Bohmig *et al.*, 1997). En canvi, estudis en rates suggereixen que els AGV poden potenciar la presència de cèl·lules CD8+ i NK a l'IG (Ishizuka *et al.*, 2004). La correlació entre la quantitat d'AGV i la presència de limfòcits a la mucosa intestinal no sempre és significativa, i el grau de resposta depèn del tipus de fibra administrada (Kudoh *et al.*, 1998). Per últim, la DF també pot incrementar la producció de mucines, i això pot evitar l'adherència i la translocació bacteriana a través de la barrera epitelial (Satchithanandam *et al.*, 1990; Katayama *et al.*, 1997). Canvis en la composició de la microbiota intestinal i la producció d'AGV, però també una disminució del pH, incrementen la producció de mucines (Bustos-Fernandez *et al.*, 1978; Sharma i Schumacher, 1995; Fontaine *et al.*, 1996; Sharma i Schumacher, 2001; Gaskins, 2003).

1.3.2. Micronutrients i additius

Els micronutrients (vitamines i minerals) són substàncies que tot i trobar-se en petites quantitats en els aliments són indispensables pel correcte funcionament del l'organisme. Malgrat se'n pugui incrementar el seu aport mitjançant suplementes, de forma normal ja es troben en els ingredients que conformen la dieta. D'altra part, els additius en alimentació animal són totes aquelles substàncies, microorganismes o preparats, diferents de les matèries primeres, que s'afegeixen de forma intencionada en el pinso o a l'aigua amb una finalitat concreta. Així que un additiu en alimentació animal haurà d'influir positivament en les característiques del pinso, en la producció, activitat o benestar dels animals, en el color d'ocells i peixos ornamentals, en les característiques dels productes animals o en les repercussions mediambientals de la producció animal, satisfer les necessitats alimentàries dels animals o tenir un efecte coccidiostàtic o histomonoestàtic (Reglament (CE) núm. 1831/2003).

1.3.2.1. Vitamines i minerals

Diferents investigacions han demostrat que les vitamines regulen el sistema immunitari quan s'utilitzen dins del rang habitual de composició de les dietes. Malgrat tot, el seu efecte immunestimulant només s'evidencia clarament quan s'utilitzen en nivells elevats o quan l'animal ha sofert un estat previ de malabsorció o malnutrició. A la taula 1.7. es poden observar les funcions principals de les vitamines pel que fa al SI. A més, s'ha proposat que les vitamines amb propietats antioxidants, com la vitamina E, poden evitar l'oxidació i posterior descamació de l'epiteli intestinal (Lopez Bote *et al.*, 2001).

Els minerals u oligoelements que han despertat més interès en els últims anys han estat el coure, el zinc i el seleni. Malgrat que els seus mecanismes d'acció no són del tot coneguts, el coure o el zinc per exemple són addicionats en dietes porcines ja que eviten de forma eficaç la diarrea i milloren els resultats productius dels garrins. Tanmateix, cal remarcar que els efectes s'observen quan s'addicionen els minerals a dosis altes (farmacològiques), en comptes de les dosis que s'usen de forma normal per suplir els requeriments nutricionals dels animals. Estudis recents han demostrat que diferents formes de Zn orgànic incrementen la capacitat limfoproliferativa i fagocítica del porcs, mentre que tenen un efecte nul o negatiu en la producció d'anticossos (van Heugten *et al.*, 2003b). Amb nivells similars (80 ppm) altres estudis tampoc han obtingut una millor resposta humoral, ni intestinal ni sistèmica, però sí un increment de la longitud de la PP ileal, indicador del grau de desenvolupament del GALT durant les primeres setmanes de vida (Castillo, 2006).

Generalment, els oligoelements actuen com a cofactors de diferents sistemes enzimàtics del metabolisme anabolitzant del SI. Per tant, i en funció del nivell d'inclusió i l'estat de l'animal, poden tenir efecte permissiu o potenciador de la resposta immune. En particular, el seleni és un cofactor de la glutatió peroxidasa i així un potenciador de la immunitat innata i adaptativa en alguns casos (Blodgett *et al.*, 1986; Ndiweni i Finch, 1995; Santomá, 1998).

Taula 1.7. Principals funcions immunomoduladores de les vitamines i provitamines (adaptat de Santomá, 1998)

Prov vitamina o vitamina	Forma activa	Funcions i efectes
Vitamina A	Àcid 9-cis-retinoic Àcid <i>all-trans</i> -retinoic	Augmenta la resposta de cèl·lules T. Estimula producció I. Augmenta pes del timus i la melsa
Vitamina C	Àcid ascòrbic	Antioxidant. Estimula la producció d'Ig i la fagocitosi. Disminueix la immunosupressió deguda a l'estrès
Vitamina D	1,25-dihidroxicolecalciferol	Estimula la fagocitosi i la immunitat inespecífica
Vitamina E	Tocoferil hidroquinona α -tocoferol	Antioxidant; evita la descamació epitelial. Incrementa resposta humoral i cel·lular, incrementa la limfoproliferació, redueix l'alliberació de PGE ₂
Carotens i carotenòids	Carotens i carotenòids	Antioxidant. Alliberació de PG i leucotriens. Activació/limfoproliferació de cèl·lules T
Vitamina B ₁	Pirofosfat de tiamina	Estimula la producció d'Ig
Vitamina B ₂	Riboflavina	Estimula la producció d'Ig
Vitamina B ₆	Pirofosfat de piridoxal	Estimula la producció d'Ig. Proliferació leucocitària
Vitamina B ₁₂	Cianocobalamina	Intervé en la producció d'Ig i àcids nucleics
Àcid pantotènic	Coenzim A	Estimula la producció d'Ig
Àcid fòlic	Àcid tetrahidrofòlic	Intervé en la producció d'Ig i àcids nucleics
Biotina	Carbosibiotina	Estimula la producció d'Ig

1.3.2.2. Prebiòtics i probiòtics

Prebiòtics i probiòtics han estat àmpliament analitzats en alimentació humana, i últimament en alimentació animal. El seu mecanisme d'acció està basat en la capacitat de certes substàncies (prebiòtics), microorganismes (probiòtics) o d'ambdós components (simbiòtics) de crear una microbiota intestinal beneficiosa per l'animal (Gibson i Roberfroid, 1995).

Com ja s'ha comentat anteriorment, alguns oligosacàrids (inulina, galactooligosacàrids, fructooligosacàrids,...) o polisacàrids (mananoligosacàrids o β -glucans) podrien tenir propietats prebiòtiques (Gibson i Roberfroid, 1995; Santomá, 1998; Swanson *et al.*, 2002). Existeixen nombrosos estudis on es descriuen els efectes beneficiosos sobre salut intestinal dels prebiòtics, bàsicament gràcies a l'acció moduladora de la microbiota intestinal: increment de bacteries àcid làctiques, bloqueig de bacteries patògenes o increment de la producció d'AGV (Santomá, 1998; Allee i Touchette, 1999).

Spencer *et al.*, (1997) van trobar que l'administració de fructooligosacàrids, o xilooligosacàrids (Marinho *et al.*, 2006), en porcs recent desmamats incrementava l'altura de les vellositats. Altres estudis han demostrat que l'administració de fructooligosacàrids també incrementa l'activitat mitòtica, la producció de mucines i la profunditat de les criptes a l'IG, probablement per l'increment de la producció de butirats (Tsukahara *et al.*, 2003). En aquest sentit, Correa-Matos *et al.* (2003) va observar una millora en la funcionalitat intestinal i una disminució dels símptomes en porcs infectats amb *Salmonella typhimurium* i alimentats amb fructooligosacàrids o polisacàrids de la soja fermentables. No obstant, en rates alimentades amb dietes semisintètiques s'ha vist que l'administració de fructooligosacàrids o inulina incrementa la citotoxicitat de la digesta i perjudica la mucosa intestinal, fet que resulta en una major translocació de *Salmonella enteritidis* (Ten Bruggencate *et al.*, 2003).

L'addició de prebiòtics a la dieta també altera la funció immune (Swanson *et al.*, 2002). En particular, la suplementació de mananoligosacàrids incrementa la concentració d'Ig A intestinals i Ig G sistèmiques, la reactivitat dels limfòcits T intestinals (limfoproliferació), la producció d'IL-2 i IFN- γ o la fagocitosi bacteriana (Santomá, 1998; Privulescu, 1999; Swanson *et al.*, 2002). Nogensmenys, també són capaços de bloquejar l'adhesió de diferents bacteries (*Salmonella* sp., *Streptococcus* sp., *E. coli*,...) a l'epiteli intestinal (Mouricout *et al.*, 1990; Fernandez *et al.*, 2002).

La WHO i la FAO (2001) defineix els probiòtics com "microorganismes vius que quan són administrats en quantitats adequades confereixen un benefici per la salut de l'hoste". *Sacharomices cerevisiae*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus farciminis*, *Bacillus licheniformis* i *Bacillus toyoi* són els microorganismes més utilitzats en nutrició porcina i normalment se'ls hi atribueixen

propietats immunoestimulants (Simon *et al.*, 2003). Encara que amb resultats molt variables en funció de l'espècie bacteriana, les bactèries àcid làctiques tendeixen a incrementar la producció d'Ig A i el número de cèl·lules T CD4+ a la LP (Vitini *et al.*, 2000), però sense induir resposta citotòxica. En contrast amb el bacteri comensal *Enterococcus faecium* (Simon *et al.*, 2003), *Bacillus toyoi* sí que incrementa el nombre de cèl·lules T $\gamma\delta$ i CD8+ a l'epiteli de garrins recent deslletats (Schraek *et al.*, 2006). Estudis recents descriuen una reducció del nombre de cèl·lules CD2+, CD4+ i MHCII+ a l'epiteli jejunal en porcs suplementats amb *Lactobacillus brevis*, aspecte que els autors relacionen amb una disminució de l'activació del sistema immune de l'intestí (Davis *et al.*, 2006). En canvi, l'addició d'alguns probiòtics (*Lactobacillus casei* DN-114 001 o altres llets fermentades) incrementen la resistència a la infecció amb *Salmonella typhimurium* en rates (Paubert-Braquet *et al.*, 1995). No així, l'eficàcia vacunal enfront el virus del síndrome respiratori i reproductiu porcí no millora amb l'administració del *Lactobacillus casei* (Kritas i Morrison, 2007). Probablement, no totes les bactèries àcid làctiques poden ser utilitzades com adjuvants orals i l'efecte beneficiós no es pot generalitzar a tot el gènere o espècies (Vitini *et al.*, 2000). Tampoc tots els estudis per humans que han usat la rata com a model són extrapolables als porcs (Simon *et al.*, 2003).

Diversos estudis també indiquen un efecte tròfic i/o un augment de la longitud de les vellositats en porcs suplementats amb *Bacillus cereus*, *Lactobacillus brevis* o *Saccharomyces boulardii*, o en rates utilitzant *Lactobacillus casei* (Thoreux *et al.*, 1998; Baum *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2003). Endemés, *Bacillus* sp. i *Lactobacillus brevis* també disminueixen el nombre de cèl·lules amb mucines sulfatades al jejú i al duodè dels porcs (Davis *et al.*, 2006).

Diferents components de la paret cel·lular de llevat *Saccharomyces cerevisiae* també mostren propietats immunomoduladores i poden interferir amb la microbiota intestinal. Per una banda, els mananoligosacàrids de la paret dels llevats poden unir-se a fimbries de bactèries gram negatiu tipus 1 o micotoxines evitant la seva adhesió a l'epiteli (Spring i Privulescu, 1998; Pettigrew, 2000; Spring *et al.*, 2000). Però també actuen com antígens estimulant diferents components del SI. Així, per exemple, en aus poden incrementar la producció de anticossos o el pes relatiu de la bursa de Fabrici respecte la melsa (Spring i Privulescu, 1998; Morales *et al.*, 2005). D'altra banda, els β -1,3/1,6-

glucans, també presents a la paret de *Saccharomyces cerevisiae*, són importants potenciadors del SI, principalment sobre la immunitat innata, capaços d'activar macròfags, cèl·lules T i NK, la via alternativa del complement, així com d'incrementar les cèl·lules CD8⁺ (Miura *et al.*, 1999; Chae *et al.*, 2006). Tanmateix, estudis recents realitzats amb tot el llevat com a suplement dietètic han aportat resultats contradictoris. En alguns s'ha observat que milloren els índexs productius i que modulen la resposta immunitària de porcells acabats de deslletar (Li *et al.*, 2006), mentre que en altres estudis no es veuen efectes remarcables (Hiss i Sauerwein, 2003), o bé s'obtenen resultats variables entre diferents experiments (van Heugten *et al.*, 2003a). Aquesta variabilitat pot estar associada a diferències en les soques de llevats emprades, les dosis, les condicions d'emmagatzematge, la composició de la dieta, a les interaccions amb fàrmacs i/o a les diferències en les estratègies d'alimentació.

1.3.2.3. Acidificants

Els acidificants han esdevingut una alternativa a l'hora de reemplaçar els antibiòtics en els pinsos o l'aigua dels garrins, a causa dels seus efectes positius sobre els rendiments productius (Partanen i Mroz, 1999). A part de tenir un cert component prebiòtic, ja que seleccionen la microbiota sapròfita, aquests productes poden tenir potencial microbiocida o microbioestàtic i milloren la digestió. El descens del pH de l'estómac del garri (molt compromès després del deslletament) i l'augment del temps de retenció gàstrica, que s'ha observat amb l'ús d'alguns àcids afavoreixen la inhibició del creixement de bacteries patògenes i la digestibilitat de la proteïna de la dieta (Partanen i Mroz, 1999).

S'ha proposat que els antibiòtics promotors del creixement i els acidificants podrien reduir els efectes nocius que exerceix la microbiota intestinal sobre la mucosa (Partanen i Mroz, 1999; Anderson, 2003). En aquest sentit, recentment, Castillo (2006) ha descrit els canvis produïts per diferents additius en les poblacions microbianes. En particular, el butirat sòdic incrementa la biodiversitat microbiana. En aquest mateix estudi, el butirat sòdic va incrementar la profunditat de les criptes al jejú i el nombre de cèl·lules caliciformes al colon (Manzanilla *et al.*, 2006), però sense produir cap variació en el nombre de cèl·lules immunitàries a la LP ni a l'epiteli. Altres autors proposen que els àcids grassos de cadena curta inclosos en el pinso, com ara el butirat, tenen la capacitat

d'estimular la proliferació cel·lular, provocant vellositats més altes a l'ili i criptes més profundes a colon, efecte simultani a un increment en el guany de pes (Galfi i Bokori, 1990).

1.3.2.4. Extractes de plantes

Els extractes de plantes o els olis essencials són un dels additius més antics utilitzats per l'home. Recentment, s'han començat a utilitzar com a alternativa als antibiòtics. Se'ls hi atribueix gran quantitat d'efectes: sobre la palatabilitat i les secrecions gàstriques (Platel i Srinivasan, 1996), propietats antimicrobianes (Didry *et al.*, 1994; Dorman i Deans, 2000) i antioxidants (Aruoma, 1996), antitoxigènics (Sakagami *et al.*, 2001) i efectes immunomoduladors (Middleton i Kandaswami, 1992; Kong *et al.*, 2006), entre d'altres (Taula 1.8.). Però la concreció dels seus efectes és difícil ja que hi ha una àmplia varietat de productes, amb diversitat de compostos i molècules com a principis actius i una gran variabilitat en la quantitat de cada component present en un extracte de plantes. Per tant, un dels aspectes més importants és la seva caracterització i estandardització (Cowan, 1999).

El timol, carvacrol, eugenol i cinamaldehyd són les substàncies amb més activitat antimicrobiana (Manzanilla, 2006). Però malgrat que l'efecte antimicrobià sigui el més evident i estudiat en animals, l'anàlisi d'altres potencials efectes sobre la fisiologia, la immunitat i especialment sobre la funció digestiva poden ajudar a obtenir i entendre els beneficis productius observats (Manzanilla, 2006). Els mecanismes d'acció són escassament coneguts en porcs, i molts d'ells només han estat demostrats *in vitro*.

Diferents estudis indiquen que la saponina de la *Quillaja saponaria* (quil·laia) realça la immunitat amb diferents patrons de citocines i anticossos en funció de les dosis (Boyaka *et al.*, 2001), pot induir una resposta citotòxica CD8⁺ (Newman *et al.*, 1992) i una protecció enfront rotavirus (McNeal *et al.*, 1998). En porcs infectats amb *Salmonella typhimurium*, s'observen millors rendiments productius quan els pinsos són suplementats amb extractes de *Quillaja saponaria* o *Ascophyllum nodosum* (alga bruna), malgrat que els efectes sobre la immunitat són marginals, afectant només la funcionalitat macrofàgica (Turner *et al.*, 2002a; Turner *et al.*, 2002b).

Taula 1.8. Sumari d'alguns dels extractes de plantes més comuns, les principals substàncies actives i les propietats descrites fins el moment (adaptat de Kamel, 2001)

Forma vegetal	Compost principal	Propietats descrites
Espècies aromàtiques		
Canyella	Cinamaldehyd	Antioxidant. Estimulant de la gana i la digestió. Antimicrobià. Possible antiinflamatori.
Clau	Eugenol	Estimulant de la gana i la digestió. Antimicrobià.
Cardamomo	Cineol	Estimulant de la gana i la digestió.
Anís	Anetol	Estimulant la digestió.
Api	Ptalides	Estimulant de la gana i la digestió.
Julivert	Apiol	Estimulant de la gana i la digestió. Antimicrobià.
All	Allicin	Estimulant de la digestió. Antimicrobià. Immunoestimulant.
Romaní	Cineol	Antioxidant. Estimulant de la digestió. Antimicrobià.
Farigola	Timol	Antioxidant. Estimulant de la digestió. Antimicrobià.
Sàlvia	Cineol	Estimulant de la digestió. Antimicrobià.
Llorer	Cineol	Estimulant de la gana i de la digestió. Antimicrobià.
Orenga	Timol, carvarcol	Immunoestimulant. Antimicrobià.
Menta	Mentol	Estimulant de la gana i de la digestió. Antimicrobià.
Espècies picants		
Pebrot picant (bitxo)	Capsaïcina	Estimulant dels enzims pancreàtics. Antidiarreic. Antiinflamatori. Tònic.
Pebre vermell/negre	Piperina	Estimulant de la digestió.
Mostassa	Alil-isotiocianat	Estimulant de la digestió.
Gingebre (curri)	Zingerona	Estimulant gàstric.
Altres		
Quil·laia	Saponina	Immunoestimulant.
Alga bruna	-	Probable immunoestimulant.

L'addició d'un extracte d'*Origanum vulgare*, que conté carvacrol i timol, té un efecte immunoestimulant no específic i millora el resultats productius en porcs d'engreix amb retràs en el creixement (Walter i Bilkei, 2004). Cumarines i fenols també podrien augmentar la resistència a la infecció per *Leishmania donovani* gràcies a un increment de la funció macrofàgica (Kayser *et al.*, 2001). L'all (*Allium sativa*), a part de moltes altres propietats, manté la immunocompetència de l'individu en aquelles situacions compromeses (Milner, 2001). En particular, gràcies a la seva capacitat immunoestimulant, principalment de la immunitat cel·lular, és capaç de reduir la incidència de càncer (Lamm i Riggs, 2001).

Altres compostos, com la capsaïcina de les diferents espècies de pebrots vermells del gènere *Capsicum* (Sancho *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003) i el cinamaldehyd del *Cinnamomum cassia* (Koh *et al.*, 1998) han demostrat propietats antinflamatòries, encara que en el cas del cinamaldehyd hi ha resultats contradictoris (Shan *et al.*, 1999).

No és infreqüent l'ús conjunt de diferents components. Així, per exemple, la combinació d'extractes d'orenga, canyella i bitxo en garrins recent deslletats pot prevenir parcialment l'atròfia de vellositats i l'hiperplàsia de criptes, cosa que provoca una millora dels resultats productius (Velazquez *et al.*, 2005b; Velazquez *et al.*, 2005a). Estudis posteriors utilitzant aquests tres mateixos productes a dosis similars (2%) no han demostrat l'efecte beneficiós sobre la raó vellositat:cripta (Manzanilla, 2006), però sí una disminució del nombre d'IEL i de mitosis, encara que variable en funció del nivell de proteïna. Aquests canvis probablement són provocats per modificacions en la funció digestiva i/o en la microbiota intestinal.

1.3.2.5. Plasma animal

Pel que fa a les proteïnes plasmàtiques, aquestes han estat àmpliament reconegudes com a ingredients alimentaris d'alta qualitat per als animals de granja, incloent-hi el bestiar porcí i boví. Un exemple d'aquestes proteïnes és el suplement amb plasma assecat, el SDAP (*spray dried animal plasma*) o el SDPP en el cas del porcí (*spray dried porcine plasma*). Aquests productes comporten destacables increments en les taxes de creixement dels garrins (Coffey i Cromwell, 1995), comparables a les dels pinsos suplementats amb antibiòtics com a promotors del creixement (Torrallardona *et al.*,

2003). Això sobretot té lloc durant els 14 primers dies després del deslletament probablement perquè els garrins són més sensibles a desordres patològics durant les dues primeres setmanes després del deslletament, ja sigui per l'estrès que comporta la pròpia separació de la mare (Pluske *et al.*, 1997), o bé per la immaduresa de l'aparell digestiu i del propi SI, i el declivi de la immunitat passiva materna (Deprez *et al.*, 1986; Bailey *et al.*, 2001).

El SDAP està constituït per un 78% de proteïna, de la qual, aproximadament un 50% és albúmina, un 25% és globulina (incloent α -, β - i γ -globulina), un 5% fibrina i un 20% altres proteïnes, incloent-hi haptoglobulina, transferrina, factors de creixement i altres proteïnes i pèptids (Howell i Lawrie, 1983). L'SDAP conté més d'un 15% d'Ig G, que podrien ser funcionals quan són consumides per l'animal ja que les Ig són relativament resistents a la digestió. De fet, Gatnau *et al.* (1989) van veure que les Ig del SDAP són absorbides des de la llum intestinal al torrent sanguini en porcs acabats de néixer i privats del calostre. Aquests anticossos podrien actuar, en animals d'aquesta edat, contra els patògens de la llum intestinal estalviant esforços en els mecanismes defensius dels garrins. Les glicoproteïnes del SDAP podrien tenir un comportament similar (Sanchez *et al.*, 1993).

En bovins, la morbiditat està reduïda en aquells animals alimentats amb el pinso suplementat amb proteïnes plasmàtiques (Quigley i Wolfe, 2003). En un estudi preliminar en porcs, Markowska-Daniel *et al.* (2003), a més de la reducció en la mortalitat i la morbiditat i la millora en el creixement, han observat un increment en el nombre de limfòcits T, concretament en la subpoblació CD8⁺ on a nivell sanguini. En canvi, Touchette *et al.* (2002) observen que els porcs alimentats amb SDAP presenten nivells d'expressió de citocines proinflamatòries (TNF- α i IL-1 β) més baixes a l'hipotàlam, a la hipòfisi i a les glàndules adrenals, així com en melsa, timus i fetge. També observen nivells d'expressió reduïts d'IL-6 a les glàndules adrenals, a la hipòfisi i a la melsa. Aquesta reducció en l'activació del sistema immunitari, es veu corroborada pel fet que porcs alimentats amb SDAP també presenten un menor grau d'activació de l'eix hipotàlam-hipòfisi-adrenal (Touchette *et al.*, 2002). Aquest eix està molt vinculat a l'activació del sistema immunitari (Carroll *et al.*, 2002). Recentment, Pérez-Bosque *et al.* (2004) han observat que rates alimentades amb SDAP tenen una menor activació limfocitària a les PP amb menys limfòcits CD4⁺ activats quan són desafiades amb

l'enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*. Malgrat que els animals alimentats amb pinso amb SDAP poden desenvolupar una resposta immunitària, aquesta és de menor intensitat. De forma similar Bosi *et al.* (2004) han observat que els animals suplementats amb plasma animal i infectats amb *E. coli* K88+ presenten una notable reducció de l'expressió d'IL-8 i TNF- α a l'intestí, respecte aquells animals que han consumit el pinso no suplementat. En resum, la majoria de treballs conclouen que el SDAP millora l'aprofitament energètic dels nutrients i protegeix contra la penetració d'agents químics i infecciosos a la circulació sanguínia, reduint el grau d'inflamació o d'activació del SI.

Un punt on diferents treballs entren en conflicte és si el SDAP promou o no el alteracions en la morfologia intestinal. Per una banda, Spencer *et al.* (1997) i Touchette *et al.* (1997) observen que hi ha una millora de l'alçada de la vellositat i de la relació vellositat-cripta. D'altra banda, diferents autors no han pogut demostrar que l'alimentació amb SDAP millori la proliferació de les cèl·lules de la cripta, la profunditat de la cripta o l'alçada de la vellositat (Jiang *et al.*, 2000; Van Dijk *et al.*, 2001; Van Dijk *et al.*, 2002). De fet, Bosi *et al.* (2004) suggereixen que el SDAP afecta l'estructura de la vellositat i la cripta només quan la integritat de la barrera intestinal es troba compromesa.

Malgrat que els efectes sobre els rendiments productius puguin ser causats per un increment del consum de pinso (Coffey i Cromwell, 1995; Van Dijk *et al.*, 2001), el fet que els efectes només s'observin amb la fracció pesada del SDPP (que conté bàsicament Ig) i no amb les altres fraccions (Owen *et al.*, 1995; Pierce *et al.*, 1995) dóna suport a la hipòtesi d'una acció immunitària. Els resultats de Jiang *et al.* (2000) coincideixen amb això ja que troben una disminució de la densitat cel·lular de la LP en animals alimentats amb SDPP independentment del nivell d'ingestió. Així doncs, la millora del creixement es creu que és resultat d'una menor estimulació del SI. Aquesta hipòtesi està recolzada per estudis que demostren que una activació immunitària produeix una reducció en el consum d'aliments, així com un increment del consum de nutrients per part del SI (Demas *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1997).

Els efectes del SDPP sobre el creixement es produeixen principalment en el deslletament (Jiang *et al.*, 2000) i en aquells animals criats en un entorn amb una

càrrega patògena important, com pot ser una granja convencional, en comparació als estabulats en condicions experimentals i, per tant, amb un grau d'higiene relativament elevat (Coffey i Cromwell, 1995). En aquest sentit, s'han desenvolupat estudis on s'ha comparat l'efecte del SDAP amb el dels antibiòtics en porcs infectats amb *E. coli*. (Torrallardona *et al.*, 2003), amb una millora en l'estat general dels animals, tant si el pinso ha estat suplementat amb antibiòtics com si ho ha estat amb SDAP. Els anticossos presents en el plasma porcí específics contra *E. coli* són en part responsables d'aquests efectes positius (Owusu-Asiedu *et al.*, 2002).

1.3.2.6. *Altres additius*

Els **nucleòtids** i els àcids ribonucleics de la dieta tenen un rol destacat en el creixement i divisió de les cel·lules, en la modulació del SI i acceleren la maduració dels limfòcits intestinals durant el deslletament (Rueda *et al.*, 2002; Manzano *et al.*, 2003; Martínez-Puig *et al.*, 2005). Així, la suplementació de la dieta amb nucleòtids pot incrementar la producció d'anticossos específics (Pickering *et al.*, 1998) i l'activitat fagocítica contra infeccions bacterianes (Kulkarni *et al.*, 1986). A nivell intestinal, en garrins, l'addició de nucleòtids incrementa el nombre d'IEL i de macròfags a la mucosa i pot disminuir l'atròfia de les vellositats subseqüent al deslletament (Domeneghini *et al.*, 2004; Martínez-Puig *et al.*, 2005; Andrés, 2006). Aquests efectes s'expliquen per una millora en la proliferació cel·lular juntament amb una disminució de la susceptibilitat a l'apoptosi (Domeneghini *et al.*, 2004).

La incorporació d'**enzims** a la ració s'ha utilitzat durant les primeres setmanes de vida per suplir les deficiències enzimàtiques dels garrins i millorar les digestibilitat de les dietes (sobretot dels PNA), disminuir la viscositat de la digesta o modular la microbiota intestinal. No obstant, les millores en la digestió i en l'ambient intestinal obtingudes en garrins no són comparables als èxits obtinguts en avicultura (Patridge, 2001).

Recentment, s'han començat a utilitzar **aromes** i **potenciadors del gust** que estimulen el consum de pinso i poden ajudar a paliar l'anorexia que té lloc després del deslletament (Langendijk *et al.*, 2006). Malgrat no es disposin encara de dades, pel seu mecanisme d'acció, aquests productes podrien ajudar al desenvolupament del sistema digestiu i immuntari dels garrins. També s'està començant a discutir l'ús de **compostos**

adsorbents, com silicats aluminics o altres argiles, que exerceixen el seu efecte per adsorció de microorganismes i toxines intestinals i per la seva interacció amb la mucosa intestinal.

Capítol 2

OBJECTIUS I HIPÒTESI

2. OBJECTIUS I HIPÒTESI

Després dels importants avenços implementats en la producció porcina en els últims anys, encara s'observen de forma freqüent problemes digestius durant el creixement dels animals. Aquests sobretot tenen lloc durant el període crític posterior al deslletament dels garrins, però també durant l'adaptació a la dieta d'engreix. A més, cal considerar que aquesta situació podria empitjorar amb les recents i les previsiblement futures prohibicions dels antibiòtics com a promotors del creixement. D'altra banda, també cal tenir en compte que els estudis de nutrició en porcs poden ser un model experimental per a nutrició humana, ja que en termes d'anatomia, fisiologia i microbiota GI el porc és molt més similar a l'home que qualsevol altre model animal (Graham i Aman, 1986; Miller i Ullrey, 1987; Liebler-Tenorio i Pabst, 2006). Així doncs, la situació actual així com les perspectives de futur estimulen el coneixement de la fisiologia digestiva porcina, alhora que impulsen la investigació de noves estratègies alimentàries per tal d'optimitzar-la.

D'acord amb l'anterior, aquest treball partia de la hipòtesi que diferents components de la dieta modifiquen la funcionalitat intestinal, en termes de morfologia i paràmetres immunitaris intestinals en el porc. Així doncs, el present treball es va dissenyar amb l'objectiu general d'estudiar l'efecte de diferents components de la ració sobre el tracte intestinal del bestiar porcí, a fi i efecte de millorar el coneixement sobre la funcionalitat intestinal porcina i determinar alguns paràmetres per avaluar-la i optimitzar-la. En particular, el treball pretenia aprofundir en l'estudi de l'estructura i sistema immunitari intestinals i específicament en dos moments concrets, el deslletament i la fase de creixement-engreix.

Per aconseguir-ho es van considerar quatre objectius parcials:

1. Adaptació i estandardització de tècniques histològiques i immunològiques per a l'estudi de l'estructura intestinal i les poblacions leucocitàries en sang perifèrica i en el GALT.
2. Caracteritzar els canvis en l'estructura i en el sistema immunitari intestinals que tenen lloc durant el deslletament dels garrins, i també durant la fase d'adaptació a la dieta d'engreix.

3. Estudiar els canvis que tenen lloc en l'estructura i sistema immunitari intestinals quan s'inclouen determinats additius a les dieta dels porcs recent deslletats.
4. Estudiar els canvis que tenen lloc en l'estructura i sistema immunitari intestinals quan s'incorporen majors nivells de fibra alimentària de la dieta, en forma de polisacàrids no amilacis o midó resistent, en porcs d'engreix.

Per assolir aquests objectius es va plantejar un treball en etapes, amb el disseny i realització de 4 estudis experimentals, dos durant la fase de deslletament (experiments I i II) i dos durant la de creixement-engreix (experiments III i IV). Els estudis es van realitzar en el Centre de Recerca en Sanitat Animal i en el Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona, en col·laboració amb el Grup de Nutrició Animal del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la mateixa universitat. El plantejament i disseny experimental d'aquests quatre experiments, així com els materials i mètodes emprats, els resultats obtinguts i la seva discussió s'exposen a continuació per separat per a cada experiment.

Capítol 3

EXPERIMENT I

**“Efectes del deslletament en l’estructura i
immunitat intestinals en porcs”**

3.1. Introducció

El deslletament és un dels períodes més crítics del creixement del garrí, ja que aquest es veu sotmès a importants canvis de diferent naturalesa que seran decisius pel seu desenvolupament posterior. En primer lloc, patirà canvis socials, jeràrquics i ambientals importants ja que serà separat de la mare, traslladat a un nou allotjament i barrejat amb garrins que provenen de diferents camades. D'altra banda, estarà sotmès a un canvi de gran magnitud en la dieta, que passarà de ser líquida i altament digestible, a base de llet, els primers dies de vida, a ser una dieta sòlida, grollera i amb ingredients vegetals. Tot això converteix el deslletament en un esdeveniment estressant per al garrí, que incrementa la seva susceptibilitat a les malalties i redueix el seu creixement (Worsaae i Schmidt, 1980; Pluske *et al.*, 1997; Jensen, 1998). Freqüentment, durant aquest període, i com a conseqüència de tots els canvis abans mencionats, els garrins presenten diarrea, un dels problemes més destacats en la producció porcina actual que ocasiona pèrdues econòmiques importants (McCracken *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 1999). Fins a l'actualitat, els antibiòtics havien estat útils per fer front a aquesta situació, però les resistències que s'han anat trobant en algunes bactèries han comportat que es prohibís el seu ús amb fins profilàctics. S'han proposat una sèrie d'estratègies alternatives als antibiòtics (ús de pre- i probiòtics, d'acidificants, SDPP, extractes de plantes, zinc, etc.), però que no són tant efectives i necessiten ser millorades (Jensen *et al.*, 2003). Així doncs, una millor comprensió dels canvis que tenen lloc durant els primers estadis del deslletament ha de permetre optimitzar l'adaptació del garrí a aquest període crític.

Durant el deslletament succeeixen canvis en la morfologia intestinal que comprometen la integritat de la mucosa, principalment per una reducció de l'alçada de les vellositats, un increment de l'amplada de les vellositats i de la profunditat de les criptes i una reducció de la capacitat enzimàtica i d'absorció a l'IP (Miller *et al.*, 1984; Hampson, 1986; Kelly *et al.*, 1991a). A més, el deslletament també suposa alteracions significatives en la immunitat i en les respostes immunitàries intestinals (McCracken *et al.*, 1995; Vega-Lopez *et al.*, 1995). En particular, s'associa a respostes inflamatòries dirigides contra antígens bacterians i/o de la dieta (Li *et al.*, 1990a; McCracken *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000; Spreewenbergen, 2002; King *et al.*, 2003). Això té lloc en un període on l'animal encara té un SI immadur i depèn dels

productes de la llet materna, com la Ig A, la lisozima o la lactoferrina, per prevenir del creixement de bacteries oportunistes intestinals (Edwards i Parret, 2002).

La interacció entre els elements fisiològics i estructurals de la mucosa intestinal, les poblacions microbianes i la resposta immunitària durant el deslletament han estat àmpliament estudiades en l'IP. Tanmateix, és escassa la informació referent als canvis que es produeixen en la mucosa de l'IG, tot i que se sap que té un rol en la patogènia de la diarrea en porcs deslletats (van Beers-Schreurs *et al.*, 1998b). Fins al deslletament, l'IG no és funcionalment actiu a causa de la baixa quantitat de substrat fermentable que hi arriba. Per tant, després del deslletament, l'IG ha d'iniciar la seva activitat fermentativa en un període de temps curt.

L'objectiu d'aquest estudi va ser caracteritzar els canvis en l'estructura i en el sistema immunitari intestinals, tant a l'intestí prim com a l'intestí gros, en garrins deslletats en condicions convencionals.

3.2. Materials i mètodes

L'experiment va rebre l'aprovació prèvia de la Comissió d'Ètica en Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona. L'allotjament, maneig, tractaments i eutanàsia es van fer d'acord amb la normativa europea sobre el maneig dels animals emprats per a l'experimentació i altres finalitats científiques (Directiva 86/609/CEE).

3.2.1. Animals, allotjament i dietes

Es van seleccionar 12 garrins de 20 ± 2 dies d'edat (4.4 ± 0.36 kg; mascles i femelles) procedents de 6 truges d'una granja comercial (a raó de 2 garrins per truja), tenint en compte el seu pes. Un garrí de cada garrinada es va deslletar i alimentar amb pinso comercial formulat per a aquesta fase (Taula 3.1.) durant una setmana (grup deslletat; **DESL**), mentre que l'altre garrí es va mantenir, també durant una setmana, amb la mare i la resta de germans/es a la granja d'origen i va seguir alimentant-se amb llet materna (grup lactants; **LACT**). Els animals deslletats es van allotjar a les instal·lacions

de la Unitat Experimental del Servei de Granges i Camps experimentals de la Universitat Autònoma de Barcelona equipades amb calefacció automàtica i ventilació forçada, on els animals tenien accés lliure al pinso i a l'aigua.

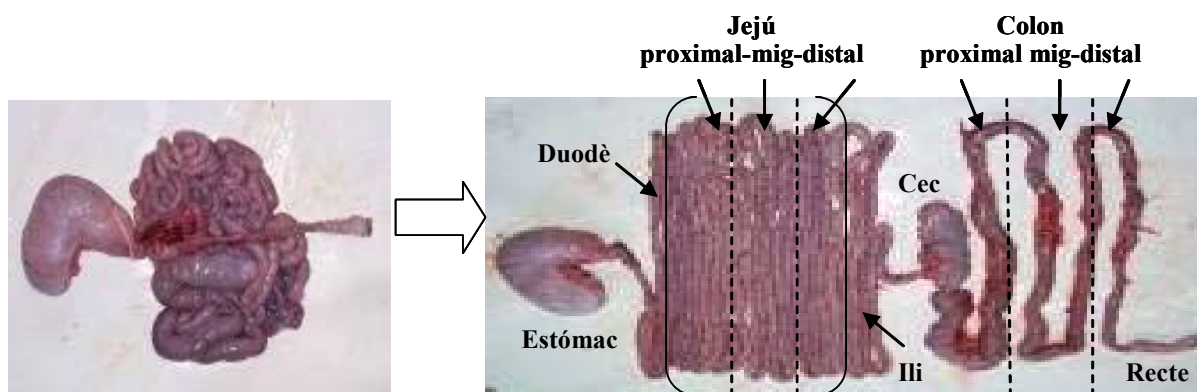
Taula 3.1. Composició de la dieta del grup d'animals deslletats (en matèria fresca).

Ingredient	g/kg
Blat de moro	46.7
Gra de soja extrusionat	17.0
Lactosa	15.0
Tortó de soja	10.0
Proteïna de patata	3.77
Sèrum de llet en pols	1.52
L-Lisina HCl	0.17
DL-Metionina	0.098
L-Treonina	0.009
Fosfat bicàlcic	3.04
Sepiolita	1.26
Sal	0.79
Carbonat càlcic	0.44
Premescla de vitamines i minerals	0.25

3.2.2. *Mostreig*

El dia 28 de vida els animals van ser pesats i eutanasiats amb una sobredosi intravenosa de pentobarbital sòdic (Dolethal, Vetoquinol, S.A., Madrid, Espanya; 200 mg/kg). Els animals van ser dessagnats i, immediatament, es va obrir l'abdomen de l'estèrnium al pubis i es va extreure, pesar i mostrejar el tracte gastrointestinal (Figura 3.1.). El pH es va mesurar a l'estómac, ili (a 15 cm de la vàlvula ileocecal), cec i colon proximal (20 cm distal del cec) per inserció d'un elèctrode unipolar a través d'una petita incisió a la paret intestinal (pHmeter CRISON 507, elèctrode Crison 52-32, Net Interlab S.A.L., Madrid). L'estómac, l'IP i l'IG es van pesar. Per a l'estudi histològic, immediatament després del sacrifici, es va obtenir una secció de jejú proximal i una de cec de cada animal, que es van obrir longitudinalment i fixar per immersió amb formol tamponat al 10% (volum/volum).

Figura 3.1. Imatges del tracte gastrointestinal d'un porc en creixement. A la imatge de l'esquerra, just extret de la cavitat abdominal de l'animal i a la de la dreta, un cop separades les diferents parts.



3.2.3. Anàlisi morfològica

Les mostres de teixit per a l'estudi histològic es van deshidratar i incloure en parafina, es van tallar a 4 μm i es van tenyir amb hematoxilina-eosina (HE). A l'examen microscòpic, es van determinar l'alçada i amplada de les vellositats, la profunditat de les criptes, el nombre de limfòcits intraepiteliais i de cèl·lules caliciformes a les vellositats i criptes, el nombre de mitosis a les criptes, la densitat cel·lular de la làmina pròpia i el gruix de la mucosa i de la capa muscular. Les mesures es van fer en 10 vellositats i/o criptes ben orientades, per a cada secció intestinal i per animal, utilitzant un microscopi òptic (BHS, Olympus, Barcelona), i posteriorment es va fer la mitja de les 10 mesures.

L'alçada i amplada de les vellositats, la profunditat de les criptes, el gruix de la mucosa i de la capa muscular es van mesurar amb un ocular amb micròmetre lineal (Olympus, ref. 209-35040, Microplanet, Barcelona). L'índex vellositat:cripta es va obtenir dividint l'alçada de cada vellositat per la seva respectiva cripta. El mateix complex vellositat-cripta es va utilitzar per determinar el nombre d'IEL, cèl·lules caliciformes i mitosis. Aquestes variables es van expressar per 100 enteròcits. La densitat cel·lular de la LP es va determinar comptant el nombre total de nuclis visibles tenyits i el nombre total de limfòcits en 10 camps (àrea total de 4000 μm^2) per a cada secció, utilitzant un ocular amb retícula (Olympus, ref. 209-35046, Microplanet, Barcelona). La densitat cel·lular es va expressar com el nombre de cèl·lules totals o el nombre total de limfòcits per 1000

μm^2 . Es va calcular el nombre total de limfòcits respecte el nombre total de cèl·lules en aquest compartiment. Al cec, també es va determinar la densitat de criptes (Brunsgaard, 1997) i la presència de nòduls limfàtics solitaris i/o complexes limfoglandulars (Drut i Drut, 1992). Totes les determinacions es van dur a terme de forma cega i per la mateixa persona.

3.2.4. Anàlisi estadística

L'efecte del deslletament sobre els pesos, el pH i la morfologia intestinal es va analitzar mitjançant una anàlisi de la variància, utilitzant el procediment GLM del programa estadístic SAS (SAS Institut, Inc. 8.1, Cary, NC), així com regressions entre els diferents paràmetres. El garrí es va utilitzar com a unitat experimental. La significació estadística es va determinar amb valors de $P < 0.05$. Els resultats es presenten com a mitja $\pm$ desviació estàndard.

3.3. Resultats

3.3.1. Resultats productius, pes i pH del tracte gastrointestinal

No es van detectar símptomes clínics generals en els animals, però sí diarrea líquida en un dels animals del grup LACT. El pes viu a l'inici de l'estudi era similar entre ambdós grups (4.4 ± 0.16 kg i 4.4 ± 0.15 kg per LACT i DESLL respectivament; $P > 0.05$). Al final del període experimental, el pes corporal va ser major en els garrins que es van quedar amb la truja (6.1 ± 0.25 kg i 5.05 ± 0.27 kg per LACT i DESLL respectivament; $P < 0.001$). El guany mig diari també va ser major en els garrins lactants respecte els deslletats (206 ± 35 i 99 ± 59 g/dia per LACT i DESLL respectivament; $P = 0.006$).

Els resultats del pes i del pH dels diferents compartiments del tracte GI es mostren a la taula 3.2. A l'estómac i a l'IP no hi va haver diferències entre grups, però el pes de l'IG buit va ser significativament superior en els animals deslletats ($P < 0.05$). Això es va acompanyar d'una disminució significativa del pH del contingut de l'IG, tant en el cec com en el colon, i d'un increment del pH gàstric en els animals deslletats ($P < 0.05$).

Taula 3.2. Pesos i pH de l'estómac, intestí prim i intestí gros dels dos grups experimentals (LACT, lactants; DESLL, deslletats). Els valors són mitjanes $\pm$ desviació estàndard (n = 6).

	LACT	DESLL	Valor <i>P</i>
Pes buit, g			
Estómac	37.4 $\pm$ 7.54	38.7 $\pm$ 4.88	0.737
Intestí prim	330 $\pm$ 56.4	370 $\pm$ 98.1	0.393
Intestí gros	120 $\pm$ 31.2	195 $\pm$ 98.1	0.027
pH			
Estómac	3.2 $\pm$ 0.84	4.4 $\pm$ 0.67	0.019
Ili	7.0 $\pm$ 0.44	6.7 $\pm$ 0.37	0.371
Cec	6.3 $\pm$ 0.13	5.8 $\pm$ 0.12	<0.001
Colon	6.9 $\pm$ 0.29	6.03 $\pm$ 0.18	<0.001

3.3.2. Morfometria intestinal

A l'IP dels garrins deslletats, s'observà una reducció de l'alçada i l'amplada de les vellositats i un increment de la profunditat de les criptes, amb la conseqüent reducció de la raó vellositat:cripta (Taula 3.3.). Els animals deslletats tenien un nombre d'IEL a les criptes de l'IP inferior que els lactants ($P < 0.05$). El nombre de cèl·lules caliciformes, nombre de mitosis, densitat cel·lular de la LP i el gruix de la capa muscular no van ser diferents entre els dos grups.

Pel que fa a la morfometria del cec (Taula 3.3.), no es van trobar diferències en la profunditat de les criptes, però si s'observà que les criptes estaven més separades i tenien un índex mitòtic més alt en els animals deslletats ($P < 0.05$). El nombre de cèl·lules caliciformes era menor en els animals deslletats ($P < 0.05$). En canvi, el nombre de limfòcits presents al compartiment epitelial i a la làmina pròpia era major en els grup dels animals deslletats (Figura 3.2.). No es va observar presència evident de nòduls limfàtics a la mucosa o submucosa del cec.

Taula 3.3. Morfologia intestinal del jejú proximal i del cec dels dos grups experimentals (LACT, lactants; DESLL, deslletats). Els valors són mitjanes $\pm$ desviació estàndard (n = 6).

	LACT	DESLL	Valor P
Jejú proximal			
Vellositat			
Alçada, μm	447 $\pm$ 62	342 $\pm$ 85	0.034
Amplada, μm	108 $\pm$ 11	89 $\pm$ 8	0.007
Cèl·lules caliciformes/100 enteròcits	3.5 $\pm$ 2.61	2.3 $\pm$ 1.02	0.296
Limfòcits intraepiteliais/100 enteròcits	7.6 $\pm$ 2.26	7.7 $\pm$ 2.66	0.939
Densitat cel·lular ¹	8.8 $\pm$ 1.08	8.5 $\pm$ 1.16	0.671
Densitat limfocitària ²	2.3 $\pm$ 0.42	2.2 $\pm$ 0.59	0.762
Raó limfòcits:cèl·lules totals ³	0.27 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.05	0.724
Cripta			
Profunditat, μm	182 $\pm$ 14	209 $\pm$ 24	0.036
Cèl·lules caliciformes/100 enteròcits	12.2 $\pm$ 3.97	10 $\pm$ 1.5	0.173
Limfòcits intraepiteliais/100 enteròcits	2.4 $\pm$ 0.9	1.3 $\pm$ 0.5	0.027
Mitosis/100 enteròcits	1.5 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 0.6	0.940
Raó vellositat:cripta ⁴	2.2 $\pm$ 0.26	1.64 $\pm$ 0.38	0.01
Gruix de la capa muscular, μm	220 $\pm$ 42.8	186 $\pm$ 2.9	0.117
Cec			
Profunditat de cripta, μm	373 $\pm$ 48.6	359 $\pm$ 30.6	0.566
Densitat de criptes ⁵	12.4 $\pm$ 0.36	10.5 $\pm$ 0.25	<0.001
Mitosis/100 enteròcits	1.0 $\pm$ 0.47	1.8 $\pm$ 0.47	0.021
Cèl·lules caliciformes/100 enteròcits	25.5 $\pm$ 3.48	19.4 $\pm$ 3.30	0.011
Limfòcits intraepiteliais/100 enteròcits	1.4 $\pm$ 0.67	2.6 $\pm$ 0.91	0.024
Densitat cel·lular ¹	1.7 $\pm$ 0.45	2.3 $\pm$ 0.40	0.045
Densitat limfocitària ²	8.7 $\pm$ 0.90	8.9 $\pm$ 0.47	0.665
Raó limfòcits:cèl·lules totals ³	0.2 $\pm$ 0.04	0.3 $\pm$ 0.07	0.109
Gruix de la mucosa, μm	470 $\pm$ 74.8	528 $\pm$ 70.8	0.243
Gruix de la capa muscular, μm	370 $\pm$ 49.5	328 $\pm$ 37.0	0.111
Gruix de la paret intestinal, μm	848 $\pm$ 98.1	856 $\pm$ 95.1	0.899

¹ Nombre total de cèl·lules per 1000 μm^2 a la làmina pròpia.

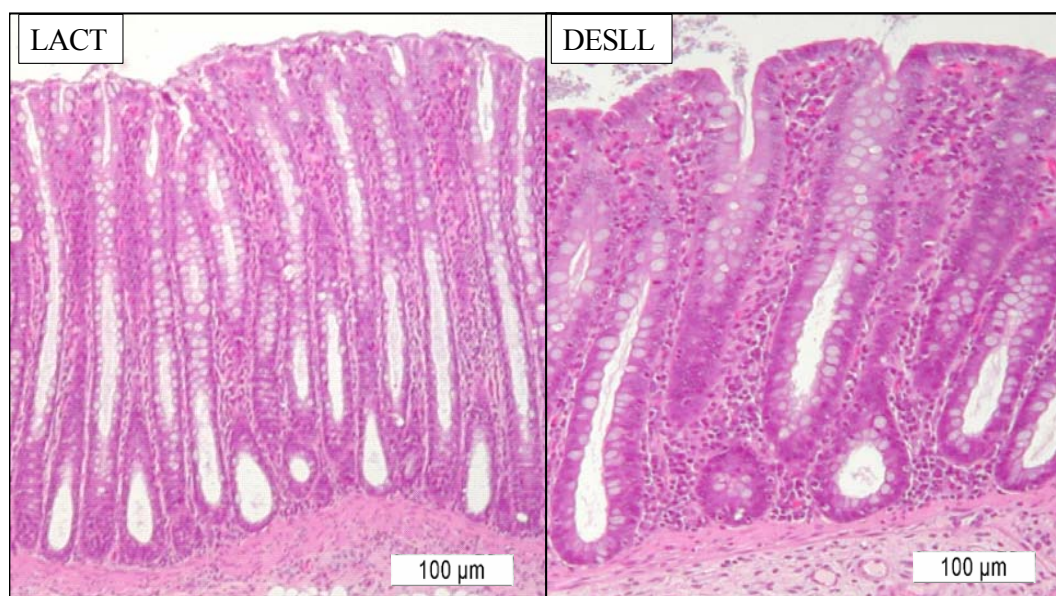
² Nombre de cèl·lules similars a limfòcits per 1000 μm^2 a la làmina pròpia.

³ Proporció de limfòcits respecte el nombre de cèl·lules totals a la làmina pròpia.

⁴ Quocient entre l'alçada de la vellositat i la profunditat de la cripta.

⁵ Nombre de criptes comptabilitzades per 1 mm, a la part basal de la mucosa.

Figura 3.2. Seccions de cec, HE, $\times 400$. Es pot observar que les criptes dels animals deslletats (DESL) estan més separades, amb menor nombre de cèl·lules caliciformes a les criptes i major presència de limfòcits a l'epiteli i a la làmina pròpia, respecte els lactants (LACT).



3.4. Discussió

En la producció porcina actual, els garrins són separats de la mare de forma sobtada entre els 21 i els 28 dies de vida. Els animals responen a aquest episodi crític amb un baix consum del nou aliment sec que provoca un menor creixement i alteracions en la funcionalitat intestinal (Le Dividich i Herpin, 1994; McCracken *et al.*, 1995; Pluske *et al.*, 1997; Spreuwenberg, 2002). Malgrat no es disposi de dades d'ingesta diària, les dades de pes corporal al final del període experimental i de guany mig diari obtingudes en aquest estudi confirmen una reducció del creixement en els garrins deslletats.

De forma similar als nostres resultats, molts altres autors també han descrit una atròfia de les vellositats i una hiperplàsia de les criptes després del deslletament (Hampson, 1986; Makkink *et al.*, 1994; Pluske *et al.*, 1997; van Beers-Schreurs *et al.*, 1998a; McCracken *et al.*, 1999). Segons Pluske *et al.* (1997) l'atròfia de les vellositats està causada per dos fenòmens: un augment de la pèrdua de cèl·lules a les vellositats (per un desafiament microbiològic, components antigènics dels ingredients del pinso, etc.) o per una reducció de la renovació cel·lular a la cripta (generalment per anorèxia). Malgrat

pugui ser causada per aquests dos mecanismes, en el nostre estudi, l'atròfia de les vellositats es deuria bàsicament a una pèrdua de cèl·lules a les vellositats ja que no s'observa una disminució de l'activitat mitòtica a les cèl·lules de la cripta. A més, existeix una correlació positiva entre l'alçada de les vellositats i el guany mig diari en els dos grups ($R^2 = 0.57$, dades no mostrades), cosa que indica que una disminució de la capacitat digestiva i absortiva de les vellositats compromet el desenvolupament productiu de l'animal. Hi ha distints components de la dieta que modulen l'estructura intestinal i que podrien explicar les diferències observades entre els grups experimentals; per exemple, el suposable consum superior de L-glutamina en el grup dels lactants, aminoàcid principal en la llet dels dies 22 al 29 (Wu i Knabe, 1994), que afavoreix el metabolisme dels enteròcits i millora l'estructura i funció intestinals (Domeneghini *et al.*, 2004).

El nombre de limfòcits a l'epiteli i a la LP de l'IP incrementa durant el deslletament en porcs convencionals (Rothkotter *et al.*, 1991; Rothkotter *et al.*, 1999a; Jiang *et al.*, 2000). Segons aquests autors, això podria ser conseqüència d'una major exposició a antigens bacterians i/o de la dieta. Probablement, la baixa exposició antigènica del grup de deslletats a la unitat experimental (comparat amb els de la granja d'origen) podrien explicar perquè no s'observen diferències en el nostre estudi. Així, per exemple, en porcs lliures de patògens específics, el nombre d'IEL i de limfòcits CD4⁺ o CD8⁺ a la LP resta pràcticament invariable en els dos primers mesos de vida (Rothkotter *et al.*, 1991; Rothkotter *et al.*, 1999a).

En canvi, a l'IG, on s'observa l'activitat fermentativa bacteriana, l'impacte sobre els paràmetres morfomètrics relacionats amb el SI és més evident. A diferència del que passa a l'IP, tant els limfòcits de la LP com els de l'epiteli del cec són superiors en els garrins deslletats, indicatiu d'un increment de l'activitat del SI a la mucosa de l'IG. Per una banda, els IEL són la primera línia cel·lular del sistema de defensa immunitari en diferents espècies i juguen un paper essencial en els desordres autoimmunes, les reaccions al·lèrgiques i les respostes contra les infeccions causades per certs microorganismes i paràsits (Hayday *et al.*, 2001; Cheroutre, 2004). D'altra banda, en nounats, les característiques fenotípiques dels IEL de l'IP i de l'IG són similars, mentre que a partir del deslletament divergeixen i adquireixen les característiques dels IEL dels animals adults per a cada localització (Kuo *et al.*, 2001). Així, en adults, els IEL de l'IG

podrien ser més sensibles als canvis de la microbiota intestinal en comparació amb els de l'IP ja que són predominantment $\alpha\beta$ (Beagley *et al.*, 1995), els quals depenen més de la colonització bacteriana que els $\gamma\delta$ (Bandeira *et al.*, 1990). En efecte, en el cec d'aquests mateixos animals, el deslletament promou l'increment de la raó enterobactèries:lactobacils i la pèrdua de riquesa en bacteries àcid làctiques, com per exemple *Lactobacillus delbruekii*, *Clostridium coccoides* o *C. butyricum* (Castillo, 2006). Per tant, els canvis en la microbiota intestinal del cec podrien ser els responsables de les variacions observades; tot i que l'efecte dels nous nutrients, majoritàriament fibra, i dels seus productes derivats no es poden excloure.

L'increment en el pes de l'IG en els garrins deslletats podria estar relacionat amb l'inici d'una activitat fermentativa més intensa, a causa de l'increment en la quantitat de material fermentable procedent de la dieta que assoleix el cec. En aquest sentit, els valors de pH confirmarien aquest increment de la fermentació. En rates, la relació entre l'inici de l'activitat fermentativa i el desenvolupament de l'IG ja ha estat descrita, i podria estar regulada per un efecte tròfic dels productes de la fermentació, com els AGV sobre l'epiteli intestinal (Sakata, 1987; Frankel *et al.*, 1994; Yu i Chiou, 1997).

A l'intestí, la producció de moc i la seva alliberació així com el nombre de cèl·lules caliciformes estan regulats alhora per factors microbians i de l'hoste (Deplancke i Gaskins, 2001). En el deslletament, i a causa de la falta de llet materna, s'observa una disminució de la presència de cèl·lules caliciformes a les criptes de l'IP, independentment de la dieta administrada (Dunsford *et al.*, 1991; Gu *et al.*, 2002). En el present estudi no s'ha observat una disminució estadísticament significativa en el nombre de cèl·lules caliciformes a l'IP. En canvi, però, sí que es demostra que el deslletament pot afectar la seva presència a l'IG. Una major secreció de mucines pot incrementar la protecció de l'epiteli intestinal dels atacs de les proteases i les bacteries (Fontaine *et al.*, 1996). Per tant, la disminució de la producció de moc a l'IG dels animals deslletats podria suposar una major susceptibilitat a certes infeccions, però també una pèrdua de la integritat intestinal que afavoria la translocació bacteriana i la resposta inflamatòria observada a l'IG dels animals deslletats (Brunsgaard, 1997; Vedonk *et al.*, 2001).

Brunsgaard (1997) va demostrar un increment de l'activitat proliferativa i de la profunditat de les criptes de l'IG dels porcs recent deslletats. La profunditat de la cripta és un reflex del balanç entre l'activitat mitòtica de les cèl·lules de la cripta i la descamació que es produeix principalment per agressions externes en la part apical (Clarke, 1973). En aquest estudi hem observat un increment de l'activitat mitòtica al cec sense variacions de la profunditat de les criptes, suggerint alhora un increment de la renovació i de la pèrdua epitelial a la part apical de les criptes en els animals deslletats.

A l'IG dels humans, l'increment d'IEL s'ha relacionat amb l'aparició de diarrea líquida que normalment s'acompanya de la presència de cèl·lules inflamatòries a la làmina pròpia (Treanor i Sheahan, 2002; Robert, 2004). Tot i que en aquest experiment la majoria d'animals no van mostrar signes de diarrea, en major o menor mesura tots els animals deslletats van patir certa resposta inflamatòria al cec amb un increment dels IEL i de la densitat cel·lular de la LP. A més d'això, els animals deslletats van presentar una menor densitat de criptes a causa de l'increment de cel·lularitat de la LP. En efecte, el garrí que va tenir diarrea líquida de forma puntual era l'animal que tenia una densitat de criptes més baixa (10.08 mentre la resta del grup DESLL tenen valors de 10.38 a 10.75). D'altra banda, durant la resposta inflamatòria, els IEL s'han relacionat amb increments de la proliferació d'enteròcits a la cripta a través de la secreció de citocines pro-inflamatòries (IFN- γ , IL-4 i TNF- α) (Ebert, 1998; Sollid, 2000). Això podria també ser una de les raons de l'increment de les mitosis observades en les criptes dels animals deslletats en el nostre estudi.

En resum, els resultats obtinguts indiquen que el deslletament provoca una reducció del creixement dels garrins deslletats en condicions comercials, alhora que altera l'estructura i el SI intestinals d'aquests animals, tant a l'IP com a l'IG. A l'IP, s'observa una atrofia de les vellositats i una hiperplàsia de les criptes que podria limitar la capacitat digestiva i absortiva dels animals. Així mateix, el deslletament també té un impacte marcat sobre els paràmetres morfomètrics de l'IG, coincidint amb l'increment de l'activitat fermentativa en aquest compartiment. En el cec dels porcs recent deslletats s'observa una disminució de les cèl·lules caliciformes, que s'acompanya d'una resposta inflamatòria intestinal i una major renovació epitelial. Per tant, el deslletament pot comprometre la funcionalitat de la mucosa intestinal, amb probables conseqüències en els rendiments productius dels garrins o el desenvolupament de diarrea.

Capítol 4

EXPERIMENT II

**“Efecte del plasma porcí assecat i d’un extracte de plantes
sobre l’estructura intestinal i les poblacions leucocitàries
en porcs deslletats”**

4.1. Introducció

El deslletament és un període crític pels garrins, que involucra diferents factors estressants, quan encara els sistemes immunitari i digestiu són encara immadurs. Aquesta situació generalment resulta en un baix consum voluntari de pinso i ritmes de creixement subòptims, amb efectes sobre la integritat de la mucosa intestinal i l'aparició de desordres patològics (Pluske *et al.*, 1997; Spreeuwenberg, 2002). Durant anys, la medicació preventiva amb antibiòtics ha estat una eina efectiva per millorar els rendiments dels garrins en aquesta etapa. Actualment, però, les noves preocupacions en matèria de seguretat alimentària pel que fa a l'aparició de resistències bacterianes front als antibiòtics ha comportat una restricció legislativa del seu ús. Aquesta situació ha induït a un increment en la investigació de l'ús de nous additius en el pinso (Kamel, 2001).

El plasma porcí assecat per polvorització (SDPP) sembla ser una bona alternativa als antibiòtics utilitzats com a promotors del creixement (Coffey i Cromwell, 2001). Els beneficis del SDPP durant el deslletament s'han atribuït majoritàriament al manteniment de la integritat de la mucosa i a la reducció de la resposta inflamatòria de l'intestí, ajudant al garri a resistir les agressions bacterianes que es donen durant aquest període (Bosi *et al.*, 2004).

Recentment, una altra alternativa interessant als antibiòtics que s'ha començat a estudiar ha estat la dels extractes de plantes. Entre altres, s'han descrit efectes antimicrobians (Didry *et al.*, 1994; Dorman i Deans, 2000), antioxidants (Aruoma, 1996), antitoxigènics (Sakagami *et al.*, 2001) i immunomoduladors (Middleton i Kandaswami, 1992) durant el seu ús en medicina humana i en la indústria alimentària. Tanmateix, els seus mecanismes d'acció encara no són plenament coneguts.

L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar l'efecte del SDPP i d'un preparat a base d'extracte de plantes (XT), que contenia carvacrol (*Origanum* sp.), cinamaldehyd (*Cinnamomum* sp.) i oleoresina de capsicum (*Capsicum annum*), sobre la morfologia intestinal i sobre les poblacions cel·lulars leucocitàries en sang perifèrica i en el GALT, en porcs convencionals durant la fase adaptativa posterior al deslletament. Aquest

experiment completa l'avaluació dels extractes de plantes efectuada amb anterioritat per Manzanilla (2006) i Castillo (2006) en els mateixos animals.

4.2. Materials i mètodes

L'experiment va rebre l'aprovació prèvia de la Comissió d'Ètica en Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona. L'allotjament, maneig, tractaments i eutanàsia es van fer d'acord amb la normativa europea sobre el maneig dels animals emprats per a l'experimentació i altres finalitats científiques (Directiva 86/609/CEE).

4.2.1. Animals, allotjament i dietes

Es van utilitzar 24 garrins ([Landrace × Large White] × Pietrain; mascles i femelles) procedents d'una granja comercial. No es va administrar pinso als garrins durant el període de lactació. Els animals es van deslletar entre els 18 i els 22 dies de vida (6.0 ± 0.14 kg) i es van allotjar a les instal·lacions de la Unitat Experimental del Servei de Granges i Camps experimentals de la Universitat Autònoma de Barcelona equipades amb calefacció automàtica i ventilació forçada. La temperatura de la nau es va reduir paulatinament dels 29 als 25°C al llarg del període experimental de 3 setmanes. Els animals tenien lliure accés al pinso i a l'aigua.

Els 24 animals (8 animals per dieta experimental) es van allotjar en 6 corrals (4 animals per corral; 2 corrals per tractament) durant 3 setmanes, seguint un disseny aleatori complet tenint en compte l'origen matern. El detall de la composició d'ingredients i del contingut calculat de nutrients de les dietes està a les taules 4.1. i 4.2. Les dietes es van formular d'acord amb el valor nutritiu dels ingredients i els requeriments descrits pel *National Research Council* (1998). La dieta control (dieta **CT**) estava formulada a base de cereals (blat de moro i ordi), gluten de blat i fonts proteiques derivades de la soja. A part, es van formular dues dietes més. La primera dieta (dieta **SDPP**) avaluava la incorporació de 6% de SDPP (APPETEIN, APC-Europe, Barcelona) com a font alternativa de proteïna en el lloc del concentrat de proteïna de soja, i també reemplaçant una porció de gluten de blat i amb ajustaments en alguns aminoàcids. La segona dieta avaluava l'addició d'un 0.03% d'una combinació d'extractes de plantes a la dieta

control (dieta **XT**). XT és una combinació d'extractes de plantes comercial (XTRACT™, Pancosma, S.A., Geneva, Switzerland) estandarditzada al 5% (pes/pes) de carvacrol (*Origanum* sp.), 3% de cinamaldehyd (*Cinnamomum* sp.) i 2% d'oleoresina de capsicum (*Capsicum annum*), tot inclòs en un portador gras inert (que representa el 90% restant) abans d'afegir-ho en el pinso.

Taula 4.1. Composició (g/kg) de les dietes experimentals (en matèria fresca).

Ingredients	CT ¹ i XT ²	SDPP ³
Blat de moro	277.8	288.7
Ordi	300.0	300.0
Tortó de soja 44	40.0	40.0
Gra de soja extrusionat	40.0	40.0
Concentrat de proteïna de soja ⁴	60.0	-
SDPP ³	-	60.0
Farina de peix LT	50.0	50.0
Sèrum dessecat	40.0	40.0
Sèrum àcid	150.0	150.0
Gluten de blat	6.8	3.8
Sepiolita (en arena)	10.0	10.0
Fosfat bicàlcic	11.0	7.2
L-Lysine HCl	4.4	2.5
DL-Metionina	2.7	2.1
L-Treonina	1.9	0.6
L-Triptòfan	0.4	0.1
Clorur de colina, 50%	2.0	2.0
Premescla de vitamines i minerals ⁵	3.0	3.0

¹ CT, dieta control.

² XT, dieta amb un 0.03% d'un extracte de plantes comercial (XTRACT™, Pancosma, S.A., Geneva, Switzerland).

³ SDPP, dieta amb un 6% de plasma porcí assecat per polvorització (APPETEIN, APC-Europe, Barcelona).

⁴ Soycomil (Indukern S.A., Barcelona).

⁵ Aporta per kg de pinso: 13500 UI de vitamina A, 2000 UI de vitamina D₃, 80 mg de vitamina E, 3 mg de vitamina B₁, 8 mg de vitamina B₂, 5 mg de vitamina B₆, 0.04 mg de vitamina B₁₂, 40 mg d'àcid nicotínic, 15 mg de pantotenat càlcic, 1.3 mg d'àcid fòlic, 0.15 mg de biotina, 4 mg de vitamina K₃, 120 mg de Fe com carbonat ferrós, 175 mg de Cu com sulfat de coure, 110 mg de Zn com òxid de zinc, 65 mg de Mn com sulfat de manganès, 1 mg de I com iodat potàssic, 0.10 mg de Se com selenit sòdic. No es van afegir antimicrobians en el pinso.

Taula 4.2. Contingut calculat de nutrients de les dietes (en g/kg de matèria fresca).

Nutrients	CT ¹ i XT ²	SDPP ³
Matèria seca	894.0	893.3
Proteïna bruta	184.1	183.6
Fibra bruta	28.0	25.8
Extracte eteri	51.1	50.5
Ca	6.4	5.4
P	6.9	6.7
Na	2.8	6.0
Metionina	6.2	5.4
Lisina	13.6	13.6
Triptòfan	2.5	2.5
Treonina	9.1	8.8
Energia metabolitzable, Mcal/kg	3.26	3.29

¹ CT, dieta control.

² XT, dieta amb un 0.03% d'un extracte de plantes comercial (XTRACTTM, Pancosma, S.A., Geneva, Switzerland).

³ SDPP, dieta amb un 6% de plasma porcí assecat per polvorització (APPETEIN, APC-Europe, Barcelona).

4.2.2. Règim alimentari i mostreig

El pes viu individual i el consum d'aliment per corral es va registrar setmanalment. Dels dies 17 al 21 post-deslletament es va aplicar un patró controlat de consum de pinso de les 08:00 a les 20:00 que consistia en períodes d'alimentació d'almenys 30 minuts alternats amb períodes de dejú, a fi i efecte d'estandarditzar les condicions del tracte digestiu (Manzanilla et al., 2004). La resta del dia (de les 20:00 a les 08:00), els porcs es van alimentar *ad libitum*. Als dies 19 i 21 post-deslletament, 24 porcs (4 porcs per tractament cada dia) es van eutanasiar amb una sobredosi de pentobarbital sòdic (200mg/kg BW; Dolethal, Vetoquinol S.A., Espanya). Els animals van ser dessagnats i, immediatament, es va obrir l'abdomen de l'estèrnum al pubis i es va extreure el tracte gastrointestinal, es va pesar ple i mesurar la longitud total i dels seus compartiments.

Per a l'estudi histològic, immediatament després del sacrifici, es va obtenir una secció de jejú proximal, ili i colon proximal de cada animal, que es van obrir longitudinalment i fixar per immersió amb formol tamponat al 10% (volum/volum). Per a l'estudi

hematològic i de les poblacions leucocitàries per citometria de flux, es van obtenir mostres de sang de la vena cava cranial en tubs que contenien EDTA i heparina de liti, respectivament, el dia del deslletament (dia 0) i els dies 7, 14 i 21 post-deslletament. També, immediatament després del sacrifici, es va extreure el gangli limfàtic ileocòlic (Milner) i ~20 cm de la placa de Peyer ileal (il-PP) de cada animal, que es van netejar amb PBS i se'n van eliminar el teixits circumdants. El LN i la il-PP es van mantenir en medi de transport (2000 UI penicil·lina i 2 mg estreptomicina en 100 ml de PBS; Sigma) fins a l'inici del processament.

4.2.3. Anàlisi morfològica

L'estudi morfològic es va portar a terme de forma similar al descrit prèviament a l'apartat 3.2.3. d'aquesta tesi. Breument, les mostres de teixit per a l'estudi histològic es van deshidratar i incloure en parafina, tallar a 4 µm i tenyir amb hematoxilina-eosina. Es va determinar l'alçada i amplada de les vellositats, la profunditat de les criptes, el nombre d'IEL a les vellositats i criptes, el nombre de cèl·lules caliciformes a les vellositats i criptes, el nombre de mitosis a les criptes i la densitat cel·lular de la LP. Les mesures es van fer en 10 vellositats i/o criptes ben orientades, per a cada secció intestinal i per animal, utilitzant un microscopi òptic (BHS, Olympus, Barcelona) i es va fer la mitja de les 10 mesures.

L'alçada i amplada de les vellositats i la profunditat de les criptes es van mesurar amb un ocular amb micròmetre lineal (Olympus, ref. 209-35040, Microplanet, Barcelona). L'índex vellositat:cripta es va obtenir dividint l'alçada de cada vellositat per la seva respectiva cripta. El mateix complex vellositat-cripta es va utilitzar per determinar el nombre de IEL, cèl·lules caliciformes i mitosis. Aquestes variables es van expressar per 100 enteròcits. La densitat cel·lular de la LP es va determinar comptant el nombre total de nuclis visibles tenyits i el nombre total de limfòcits en 10 camps (àrea total de 4000 µm²) per a cada secció, utilitzant un ocular amb retícula (Olympus, ref. 209-35046, Microplanet, Barcelona). La densitat cel·lular es va expressar com el nombre de cèl·lules totals o el nombre total de limfòcits per 1000 µm². Es va calcular el nombre total de limfòcits respecte el nombre total de cèl·lules en aquest compartiment. Totes les determinacions es van portar a terme de forma cega i per la mateixa persona.

4.2.4. Anàlisi de les poblacions leucocitàries de sang i dels teixits limfoides intestinals

Es va realitzar un hemograma complet, un comptatge diferencial dels leucòcits i una fórmula leucocítica per a cada mostra sanguínia recol·lectada en EDTA mitjançant un comptador semiautomàtic de cèl·lules sanguínies d'impedància elèctrica (Sysmex F-800; Toa Medial Electronic Europa). El comptatge diferencial dels leucòcits es va realitzar mitjançant la identificació de 100 cèl·lules en una citologia sanguínia utilitzant un microscopi òptic.

Per a l'anàlisi amb citometria de flux, les cèl·lules mononuclears (CM) es van aïllar de la sang, el LN i la il-PP, i van ser processades en base al protocol descrit prèviament per Solano-Aguilar *et al.* (2000). En resum, la sang que contenia heparina de liti es va barrejar amb Ficoll-histopaque (densitat específica 1.077 g/ml, Sigma) i es va centrifugar (800 g, 30'). Les CM es van centrifugar dues vegades (600 g, 10'), ressuspensar i mantenir en medi RPMI-1640 (Sigma) fins a l'anàlisi amb citometria de flux. Les cèl·lules del LN es van aïllar després de trossejar suaument el teixit en RPMI-1640 (Sigma). La suspensió cel·lular es va filtrar a través d'una malla de nylon de 100µm (Sigma). Després de dues centrifugacions consecutives (600 g, 10'), les cèl·lules també es van ressuspensar i mantenir en medi RPMI-1640 (Sigma). La il-PP es va seccionar (~2 cm) i incubar al bany Maria (37°C, 20') en un medi que contenia 2 mM HBSS-DTT (Sigma) i 5 mM HBSS-EDTA (Sigma). Els teixits obtinguts es van esmicolar suaument amb medi de transport (2000 UI penicil·lina, 2 mg estreptomicina i 50 mg gentamicina en 100 ml de PBS, Sigma) i es va filtrar a través d'un colador de metall. Després de centrifugar-ho (600 g, 10') i eliminar-ne els sobrenedants, el romanent es va purificar (1000 g, 30') a través d'un gradient continu 40-70% de Percoll (Sigma). Les CM es van centrifugar (600 g, 10'), ressuspensar i mantenir en medi RPMI-1640 (Sigma). Per últim, els eritròcits contaminants de totes les suspensions cel·lulars es van eliminar mitjançant una lisi amb clorur d'amoni. La viabilitat de les CM es va testar amb la tinció de blau tripà.

Les poblacions cel·lulars leucocitàries de totes aquestes mostres, es van determinar mitjançant la tinció amb un panell d'anticossos monoclonals contra antígens leucocitaris porcins i l'anàlisi posterior en el citòmetre de flux. Concretament, les CM es van tindre amb anti-CD45, anti-SWC3, anti-CD21, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-γδTCR

(Taula 4.3.). Com a controls negatius es van utilitzar anticossos monoclonals irrelevants diferents per a cada isotip. Cada mostra es va ajustar a 6×10^6 cèl·lules per ml de medi de citòmetre (FCM; PBS amb 0.1% de albúmina sèrica bovina, Sigma). Cinquanta microlitres de cada suspensió cel·lular es van introduir en cada pouet d'una placa de 96 pouets (Costar) i es van incubar durant 30 minuts amb 50 μ l d'anticòs monoclonal. Després de dos rentats amb FCM, les cèl·lules es van incubar durant 30 minuts amb un anticòs de conill F(ab')₂ contra ratolí (conjugat amb FITC; Dako) diluït a 1:40 en FCM (excepte quan l'anticòs monoclonal era CD3, CD21 o CD8, perquè ja estaven conjugats). Finalment, les cèl·lules es van rentar dues vegades més i es van fixar amb FCM amb 0.3% paraformaldehid prèviament a ser analitzades en un citòmetre de flux EPICS_XL MCL (Beckman-Coulter). Per comprovar el grau de purificació de la suspensió cel·lular, la immunotinció es va fer contra l'antigen comú leucocitari (CD45). Només es van utilitzar les mostres sanguínies amb un percentatge de cèl·lules CD45+ superior al 96%, i les mostres de LN i il-PP amb percentatges de CD45+ superiors al 90%.

Taula 4.3. Anticossos monoclonals primaris utilitzats en aquest estudi.

Anticòs	Clon	Dilució	Isotipus	Població cel·lular leucocitària	Procedència ¹
CD45	2A5	1:10	IgG3	Leucòcits	INIA
SWC3	BL1H7	1:20	IgG1	Macròfags, granulòcits	INIA
CD21 ²	BB6-11C9.6	1:200	IgG1	Limfòcits B	SBA
CD3 ³	B23-8E6	1:120	IgG1	Limfòcits T	SBA
CD4	74-2-11	1:10	IgG2b	Limfòcits T cooperadors	INIA
CD8 ³	76-2-11	1:120	IgG2a	Limfòcits T citotòxics	SBA
$\gamma\delta$ -TCR	PGBL22A	1:240	IgG1	Limfòcits T $\gamma\delta$	VMRD

¹ INIA: Anticossos cedits pel Dr. Javier Domínguez de l'*Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria* (Madrid, Espanya); SBA, *Southern Biotechnology Association* (Birmingham, Anglaterra); VMRD, *Veterinary Medical Research and Development* (Pullman, Estats Units).

² Anticòs conjugat amb isotiocinat de fluoresceïna (FITC).

³ Anticòs conjugat amb ficoeritrina (PE).

4.2.5. Anàlisi estadística

Les dades obtingudes foren analitzades mitjançant una anàlisi de la variància, utilitzant la dieta com a factor classificador, amb el procediment GLM del programa estadístic SAS (SAS Institut, Inc. 8.1, Cary, NC). De forma addicional, el procediment MIXED del SAS es va utilitzar per les mesures repetides sanguínies. En l'anàlisi dels resultats productius, es va considerar el corral com a unitat experimental. En l'anàlisi de la morfologia intestinal i de les poblacions cel·lulars leucocitàries es va considerar el porc com a unitat experimental. Quan l'animal es va utilitzar com a unitat experimental, els efectes del gènere, garrinada d'origen, corral (com efecte aleatori) i dia de sacrifici es van incloure inicialment en el model, però finalment es van excloure ja que cap d'ells va resultar significatiu (en tots els casos excedien de $P = 0.30$). El pes viu inicial de l'animal es va utilitzar com a covariable en l'anàlisi dels resultats productius. Per a tots els anàlisis es va determinar la significació estadística amb valors de $P < 0.05$ i les tendències amb $P < 0.10$. En cas d'existir un efecte significatiu, les mitjanes es van comparar mitjançant un test de comparació múltiple de mitjanes (test de Tukey), del mateix programa estadístic. Els resultats es presenten com a mitja i error estàndard de la mitja (EEM).

4.3. Resultats

4.3.1. Resultats productius i clínics

Els resultats dels rendiments productius es mostren a la taula 4.4. El guany mig diari va incrementar-se 34.6 g/dia (86%) i 33.1 g/dia (82%) en els grups SDPP i XT respecte el grup CT durant la primera setmana post-deslletament, respectivament. A més, el consum mig diari de pinso també va incrementar-se 53.6 g/dia (39%) i 71.2 g/dia (21%) en el grup XT comparat amb el CT, durant la primera i segona setmana post-deslletament, respectivament. Els animals alimentats amb SDPP van presentar un major índex de conversió (10 g/g; 18%) respecte el grup CT ($P = 0.024$).

No es van observar signes clínics durant l'estudi, ni tampoc lesions a la necròpsia en cap dels animals. Durant el període d'estudi, els animals no van seroconvertir enfront els agents infecciosos més importants en el porc: circovirus porcí tipus 2, parvovirus

porcí, virus de la síndrome reproductiva i respiratòria porcina, virus de la influència porcina, virus de la malaltia d'Aujeszky, *Mycoplasma hyopneumoniae* i *Lawsonia intracellularis*.

Taula 4.4. Rendiments productius dels porcs alimentats amb les dietes experimentals (CT, control; SDPP, 6% de plasma porcí assecat per polvorització; XT, 0.03% d'una combinació d'extractes de plantes).

	CT	SDPP	XT	EEM ¹	P valor
0 a 7 dies post-deslletament					
Guany mig diari, g	40.4	75.0	73.5	19.67	0.615
Consum mig diari, g	138.8	141.1	192.4	17.93	0.270
Guany:Consum, g/g	0.30	0.51	0.36	0.076	0.247
7 a 14 dies post-deslletament					
Guany mig diari, g	208.0	230.0	258.3	16.48	0.353
Consum mig diari, g	338.4	340.0	409.6	31.64	0.461
Guany:Consum, g/g	0.62	0.67	0.63	0.020	0.316
0 a 14 dies post-deslletament					
Guany mig diari, g	124.7	150.0	165.9	16.43	0.487
Consum mig diari, g	238.6	240.9	300.9	21.42	0.319
Guany:Consum, g/g	0.53	0.63*	0.55	0.015	0.056

¹ EEM, error estàndard de la mitja. Tots els valors són mitjanes dels 2 corrals (n = 2) amb 4 porcs per corral.

* Mitjanes diferents respecte el grup control ($P < 0.05$).

4.3.2. Morfometria intestinal

El pes i la longitud de tot el tracte gastrointestinal, així com les longituds del duodè, jejú i ili no es van veure afectats per la dieta. Les mesures morfomètriques estan resumides a la taula 4.5. No hi va haver diferències en l'alçada de les vellositats, la profunditat de les criptes en el jejú proximal i a l'ili, encara que l'amplada de les vellositats ileals va tendir a disminuir en els porcs del grup SDPP ($P = 0.092$). En el colon proximal, la profunditat de les criptes va tendir a ser menor en els garrins alimentats amb XT ($P = 0.064$). El nombre d'IEL es va veure afectat per la dieta. Es va observar una reducció en el jejú proximal dels animals alimentats amb la dieta XT comparat amb aquells alimentats amb

la dieta CT ($P = 0.034$). A part, es va observar una reducció en els IEL en el colon dels animals que van rebre la dieta SDPP ($P = 0.026$). També hi va haver diferències en la densitat cel·lular de la LP associades amb la dieta. Encara que no es va quantificar el fenotip específic de les cèl·lules de la LP, en base a la morfologia cel·lular, es va observar que entre el 22 i el 41% de les cèl·lules presents a la LP eren cèl·lules compatibles amb limfòcits. La densitat cel·lular total es va reduir a l'ili i al colon proximal dels porcs alimentats amb SDPP comparat amb els animals control ($P < 0.05$). En contrast, la densitat cel·lular limfocitària va incrementar en el colon proximal dels garrins alimentats amb la dieta XT ($P = 0.003$). El nombre de cèl·lules caliciformes i el nombre de mitosis van ser similars entre els diferents tractaments experimentals.

4.3.3. Poblacions cel·lulars immunitàries

Les variables sanguínies van demostrar diferències associades amb l'edat i la dieta (Taula 4.6.). El recompte total de leucòcits i limfòcits al dia 14 i al dia 21 va ser major comparat amb el dia del deslletament ($P < 0.05$). Els percentatges de cèl·lules T també van incrementar els dies 7 i 21 post-deslletament, degut a l'augment de les subpoblacions CD8+ i CD4-CD8+, mentre que el percentatge de limfòcits B (CD21+) i T $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ TCR+) es va reduir els dies 7 i 21, i 7 i 14 post-deslletament, respectivament ($P < 0.05$).

Els garrins alimentats amb SDPP van tenir majors percentatges de monòcits al dia 7 post-deslletament comparat amb els porcs alimentats amb la dieta CT ($P = 0.004$). Tanmateix, aquests mateixos animals van presentar una disminució del percentatge de monòcits el dia del sacrifici ($P = 0.006$). En contrast amb això, el dia del sacrifici, els animals alimentats amb XT van mostrar percentatges majors de cèl·lules SWC3+ ($P = 0.038$) i menors percentatges de cèl·lules CD21+ ($P < 0.001$) i CD8^{high}+ ($P = 0.07$) comparat amb els animals del grup CT. Les altres poblacions cel·lulars immunitàries estudiades en sang no van diferir entre els porcs alimentats amb les diferents dietes.

Taula 4.5. Morfologia intestinal del jejú proximal, ili i colon proximal dels porcs alimentats amb les dietes experimentals (CT, control; SDPP, 6% de plasma porcí assecat; XT, 0.03% d'una combinació d'extractes de plantes) durant 3 setmanes.

	CT	SDPP	XT	EEM ¹	P valor
Jejú					
Vellositat					
Alçada, µm	397	417	412	24.1	0.886
Amplada, µm	102	120	125	4.5	0.12
Cèl·lules caliciformes/100 enteròcits	3.1	2.2	3.5	0.86	0.497
Limfòcits intraepitelials/100 enteròcits	14.7	12.0	10.3*	0.79	0.007
Densitat cel·lular ²	10.1	9.4	10.7	0.37	0.071
Densitat limfocitària ²	2.7	2.3	3.0	0.25	0.264
Cripta					
Profunditat, µm	205	195	216	16.0	0.374
Cèl·lules caliciformes/100 enteròcits	10.1	10.7	11.2	1.07	0.863
Mitosis/100 enteròcits	1.6	2.6	1.8	0.35	0.402
Raó vellositat:cripta ³	2.00	2.18	2.03	0.148	0.790
Ili					
Vellositat					
Alçada, µm	274	262	308	16.0	0.248
Amplada, µm	145	129[†]	141	4.0	0.092
Cèl·lules caliciformes/100 enteròcits	5.9	4.5	6.1	0.85	0.601
Limfòcits intraepitelials/100 enteròcits	15.1	14.4	9.8	1.43	0.107
Densitat cel·lular ²	10.5	8.4**	10.7	0.34	<0.001
Densitat limfocitària ²	2.8	1.9*	3.4	0.18	<0.001
Cripta					
Profunditat, µm	192	197	185	14.3	0.766
Cèl·lules caliciformes/100 enteròcits	16.0	17.0	18.6	1.39	0.555
Mitosis/100 enteròcits	1.7	1.9	1.7	0.29	0.897
Raó vellositat:cripta ³	1.50	1.32	1.76	0.099	0.17
Colon					
Cripta					
Profunditat, µm	388	374	343[†]	13.2	0.064
Cèl·lules caliciformes/100 enteròcits	9.1	10.5	10.1	0.96	0.508
Limfòcits intraepitelials/100 enteròcits	4.9	2.2*	3.7	0.59	0.026
Mitosis/100 enteròcits	0.9	0.9	1.0	0.18	0.845
Densitat cel·lular ²	9.8	7.8**	10.4	0.39	<0.001
Densitat limfocitària ²	2.5	1.8*	3.5**	0.18	<0.001

¹ EEM, error estàndard de la mitja. Tots els valors són mitjanes (n = 8).

² Nombre total de cèl·lules o de cèl·lules similars a limfòcits per 1000 µm².

³ Quocient entre l'alçada de la vellositat i la profunditat de la cripta.

†, *, ** Mitjanes diferents respecte el grup control (P < 0.10, 0.05 i 0.01, respectivament).

Taula 4.6. Poblacions leucocitàries (anàlisi hematològica i per citometria de flux) dels porcs alimentats amb les dietes experimentals (CT, control; SDPP, 6% de plasma porcí assecat per polvorització; XT, 0.03% d'una combinació d'extractes de plantes).

	Dia 0¹	Dia 7				Dia 14				Dies 19 i 21¹			
		CT	SDPP	XT	EEM²	CT	SDPP	XT	EEM²	CT	SDPP	XT	EEM²
Leucòcits, 10 ³ /μl	14.9	12.3	13.4	15.9	1	19.2	19.9	16.4	1	20.1	19.4	17.3	1.3
Limfòcits, %	31.2	48.4	45.4	43	2.1	45.8	40.6	43.8	1.7	50.8	50.8	43.8	2.4
Monòcits, %	3.8	4	5.8^{**}	4.7	0.2	4.8	3.4	3.7	0.3	7.3	3.8^{**}	5.2	0.4
Neutròfils, %	65.6	46.2	47.6	51.1	2.1	48.8	54.8	51.2	1.9	40.3	44.3	49.6	2.5
Eosinòfils, %	-	1.4	1.1	1.2	0.1	0.7	1.2	1.3	0.2	1.7	1.2	1.4	0.1
SWC3 ⁺ , %	20.9	19.8	24.7	22.2	1.6	28.3	21.5	25	1.6	8.8	15.3	21.9[*]	1.8
CD21 ⁺ , %	31.7	19.2	18.1	16.8	1.2	24.2	26.7	23.4	1.2	21.5	22.2	14.4^{***}	1.3
γδTCR ⁺ , %	26	21.2	18.6	22.5	2.1	17.6	17.2	18.7	1.5	23.6	21.7	23.5	1.6
CD4 ⁺ , %	9.4	9.6	10	11.4	0.7	7.9	8.2	7.8	0.7	10.4	9.7	10.4	1
CD8 ⁺ , %	21.2	29.5	26.3	25.1	2.1	20.8	19.9	19.2	2.1	34.1	24.5	24.6	3
CD8 ^{low+} , %	15	24.4	19.9	20	1.8	14.2	12.9	14	1.8	21.3	14.8	17.8	2.1
CD8 ^{high+} , %	6.2	5.2	6.4	5.1	1	6.6	7	5.2	1	12.8	9.7	6.8[†]	1.3
CD4 ⁺ CD8 ⁻ , %	0.4	4.9	4.3	5.4	2.1	3.5	4	3.4	1.7	4.7	4.3	4.6	2.4
CD4 ⁺ CD8 ⁺ , %	6.4	4.4	4.4	4	0.2	4.1	3.5	3.4	0.3	6	5.8	5.8	0.4
CD4 ⁻ CD8 ⁺ , %	13.8	28.8	24.9	22.2	2.1	18.5	18.4	16.6	1.9	28.3	21	19.4	2.5

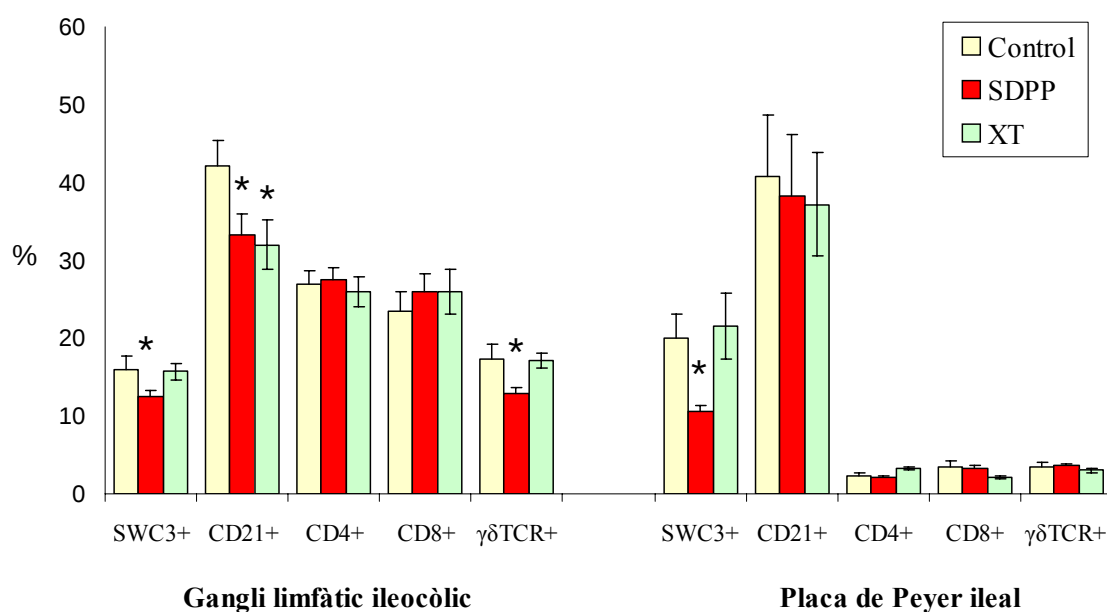
¹ Dia 0 = dia del deslletament (18-22 dies d'edat); Dies 19 i 21 = dies del sacrifici.

² EEM, error estàndard de la mitja. Tots els valors són mitjanes (n = 8).

†, *, **, *** Mitjanes diferents respecte el grup control dins de cada dia de mostreig (P < 0.10, 0.05, 0.01, i 0.001, respectivament).

L'anàlisi de les poblacions leucocitàries mitjançant citometria de flux també es va realitzar en les mostres del GALT els dies del sacrifici (Figura 4.1.). A la il-PP, els porcs alimentats amb SDPP van tenir menor percentatge de macròfags (SWC3+) en comparació amb el control ($P = 0.04$). A més, al LN, els porcs del grup SDPP van tenir menors percentatges de macròfags, limfòcits B (CD21+) i cèl·lules $\gamma\delta$ TCR+ ($P < 0.05$). L'addició de XT a la dieta va reduir el percentatge de limfòcits B presents al LN en comparació amb el control ($P = 0.03$). Les altres poblacions cel·lulars del LN i la il-PP no van diferir entre les dietes experimentals.

Figura 4.1. Percentatge de les poblacions leucocitàries analitzades per citometria de flux en el gangli limfàtic ileocòlic i en la placa de Peyer ileal dels porcs alimentats amb les dietes experimentals (CT, control; SDPP, 6% de plasma porcí assecat per polvorització; XT, 0.03% d'una combinació d'extractes de plantes). * Diferències respecte la dieta control per a cada població leucocitària ($P < 0.05$).



4.4. Discussió

El deslletament implica importants canvis socials, ambientals i nutricionals per als garrins, convertint-lo en un esdeveniment estressant per aquests animals (Pluske *et al.*, 1997). A part, el deslletament s'associa amb una inflamació intestinal i una resposta proinflamatòria sistèmica (McCracken *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000). En aquest estudi, hem observat un increment dels leucòcits, limfòcits i varies poblacions de cèl·lules T

sanguínies en diferents moments durant el període de 21 dies posterior al deslletament, suggerint una activació del SI durant aquest període.

Els resultats aquí descrits també indiquen que el SDPP pot afectar les poblacions de cèl·lules leucocitàries sanguínies i del GALT en els porcs deslletats, i que pot modificar la morfologia de l'intestí prim i gros. Hem demostrat que el SDPP provoca una menor presència de diverses poblacions cel·lulars leucocitàries en sang i en el GALT. Els porcs alimentats amb SDPP també mostren menor nombre de limfòcits a l'epiteli i a la LP de l'IG, comparat amb els altres grups. Tots aquests resultats suggereixen que el SDPP en l'espècie porcina podria regular a la baixa la possible activació del GALT en el deslletament, de forma similar a com ja ha estat demostrat en animals de laboratori (Perez-Bosque *et al.*, 2004). A més, el nostre estudi posa en evidència que l'efecte immunitari del SDPP és observable, no només en porcs inoculats amb bacteries o productes bacterians com ja ha estat demostrat (Touchette *et al.*, 2002; Bosi *et al.*, 2004), sinó també en porcs deslletats i no desafiats.

La millora de l'eficiència alimentària observada en els porcs del SDPP coincideix amb estudis previs on la substitució de concentrats de proteïna de soja per productes proteics de plasma resulta en respostes positives (Jiang *et al.*, 2000; Coffey i Cromwell, 2001). Encara que l'efecte del SDPP sobre el guany mig diari no va ser significatiu en aquest estudi degut al baix nombre de rèpliques, els 35 g/dia incrementats és consistent amb el que s'ha observat en estudis més grans amb més nombre de garrins dissenyats per avaluar les respostes productives (Jiang *et al.*, 2000; Coffey i Cromwell, 2001; Bosi *et al.*, 2004), i que permeten establir que els garrins del present estudi han respost al SDPP de forma usual. Els beneficis apareixen fins i tot en situacions on el SDPP és deficient en metionina (Kats *et al.*, 1994) o amb una digestibilitat ileal aparent dels aminoàcids més baixa que la llet en pols descremada, les proteïnes de la soja o el gluten de blat (Chae *et al.*, 1999). Aquest fet indica que, tal i com ja ha estat suggerit per altres autors (Torrallardona *et al.*, 2003), els efectes positius del SDPP no s'expliquen tan sols per la seva composició nutritiva. Recentment, s'ha proposat que el mecanisme d'acció del SDPP sobre els rendiments productius involucra el SI, perquè el grau d'activació de les cèl·lules immunitàries podria limitar la disponibilitat de l'energia pel creixement (Demas *et al.*, 1997; Perez-Bosque *et al.*, 2004). De fet, el SDPP pot prevenir l'estimulació del SI disminuint el creixement i la colonització microbiana a l'IP o per un

efecte indirecte sobre la integritat de la mucosa intestinal (Touchette *et al.*, 2002). Els nostres resultats pel que fa a les cèl·lules leucocitàries sanguínies i del GALT i les dades de la morfologia intestinal també recolzen la hipòtesi d'una menor activació del SI dels porcs alimentats amb SDPP.

Les cèl·lules T $\gamma\delta^+$ poden jugar un rol en modular la resposta inflamatòria en promoure l'influx de limfòcits i monòcits a les superfícies mucoses (Soltys i Quinn, 1999). En aquest sentit, els porcs alimentats amb SDPP van mostrar un reduït nombre de cèl·lules T $\gamma\delta^+$ en el LN i una disminució de la infiltració leucocitària a la mucosa intestinal (IEL i densitat cel·lular a la LP), donant suport a la teoria que hi ha una relació entre el LN i la població leucocitària intestinal. A part, la disminució de la infiltració leucocitària a la mucosa podria estar relacionada amb la disminució del nombre de macròfags (cèl·lules presentadores d'antigen) a la il-PP i al LN, degut a una baixa presentació antigènica a nivell del GALT en els animals alimentats amb SDPP. D'altra banda, una altra possible explicació per la reducció del nombre d'IEL és que aquesta font de proteïnes presenta probablement propietats antimicrobianes, ja que la proliferació d'IEL s'ha associat amb l'exposició a antigens bacterians (Rothkotter *et al.*, 1999a).

Jiang *et al.* (2000) consideraven que la resposta proinflamatòria local a l'intestí associada amb el deslletament es podia impedir amb l'addició de plasma a la dieta i, en conseqüència, es podia reduir la infiltració leucocitària a la mucosa intestinal de garrins convencionals recent deslletats. D'acord amb aquests resultats, hem observat una disminució de la densitat cel·lular a les vellositats no només a de l'ili, sinó també en les criptes del colon proximal. En contrast, el SDPP de la dieta no va tenir cap efecte en l'alçada de les vellositats, ni la profunditat de les criptes, ni en el nombre de mitosis, indicant que no té cap efecte tròfic específic a l'IP o a l'IG als 21 dies post-deslletament. Això coincideix amb altres estudis publicats sobre l'efecte del SDPP en porcs no desafats (Jiang *et al.*, 2000; Van Dijk *et al.*, 2002).

Walter i Bilkei (2004) van observar un efecte immunoestimulant no específic sobre diverses poblacions leucocitàries (cèl·lules CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, MHCII⁺ i no-T/no-B) en la sang de porcs d'engreix alimentats amb dietes que incloïen un 0.3% d'orenga (que contenia un 6% de carvacrol). Les diferències amb els nostres resultats, on no s'ha observat aquest efecte immunoestimulant en sang, podria ser degut a la

quantitat real de carvacrol que s'ha afegit a les dietes (180 mg/kg en la dieta de Walter i Bilkei vs. 15 mg/kg en la nostra dieta). Tanmateix, aquest efecte podria estar causat no pel carvacrol sinó per altres components presents en l'orenga, com el timol. D'altra banda, la capsiacina de la oleoresina de capsicum i el cinamaldehid han demostrat propietats antiinflamatòries. Aquests compostos inhibeixen l'activació o la proliferació de cèl·lules T, i poden modular la seva diferenciació (Koh *et al.*, 1998; Sancho *et al.*, 2002). Per tant, aquests dos compostos poden explicar el reduït nombre d'IEL observats en el jejú, que són majoritàriament cèl·lules T, i el reduït percentatge de limfòcits T citotòxics sanguinis.

La infiltració de limfòcits a la LP de l'ili i del colon estava incrementada en els animals alimentats amb XT. Això podria estar relacionat amb el major nombre de lactobacils presents a l'IG d'aquests mateixos animals (Castillo, 2006) ja que les bacteries de l'àcid làctic, en general poden estimular el SI (Schley i Field, 2002) i en particular incrementar el nombre d'IEL i limfòcits a la LP (Babinska *et al.*, 2005).

En resum, els resultats obtinguts indiquen que la inclusió de SDPP a la dieta dels porcs recent deslletats incrementa l'eficiència alimentària, i redueix els percentatges de poblacions cel·lulars immunitàries en la sang i el GALT, els nombres d'IEL i la densitat de la LP, suggerint una menor activació del SI. D'altra banda, l'addició de XT a la dieta va ser capaç de modificar els leucòcits intestinals i sistèmics encara que de forma poc consistent, causant una reducció dels nombres d'IEL i algunes poblacions limfocitàries a sang i LN, però incrementant els monòcits sanguinis i la densitat limfocitària a la LP. Malgrat que els resultats observats es puguin relacionar amb propietats antiinflamatòries o moduladores de la microbiota intestinal, són necessaris estudis més específics per confirmar aquests mecanismes. Altrament, aquest estudi també indicaria la potencialitat d'aquests productes com a alternativa vàlida als antibiòtics promotores del creixement que han estat prohibits per a ús profilàctic a la Unió Europea.

Capítol 5

EXPERIMENT III

**“Efecte del blat de moro groller, la polpa de remolatxa i el
segó de blat sobre l’estructura del colon i el sistema
immunitari intestinal en porcs d’engreix”**

5.1. Introducció

Les colitis no específiques són una causa freqüent de diarrea en porcs d'entre 12 i 40 kg, que provoquen una reducció de l'aprofitament de nutrients i, per tant, també pèrdues econòmiques en la fase d'engreix (Duncan i Lysons, 1987; Smith i Nelson, 1987; Taylor *et al.*, 1987; Thomson *et al.*, 1998). Malgrat que l'etiologia i la patogènia d'aquesta condició han estat poc estudiades, sembla que més que una causa infecciosa, el més probable és que diferents factors de la dieta i/o del maneig puguin induir aquest procés. En concret, les colitis no específiques s'han associat amb alguns components de la dieta o amb les característiques del pinso (Smith i Nelson, 1987; Thomson *et al.*, 1998). Recentment, Chase-Topping *et al.* (2007) han observat que les dietes de les granges diagnosticades amb colitis no específica contenen una major presència de segó de blat i cereals cuits, aportant nivells més alts de polisacàrids no amilacis (PNA).

En aquest sentit, Anguita *et al.* (2007) han demostrat recentment que la incorporació de determinats ingredients fibrosos o processos tecnològics canvien les característiques físicoquímiques del contingut intestinal dels porcs d'engreix, amb potencials efectes sobre la integritat i la salut del tracte digestiu, ja que l'ambient al qual s'exposa la mucosa colònica pot condicionar-ne la integritat i modular la resposta immunitària intestinal (Brunsgaard, 1998; Schley i Field, 2002; Mikkelsen *et al.*, 2004). Per exemple, la incorporació de segó de blat a la ració pot incrementar la fermentació proteica a l'IG i el nivell de citotoxicitat del contingut colònic (Anguita, 2006), a part de disminuir la biodiversitat microbiana al colon (Castillo, 2006). Probablement, això indicaria un contingut més nociu per la mucosa i una microbiota més inestable al colon (Anguita, 2006; Castillo, 2006). D'altra banda, altres factors com la mida de partícula del pinso també mereixerien ser estudiats ja que poden afectar les característiques morfològiques, la proliferació epitelial i els patrons d'unió a les lectines a l'IG (Brunsgaard, 1998).

En general, s'assumeix que les dietes amb alts nivells de fibra mostren efectes beneficiosos sobre la mucosa de l'IG (Newmark i Lupton, 1990; McCullogh *et al.*, 1998). Tanmateix, altres autors suggereixen que la fermentació dels carbohidrats pot alterar la funció entèrica normal i incrementar la incidència de colitis i diarrea (Siba *et*

al., 1996; Durmic *et al.*, 1998). Així doncs, probablement, una presumpció general sobre els efectes de la DF en els animals no seria vàlida ja que la fracció carbohidratada dels ingredients fibrosos presenta una composició altament complexa.

Aquest estudi pretén avaluar l'efecte de la incorporació de blat de moro molt de forma grollera com a font de midó resistent i de polpa de remolatxa o segó de blat com a font de PNA solubles i insolubles, respectivament, sobre l'estructura del colon i les respostes immunitàries a nivell intestinal i sistèmic en porcs durant la primera fase del període d'engreix. Aquest experiment completa els treballs sobre l'avaluació de la fibra alimentària (DF) efectuada amb anterioritat per Anguita (2006) i Castillo (2006) en els mateixos animals.

5.2. Materials i mètodes

L'experiment va rebre l'aprovació prèvia de la Comissió d'Ètica en Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona. L'allotjament, maneig, tractaments i eutanàsia es van fer d'acord amb la normativa europea (Directiva 86/609/CEE).

5.2.1. Animals, allotjament i dietes

Un total de 104 porcs mascles i femelles ([Large White x Landrace] x Pietrain) d'aproximadament 8 setmanes d'edat (15 ± 0.2 kg de pes viu) es van allotjar a les instal·lacions de la Unitat Experimental del Servei de Granges i Camps experimentals de la Universitat Autònoma de Barcelona, equipada amb 4 sales, amb 8 corrals cadascuna (1.0 m x 1.8 m). Cada corral tenia una menjadora i una font d'aigua en xumet per tal d'assegurar una alimentació *ad libitum* i un lliure accés a l'aigua. Els porcs es van vacunar enfront la malaltia d'Aujeszky el dia 7 de l'estudi (via intranasal) i el dia 17 (via intramuscular) amb una vacuna comercial atenuada (Ingelvac Aujeszky MLV; Boehringer Ingelheim) que contenia 10^6 TCID₅₀/dosi de la soca Bartha K61 gE-.

Els tractaments experimentals van consistir en 4 dietes experimentals que diferien en l'origen i el contingut de la fibra (Taula 5.1.). Les dietes es van formular d'acord amb el valor nutritiu dels ingredients i els requeriments per a porcs d'engreix descrits pel *National Research Council* (1998). Les dietes es van administrar en forma de farina

seca i tots els ingredients es van moldre per tal que passessin a través d'un sedàs de 2.5 mm de diàmetre. La ració contenia una base de cereal (ordi 150 g/kg i blat de moro en quantitats variables de 424 a 541 g/kg en funció del tractament) i tortó de soja 44 (280 g/kg). A partir d'aquesta dieta base (dieta control, **CT**) es van obtenir 3 dietes isoenergètiques (energia digestible 14.2 MJ/kg) que presentaven un major aport de fibra dietètica i de grassa (oli vegetal) en compensació pel seu menor valor energètic. En primer lloc, es va incrementar el nivell de midó resistent Tipus I (dieta **GRO**) substituint el blat de moro mòlt a 2.5 mm per un blat de moro mòlt a 4.0 mm. Mitjançant la substitució de blat de moro per un 8% de polpa de remolatxa (dieta **POLPA**) es va incrementar el nivell de PNA solubles. A la quarta dieta, es va incrementar el nivell de PNA insolubles mitjançant la substitució de blat de moro per un 10% segó de blat (dieta **SEGÓ**). Els animals van rebre les dietes experimentals des del primer dia d'arribada a la unitat experimental.

5.2.2. Procediments experimentals

Els 32 corrals, cadascun d'ells amb 3 porcs, es van assignar aleatòriament a un dels 4 grups experimentals, resultant en 8 corrals (2 en cada sala) i 24 animals per dieta. L'experiment va durar 42 dies dividits en tres períodes experimentals: primer període fins als 7 dies després d'arribar a la unitat experimental, segon període dels 7 als 21 dies i tercer període dels 21 als 42 dies. Al final de cada període experimental es va determinar el pes corporal, el consum voluntari de pinso i l'índex de conversió, i es va sacrificar l'animal més pesat de cada corral, resultant així en 8 animals sacrificats per dieta i període experimental. A més, com a control, es van sacrificar 8 animals al dia 0. Dins de cada període, els animals es van sacrificar en dos dies diferents: dies 7 i 9 pel primer període, dies 21 i 23 pel segon període, i dies 42 i 44 pel tercer període. Prèviament, aquests animals havien estat sotmesos a un protocol controlat d'ingesta de pinso que va permetre estandarditzar les condicions del tracte digestiu. El protocol d'ingesta consistia en almenys 3 cicles complets abans del sacrifici de 30 minuts d'alimentació alternats amb una hora de dejú (Manzanilla *et al.*, 2004).

Taula 5.1. Ingredients i composició química analitzada de les dietes experimentals (CT, dieta control amb molla fina (2.5 mm); GRO, dieta amb molla grollera del blat de moro (4.0 mm); POLPA, dieta amb polpa de remolatxa 8%; SEGÓ, dieta segó de blat 10%).

	Dietes			
	CT	GRO	POLPA	SEGÓ
Ingredients (g/kg matèria fresca)				
Ordi	150	150	150	150
Tortó de soja 44	277	277	277	277
Blat de moro	541	541	453	424
Polpa de remolatxa	-	-	80	-
Segó de blat	-	-	-	100
Oli vegetal	7	7	16	27
L-lisina HCl	1.7	1.7	1.5	1.2
Treonina	0.4	0.4	0.3	0.2
Carbonat càlcic	8.1	8.1	6.1	10.8
Fosfat bicàlcic	7.6	7.6	8.5	2.7
Clorur sòdic	2.5	2.5	2.2	2.5
Premescla vitamínica-mineral ¹	4.0	4.0	4.0	4.0
Crom (Cr ₂ O ₃)	1.5	1.5	1.5	1.5
Composició química analitzada (g/kg matèria seca)				
Matèria seca	894.2	897.7	897.7	893.1
Cendres	42.7	45.0	43.6	47.6
Energia Bruta (MJ/kg MS)	18.5	18.5	18.6	18.9
Extracte eteri	34.3	37.7	39.9	50.0
Proteïna bruta	185.3	198.8	187.4	193.4
Midó	456.7	440.1	357.3	367.4
Fibra Neutra Detergent	141.0	168.0	172.0	186.0
PNA totals ²	148.0 (29)	150.2 (28)	198.8 (34)	168.1 (26)
Arabinosa	20.2	19.0	30.7	24.3
Xilosa	24.6	22.0	23.3	35.9
Galactosa	22.5	22.6	28.3	18.3
Glucosa	45.1	45.4	63.3	50.2
Àcids urònics	19.1	18.1	36.5	20.7
Tamany de partícula (µm) ³	472.36 (2.3)	557.47 (2.2)	528.28 (2.2)	578.77 (2.2)

¹ Aportament per kg de pinso: 5000 UI de vitamina A, 1000 UI de vitamina D₃, 15 mg de vitamina E, 1.3 mg de vitamina B₁, 3.5 mg de vitamina B₂, 1.5 mg de vitamina B₆, 0.025 mg de vitamina B₁₂, 10 mg de pantotenat càlcic, 15 mg d'àcid nicotínic, 15 mg de niacina, 15 mg de biotina, 0,1 mg d'àcid fòlic, 2 mg de vitamina K₃, 80 mg de Fe, 6 mg de Cu, 0.75 mg de Co, 60 mg de Zn, 30 mg de Mn, 0,75 mg de I, 0,10 mg de Se, 0,15 mg d'Etoxiquin com a fungicida.

² PNA, polisacàrids no amiloides: inclou ramnosa, fructosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa i glucosa. Entre parèntesis es mostra el percentatge de PNA solubles.

³ Tamany de partícula determinat segons Pfof i Headley, 1976. Entre parèntesis, la desviació.

Els animals es van eutanasiar amb una sobredosi intravenosa de pentobarbital sòdic (200 mg/kg pes corporal; Dolethal, Vetoquinol, S.A., Madrid, Espanya), es van dessagnar i es va obrir immediatament la cavitat abdominal de l'estèrnum al pubis. Es va extreure el tracte GI, es va lligar el càrdies i el recte, i es va pesar. Posteriorment, es van separar els diferents compartiments mitjançant lligadures dobles: estómac, intestí prim, cec, colon i recte. L'estómac, cec i colon es van pesar plens i buits. Es va mesurar el pH al colon proximal i colon distal per inserció d'un elèctrode unipolar a través d'una petita incisió a la paret intestinal (pHmeter CRISON 507, elèctrode Crison 52-32, Net Interlab S.A.L., Madrid, Spain). El contingut del colon proximal i del distal es van col·lectar i congelar a -20°C per a la determinació del contingut d'aigua, àcids grassos volàtils (AGV) i amoníac.

Per a l'estudi histològic, immediatament després del sacrifici, es va obtenir el gangli limfàtic ileocòlic i una secció de colon proximal i una de colon distal de cada animal, que es van obrir longitudinalment i es van fixar per immersió en formol tamponat al 10% (volum/volum). Per a l'estudi hematològic i de les subpoblacions leucocitàries mitjançant citometria de flux, es van obtenir mostres de sang de la vena cava cranial en tubs que contenien EDTA i heparina de liti, respectivament. També, immediatament després del sacrifici, es va extreure el gangli limfàtic ileocòlic (Milner) i ~20 cm de la placa de Peyer ileal (il-PP) de cada animal, que es van netejar amb PBS i se'n van eliminar el teixits circumdants. El LN i la il-PP es van mantenir en medi de transport (2000 UI penicil·lina i 2 mg estreptomicina en 100 ml de PBS, Sigma).

5.2.3. Procediments analítics

L'anàlisi química de les dietes (Taula 5.1.) es va realitzar d'acord amb els procediments estàndards de l'*Association of Official Analytical Chemists* (1995). El contingut total de midó i de PNA de la dieta es va determinar seguint el mètode de Theander (1990). El midó es va determinar mitjançant un assaig colorimètric després d'una hidròlisi enzimàtica de les mostres gelatinitzades. Els PNA es van determinar mitjançant una hidròlisi àcida de la mostra excedent de l'anàlisi del midó. La fracció de PNA neutres es va analitzar per cromatografia de gasos i els àcids urònics mitjançant colorimetria. El contingut d'aigua es va determinar en les mostres d'IG a partir del valor de pèrdua d'aigua durant la liofilització a 103°C i la determinació de la matèria seca en les mostres

liofilitzades. Els AGV es van determinar per cromatografia de gasos, després de sotmetre les mostres a un tractament àcid-base seguit per una extracció en èter i una derivatització (Jouany, 1982). L'amoníac es va determinar amb l'ajuda d'un elèctrode sensible al gas (Crison ISE-9665) combinat amb un voltímetre digital (Crison GLP 22). L'amoníac alliberat es va mesurar en el sobrenedant a diferents voltatges.

5.2.4. Anàlisi morfològica

L'estudi morfològic es va realitzar de forma similar al descrit prèviament a l'apartat 3.2.3. d'aquesta tesi. Breument, les mostres de teixit per a l'estudi histològic dels dies 0, 7, 21 i 42 es van deshidratar i incloure en parafina, tallar a 4 µm i tenyir amb hematoxilina-eosina. Les mesures morfològiques es van realitzar amb un microscopi òptic (BHS, Olympus, Barcelona) utilitzant un micròmetre lineal (Olympus, ref. 209-35040, Microplanet, Barcelona). El gruix de la paret intestinal i de la capa muscular, la profunditat de les criptes i el nombre de cèl·lules caliciformes, d'IEL i de figures mitòtiques presents a les criptes es van determinar en 10 criptes ben orientades, per a cada secció intestinal, i es va fer una mitja de les 10 mesures. La presència de cèl·lules mononuclears a la LP es va determinar mitjançant el recompte del nombre d'aquestes cèl·lules entre les criptes en 15 camps per a cada secció intestinal. També es van determinar la densitat de criptes per mm (Brunsgaard, 1997) i la presència de nòduls limfàtics (fol·licles limfoides solitaris i complexos limfoglandulars) a la mucosa (Drut i Drut, 1992). Totes les determinacions es van dur a terme de forma cega i per la mateixa persona.

5.2.5. Anàlisi de les poblacions leucocitàries de sang i dels teixits limfoides intestinals

Es va realitzar un hemograma complet, un comptatge diferencial dels leucòcits i una fórmula leucocítica per a cada mostra sanguínia mitjançant un comptador semiautomàtic de cèl·lules sanguínies d'impedància elèctrica (Sysmex F-800; Toa Medial Electronic Europa) els dies 0, 7, 21 i 42. Per a l'anàlisi amb citometria de flux, els dies 7, 21 i 42, les cèl·lules mononuclears es van aïllar de la sang, el LN i la il-PP mitjançant diferents gradients de densitat amb Ficoll-histopaque (Sigma), es van tenyir amb un panell d'anticossos monoclonals contra porcí, i es van analitzar mitjançant citometria de flux

(EPICS XL-MCL; Beckman-Coulter) tal i com s'ha descrit anteriorment en l'apartat 4.2.4. d'aquesta tesi. Concretament, les poblacions cel·lulars leucocitàries es van determinar utilitzant els següents anticossos: anti-CD45, anti-SWC3, anti-CD21, anti-CD4, anti-CD8, anti- $\gamma\delta$ TCR, anti-CD25 i anti-SLADR (Taula 5.2). Per tal d'estudiar el grau d'activació d'algunes cèl·lules immunitàries es va avaluar l'expressió del receptor d'IL-2 i del MHC II, mitjançant l'ús dels anticossos anti-CD25 i anti-SLADR, respectivament (Denham *et al.*, 1994; Sinkora *et al.*, 2001). Com a controls negatius es van utilitzar anticossos monoclonals irrelevants diferents per a cada isotip .

Taula 5.2. Anticossos monoclonals primaris utilitzats en aquest estudi.

Anticòs	Clon	Dilució	Isotipus	Població cel·lular leucocitària	Procedència ¹
CD45	2A5	1:10	IgG3	Leucòcits	INIA
SWC3	BL1H7	1:20	IgG1	Macròfags, granulòcits	INIA
CD21 ²	BB6-11C9.6	1:200	IgG1	Limfòcits B	SBA
CD4	74-2-11	1:10	IgG2b	Limfòcits T cooperadors	INIA
CD8 ³	76-2-11	1:120	IgG2a	Limfòcits T citotòxics	SBA
$\gamma\delta$ -TCR	PGBL22A	1:240	IgG1	Limfòcits T $\gamma\delta$	VMRD
CD25	K231-3B2	1:20	IgG1	Expressió receptor IL-2	INIA
SLA-DR	2E9/13	1:10	IgG2a	Expressió MHC II	INIA

¹ INIA: Anticossos cedits pel Dr. Javier Domínguez de l'*Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria* (Madrid, Espanya); SBA, *Southern Biotechnology Association* (Birmingham, Anglaterra); VMRD, *Veterinary Medical Research i Development* (Pullman, Estats Units).

² Anticòs conjugat amb isotiocinat de fluoresceïna (FITC).

³ Anticòs conjugat amb ficoeritrina (PE).

La funcionalitat de les poblacions cel·lulars enfront diferents mitògens, en diferents teixits, es va avaluar en un assaig *in vitro* adaptat de Pappaterra (2002). En síntesi, les cèl·lules mononuclears aïllades de sang i LN (8 per tractament) i il-PP (4 per tractament) als dies 7, 21 i 42 es van ajustar a 1×10^6 cèl·lules/ml i es van incubar en plaques de cultiu de 96 pouets de fons pla (Costar 3799) a 37°C i en una atmosfera amb

un 5% CO₂ durant 24 hores. Les cèl·lules es van mantenir sense estimular amb medi RPMI-1640 complet (Sigma) o es van estimular amb 10 µg/ml fitohemaglutinina (PHA, Sigma), 5 µg/ml lipopolisacàrid (LPS, *Escherichia coli* 0111:B4, L-4391, Sigma) o 10³ TCID₅₀/ml del virus de la malaltia d'Aujeszky (ADV, soca Bartha K61 gE-, lot 195-851, Boehringer Ingelheim). Posteriorment, els cultius es van tenyir amb anti-CD25 i anti-SLADR i es va analitzar cada mostra per citometria de flux de forma similar a l'explicat anteriorment. L'estimulació produïda es va determinar com la proporció de cèl·lules incubades amb PHA, LPS o ADV que expressaven el receptor d'IL-2 (CD25+) o el MHC II (SLADR+) dividit per la proporció de cèl·lules CD25+ o SLADR+ dels cultius no estimulats i mantinguts amb medi RPMI-1640 complet, per a cada mostra, animal i dia.

5.2.6. Anàlisi estadística

Les dades obtingues foren analitzades mitjançant una anàlisi de la variància, utilitzant el procediment GLM del programa estadístic SAS (SAS Institut, Inc. 8.1, Cary, NC), avaluant l'efecte de la dieta, del període experimental i de la interacció entre els dos. El pes viu inicial de l'animal es va utilitzar com a covariable en l'anàlisi dels resultats productius. En tots els casos es va considerar l'animal com a unitat experimental, excepte per a la ingestió voluntària i l'índex de conversió on la unitat experimental va ser el corral. La presència de nòduls limfàtics al colon es va analitzar mitjançant el procediment GENMOD del SAS. Per a totes les anàlisis es va determinar la significació estadística amb valors de $P < 0.05$, i les tendències amb $P < 0.10$. La interacció es va estudiar quan el seu P valor era menor a 0.15, encara que els efectes principals no fossin significatius (Lowry, 1992). Posteriorment, les mitjanes es van comparar mitjançant un test de comparació múltiple de mitjanes (test de Tukey), del mateix programa estadístic. Els resultats es presenten com a mitja i error estàndard de la mitja (EEM).

5.3. Resultats

No es van detectar símptomes clínics, excepte en dos animals del grup SEGÓ: un amb diarrea en el primer període i un altre amb epidermitis exsudativa en el segon període. A part, a la necròpsia, tres animals van presentar peritonitis o poliserositis fibrinosa: un del grup CT (dia 23), un del grup GRO (dia 23) i un del grup SEGÓ (dia 41), que es van excloure dels estudis posteriors.

5.3.1. Resultats productius

La incorporació de fibra dietètica (GRO, POLPA, SEGÓ) va disminuir el consum voluntari de pinso (Taula 5.3.). La disminució de l'ingesta voluntària estava associada amb un menor pes viu en el grup de la POLPA, i amb un major índex de conversió en els grups GRO, POLPA i SEGÓ ($P < 0.05$).

Taula 5.3. Pes viu (kg), consum (g/animal·dia) i relació guany:consum (G:C) dels porcs alimentats amb les dietes CT (control), GRO (blat de moro groller), POLPA (10% polpa de remolatxa) i SEGÓ (10% segó de blat) durant els tres períodes experimentals.

	Període	Dieta				EEM ¹	Valor <i>P</i>		
		CT	GRO	POLPA	SEGÓ		Dieta	Període	Int. ²
Pes viu	1 ^{er}	19.57^a	19.56^a	18.88^a	19.72^a	0.534	<0.001	<0.001	0.006
	2 ^{on}	28.53^a	28.39^{ab}	26.69^b	28.26^{ab}				
	3 ^{er}	43.45^a	43.92^a	40.13^b	41.64^{ab}				
Consum	1 ^{er}	714	619	596	672	60.2	<0.001	<0.001	0.083
	2 ^{on}	1266	1137	1086	1118				
	3 ^{er}	2186	2056	1745	1903				
	Total ³	1388^a	1271^b	1142^c	1231^{bc}				
G:C	1 ^{er}	0.80	0.92	0.81	0.87	0.023	0.007	<0.001	0.183
	2 ^{on}	0.48	0.51	0.51	0.52				
	3 ^{er}	0.47	0.52	0.51	0.49				
	Total ³	0.54^b	0.59^a	0.57^a	0.58^a				

¹ EEM, error estàndard de la mitja. Tots els valors són mitjanes (n=8).

² Int., *P* valor de la interacció (Dieta per període).

³ Total fa referència a la mitjana del consum per als 3 períodes i el valor de G:C calculat per a tot l'experiment.

^{a,b} Dins d'una fila, les mitjanes amb lletres diferents són diferents ($P < 0.05$).

5.3.2. Característiques del tracte gastrointestinal i del seu contingut

El pes del tracte GI va variar en funció de la dieta ($P = 0.009$). La mòlta grollera del blat de moro (4.23 kg) i els increments en els nivells de PNA de la dieta (4.23 i 4.24 kg per POLPA i SEGÓ) van determinar increments en el pes mig del tracte GI en comparació amb la dieta CT (3.88 kg). Les diferències ja eren evidents en el primer període, encara que a partir del segon i tercer període els valors van ser significativament diferents. L'administració de les diferents racions no va provocar diferències significatives en el pes mig buit de l'IG (0.44, 0.47, 0.43 i 0.43 kg de pes del colon buit per CT, GRO, POLPA i SEGÓ; 0.022 EEM; $P > 0.05$) però si va incrementar el pes del contingut del cec i del colon en les dietes GRO i POLPA respecte la dieta CT (0.71, 0.91, 1.02 i 0.71 kg de pes del contingut del colon per CT, GRO, POLPA i SEGÓ; 0.057 EEM; $P < 0.001$). L'increment del pes del contingut de l'IG es va correspondre amb increments en els percentatges de matèria seca en el grup GRO i en majors contingut d'aigua en el grup POLPA (dades no mostrades).

La fermentació a l'IG es va avaluar amb el pH, els AGV i l'amoníac. Les concentracions d'AGV van ser menors en el primer període comparat amb el segon i tercer període, tant en el colon proximal (122.8, 150.0 i 143.9 $\mu\text{mol/g}$ per primer, segon i tercer període; EEM 4.34; $P < 0.001$) com en el distal (96, 128.9 i 110.5 $\mu\text{mol/g}$ per primer, segon i tercer període; EEM 4.05; $P < 0.001$). En el colon proximal, els animals alimentats amb GRO i POLPA mostraven una tendència a tenir majors concentracions d'AGV comparat amb els animals dels grups CT i SEGÓ (133.6, 143.1, 145.8 i 133.3 $\mu\text{mol/g}$ per CT, GRO, POLPA i SEGÓ; EEM 4.34; $P = 0.093$). En el colon distal, les concentracions d'AGV també van ser superiors pels animals del grup POLPA respecte el CT i el WB (107.1, 113.8, 119.3 i 104.4 $\mu\text{mol/g}$ per CT, GRO, POLPA i SEGÓ; EEM 4.05; $P = 0.039$). El perfil d'AGV també es va veure afectat pel tractament experimental. Els animals alimentats amb POLPA tenien majors proporcions d'àcid acètic i menors proporcions de butíric i d'AGV ramificats en comparació amb les altres dietes, especialment en el colon distal (56 vs. 60.4, 14.2 vs. 12.2, 2.5 vs. 1.6 % d'àcid acètic, butíric i AGV ramificats per a la dieta CT vs. POLPA; $P < 0.05$). En el colon proximal, la incorporació de polpa de remolatxa va disminuir la concentració d'amoníac

en el contingut colònic (11.8 $\mu\text{mol/g}$) comparat amb les altres dietes (18.9 $\mu\text{mol/g}$; $P < 0.001$). En el colon distal, les concentracions d'amoníac de les dietes amb alt nivell de fibra dietètica (18.9 $\mu\text{mol/g}$) eren menors que les de la dieta CT (24.5 $\mu\text{mol/g}$; $P = 0.002$). La dieta va tenir un efecte significatiu sobre el pH del colon. Les majors diferències es van observar entre les dietes POLPA i SEGÓ (5.74 vs. 5.91 en el colon proximal, i 5.86 vs. 6.06 en el colon distal; $P < 0.05$), que representaven concentracions de H^+ de 1.82 vs. 1.23 i 1.38 vs. 0.87 $\mu\text{mol/L}$ en el colon proximal i distal, respectivament.

5.3.3 Morfometria del colon

L'estudi morfològic va mostrar diferències significatives en l'estructura microscòpica entre els compartiments proximal i el distal del colon (Taules 5.4.1. i 5.4.2.). El gruix de la capa muscular, el nombre d'IEL i de mitosis i la presència de nòduls limfàtics van ser superiors en el colon proximal, mentre que el gruix de la paret intestinal, la profunditat de les criptes, el nombre de cèl·lules caliciformes i la densitat de les criptes van ser majors en el colon distal ($P < 0.01$). També es va observar un efecte relacionat amb el període experimental. En el colon proximal, el nombre de cèl·lules caliciformes, d'IEL i de cèl·lules mononuclears a la LP va incrementar en els períodes finals, mentre que el gruix de la capa muscular i el nombre de mitosis va disminuir ($P < 0.05$). En canvi, en el colon distal, la profunditat de les criptes, el nombre d'IEL i el de cèl·lules mononuclears a la LP va disminuir amb el temps ($P < 0.05$).

Taula 5.4.1. Morfometria del colon proximal dels porcs alimentats amb les dietes CT (control), GRO (blat de moro groller), POLPA (10% polpa de remolatxa) i SEGÓ (10% segó de blat) durant els tres períodes experimentals (7, 21 i 42 dies).

Colon proximal	Període	Dieta				EEM ¹	Valor <i>P</i>		
		CT	GRO	POLPA	SEGÓ		Dieta	Període	Interacció
Gruix total, μm	1 ^{er}	1018	1006	977	1039	37,92	NS ³	NS	NS
	2 ^{on}	938	1048	970	954				
	3 ^{er}	1030	1012	1055	991				
Túnica muscular, μm	1 ^{er}	491^a	481^a	444^{ab}	425^b	23,35	0.01	0.002	NS
	2 ^{on}	498^a	449^{ab}	426^b	428^b				
	3 ^{er}	427^a	416^{ab}	393^b	371^b				
Profunditat de cripta, μm	1 ^{er}	442	424	417	435	15,80	NS	NS	NS
	2 ^{on}	400	452	419	410				
	3 ^{er}	420	416	410	403				
Cèl·lules caliciformes/100 enteròcits	1 ^{er}	17,8	20,0	16,9	20,7	1,24	NS	0.024	NS
	2 ^{on}	20,2	19,6	19,7	19,5				
	3 ^{er}	21,4	21,1	20,6	22,6				
Mitosis/100 enteròcits	1 ^{er}	0,78	0,81	0,85	0,56	0,09	NS	<0.001	NS
	2 ^{on}	0,94	0,88	0,95	1,08				
	3 ^{er}	0,79	0,63	0,67	0,72				
Densitat de criptes ²	1 ^{er}	9,8	10,3	10,1	9,8	2,90	NS	<0.001	0.03
	2 ^{on}	9,2	9,3	8,6	8,6				
	3 ^{er}	9,1^b	9,5^b	9,6^{ab}	10,3^a				

¹ Els valors són mitjanes. L'error estàndard de la mitja (EEM) fa referència a n = 8.

² Nombre de criptes comptabilitzades per 1 mm de distància, a la part basal de la mucosa.

³ NS: no significatiu, $P > 0.10$.

^{a,b} Dins d'una fila, les mitjanes amb lletres diferents són diferents ($P < 0.05$).

Taula 5.4.2. Morfometria del colon distal dels porcs alimentats amb les dietes CT (control), GRO (blat de moro groller), POLPA (10% polpa de remolatxa) i SEGÓ (10% segó de blat) durant els tres períodes experimentals (7, 21 i 42 dies).

Colon distal	Període	Dieta				EEM ¹	Valor P		
		CT	GRO	POLPA	SEGÓ		Dieta	Període	Interacció
Gruix total, μm	1 ^{er}	731	791	699	815	49,85	NS ³	NS	NS
	2 ^{on}	775	725	752	694				
	3 ^{er}	711	687	708	656				
Túnica muscular, μm	1 ^{er}	376	367	338	353	23,72	NS	NS	NS
	2 ^{on}	365	360	354	368				
	3 ^{er}	327	342	344	302				
Profunditat de cripta, μm	1 ^{er}	505	480	505	505	21,64	NS	0.001	NS
	2 ^{on}	489	489	475	490				
	3 ^{er}	448	478	462	442				
Cèl·lules caliciformes/100 enteròcits	1 ^{er}	15	19,2	16,9	18,1	1,38	<0.001	NS	NS
	2 ^{on}	19,7	21,7	22	22				
	3 ^{er}	29,1^a	28,5^a	25,7^b	24,3^b				
Mitosis/100 enteròcits	1 ^{er}	0,33	0,27	0,39	0,27	0,07	NS	NS	NS
	2 ^{on}	0,31	0,37	0,37	0,32				
	3 ^{er}	0,21	0,39	0,36	0,38				
Densitat de criptes ²	1 ^{er}	9,1	9,7	9,1	9,4	2,65	NS	<0.001	NS
	2 ^{on}	10,7	10,2	10	10,1				
	3 ^{er}	10	10,2	10	9,9				

¹ Els valors són mitjanes. L'error estàndard de la mitja (EEM) fa referència a n = 8.

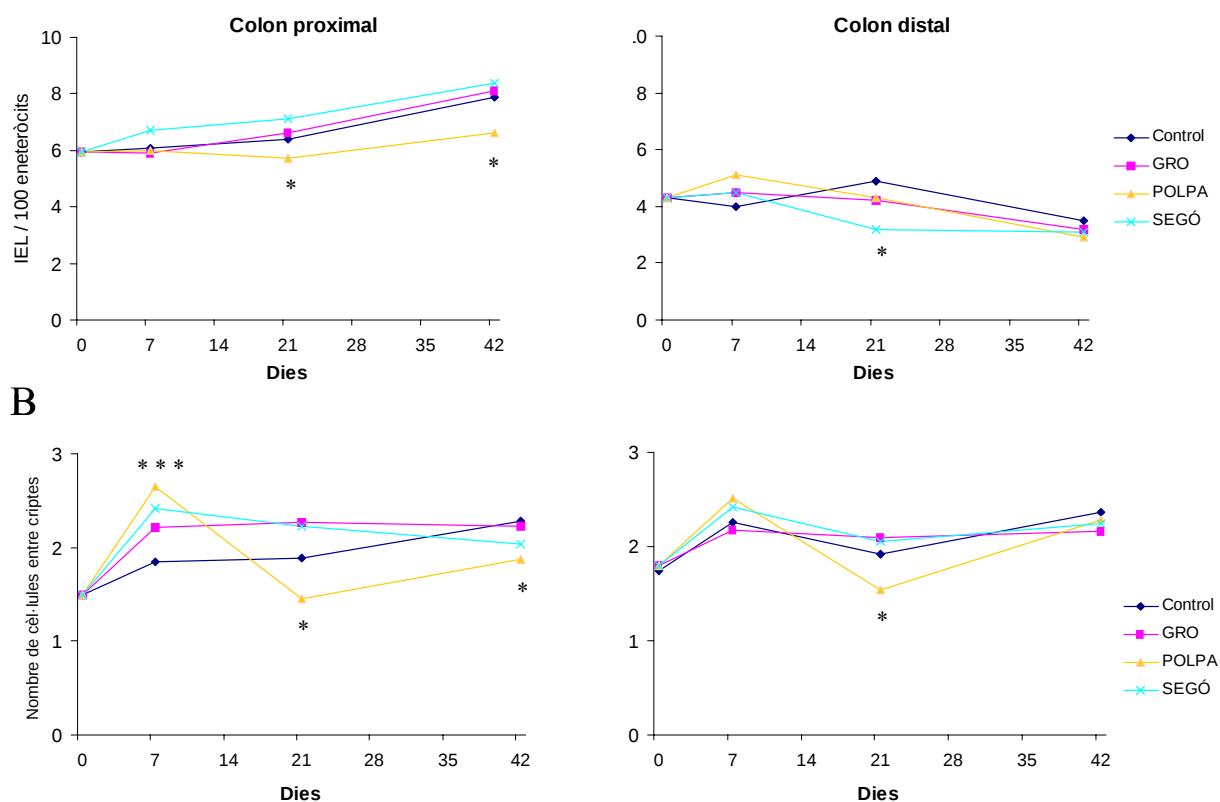
² Nombre de criptes comptabilitzades per 1 mm de distància, a la part basal de la mucosa.

³ NS: no significatiu, $P > 0.10$.

^{a,b} Dins d'una fila, les mitjanes amb lletres diferents són diferents ($P < 0.05$).

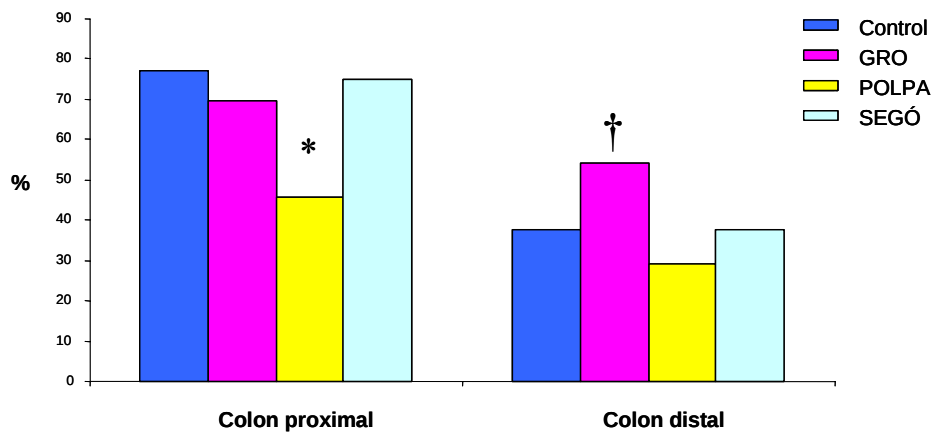
En el colon proximal, el gruix de la capa mucosa va ser menor en els porcs del grups POLPA i SEGÓ, tant per una disminució de la capa circular interna com de la longitudinal externa (Taula 5.4.1.). La profunditat de les criptes i el nombre de mitosis no van ser diferents entre tractaments, però sí es va observar una disminució al final del tercer període en el nombre de cèl·lules caliciformes en el colon distal dels porcs alimentats amb POLPA i SEGÓ ($P < 0.05$). Aquestes mateixes dietes, amb majors nivells de PNA, també van modificar la presència de limfòcits a la mucosa de l'IG (Figura 5.1.). La inclusió de polpa de remolatxa a la dieta va provocar una disminució del nombre de limfòcits a l'epiteli en el colon proximal i a la LP en colon proximal i distal ($P < 0.04$); mentre que el segó de blat va disminuir el nombre d'IEL però només al colon distal i de forma transitòria (dia 21). No obstant això, la incorporació de fibra dietètica (GRO, POLPA i SEGÓ) va incrementar la presència de cèl·lules inflamatòries a la LP del colon proximal, als 7 dies d'introduir les dietes respecte els valors de la dieta CT (Figura 5.1. B).

A **Figura 5.1.** Nombre de limfòcits intraepiteliais (A) i a la làmina pròpia (B) en el colon



D'altra banda, la proporció d'animals que tenien una presència evident de nòduls limfàtics a la mucosa era menor en el grup POLPA comparat amb altres dietes ($P = 0.038$), especialment en el colon proximal (Figura 5.2.). En canvi, la seva presència era major en el grup GRO en el colon distal ($P = 0.084$).

Figura 5.2. Presència de nòduls limfàtics a la mucosa del colon proximal i del colon distal dels porcs alimentats amb les dietes control, GRO (blat de moro groller), POLPA (8% polpa de remolatxa) i SEGÓ (10% segó de blat). Els valors són el percentatge de mostres de tots els períodes ($n = 24$) que tenien una presència evident de nòduls limfàtics a la mucosa (> 0.1 per mm). †,* La proporció del grup és significativament diferent respecte la de la resta de dietes ($P < 0.10$ i $P < 0.05$, respectivament).



5.3.4. Poblacions de cèl·lules del sistema immunitari

La majoria dels paràmetres hematològics i immunològics de sang perifèrica van variar amb el període experimental (Taules 5.5. i 5.6.). A l'inici de l'estudi, entre dia 0 i el dia 7, i en tots els grups experimentals, hi va haver un increment transitori en la concentració ($10^3/\mu L$) de leucòcits (12.6 vs. 17.8), limfòcits (6.4 vs. 9.6) i monòcits (0.3 vs. 0.71) ($P < 0.05$). Posteriorment, del dia 7 al 42, les concentracions d'eritròcits i d'hemoglobina i el valor d'hematòcrit van incrementar, mentre que les concentracions de leucòcits, neutròfils, limfòcits i monòcits van disminuir ($P < 0.05$). Pel que fa a les subpoblacions leucocitàries determinades en sang per citometria de flux, les cèl·lules CD4+, CD25+ i $\gamma\delta$ TCR+ van incrementar de forma significativa amb el temps, i les cèl·lules B (CD21+), CD8+ i SLADR+ van disminuir ($P < 0.05$).

Taula 5.5. Paràmetres hematològics dels porcs alimentats amb les dietes CT (control), GRO (blat de moro groller), POLPA (10% polpa de remolatxa) i SEGÓ (10% segó de blat) durant els tres períodes experimentals (7, 21 i 42 dies).

	Període	Dieta				EEM ¹	Valor <i>P</i>		
		CT	GRO	POLPA	SEGÓ		Dieta	Període	Interacció
Comptatge d'eritròcits, 10 ⁶ /μL	1 ^{er}	6.8	7.1	6.9	6.6	0.24	NS ²	0.008	NS
	2 ^{on}	7.4	7.1	6.9	7				
	3 ^{er}	7.3	7.3	7.5	7.4				
Concentració d'hemoglobina, g/dL	1 ^{er}	11.4	11.2	11.2	11	0.21	NS	<0.001	0.02
	2 ^{on}	12.4^a	12^{ab}	11.3^c	11.7^{bc}				
	3 ^{er}	12.8	12.9	12.8	12.4				
Valor hematòcrit, %	1 ^{er}	36.5^a	36.6^a	35.4^b	34.9^b	1.25	NS	<0.001	0.018
	2 ^{on}	41.1	39.6	38.1	38.2				
	3 ^{er}	39.3	40.5	39.8	39.4				
Comptatge de leucòcits, 10 ³ /μL	1 ^{er}	17.8	18.7	15.3	19.4	1.56	NS	0.001	NS
	2 ^{on}	14.6	13.9	14.6	14.6				
	3 ^{er}	11.8	14.4	12.7	13.1				
Neutròfils									
Comptatge absolut, 10 ³ /μL	1 ^{er}	6.2	5.8	4.4	5.3	0.57	NS	<0.001	NS
	2 ^{on}	3.7	4.3	4	3.5				
	3 ^{er}	2.8	3.4	2.7	3.3				

Neutròfils									
Comptatge relatiu, %	1 ^{er}	38	33.9	31.5	32.3	2.62	NS	<0.001	0.09
	2 ^{on}	20.6^b	33.2^a	31^a	26.2^{ab}				
	3 ^{er}	24.7	24.2	21.6	24				
Limfòcits									
Comptatge absolut, 10 ³ /μL	1 ^{er}	9	10.2	8.7	10.7	1.03	NS	0.04	NS
	2 ^{on}	9.1	7.5	8.4	9.1				
	3 ^{er}	7.3	9.1	8.4	9				
Comptatge relatiu, %	1 ^{er}	55.2	59.7	62	59.3	2.91	NS	<0.001	0.096
	2 ^{on}	70.6^a	59.5^b	62.9^b	66.3^{ab}				
	3 ^{er}	67.9	68.8	72.4	69.7				
Monòcits									
Comptatge absolut, 10 ³ /μL	1 ^{er}	0.55^b	0.63^{ab}	0.53^{ab}	0.73^a	0.10	0.07	0.006	NS
	2 ^{on}	0.33	0.41	0.34	0.48				
	3 ^{er}	0.43	0.55	0.37	0.47				
Comptatge relatiu, %	1 ^{er}	3.3^b	3.6^b	3.9^b	5.9^a	0.53	0.08	0.004	NS
	2 ^{on}	2.7	2.9	2.5	3.4				
	3 ^{er}	3.5	3.9	3.1	3.2				

¹ Els valors són mitjanes. L'error estàndard de la mitjana (EEM) fa referència a n = 8.

² NS: no significatiu, $P > 0.10$.

^{a,b,c} Dins d'una fila, les mitjanes amb lletres diferents són diferents ($P < 0.05$).

Taula 5.6. Anàlisi de les poblacions cel·lulars leucocitàries en sang per citometria de flux dels porcs alimentats amb les dietes CT (control), GRO (blat de moro groller), POLPA (10% polpa de remolatxa) i SEGÓ (10% segó de blat) durant els tres períodes experimentals (7, 21 i 42 dies).

	Període	Dieta				EEM ¹	Valor <i>P</i>		
		CT	GRO	POLPA	SEGÓ		Dieta	Període	Interacció
CD21+, %	1 ^{er}	12.5	8.1	10.6	10.5	0.68	NS ²	0.01	0.033
	2 ^{on}	2.2^b	6.9^a	10.9^a	7.7^a				
	3 ^{er}	9.1	9.1	9.2	8.8				
$\gamma\delta$ TCR+, %	1 ^{er}	7.8	8.9	11.1	8.6	1.79	NS	<0.001	NS
	2 ^{on}	9.5	13.7	10.7	9.9				
	3 ^{er}	26.3	25.5	17.0	23.9				
CD4+, %	1 ^{er}	14.6	15.6	14.5	13.5	1.93	NS	0.02	NS
	2 ^{on}	22.5	24.7	24.8	15.5				
	3 ^{er}	17.1	22.3	21.1	20.2				
CD8+, %	1 ^{er}	-	-	-	-	2.3	NS	0.03	NS
	2 ^{on}	41.5	36.4	41.7	34.2				
	3 ^{er}	23.5	26.8	25.5	24.1				
CD25, %	1 ^{er}	3.8	3.5	4.3	3.4	0.75	NS	<0.001	NS
	2 ^{on}	1.6	3.8	5.2	2.6				
	3 ^{er}	9.3	10.3	9.5	8.6				
SLADR, %	1 ^{er}	51.5	51.8	40.4	49.5	2.45	NS	0.03	0.076
	2 ^{on}	43.3^b	55.4^a	57.0^a	56.9^a				
	3 ^{er}	45.9	46.5	50.3	44.3				

¹ Els valors són mitjanes. L'error estàndard de la mitjana (EEM) fa referència a n = 8.

² NS: no significatiu, $P > 0.10$.

^{a,b,c} Dins d'una fila, les mitjanes amb lletres diferents són diferents ($P < 0.05$).

Els porcs alimentats amb majors nivells de PNA van tenir valors d'hematòcrit i concentracions d'hemoglobina inferiors que el grup control en el primer i segon període respectivament (Taula 5.5). El recompte total i el percentatge de monòcits van tendir a ser majors en el grup SEGÓ ($P < 0.08$), especialment en el primer període. Els recomptes totals de leucòcits, neutròfils, limfòcits, eosinòfils i basòfils no van variar entre tractaments. Malgrat això, els percentatges de neutròfils van tendir a incrementar i els de limfòcits a disminuir en els grups GRO i POLPA en el segon període. La citometria de flux de sang perifèrica va mostrar que tots els tres grups alimentats amb nivells superiors de fibra dietètica tenien percentatges majors de cèl·lules CD21+ i SLADR+ en el segon període (Taula 5.6).

L'estudi del GALT per citometria de flux també va mostrar diferències significatives associades al període i als grups experimentals (Taules 5.7. i 5.8.). Amb el temps, la proporció de cèl·lules T CD4+, CD8+ i $\gamma\delta$ + a la il-PP, i la de cèl·lules B (CD21+) i T CD8+ a LN van incrementar ($P < 0.01$). En els porcs alimentats amb majors nivells de fibra (GRO, POLPA i SEGÓ) es va observar una reducció en el percentatge de cèl·lules SLADR+ en el LN en els primers períodes, mentre que, en aquests mateixos grups aquestes cèl·lules van incrementar a la il-PP en el període final respecte la dieta CT ($P < 0.05$). D'altra banda, en diferents moments al llarg de l'estudi, els porcs del grup SEGÓ van tenir proporcions incrementades de cèl·lules B, CD4+ i cèl·lules CD25+ a la il-PP, i de macròfags (SWC3+) i cèl·lules B al LN, mentre que els percentatges de cèl·lules CD4+ i CD8+ al LN tendien a ser menors respecte la dieta CT ($P < 0.05$). En el període final, la proporció de cèl·lules CD4+, CD8+ i CD25+ a la il-PP era superior en els porcs alimentats amb la dieta GRO ($P < 0.05$).

Per últim, també es va analitzar la funcionalitat de les cèl·lules aïllades de sang, il-PP i LN, incubant-les primer amb diferents mitògens i determinant l'expressió induïda del receptor d'IL-2 (CD25+) o del MHC II (SLADR+) per citometria de flux. El cultiu de les cèl·lules amb mitogen inespecífic (PHA) o d'origen bacterià (LPS) o viral (ADV) va incrementar la proporció de cèl·lules mononuclears CD25+ i SLADR+ respecte els cultius no estimulats. En general, el període experimental no va tenir un efecte consistent; excepte per els cultius de sang perifèrica estimulats amb ADV on la proporció de SLADR+ va incrementar amb el temps ($P < 0.01$).

Taula 5.7. Anàlisi de les poblacions cel·lulars leucocitàries per citometria de flux en la placa de Peyer ileal i en gangli limfàtic ileocòlic dels porcs alimentats amb les dietes CT (control), GRO (blat de moro groller), POLPA (10% polpa de remolatxa) i SEGÓ (10% segó de blat) durant els tres períodes experimentals (7, 21 i 42 dies)

Placa de Peyer ileal	Període	Dieta				EEM ¹	Valor <i>P</i>		
		CT	GRO	POLPA	SEGÓ		Dieta	Període	Interacció
SWC3, %	1 ^{er}	3.1	3.8	6.4	6.7	0.71	0.038	NS ²	NS
	2 ^{on}	3.1^b	7.4^a	9.4^a	-				
	3 ^{er}	6.8	7.0	2.7	6.4				
CD21+, %	1 ^{er}	43.6^b	54.2^{ab}	52.8^{ab}	58.3^a	2.32	0.094	NS	NS
	2 ^{on}	57.1	43.6	56.0	-				
	3 ^{er}	53.4^{ab}	50.8^b	46.0^b	65.5^a				
$\gamma\delta$ TCR+, %	1 ^{er}	1.1	5.9	1.1	1.5	0.45	NS	0.007	NS
	2 ^{on}	3.9	4.4	3.7	-				
	3 ^{er}	-	9.5	4.3	5.7				
CD4+, %	1 ^{er}	3.3	2.8	1.6	1.9	1.13	0.001	0.01	NS
	2 ^{on}	6.1^b	4.3^b	3.3^b	9.6^a				
	3 ^{er}	5.1^b	11.9^a	7.5^{ab}	11.7^a				
CD8+, %	1 ^{er}	4.9	6.1	7.6	6.4	2.05	0.03	0.009	NS
	2 ^{on}	14.3	14.0	11.6	14.6				
	3 ^{er}	13^b	24.2^a	20.8^{ab}	15.3^b				
CD25, %	1 ^{er}	1.4	2.3	1.7	0.8	0.65	0.04	0.001	0.001
	2 ^{on}	4.2	8.7	7.2	-				
	3 ^{er}	3.9^b	7.1^a	4.1^{ab}	6.9^a				
SLADR, %	1 ^{er}	78.5	76.3	76.3	77.1	2.76	0.006	0.001	0.001
	2 ^{on}	69.2	66.4	70.5	-				
	3 ^{er}	70.1^b	76.7^a	74.5^{ab}	78.2^a				

¹ Els valors són mitjanes. L'error estàndard de la mitja (EEM) fa referència a n=8.

² NS: no significatiu, $P > 0.10$.

^{a,b} Dins d'una fila, les mitjanes amb lletres diferents són diferents ($P < 0.05$).

Taula 5.8. Anàlisi de les poblacions cel·lulars leucocitàries per citometria de flux en la placa de Peyer ileal i en gangli limfàtic ileocòlic dels porcs alimentats amb les dietes CT (control), GRO (blat de moro groller), POLPA (10% polpa de remolatxa) i SEGÓ (10% segó de blat) durant els tres períodes experimentals (7, 21 i 42 dies)

Gangli limfàtic ileocòlic	Període	Dieta				EEM ¹	Valor <i>P</i>		
		CT	GRO	POLPA	SEGÓ		Dieta	Període	Interacció
SWC3, %	1 ^{er}	4.6	3.1	2.2	2.8	1.04	NS ²	NS	0.09
	2 ^{on}	2.1	4.4	5.2	3.1				
	3 ^{er}	1.9^b	4^{ab}	4.5^{ab}	5.4^a				
CD21+, %	1 ^{er}	24.0	18.1	18.5	18.1	2.1	0.003	0.001	NS
	2 ^{on}	18.4	20.9	23.1	19.2				
	3 ^{er}	27.9^a	26.0^a	29.8^{ab}	34^b				
$\gamma\delta$ TCR+, %	1 ^{er}	16.6	15.8	16.4	14.7	1.65	NS	NS	NS
	2 ^{on}	17.1	17.2	20.5	19.7				
	3 ^{er}	-	-	-	-				
CD4+, %	1 ^{er}	33.0	35.9	34.3	31.5	2.1	NS	NS	0.082
	2 ^{on}	26.4^{ab}	28.5^a	27.5^{ab}	19.9^b				
	3 ^{er}	32.2	32.5	32.6	35.2				
CD8+, %	1 ^{er}	17.3	17	14.6	16	1.67	0.08	<0.001	NS
	2 ^{on}	20.8^a	21.4^{ab}	21.2^{ab}	15.2^b				
	3 ^{er}	24.5	28.9	23.8	25.3				
CD25, %	1 ^{er}	12.4	12.3	12.1	10.4	1.89	NS	0.006	NS
	2 ^{on}	8.6	9.7	8	8.5				
	3 ^{er}	10.9	12	12.1	12.2				
SLADR, %	1 ^{er}	53.2^a	42.3^b	40.9^b	49.8^{ab}	2.1	0.02	<0.001	NS
	2 ^{on}	39^a	31.7^{ab}	30.8^b	30.2^b				
	3 ^{er}	42.2	40.5	37.9	42.1				

¹ Els valors són mitjanes. L'error estàndard de la mitjana (EEM) fa referència a n=8.

² NS: no significatiu, $P > 0.10$.

^{a,b} Dins d'una fila, les mitjanes amb lletres diferents són diferents ($P < 0.05$).

En el gangli limfàtic dels porcs alimentats amb majors nivells de fibra (GRO, POLPA i SEGÓ) la resposta a LPS (cèl·lules CD25+) va incrementar de forma transitòria en el primer període, encara que en el segon període la resposta front PHA o LPS (cèl·lules SLADR+) va disminuir comparat amb el grup CT ($P < 0.05$). En sang i durant el primer període, els grups POLPA i SEGÓ van tenir menor nombre de cèl·lules CD25+ quan es van estimular els cultius amb ADV ($P < 0.05$). A més, en els porcs del grup SEGÓ la resposta al LPS (cèl·lules SLADR+) també va disminuir en el segon període ($P < 0.05$). Malauradament, a la il-PP no es van poder obtenir un nombre suficient de cultius cel·lulars viables (menys de tres per grup/mitogen/dia) per establir una comparativa entre els grups experimentals.

5.4. Discussió

La molta grollera del blat de moro i l'administració de polpa de remolatxa o de segó de blat van reduir l'ingesta voluntària de pinso, i també el pes viu dels animals del grup POLPA d'acord amb el potencial efecte limitant de la DF sobre el creixement (Kass *et al.*, 1980). Tot i que amb una magnitud variable en funció del tractament, la inclusió de fibra a la dieta també va incrementar el pes del tracte GI, essencialment per un augment del seu contingut, fet que podria implicar una reducció del rendiment en canal d'aquests animals (Rijnen *et al.*, 2000). Dietes amb alts nivells de fibra indueixen un increment del pes del tracte GI posterior i del seu contingut (Stanogias i Pearce, 1985; Jin *et al.*, 1994; Jorgensen *et al.*, 1996) i també poden tenir efectes tròfics sobre la paret intestinal, tot i que aquest fet no s'ha observat en el present estudi. La inclusió de DF en el nostre estudi implica un increment de contingut intestinal que podria provocar una distensió de l'IG, però sense efectes tròfics sobre la capa muscular.

L'increment dels leucòcits, limfòcits i monòcits sanguinis a la primera setmana, respondria a una activació del SI motivada pel canvi a un nou ambient o per la simple introducció d'una nova dieta. Malgrat això tingués lloc en tots els grups experimentals, inclòs el control, va ser relativament més intens en els grups GRO i SEGÓ. D'altra banda, en aquest mateix període, els porcs alimentats amb dietes riques en fibra (GRO, POLPA i SEGÓ) van tenir un increment de la presència de cèl·lules inflamatòries mononuclears a la làmina pròpia de l'IG, suggestiu d'una resposta inflamatòria a nivell

intestinal (Jiang *et al.*, 2000; Treanor i Sheahan, 2002; Robert, 2004). És més, en aquests mateixos animals, les cèl·lules obtingudes del LN que drena directament d'aquesta regió responien de forma més activa en ser estimulades amb un mitogen bacterià. Per tant, els animals alimentats amb majors nivells de DF probablement van sofrir cert grau de colitis en els trams anteriors de l'IG, coincidint amb el lloc d'arribada del substrat no digerit, encara que no suficientment acusada perquè fos simptomàtica en forma de diarrea (excepte un animal del grup SEGÓ). Això podria succeir per un desafiament de la barrera mucosa a causa de la pertorbació de l'ambient intestinal o per canvis en les poblacions microbianes el dia 7 respecte el dia 0 al llarg de tot l'intestí (Roca-Canudas, comunicació personal). Després d'aquesta fase inicial de resposta similar en tots els grups, s'observen respostes diferenciades en funció de la font de fibra de la dieta.

Les cèl·lules immunitàries deixen o entren a l'intestí a través del LN i poden recircular des de la sang, fins a la paret intestinal, a la LP i potencialment als espais intraepitelials (Rothkotter *et al.*, 1999b). Les alteracions a nivell colònic amb la incorporació de fibra a la dieta (GRO, POLPA i SEGÓ) també podrien provocar una redistribució de les cèl·lules que expressen MHC II involucrades en la presentació antigènica, que es caracteritzaria per una disminució de les APC en el LN durant les 3 primeres setmanes que podrien migrar a sang o altres teixits. D'altra banda, amb el temps, aquests tres grups experimentals tendeixen a reduir la resposta a mitògens en el LN i a sang perifèrica, d'acord amb les possibles propietats antiinflamàtores de les dietes riques en fibra a través d'efectes sobre la funcionalitat i el metabolisme dels leucòcits (Cavaglieri *et al.*, 2000). Per contraposició, estudis amb rates alimentades amb un 5% de fibra soluble (pectina) troben major nombre de limfòcits T CD4⁺ i IFN- γ en el limfonode mesentèric (Lim *et al.*, 1997). De forma semblant, gossos alimentats amb alts nivells de fibra tenien una alta proporció de limfòcits CD4⁺ i major resposta a mitògens al limfonode (Field *et al.*, 1999). Per tant, l'efecte de la DF sobre el SI intestinal podria variar en funció tant del tipus de DF com de l'espècie animal estudiada.

Amb el temps, la inclusió d'una font de PNA solubles a la dieta (8% de polpa de remolatxa) va disminuir la presència de limfòcits a l'epiteli i a la làmina pròpia del colon, principals llocs efectors de la resposta immunitària intestinal, i també de nòduls limfàtics a la mucosa colònica, com a emplaçaments responsables del processament

antigènic (O'Leary i Sweeney, 1986; Bailey *et al.*, 2001; McCracken i Lorenz, 2001; Liebler-Tenorio i Pabst, 2006). És remarcable que les diferències eren observables tant respecte la dieta control com a l'altra font de PNA menys solubles (segó de blat). El mecanisme pel qual la POLPA promou aquests canvis és desconegut. En primer lloc, la major quantitat de contingut en el colon i amb més proporció d'aigua podria suposar un contingut colònic menys abrasiu i amb un potencial efecte diluent de substàncies amb efecte nociu. En segon lloc, els efectes s'observen coincidint amb els períodes i amb els llocs de major fermentació d'aquest substrat, i per tant, també podria ser degut als AGV produïts i/o a l'exposició d'antígens bacterians amb propietats immunomoduladores (Cavaglieri *et al.*, 2000; McCracken i Lorenz, 2001; Schley i Field, 2002). De fet, el grup POLPA és el que presenta una concentració d'AGV més elevada, tant a colon proximal com distal.. Per tant, els nostres resultats concorden amb estudis previs realitzats *in vitro* que mostren que concentracions fisiològiques d'AGV poden promoure un ambient antiinflamatori (Cavaglieri *et al.*, 2003). Tanmateix, altres estudis en rates suggereixen que els AGV incrementen el nombre de cèl·lules T al tracte GI (Tappenden *et al.*, 1997). Ishizuka *et al.* (2004) administrant a les rates una dieta semblant, que també contenia polpa de remolatxa, obtenen un perfil d'AGV similar al dels nostres animals (Anguita, 2006), però amb efectes oposats pel que fa a la presència d'IEL. Per les seves condicions experimentals, i la seva anatomia i fisiologia digestiva diferenciades (Stevens i Hume, 1998), és possible que els resultats obtinguts amb animals de laboratori no siguin del tot extrapolables als efectes observats en animals de granja. D'altra banda, pel que fa a la modulació per part de la microbiota intestinal, Roca-Canudas *et al.* (2006), utilitzant tècniques moleculars, han observat que els animals del grup POLPA tenien major diversitat microbiana i més estable, i una adaptació més ràpida a la nova dieta. Aquest fet podria ajudar a disminuir la intensitat de resposta immunitària intestinal, retornant-la als nivells observats a l'inici de l'estudi. De forma addicional, la fermentació dels PNA solubles de la polpa de remolatxa podria tenir altres connotacions positives per la mucosa intestinal ja que redueix el pH del contingut colònic amb potencials efectes protectors sobre la mucosa i la fermentació proteica productora de substàncies tòxiques o irritants, alhora que converteix l'amoni luminal tòxic per l'epiteli en proteïnes bacterianes de nova síntesi (Lin i Visek, 1991; Piva *et al.*, 1996; Govers *et al.*, 1999; Anguita, 2006).

En contraposició, els porcs alimentats amb la dieta SEGÓ presenten una major fermentació proteica a l'IG, un contingut colònic més citotòxic i potencialment més nociu per la mucosa, i una microbiota menys diversa, més inestable i canviant (Anguita, 2006; Castillo, 2006). Per aquests o d'altres mecanismes, el segó de blat podria estar implicat en la patogènesi de les colitis no específiques en porcs d'engreix (Chase-Topping *et al.*, 2007). En el nostre estudi hem observat que el SEGÓ indueix increments en els monòcits a nivell sistèmic, suggerint una activació inicial del sistema immunitari; sobretot tenint en compte que els monòcits estan implicats en la iniciació, ampliació i regulació tant de la inflamació, com de la resposta immunitària més específica (Guilford *et al.*, 1996). En efecte, la inflamació inicial té continuació en una resposta més específica amb major proporció de limfòcits B productors d'immunoglobulines juntament amb canvis en les subpoblacions T al LN i a la il-PP. Per tant, el SEGÓ, és capaç de provocar una considerable immunomodulació del SI tant a nivell local com sistèmic. Malgrat se'n desconeixi la significació biològica, el fet que el grup SEGÓ sigui el grup amb menor resposta sistèmica a mitògens i també on s'ha observat algun animal símptomatologia clínica podria indicar que el segó de blat pot comprometre, en algun cas, cert tipus de respostes immunes. En aquest sentit, Cavaglieri *et al.* (2000, 2003) van trobar una clara reducció de la funcionalitat dels macròfags intraperitoneals en rates alimentades amb segó de blat i una major susceptibilitat a les infeccions.

La molta grollera del blat de moro incrementa el contingut de l'IG i dels productes derivats de la seva fermentació al colon proximal. Tot i que això podria tenir efectes positius sobre la mucosa intestinal (Newmark i Lupton, 1990; Govers *et al.*, 1999), aquests no s'han observat en aquest estudi. Així, l'increment de midó en el colon proximal d'aquests animals (Anguita, 2006) tampoc s'acompanya de criptes més profundes per una fermentació butírica, ni de major producció de mucines amb efecte protector sobre la mucosa. Al contrari, en el colon distal, la dieta GRO podria provocar un deteriorament de la barrera mucosa ja que incrementen els nòduls limfàtics a l'IG, relacionats amb la presentació antigènica. A més a més, aquesta dieta també provoca una activació de la resposta immunitària a la il-PP (majors proporcions de macròfags, cèl·lules activades i limfòcits T citotòxics) de forma tardana (6 setmanes), quan l'ambient digestiu ja hauria d'estar, teòricament, estabilitzat.

En resum, els resultats obtinguts indiquen que la incorporació de fibra a la dieta dels porcs d'engreix, ja sigui per la molta grollera del blat de moro o per la incorporació d'ingredients fibrosos com la polpa de remolatxa o el segó de blat, provoca una disminució del consum voluntari de pinso i en algun cas pot disminuir els rendiments productius. A part, l'addició de fibra a la dieta incrementa del pes del tracte GI, i especialment del seu contingut, alhora que modula l'estructura de l'IG i la composició i la funció de les cèl·lules del sistema immunitari dels animals. En primer lloc, a la primera setmana, totes les dietes amb majors nivell de fibra (GRO, POLPA i SEGÓ) provoquen cert grau d'inflamació al colon proximal i un increment de la funcionalitat de les cèl·lules immunitàries del LN. En segon lloc, amb el temps, tot i que disminueix la funcionalitat de les cèl·lules immunitàries al LN en aquestes tres dietes, s'observen efectes diferenciats sobre l'estructura i el sistema immunitari intestinals en funció del tipus de DF que contenen. Aquestes diferències probablement s'expliquen per les característiques físicoquímiques de la digesta i de la microbiota intestinals particulars de cada dieta. Per una banda, la dieta POLPA redueix la presència de cèl·lules immunitàries als diferents compartiments de la mucosa intestinal, facilitant l'adaptació dels porcs d'engreix a la nova dieta. En canvi, la dieta SEGÓ provoca una resposta inflamatòria més prolongada, amb increments dels macròfags al LN i a nivell sistèmic, i canvis en les subpoblacions limfocitàries al GALT.

Capítol 6

EXPERIMENT IV

**“Efecte del consum prolongat de midó resistent de patata
sobre l’estructura i teixits limfoides intestinals, i les
poblacions leucocitàries sanguínies en porcs d’engreix”**

6.1. Introducció

Els efectes beneficiosos de la fibra alimentària en algunes malalties metabòliques i digestives, tant dels animals com dels humans, han estat ben establerts. La presència d'alguns carbohidrats a la dieta, i en particular el midó resistent, han evitat la diarrea o infeccions per patògens (Williams *et al.*, 2001) i han estat beneficiosos enfront processos patològics com la malaltia inflamatòria de l'intestí gros (Jacobasch *et al.*, 1999), el càncer de colon (Govers *et al.*, 1999), la diabetis (Higgins, 2004) o malalties renals o hepàtiques diverses (Younes *et al.*, 1997).

Els components majoritaris de la fibra dietètica, en general polisacàrids no amiloides i midó resistent (MR), són fermentats per les bacteries del tracte GI a AGV i poden causar importants canvis en les propietats físicoquímiques del contingut intestinal. La modificació dels diferents substrats de la dieta permet aconseguir els nivells i les proporcions desitjades d'AGV, en particular pel que fa al butirat, per tal de poder influir en la incidència de malalties colòniques (Velazquez *et al.*, 1997). En humans i animals, la fermentació del MR a l'IG sembla que incrementa la producció de butirat (van Munster *et al.*, 1994; Noakes *et al.*, 1996; Martínez-Puig, 2006). El butirat, com a substrat predilecte dels colonòcits, modula varies funcions com ara la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi d'aquestes cèl·lules. En conseqüència, el butirat promou un fenotip normal en els colonòcits i s'ha suggerit que impedeix el desenvolupament de poblacions cel·lulars anormals en el colon (Roediger i Millard, 1995; Wachtershauser i Stein, 2000; Topping i Clifton, 2001).

Alguns estudis han indicat que la quantitat i naturalesa de la fibra de la dieta també pot afectar la composició, el metabolisme i les funcions de les cèl·lules del sistema immunitari (Lim *et al.*, 1997; Cavaglieri *et al.*, 2000), tant en els teixits limfoides de l'intestí com en la circulació perifèrica (Schley i Field, 2002). Entre d'altres, els efectes de la fibra podrien ser deguts als canvis en la producció d'AGV. En aquest sentit, s'ha observat que el butirat regula a la baixa la funció estimuladora de les cèl·lules presentadores d'antigen derivades de sang (Bohmig *et al.*, 1997), incrementa la producció de prostagladina E₂ per part de les cèl·lules de Kupffer (Perez *et al.*, 1998), i inhibeix la funcionalitat dels limfòcits B (Eftimiadi *et al.*, 1995) així com la proliferació *in vitro* dels limfòcits T (Cavaglieri *et al.*, 2003). Específicament, el butirat inhibeix *in*

vitro les respostes Th1, la qual cosa explicaria l'efecte terapèutic que té sobre la malaltia inflamàtoria de l'IG que es caracteritza per una inflamació crònica de la mucosa intestinal (Cavaglieri *et al.*, 2003). No obstant, falta esbrinar si majors nivells de butirats a l'IG poden modular *in vivo* les cèl·lules leucocitàries de la mucosa i potencialment de sang perifèrica.

Aquest estudi té com a objectiu estudiar els efectes a llarg termini de l'administració prolongada i copiosa de midó resistent, ofert en forma de midó cru de patata, sobre les propietats fisicoquímiques del contingut del colon i la seva fermentació, així com sobre la morfologia intestinal, incloent-hi la infiltració limfocitària, l'activitat proliferativa i l'apoptosi de les cèl·lules epitelials en porcs d'engreix. Els paràmetres hematològics i immunològics també s'han avaluat al llarg de l'experiment. Aquest estudi completa els treballs sobre l'avaluació del midó resistent de la dieta efectuada per Martínez-Puig (2006).

6.2. Materials i mètodes

L'experiment va rebre l'aprovació prèvia de la Comissió d'Ètica en Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona. L'allotjament, maneig, tractaments i eutanàsia es van fer d'acord amb la normativa europea (Directiva 86/609/CEE).

6.2.1. Animals, allotjament i dietes

Setze porcs d'engreix Landrace x Large White de 9 setmanes d'edat (20.69 ± 2.1 Kg) es van allotjar individualment i es van distribuir aleatòriament en dos grups als quals se'ls va administrar dues dietes experimentals diferenciades. Les dietes (Taula 6.1.) es van formular d'acord amb els requeriments nutricionals del *National Research Council* (1998), assumint com a contingut d'energia del midó 16720 kJ/kg.

Taula 6.1. Composició i contingut de nutrients analitzat de les dietes experimentals administrades als porcs entre els 21 i 61 Kg (dieta d'engreix) i entre els 61 i 93 kg (dieta finalitzadora) de pes viu.

	Dieta d'engreix		Dieta finalitzadora	
	BM ¹	MCP ²	BM ¹	MCP ²
Ingredients (g/kg matèria fresca)				
Blat de moro	250	-	350	-
Midó cru de patata	-	250	-	350
Ordi	451	451	389	389
Tortó de soja	199	199	215	215
Gra de soja extrusionat	66	66	14	14
Fosfat bicàlcic	15	15	10	10
Carbonat càlcic	6.7	6.7	9.8	9.8
Sal	5	5	5	5
L-Lisina	2	2	1.8	1.8
DL-Metionina	1.2	1.2	1.2	1.2
L-Treonina	0.9	0.9	1	1
Premescla de vitamines i minerals ³	2	2	2	2
Composició química analitzada (g/kg matèria seca)				
Proteïna bruta	167.8	165.1	148.9	144.1
Midó	447.0	453.8	572.4	589.7
Fibra neutra detergent	222.3	219.0	194.0	191.2
Cendres	78.2	70.4	62.1	63.8

¹ Dieta control amb blat de moro (BM).

² Dieta amb alts nivells de midó resistent en forma de midó cru de patata (MCP).

³ Aport per kg de pinso: 2.100 mg retinol, 0.045 mg vitamina D₃, 10 mg vitamina E, 1 mg menadione, 1 mg *vitamina B₁*, 4 mg *vitamina B₂*, 2 mg *vitamina B₆*, 0.02 mg *vitamina B₁₂*, 0.01 mg biotina, 18 mg niacin, 10 mg pantotenat càlcic, 175 mg colina, 12.3 g carbonat càlcic, 9 g fosfat càlcic, 2 g clorur de sodi, 80 mg Fe, 110 mg Zn, 90 mg Cu, 50 mg Mn, 0.1 mg Co, 1 mg I, i 0.2 mg Se. A ambdues dietes, es van addicionar 150 mg de Etoxiquin® com a antioxidant i 500 mg de Luctamold® com a fungicida per kg de pinso. No es van afegir antimicrobians en el pinso.

La primera dieta (dieta d'engreix) contenia 250 g/kg de blat de moro (dieta control, **BM**) o 250 g/kg de midó cru de patata (dieta **MCP**), i aportava 13972 kJ energia metabolitzable/kg, 165.4 g proteïna bruta/kg i 10.8 g lisina/kg. Quan els animals van aconseguir un pes mig de 61.2 ± 4.5 kg, les dietes es van adaptar als requeriments nutricionals d'aquests (dieta finalitzadora: 13972 kJ energia metabolitzable/kg, 146.7 g proteïna bruta/kg i 9.5 g lisina/kg) i la quantitat de midó

purificat va incrementar als 350 g de BM o MCP/Kg de pinso. Tal i com es va determinar per anàlisis enzimàtic (Champ, 1992), els midons purificats (BM: 260 g/kg amilosa, 740 g/kg amilopectina; i MCP: 200 g/kg amilosa, 800 g/kg amilopectina; Cerestar Iberica, Barcelona) contenen 187 g/kg i 637 g/kg de midó resistent en el BM i el MCP, respectivament. Les dietes es van oferir *ad libitum* durant tot el període experimental, que va consistir en 8 setmanes (dia 0 al 55) consumint la dieta d'engreix, i 6 setmanes (dia 55 al 69) consumint la dieta finalitzadora. El disseny experimental va tenir en compte que calen varies setmanes perquè la microbiota intestinal s'adapti a una càrrega de substrat fermentable (Govers *et al.*, 1999; Martínez-Puig *et al.*, 2003).

6.2.2. Procediments experimentals

El pes viu individual es va registrar els dies 0, 55 i 97. Per a l'estudi hematològic i de les poblacions leucocitàries, es van extreure mostres de sang de la vena cava cranial en tubs que contenen EDTA o heparina de liti, respectivament, els dies 0, 7, 55, 62 i 97. Les mostres dels dies 7 i 62 es van obtenir per avaluar l'adaptació a les dietes a curt termini.

El dia 97, els porcs (90 ± 3.6 kg) es van eutanasiar amb una sobredosi intravenosa de pentobarbital sòdic (200mg/kg BW; Dolethal, Vetoquinol S.A., Espanya). Els animals van ser dessagnats i, immediatament, es va obrir l'abdomen de l'estèrnium al pubis i es va extreure el tracte GI, es va mesurar, pesar ple i buit i mostrejar. Es va mesurar el pH al colon proximal per inserció d'un elèctrode unipolar a través d'una petita incisió a la paret intestinal (pHmeter CRISON 507, elèctrode Crison 52-32, Net Interlab S.A.L., Madrid, Spain). El contingut del colon proximal es va recollir i congelar per a la determinació del contingut de midó, fibra neutra detergent i minerals (Ca i Mg). Aproximadament, 1 g de contingut es va acidificar amb 1 ml de solució que contenia 50 g/L H_3PO_4 , 10 g/L de clorur mercurí i 50 mmol/L de 3-metil valerat com a estàndard intern, i es va congelar a $-20^{\circ}C$ fins l'anàlisi de la concentració dels AGV. Per a l'estudi histològic, immediatament després del sacrifici, es va obtenir una secció de jejú proximal, ili i colon proximal de cada animal, que es van obrir longitudinalment i fixar per immersió amb formol tamponat al 10% (volum/volum).

6.2.3. Procediments analítics

L'anàlisi química de les dietes i del contingut del colon proximal es va realitzar d'acord amb els procediments estàndards de l'*Association of Official Analytical Chemists* (1995) per a la matèria seca, les cendres, la proteïna bruta i el greix. La fibra neutra detergent es va determinar amb els procediments de Goering i Van Soest (1970) i el contingut total de midó seguint el mètode de Theander (1990). El midó es va determinar mitjançant un assaig colorimètric després d'una hidròlisi enzimàtica amb la α -amilasa termoestable (Sigma ref. A-4551) durant 1 hora a 100°C, i amb l'amiloglucosidasa (Sigma ref. A-3514) durant 4 hores a 60°C. El Ca i el Mg es van extreure del contingut intestinal amb HNO₃ i es van analitzar amb espectrofotometria d'emissió atòmica (ICP-OES, Perkin-Elmer, Optima 4300DV). Els AGV es van determinar per cromatografia de gasos, després de sotmetre les mostres a un tractament àcid-base seguit per una extracció en èter i una derivatització (Jouany, 1982).

6.2.4. Anàlisi morfològica

L'estudi morfològic es va portar a terme de forma similar al descrit prèviament a l'apartat 3.2.3. d'aquesta tesi. Breument, les mostres de teixit per a l'estudi histològic es van deshidratar i incloure en parafina, tallar a 4 μ m i tenyir amb hematoxilina-eosina. En cada secció intestinal, es va determinar l'alçada i amplada de les vellositats, la profunditat de les criptes, el nombre d'IEL i de cèl·lules caliciformes a les vellositats i a les criptes, el nombre de mitosis a les criptes, la densitat cel·lular de la LP, el gruix de la capa muscular i de la paret intestinal. Al colon, també es va determinar la densitat de criptes (Brunsgaard, 1997) i la presència de nòduls limfàtics solitaris o agregats (Drut i Drut, 1992). Les mesures es van fer en 10 vellositat i/o criptes ben orientades, per a cada secció intestinal, utilitzant un microscopi òptic (BHS, Olympus, Barcelona) amb un ocular amb micròmetre lineal (Olympus, ref. 209-35040, Microplanet, Barcelona) o un ocular amb retícula (Olympus, ref. 209-35046, Microplanet, Barcelona) i es va fer la mitjana de les 10 mesures. Totes les determinacions es van portar a terme de forma cega i per la mateixa persona.

En el colon, es va realitzar una immunohistoquímica per a CD3 per tal de determinar la presència de cèl·lules T a l'epiteli i a làmina pròpia (Chianini *et al.*, 2001). L'activitat

proliferativa dels colonòcits es va determinar immunohistoquímicament utilitzant un anticòs contra l'antígen nuclear de proliferació cel·lular (PCNA, *proliferate cell nuclear antigen*) (Ordeix *et al.*, 2001). A les seccions d'ili i de colon també es va portar a terme una immunohistoquímica per a la caspasa-3 activada (Casp3) per tal d'identificar les cèl·lules en apoptosi (Resendes *et al.*, 2004). El nombre de cèl·lules apoptòtiques es va determinar tant a l'epiteli com a la LP de l'ili i del colon proximal, a la placa de Peyer ileal i als nòduls limfàtics de la mucosa del colon. La distribució de les cèl·lules marcades (CD3+, PCNA+ o Casp3+) en els compartiments basal, mig i apical de les criptes, que equivalen a un terç de la longitud total de la vellositat, també es va determinar (Luciano *et al.*, 1996; Hass *et al.*, 1997; Claus *et al.*, 2003; Mentschel i Claus, 2003).

Les seccions del colon proximal també es van processar amb tincions histoquímiques d'àcid periòdic de Schiff o blau alcià a pH 2.5 o a pH 0.5, d'acord amb els mètodes histològics de rutina, per tal de tenyir les mucines neutres, àcides (sialomucines) o àcides-sulfatades (sulfomucines), respectivament (Fontaine *et al.*, 1996). El nombre de cèl·lules caliciformes amb grànuls neutres, àcids o àcids-sulfatats es van comptabilitzar per cripta.

6.2.5. Anàlisi de les poblacions leucocitàries de sang perifèrica

Es va realitzar un hemograma complet, un comptatge diferencial dels leucòcits i una fórmula leucocítica per a cada mostra sanguínia mitjançant un comptador semiautomàtic de cèl·lules sanguínies d'impedància elèctrica (Sysmex F-800; Toa Medial Electronic Europa). Per a l'anàlisi amb citometria de flux, les cèl·lules mononuclears es van aïllar de la sang mitjançant gradients de densitat amb Ficoll-histopaque (Sigma), es van tenyir amb un conjunt d'anticossos monoclonals contra porcí i es van analitzar mitjançant citometria de flux (EPICS XL-MCL; Beckman-Coulter) tal i com s'ha descrit anteriorment en l'apartat 4.2.4. d'aquesta tesi. Concretament, les poblacions cel·lulars leucocitàries es van determinar utilitzant els següents anticossos: anti-CD45, anti-CD21, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti- $\gamma\delta$ TCR. Com a controls negatius es van emprar anticossos monoclonals irrelevants diferents per a cada isotip.

6.2.6. Anàlisi estadística

Les dades obtingues foren analitzades mitjançant una anàlisi de la variància, utilitzant la dieta com a factor classificador, amb el procediment GLM del programa estadístic SAS (SAS Institut, Inc. 8.1, Cary, NC). De forma addicional, es va utilitzar el procediment MIXED del SAS per les mesures repetides sanguínies. En cas d'existir un efecte significatiu, les mitjanes es van comparar mitjançant un test de comparació múltiple de mitjanes (test de Tukey), del mateix programa estadístic. Per a totes les anàlisis es va determinar la significació estadística amb valors de $P < 0.05$, i les tendències amb $P < 0.10$. Els resultats es presenten com a mitjanes i error estàndard de la mitjana (EEM).

6.3. Resultats

El consum de MR no va afectar el rendiment productiu (0.759 vs. 0.749 kg/dia de guany mig diari del dia 0 al 97 per BM i MCP, respectivament; EEM 1.3; $P > 0.05$). Durant l'estudi, no es van observar signes clínics en cap animal, ni lesions a la necròpsia en cap d'ells, excepte de l'ocurrència de dos incidents: un porc alimentat amb la dieta BM va patir un prolapse rectal i es va eutanasiar i un porc de la dieta MCP va disminuir dràsticament el consum de pinso durant els dies previs al sacrifici. Cap dels animals va seroconvertir enfront els agents infecciosos més importants en el porc: circovirus porcí tipus 2, parvovirus porcí, virus de la síndrome reproductiva i respiratòria porcina, virus de la influença porcina, virus de la malaltia d'Aujeszky, *Mycoplasma hyopneumoniae* i *Lawsonia intracellularis*.

6.3.1. Característiques del tracte gastrointestinal i del seu contingut

El tracte GI dels porcs de la dieta MCP va ser més pesat que els de la dieta de BM (8.37 vs. 10.20 kg; EEM 0.56; $P < 0.05$). Les diferències es van observar principalment al colon que pesava més en els porcs alimentats amb MCP que en els del BM, tant ple (2.65 vs. 4.57 kg; EEM 0.24; $P < 0.001$) com buit (1.13 vs. 1.52 kg; EEM 0.14; $P < 0.05$).

La fermentació a l'IG es va avaluar amb la composició del contingut, el pH i la determinació dels AGV en el colon proximal (Taula 6.2.). El contingut colònic dels porcs del MCP va ser dues vegades més pesat que en el dels porcs del BM (1.52 vs. 3.04 kg; EEM 0.19; $P < 0.0001$). La concentració de midó que va assolir el colon proximal va ser major en els porcs del MCP, però no es van observar diferències en la fibra neutra detergent. La concentració de Mg es va reduir en els porcs del MCP ($P < 0.01$), mentre que no es van observar diferències en la concentració de Ca. El pH del colon proximal va ser més baix en els porcs alimentats amb MCP ($P < 0.01$), amb 3.3 vegades més de concentració de H^+ (1.12 vs. 3.7 μM). La concentració total d'AGV al colon no va diferir entre les dietes experimentals. No obstant això, la proporció d'acetat (mol/mol) del contingut del colon va ser major en els porcs alimentats amb BM respecte els del MCP, mentre que l'efecte invers es va observar per la proporció de butirat ($P < 0.05$). En conseqüència, la concentració de butirat en el colon proximal va ser tres vegades superior en els porcs alimentats amb MCP respecte dels de la dieta BM (16.30 vs. 5.86; EEM 2.55; $P = 0.02$).

Taula 6.2. Composició i característiques físicoquímiques del contingut del colon proximal dels porcs alimentats amb la dieta de blat de moro (BM) o amb la dieta que contenia alts nivells de midó resistent (MCP) durant 97 dies.

	BM	MCP	EEM ¹	<i>P</i> valor
Contingut (g/100g material seca)				
Midó	8.54	16.57	2.199	< 0.05
Fibra neutra detergent	36.99	36.96	2.041	NS ²
Calci	1.23	0.95	0.132	NS
Magnesi	0.52	0.34	0.038	< 0.01
pH	5.95	5.43	0.078	< 0.01
Àcids grassos volàtils				
Total ($\mu mol/g$ matèria seca)	88.57	99.82	26.068	NS
Acetat (mol/mol)	0.62	0.55	0.010	< 0.05
Propionat (mol/mol)	0.23	0.19	0.010	NS
Butirat (mol/mol)	0.11	0.20	0.011	< 0.05
Ramificats (mol/mol)	0.02	0.01	0.003	NS

¹ Els valors són mitjanes ($n = 7$). L'error estàndard de la mitjana (EEM) fa referència a $n = 7$.

² NS: no significatiu, $P > 0.05$.

6.3.2. Morfometria intestinal i immunohistoquímica

A l'intestí prim, els porcs alimentats amb MCP van tendir a tenir més cèl·lules caliciformes al jejú proximal (21.9 vs. 26.1 cèl·lules/100 enteròcits; EEM 1.6; $P = 0.09$) i vellositats més curtes (415.8 vs. 377.8 μm ; EEM 10.9; $P = 0.030$) i major densitat cel·lular a la LP (7.8 vs. 8.9 cèl·lules/1000 μm^2 ; EEM 0.3; $P = 0.014$) a l'ili.

Les característiques morfològiques del colon proximal es mostren a la taula 6.3. El gruix de la capa muscular va ser major en els porcs de la dieta MCP, a causa de l'increment d'ambdues capes, la muscular interna i la muscular externa ($P < 0.05$). La dieta BM es va associar amb criptes més profundes ($P < 0.05$). En canvi, el MCP va incrementar el nombre de cèl·lules amb grànuls de sulfomucines (Blau alcian+ a pH 0.5). D'altra banda, encara que el nombre d'IEL no va variar entre les dietes, el nombre d'IEL CD3+ (limfòcits T) es va reduir a les criptes dels animals alimentats amb MCP, especialment en el compartiment apical ($P < 0.05$). A la làmina pròpia del colon, no es van observar diferències en la densitat cel·lular ni en el nombre de cèl·lules T. No obstant, es va observar una reducció del nombre i diàmetre dels nòduls limfàtics de la mucosa en els porcs de la dieta MCP ($P < 0.10$). El nombre de cèl·lules PCNA+ (amb tinció intensa corresponent a la fase S de divisió cel·lular) va ser un 10% major en els porcs de la dieta BM, especialment al compartiment basal (25% d'increment).

Taula 6.3. Morfologia intestinal i immunohistoquímica del colon proximal dels porcs alimentats amb la dieta de blat de moro (BM) o amb la dieta que contenia alts nivells de midó resistent (MCP) durant 97 dies.

	BM	MCP	EEM ¹	P valor
Morfologia				
Gruix de la paret, µm	1339	1423	134	NS ²
Gruix de la capa muscular, µm	428	529	15.95	0.035
Muscular interna	296	407	10.07	0.014
Muscular externa	132	187	9.19	0.04
Profunditat de cripta, µm	429	416	4.91	0.045
Cèl·lules caliciformes ³				
PAS+	32.0	31.4	0.606	NS
AB2.5+	31.9	30.8	0.646	NS
AB0.5+	28.9	33.8	0.543	0.033
Limfòcits intraepiteliais/100 enteròcits	5.1	4.2	0.181	NS
Densitat cel·lular a la LP ⁴	7.74	7.78	0.123	NS
Densitat limfocitària a LP ⁴	2.82	2.83	0.064	NS
Nòduls limfàtics				
Nombre, per mm	0.094	0.037	0.015	0.04
Diàmetre, µm	1556	886	190.2	0.096
Immunohistoquímica del PCNA				
Cripta ⁵				
Compartiment apical	9.6	9.5	0.313	NS
Compartiment mig	12.8	12.7	0.382	NS
Compartiment basal	12.5	10.0	0.243	0.009
Total	35.7	32.5	0.833	0.09
Immunohistoquímica del CD3				
Cripta ⁵				
Compartiment apical	4.1	3.5	0.148	0.044
Compartiment mig	1.2	1.4	0.065	NS
Compartiment basal	0.9	0.7	0.127	NS
Total	6.1	5.6	0.233	0.027
Làmina pròpia ⁶	1.57	1.52	0.057	NS

¹ Els valors són mitjanes (n = 7). L'error estàndard de la mitjana (EEM) fa referència a n = 7.

² NS: no significatiu, P > 0.10.

³ Nombre de cèl·lules caliciformes tenyides amb àcid periòdic de Schiff (PAS+), blau alcià a pH 2.5 (AB2.5+) i blau alcià a pH 0.5 (AB0.5+), per 100 enteròcits.

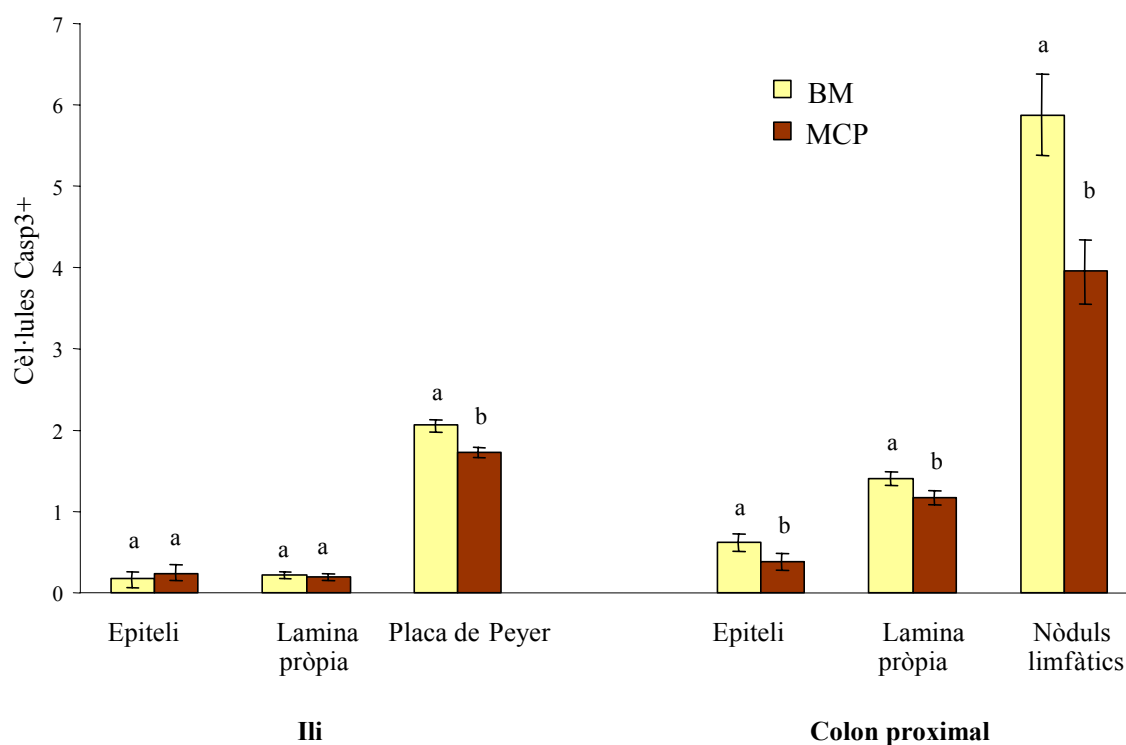
⁴ Nombre total de cèl·lules o de cèl·lules similars a limfòcits per 1000 µm².

⁵ Nombre de cèl·lules PCNA+ o CD3+ per compartiment o en el global de la cripta.

⁶ Nombre de cèl·lules CD3+ a la làmina pròpia (1000 µm²).

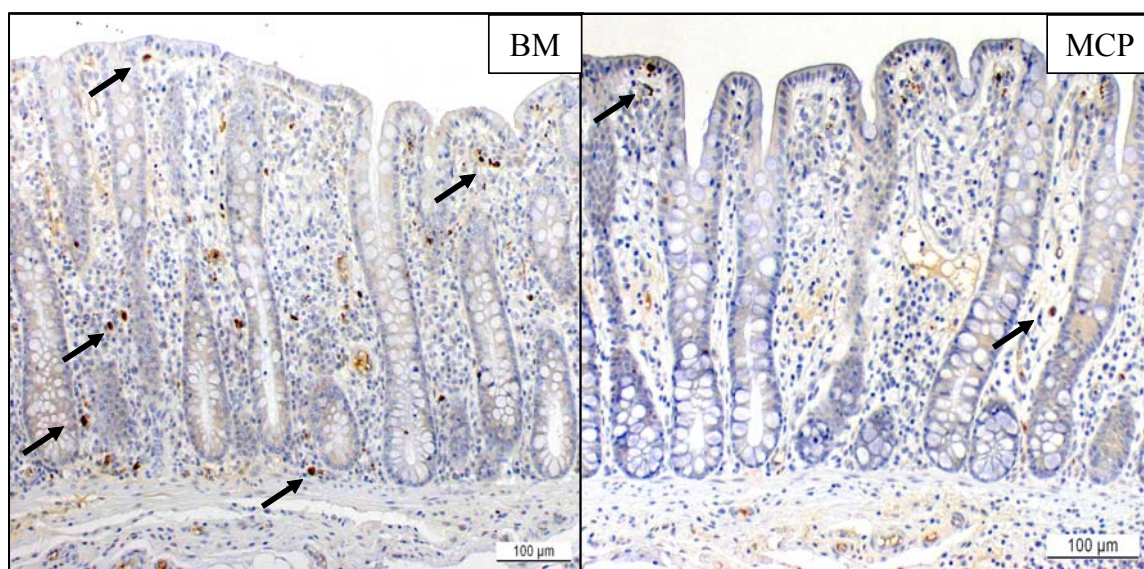
L'activitat apoptòtica es mostra a la Figura 6.1. A l'ili, el nivell d'apoptosi va ser similar a l'epiteli i a la làmina pròpia. A l'epiteli de l'ili, l'apoptosi es localitzava majoritàriament a la part mitja i apical de les vellositats (69 % i 23 % del total de cèl·lules apoptòtiques, respectivament). Tanmateix, es va observar una reducció de l'activitat apoptòtica en les zones fol·liculars de la placa de Peyer ileal en els porcs alimentats amb MCP ($P = 0.004$).

Figura 6.1. Presència de cèl·lules apoptòtiques (Casp3+) a l'ili i al colon proximal dels porcs alimentats amb dietes que contenien blat de moro (BM) o midó cru de patata (MCP). L'apoptosi de l'epiteli es va expressar com el nombre de cèl·lules Casp3+ per vellositat ileal o cripta colònica, i a la làmina pròpia, placa de Peyer ileal o nòduls limfàtics com cèl·lules Casp3+ per 10000 μm^2 . Els valors són mitjanes $\pm$ EEM ($n = 7$). Les mitjanes amb diferents lletres són diferents ($P < 0.05$).



Al colon, els porcs alimentats amb MCP van tenir un 38% menys d'apoptosis a l'epiteli que els del grup BM ($P < 0.05$). La reducció es va localitzar, majoritàriament, en els compartiments mig i apical amb disminucions del 31% i 78%, respectivament. En ambdós grups, el compartiment apical va ser el principal compartiment apoptòtic contenint el 69% i el 65% de totes les cèl·lules apoptòtiques de la cripta dels grups BM i MCP, respectivament. A la làmina pròpia, es va observar una disminució ($P = 0.030$) del nombre de cèl·lules apoptòtiques en els porcs alimentats amb MCP (Figura 6.2.). En aquest compartiment, el percentatge de cèl·lules Casp3+ variava del 2.5 al 12.4 % i era menor en els porcs del MCP ($P < 0.05$). A més, les cèl·lules que pertanyien als nòduls limfàtics del colon també van tenir menor activitat apoptòtica ($P = 0.052$).

Figura 6.2. Immunohistoquímica per caspasa-3 activada. Contrast hematoxilina de Mayer, $\times 400$. L'apoptosi (fletxes) de l'epiteli, majoritàriament observada al compartiment apical, i de la làmina pròpia era menor en els animals alimentats amb midó cru de patata (MCP) en comparació amb els de la dieta del blat de moro (BM).



6.3.3. Poblacions leucocitàries

Els resultats hematològics estan resumits a la taula 6.4. L'efecte de l'edat es va observar en pràcticament tots els paràmetres sanguinis estudiats. Amb el temps, la concentració d'eritròcits i d'hemoglobina, el valor hematòcrit, i el recompte de leucòcits, monòcits, neutròfils i eosinòfils va incrementar, mentre que el nombre de plaquetes va disminuir ($P < 0.05$). Els porcs alimentats amb MCP tendien a tenir major concentració d'hemoglobina que els del grup BM ($P = 0.06$), especialment a llarg plaç. El recompte total de leucòcits, limfòcits i neutròfils estava reduït en els porcs del grup MCP ($P < 0.05$). Malgrat que el recompte absolut de monòcits no va variar entre tractaments, el seu percentatge va ser major en el grup MCP ($P = 0.012$). No es van observar diferències estadístiques en els recomptes i percentatges d'eosinòfils i basòfils.

La citometria de flux també va demostrar diferències significatives associades amb l'edat dels animals i el tractament experimental (Taula 6.5.). Els percentatges de cèl·lules T CD4+ en sang va disminuir en els porcs alimentats amb MCP comparat amb els del BM ($P = 0.03$), degut a la disminució de cèl·lules CD4+CD8- (cooperadores) i CD4+CD8+ (de memòria) als dies 55, 62 i/o 97 ($P < 0.05$). En canvi, els porcs alimentats amb BM tendien a tenir majors percentatges de cèl·lules T citotòxiques (CD8^{high}+) al dia 62 (7 dies després d'introduir la segona dieta; $P = 0.051$), mentre que no es van observar diferències en els altres dies. Els percentatges de limfòcits B i T $\gamma\delta$ no van diferir entre tractaments. No es disposa de resultats per a la població CD3+ en sang.

Taula 6.4. Paràmetres hematològics (hemograma complet, comptatge diferencial dels leucòcits i fórmula leucocítica) dels porcs alimentats amb la dieta de blat de moro (BM) o amb la dieta que contenia alts nivells de midó resistent (MCP) durant 97 dies.

	dia 0	dia 7		dia 55		dia 62		dia 97		EEM ¹
		BM	MCP	BM	MCP	BM	MCP	BM	MCP	
Comptatge d'eritròcits, 10 ⁶ /μL	6.1	6.6	6.7	7.3	7.2	7.0	6.9	8.2	8.0	0.2
Concentració d'hemoglobina, g/dL	11.2	12.0	12.5	13.0	13.5	12.5^a	13.0^b	12.6^a	13.7^b	0.2
Valor hematòcrit, %	36.3	37.5	38.0	39.8	40.2	39.7	39.7	40.0	42.6	1.0
MCV ² , fL	59.1	56.6	56.91	54.71	55.9	56.7	57.0	48.7	53.6	1.0
MCH ³ , pg	30.9	31.9	32.9	32.5	33.5	31.6^a	32.7^b	31.2	31.0	3.9
Comptatge plaquetes, 10 ³ /μL	613	579	542	436	375	402	373	153	127	92
Comptatge de leucòcits, 10 ³ /μL	16.0	16.6	14.3	17.6	15.2	19.6^a	14.7^b	20.2^a	17.0^b	1.0
Limfòcits										
Comptatge absolut, 10 ³ /μL	8.8	9.7	8.5	10.4^a	8.0^b	11.4^a	9.0^b	10.5	8.8	0.7
Comptatge relatiu, %	56.3	59.2	59.9	58.9	53.0	57.9	60.6	52.6	52.0	2.8
Monòcits										
Comptatge absolut, 10 ³ /μL	1.0	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.7	1.0	1.0	0.1
Comptatge relatiu, %	6.3	3.9	4.7	3.5^a	4.5^b	3.7^a	4.6^b	5.2	6.2	0.5
Neutròfils										
Comptatge absolut, 10 ³ /μL	8.8	9.7	8.5	10.4	8.0	11.4^a	9.0^b	10.5^a	8.8^b	0.7
Comptatge relatiu, %	35.9	33.3	32.0	33.6	38.0	34.6	30.4	37.8	35.6	2.8

¹ Els valors són mitjanes (n = 7). L'error estàndard de la mitjana (EEM) fa referència a n = 7.

² MCV, Volum corpuscular mig.

³ MCH, hemoglobina corpuscular mitja.

^{a,b} Dins de cada dia de mostreig, les mitjanes amb lletres diferents són diferents ($P < 0.05$).

Taula 6.5. Poblacions leucocitàries analitzades per citometria de flux (en percentatge) dels porcs alimentats amb la dieta de blat de moro (BM) o amb la dieta que contenia alts nivells de midó resistent (MCP) durant 97 dies.

	dia 0	dia 7		dia 55		dia 62		dia 97		
		BM	MCP	BM	MCP	BM	MCP	BM	MCP	EEM ¹
CD21 ⁺	15.0	16.0	16.7	14.2	17.4	17.6	19.8	16.5	18.2	1.8
$\gamma\delta$ TCR+	13.3	18.5	17.1	20.1	18.9	20.8	20.3	14.6	11.3	1.6
CD4+	11.8	12.9	11.9	17.5^a	12.0^b	17.2	15.0	16.0^a	12.1^b	1.6
CD8+	38.5	43.1	42.6	35.0	29.8	32.5	25.9	35.8	38.0	3.3
CD8 ^{low}	17.0	26.6	25.7	19.4	15.6	14.0	13.4	13.6	16.0	2.1
CD8 ^{high} +	21.5	16.6	16.8	15.6	14.2	17.7^A	12.5^B	22.2	22.0	1.9
CD4+CD8-	3.1	3.5	2.6	5.7^a	4.1^a	6.7	8.2	9.6^a	6.0^b	0.9
CD4+CD8+	12.6	9.6	9.0	10.0^a	7.1^b	9.8^a	6.7^b	10.2	10.0	1.3
CD4-CD8+	23.9	29.8	30.3	26.5	21.5	26.2	23.2	26.5	31.9	2.9
CD4+:CD8+ ratio	0.3	0.3	0.3	0.5	0.4	0.5	0.6	0.4 ^a	0.3 ^b	0.05

¹ Els valors són mitjanes (n = 7). L'error estàndard de la mitjana (EEM) fa referència a n = 7.

^{a,b i A,B} Dins de cada dia de mostreig, les mitjanes amb lletres diferents són diferents ($P < 0.05$ i $P < 0.10$, respectivament).

6.4. Discussió

El midó representa el major component i font d'energia de les dietes porcines (>50% de l'energia diària ingerida) i és un component substancial de les dietes d'humans (25-50% en cultures agràries i dietes occidentalitzades, respectivament) (Baghurst *et al.*, 1996; Björck, 1996). En humans i en animals, la major part del midó ingerit es digereix a l'intestí prim, però una fracció del midó i dels productes de la seva degradació resisteixen la digestió de l'intestí prim (midó resistent, MR) i entren a l'IG on poden ser fermentats (Asp *et al.*, 1992). En aquest estudi hem escollit el MCP per tal de generar un suplement extra de MR a l'IG dels porcs d'engreix (Martínez-Puig *et al.*, 2003). Els resultats presentats en aquest treball mostren que el MCP de la dieta modifica la morfologia del colon i redueix les cèl·lules T sanguínies i l'apoptosi en els teixits limfoides intestinals i en la mucosa colònica, probablement per canvis en l'ambient intestinal i especialment per l'increment de la concentració de butirats en el colon.

En general, un dels canvis més remarcables s'ha observat en el pes del tracte GI, que ha incrementat després del consum prolongat de grans quantitats de midó resistent. El MCP de la dieta també va incrementar el pes de la paret de l'IG a causa de la hipertròfia de la capa muscular. Aquest efecte tròfic adaptatiu podria ser degut a un increment net del contingut de l'IG o a les seves característiques físicoquímiques com per exemple la major presència de butirats (Goodlad *et al.*, 1989; Roediger i Millard, 1995; Topping i Clifton, 2001; Claus *et al.*, 2003; Mentschel i Claus, 2003).

Els nostres resultats també suggereixen que l'administració de MCP podria millorar la integritat de l'epiteli del colon tal i com ho indiquen l'increment de la sulfatació de les mucines, la menor concentració de magnesi a la llum intestinal i la menor activitat proliferativa de l'epiteli. La sulfatació de les mucines es considera un indicador del grau de maduració de les cèl·lules caliciformes i s'associa amb un augment de la protecció de l'epiteli intestinal contra bacteries i proteases (Fontaine *et al.*, 1996; Deplancke i Gaskins, 2001; Piel *et al.*, 2005). En canvi, una reduïda sulfatació de les mucines està estretament correlacionada amb colitis en humans (Van Klinken *et al.*, 1999). Així doncs, la modificació de la composició de les mucines, observada en el grup MCP, podria disminuir l'adhesió i/o translocació bacteriana a l'IG. D'altra banda, la menor

concentració de magnesi a la llum de l'IG observada en els porcs del MCP podria ser un indicador d'un menor dany cel·lular de l'epiteli, ja que les cèl·lules epitelials contenen grans quantitats de magnesi. Estudis previs han demostrat la relació entre dany cel·lular i una major proliferació dels colonòcits, i excreció de magnesi endogen (Govers *et al.*, 1993). La dieta MCP no va induir proliferació, que es pot considerar com una resposta inespecífica al dany cel·lular epitelial (Govers *et al.*, 1993; Lapre *et al.*, 1993). En aquest sentit, els animals alimentats amb la dieta MCP podrien tenir una reducció de la citotoxicitat del contingut de l'IG com a resultat de la fermentació del midó i l'increment de volum del contingut, i probablement per una disminució de la fermentació proteica productora de substàncies tòxiques (Lin i Visek, 1991). L'increment del pes del contingut té un efecte diluent sobre components potencialment carcinògens o irritants.

D'altra banda, els porcs alimentats amb la dieta MCP van mostrar altes concentracions de butirat en el contingut colònic, d'acord amb resultats previs sobre la fermentació del midó resistent (Scheppach *et al.*, 1988; Mentschel i Claus, 2003). El butirat té un efecte paradoxal sobre els colonòcits neoplàsics o normals (Topping i Clifton, 2001). La presència de butirat estimula la proliferació i inhibeix l'apoptosi dels colonòcits normals *in vivo*, mentre que té un efecte contrari en els neoplàsics (Luciano *et al.*, 1996; Hass *et al.*, 1997; Wachtershauser i Stein, 2000; Claus *et al.*, 2003; Mentschel i Claus, 2003). En el nostre experiment, es va observar una reducció del nombre de cèl·lules apoptòtiques a l'epiteli en el porcs del MCP, que es podria explicar per l'alta concentració de butirat en el contingut del colon. Tanmateix, no es van observar els efectes proliferatius descrits pel butirat sobre l'epiteli en el grup MCP.

Els canvis de la dieta també van promoure canvis en la poblacions cel·lulars immunitàries tant a nivell local com perifèric. La fermentació del MR va reduir la infiltració epitelial de cèl·lules T a colon. Aquests efectes podrien ser deguts als AGV produïts. En particular, el butirat, però no l'acetat ni el propionat, poden inhibir la proliferació dels limfòcits i la producció d'IL-2 i IFN- γ *in vitro* (Cavaglieri *et al.*, 2003) i això podria explicar els nostres resultats. Però la proliferació dels IEL també s'ha associat amb l'exposició a antigens bacterians (Rothkotter *et al.*, 1999a). Així, els canvis en algunes soques majoritàries de la microbiota colònica i una major

biodiversitat en porcs alimentats amb midó resistent (Le Leu *et al.*, 2005; Martinez-Puig *et al.*, 2007) podrien reduir l'estimulació que s'exerceix sobre els limfòcits del colon. A més, l'increment del nombre de nòduls limfoides a la mucosa dels porcs del BM comparat amb els del MCP podria indicar una major reactivitat immunitària contra bacteries o altres substàncies de la dieta, probablement causada per un detriment de la funció de barrera mucosa. En canvi, els limfòcits T de la LP no van variar, indicant que no tots els teixits limfoides de l'intestí responen de manera igual. Estudis en humans i en porcs *in vivo* han suggerit que, després de l'activació, els limfòcits T de la làmina pròpia entren en fase S menys eficientment que els limfòcits T sistèmics (Rothkotter *et al.*, 1999b), proporcionant una possible explicació de perquè els limfòcits T sistèmics estaven disminuïts, però no els de la LP.

Aquest estudi descriu, per primera vegada, la reducció de l'apoptosi en els teixits limfoides de l'ili i del colon després de la ingestió d'alts nivells de MR. L'apoptosi en els teixits limfoides està directament relacionada amb la proliferació i diferenciació cel·lular a conseqüència de l'estimulació antigènica (Janeway, 2001). Per tant, el menor nombre de cèl·lules apoptòtiques indicaria un menor nombre de cèl·lules activades per antígens en els punts principals d'inducció de la resposta immunitària i de captació antigènica. En conseqüència, el MCP podria modular la patogènia de les malalties inflamàtores de l'IG ja que la fermentació del MR ajudaria a no induir respostes T exacerbades, que poguessin estar implicades en la seva patogènesi (Fiocchi, 1998).

En sang perifèrica, el MR també va disminuir algunes poblacions leucocitàries, bàsicament limfòcits i neutròfils. Valors elevats de leucòcits sanguinis també s'han observat en rates amb enteritis, quan sofrien una invasió bacteriana de la paret intestinal (Porras *et al.*, 2004). A part, una setmana després d'introduir la segona dieta, les cèl·lules T citotòxiques van incrementar en el grup BM, suggerint una resposta proinflamatòria que podria ser deguda a canvis bacterians o a una pertorbació de l'ambient intestinal. Per tant, aquests resultats també indiquen una millora de la integritat i la funció de la mucosa intestinal en els porcs alimentats amb MCP. D'altra banda, la citometria de flux indicava que els canvis en els limfòcits eren deguts a la reducció de poblacions limfòcits T cooperadors. Bohmig *et al.* (1997) va demostrar que el butirat disminueix *in vitro* la funció estimuladora de les cèl·lules presentadores

d'antígen sanguínies, modulant així les respostes T. La reducció dels limfòcits T en sang perifèrica podria ser conseqüència de l'efecte dels AGV sobre la proliferació i la producció de citocines antiinflamatòries en els porcs de la dieta MCP. D'altra part, el butirat podria induir un increment de la concentració d'hemoglobina en la circulació perifèrica per efectes sobre l'expressió gènica (Weinberg *et al.*, 2005), tot i que se'n desconeix encara la seva rellevància clínica. Podria ser que l'increment en la concentració de butirat de l'IG, s'assolís també a nivell sanguini i, per tant, amb potencials efectes sobre cèl·lules no pròximes a l'intestí (Bach Knudsen *et al.*, 2005). En contraposició, altres estudis han observat que porcs alimentats amb midó ric en amilosa (midó resistent) tenien concentracions menors de butirat a la vena porta que aquells alimentats amb blat de moro (Topping *et al.*, 1997). Malauradament, no es va poder quantificar el butirat present en la sang perifèrica. Sigui com sigui, els canvis en els paràmetres sanguinis observats al dia 7, no es van fer significatius fins el dia 55 en endavant. Per tant, és necessari considerar el temps requerit (al menys varies setmanes) per adaptar la microbiota intestinal a un aportament elevat de substrat fermentable (Govers *et al.*, 1999; Martínez-Puig *et al.*, 2003).

En resum, els resultats obtinguts indiquen que el consum prolongat de midó cru de patata de la dieta, com a font de midó resistent, modifica la morfologia de l'intestí prim, però principalment la del colon, i promou canvis en la poblacions cel·lulars immunitàries tant a nivell local com perifèric. En el colon, la fermentació del MCP va induir canvis en l'ambient intestinal, especialment per l'increment de la concentració de butirat. A més, probablement també va millorar la integritat de l'epiteli colònic tal i com ho indiquen l'increment de la sulfatació de les mucines, que té efectes protectors sobre l'epiteli, i la menor concentració de magnesi a la llum intestinal i la menor activitat proliferativa de l'epiteli, que són indicadors del dany epitelial cel·lular. Per aquests i/o altres raons, el MCP de la dieta redueix les cèl·lules T a sang i a l'epiteli del colon, així com la presència de nòduls limfàtics a la mucosa del colon i l'apoptosi en els teixits limfoides intestinals i a la mucosa colònica. En conjunt, els resultats suggereixen una major protecció de la mucosa del colon i menor activació limfocitària en els animals alimentats amb MCP, amb probables efectes positius sobre malalties de l'IG.

Capítol 7

DISCUSSIÓ GENERAL

7. DISCUSSIÓ GENERAL

Els efectes particulars del canvi a una dieta sòlida durant el deslletament, de la incorporació del plasma porcí assecat o d'un extracte de plantes en dietes de deslletament i de diferents tipus de fibra alimentària en porcs de transició-engreix han estat discutits en els capítols anteriors (3, 4, 5 i 6). Tanmateix, manca una valoració conjunta dels resultats, de la seva significació, així com de la metodologia emprada, que es discutirà a continuació.

7.1. L'etapa crítica del deslletament

Diferents paràmetres fisiològics s'han proposat com indicadors de la salut dels garrins quan s'utilitzen antibiòtics promotors del creixement (François, 1962). No obstant, cap d'aquests paràmetres dóna, per ell mateix, una idea clara de l'habilitat que té l'animal per fer front a una eventual situació estressant. Jensen *et al.* (2003) va enumerar les variables més importants que es poden estudiar en el tracte GI en relació a la funció intestinal: morfologia, motilitat, producció i característiques del mucus, permeabilitat transepitelial, immunitat, enzims, secrecions pancreàtiques i microbiota. Algunes d'aquestes variables s'han utilitzat en aquesta tesi per avaluar algunes estratègies nutricionals durant el deslletament.

El deslletament implica complexos canvis socials, ambientals i nutricionals per als garrins (Pluske *et al.*, 1997). L'experiment I confirma que això comporta una situació estressant que s'acompanya de canvis adversos en la morfologia intestinal que inclouen una reducció de l'alçada de les vellositats, un increment de l'amplada de les vellositats i de la profunditat de les criptes a l'IP, i la consegüent reducció de la capacitat enzimàtica i d'absorció, que causen una reducció en el creixement (Miller *et al.*, 1984; Hampson, 1986; Kelly *et al.*, 1991b; Kelly *et al.*, 1991a). Les mesures morfològiques dels experiments I i II (longituds de vellositats i criptes, nombre de mitosis, de cèl·lules caliciformes o d'IEL i densitat de LP) estan en un rang comparable amb les dades obtingudes per altres autors a l'IP (Kelly *et al.*, 1990; McCracken *et al.*, 1995; Zijlstra *et al.*, 1996; Pluske *et al.*, 1997; Cera *et al.*, 1998; Rothkotter *et al.*, 1999a; Jiang *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2002). La comparativa en el cas de l'IG només es factible en alguns

paràmetres concrets, que han estat prèviament estudiats, com la profunditat i densitat de criptes, nombre de mitosis i de cèl·lules caliciformes (Brunsgaard, 1997; Hedemann *et al.*, 2006). Per tant, els resultats dels experiments I i II representen una de les primeres descripcions morfomètriques completes de l'IG en porcs de les primeres edats.

A més, el deslletament també suposa alteracions significatives en la immunitat i en les respostes immunitàries intestinals (Vega-Lopez *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000; Solano-Aguilar *et al.*, 2001; Spreeuwenberg, 2002). En particular, s'associa a respostes inflamatòries dirigides contra antígens bacterians i/o de la dieta a nivell intestinal (Li *et al.*, 1990a; King *et al.*, 2003), que tenen traducció en respostes proinflamatòries a nivell sistèmic (McCracken *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000). Els resultats obtinguts en els experiments I (increment de l'infiltrat limfocitari al cec) i II (increment dels leucòcits, limfòcits i vàries poblacions de cèl·lules T en sang perifèrica en les setmanes posteriors al deslletament) confirmen la hipòtesi de l'activació immunitària tant a nivell intestinal, i especialment a l'IG on s'inicia l'activitat fermentativa, com a nivell sistèmic.

No és sorprenent que els factors associats al deslletament, canvi sobtat de dieta, l'estrès per les noves instal·lacions i per l'establiment de la jerarquia entre els garrins o l'exposició a noves fonts infeccioses puguin afectar la composició fenotípica de les cèl·lules limfocitàries d'un SI que està en desenvolupament. Els valors de les poblacions leucocitàries (macròfags, limfòcits B i poblacions de limfòcits T) de sang, placa de Peyer ileal i gangli limfàtic ileocecal de l'experiment II són similars als descrits per altres autors amb animals de la mateixa edat (Yang i Parkhouse, 1996; Zuckermann i Gaskins, 1996; Solano-Aguilar *et al.*, 2001). Tanmateix, hi ha alguns valors de CD4⁺ i CD8⁺ sanguinis, CD8⁺ a il-PP, i $\gamma\delta$ TCR⁺ i CD8⁺ a LN que són menors als reportats prèviament (Joling *et al.*, 1994; Solano-Aguilar *et al.*, 2001). Aquestes diferències es podrien explicar pels diferents estats sanitaris, l'edat del deslletament o per les condicions experimentals utilitzades en els distints estudis. Per exemple, en el nostre cas, els animals no van seroconvertir enfront la majoria de patògens porcins i estaven ubicats en unitats experimentals, amb un grau relativament elevat d'higiene.

En general, els estudis que han afrontat la problemàtica del deslletament des d'un punt de vista nutricional s'han centrat majoritàriament en l'intestí prim. Si bé els canvis estructurals a l'IP poden comprometre el futur del garrí, l'experiment I també posa en evidència que el pas de la llet materna al pinso sòlid implica alteracions macroscòpiques i microscòpiques marcades en la morfologia de l'IG, coincidint amb canvis microbiològics importants a causa del desenvolupament de l'activitat fermentativa (Castillo, 2006). Per tant, aquests resultats suggereixen que els estudis de les diferents estratègies nutricionals durant el deslletament probablement haurien d'incloure també l'anàlisi del cec i/o del colon. L'experiment II n'és un exemple clar ja que en ambdós additius l'efecte modulador més evident té lloc més enllà de l'ili, en la morfologia del colon i en les subpoblacions del gangli limfàtic ileocòlic comparat amb l'IP o la il-PP, respectivament (Taula 4.5. i Figura 4.1.). És més, aquests additius s'han administrat i han tingut efecte durant les 3 setmanes posteriors al deslletament, coincidint amb el temps que necessita la microbiota per adquirir una capacitat fermentativa plena (Jensen, 1998).

Durant el període transitori posterior al deslletament, es poden distingir dues fases successives (McCracken *et al.*, 1995; Spreeuwenberg, 2002; Burrin i Stoll, 2003; Montagne *et al.*, 2007). Una primera fase aguda o degenerativa causada pels successos estressants del deslletament i on els canvis metabòlics i morfològics són majoritàriament independents de la dieta o en tot cas depenen del nivell d'ingestió (no de la dieta *per se*), i una segona fase adaptativa o regenerativa (de la segona setmana en endavant) on el recondicionament de la mucosa intestinal depèn de la dieta. L'experiment I ha permès determinar les conseqüències de la fase degenerativa, mentre que l'experiment II, on es valoren els efectes dels additius sobre la morfologia i paràmetres immunològics intestinals, s'ha centrat en aquesta segona fase adaptativa dieta dependent.

7.1.2. Els additius en el pinso de post-deslletament: el plasma porcí assecat per polvorització i l'extracte de plantes XTRACT™.

Quan els antibiòtics promotors del creixement no s'utilitzen, s'obtenen menors rendiments productius i, en general, cal utilitzar més antibiòtics amb finalitat terapèutica. Per això, l'estat sanitari dels animals i les taxes de creixement són els dos indicadors més importants a l'hora d'afrontar qualsevol estudi sobre les alternatives als antibiòtics promotors del creixement. A l'experiment II, la substitució del concentrat de proteïna de soja per SDPP va millorar l'eficiència alimentària en el deslletament. A més, el guany mig diari va ser un 86% superior respecte la dieta control i similar a estudis previs (Coffey i Cromwell, 1995; Jiang *et al.*, 2000; Bosi *et al.*, 2004). Tanmateix, les diferències no van ser estadísticament significatives a causa de la grandària de la mostra i el baix nombre de rèpliques. De fet, els experiments que analitzen els efectes productius dels additius utilitzen un nombre molt més elevat de rèpliques, i les conclusions normalment s'obtenen per l'acumulació de dades de diferents experiments a través de tècniques com ara el metanàlisi. Però la manca de diferències estadísticament significatives també es podria explicar pel fet que l'efecte dels concentrats de proteïnes plasmàtiques, o d'altres alternatives als antibiòtics, es posen de manifest més clarament quan els animals estan en condicions menys higièniques i en conseqüència amb més càrrega patògena (Coffey i Cromwell, 1995; Page, 2003). Quelcom similar pot passar amb els garrins del grup XT que tenen un guany mig diari i un consum mig diari un 82% i 39% superior respecte el grup control, respectivament, durant la primera setmana (Manzanilla, 2006). La millora del consum seria especialment beneficiós, ja que un consum baix de pinso durant els dies immediatament posteriors al deslletament, en plena fase degenerativa, contribueix a la inflamació intestinal i pot comprometre l'estructura i la funcionalitat del complex vellositat-cripta (McCracken *et al.*, 1999).

La longitud de les vellositats i de les criptes són paràmetres importants a l'hora de valorar la majoria dels additius de la dieta ja que estan directament relacionats amb la disfuncionalitat intestinal que té lloc durant el deslletament i amb la gravetat de la diarrea que pot ocórrer durant aquest període (Hampson, 1986; Nabuurs *et al.*, 1993). Tanmateix, malgrat les dietes SDPP o XT puguin comportar determinats beneficis durant el procés del deslletament, aquests additius no semblen tenir influència sobre aquests dos paràmetres. També és possible que el disseny experimental de l'estudi, on

els animals es van sacrificar a les 3 setmanes post-deslletament, no permeti detectar aquestes diferències. Això podria ser així ja que l'atròfia de les vellositats no dura més de 11-14 dies, tot i que la hiperplàsia de criptes es pugui perllongar més (Hampson, 1986; Nabuurs *et al.*, 1993). A part, l'escurçament de les vellositats i l'increment de la profunditat de les criptes és normal en el deslletament però dins alguns límits (Vente-Spreuwenberg *et al.*, 2003). Això també suggereix que a part d'aquests paràmetres morfomètrics “clàssics”, l'estudi d'altres paràmetres morfomètrics, de paràmetres immunes o la relació entre la microbiota intestinal i l'animal també poden ser eines molt útils per entendre com els garrins reaccionen enfront les agressions.

Els resultats de l'experiment II indiquen que el SDPP és capaç de modificar la morfologia intestinal i les cèl·lules immunitàries associades a l'intestí en porcs recent deslletats. Les dades presentades també donen suport a la hipòtesi que el SI podria estar menys activat en aquells animals alimentats amb SDPP, bé sigui perquè el SDPP neutralitza els antígens i els microorganismes presents a la llum intestinal, bé perquè millora la integritat de la mucosa intestinal, o perquè redueix l'estat d'activació basal del SI (Touchette *et al.*, 2002; Bosi *et al.*, 2004; Pérez-Bosque, 2005). Per una banda, Pérez-Bosque (2005) afirma que la reducció del grau d'estimulació limfocitària només afectaria la defensa innata, ja que ni les cèl·lules que pertanyen a la defensa adquirida ni els nivells d'Ig A ni els d'Ig G estan modificats. No obstant, en el nostre cas on s'avalua la resposta intestinal al cap dels 21 dies, en comptes dels 14 dies, la proporció de cèl·lules B madures (CD21+) al gangli limfàtic és menor en el SDPP, suggerint també una disminució de la resposta adaptativa humoral. D'altra banda, el menor infiltrat inflamatori de la mucosa podria estar relacionat amb la disminució del nombre de macròfags (cèl·lules presentadores d'antígen) a la il-PP i el LN. Per tant, una menor presentació antigènica que es tradueix en una menor funció efectora a nivell del GALT. En canvi, la disminució dels limfòcits T $\gamma\delta$ no tindria les mateixes connotacions ja que són cèl·lules importants per controlar les infeccions primàries en animals joves però alhora presenten propietats antipatogèniques que limiten la inflamació (Hayday *et al.*, 2000), explicant perquè hi ha una sobrerresposta del SI després de l'administració de LPS en garrins alimentats amb SDAP (Touchette *et al.*, 2002). En definitiva, els canvis en la resposta immunitària de l'animal són d'un interès remarcable ja que representen clarament l'esforç que fa l'animal en respondre, i que es pot traduir en major consum de nutrients (despesa energètica) i menor índex de conversió (Demas *et al.*, 1997).

No obstant això, els canvis en els paràmetres immunitaris no es podrien considerar positius o negatius per ells mateixos, sinó que dependrien de variacions en la funció immunitària o de la magnitud del canvi en sí. Tal com s'argumenta a la introducció (Apartat 1.2.2.2., Figura 1.5.), amb l'edat, el sistema immunitari es desenvolupa en equilibri entre les funcions efectores i reguladores, i la pertorbació d'aquest balanç acaba en un desviació transitòria fora dels límits segurs (Bailey *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2005). Per una banda, durant el deslletament (o en el curs d'alguna infecció) es pot desenvolupar una excessiva expressió de la funció efectora; en aquestes circumstàncies, una disminució de la resposta immunitària, similar a la que produeix el SDPP, podria ser adequada. D'altra banda, alguns animals també poden presentar una excessiva funció reguladora que podria permetre el sobrecreixement bacterià després del deslletament. En aquest cas, productes amb propietats immunoestimulants (Apartat 1.3.2.), com algunes vitamines i minerals, pre- i probiòtics, la glutamina, els nucleòtids o algun extracte de plantes podrien ser d'utilitat.

El suplement dietètic amb XT també és capaç de modificar els leucòcits a nivell intestinal i sistèmic, encara que de forma menys consistent. Malgrat que algunes de les observacions es puguin relacionar amb les propietats antiinflamatòries (capsaïcina, cinamaldehyd) o antimicrobianes (carvacrol, cinamaldehyd) d'algun dels seus components (Didry *et al.*, 1994; Koh *et al.*, 1998; Sancho *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2004), manquen estudis més específics que en clarifiquin els mecanismes. Sobretot considerant que la majoria d'aquestes estudis han estat realitzats *in vitro*. És més, recentment Manzanilla (2006) ha demostrat que a les concentracions d'XT utilitzades (300 ppm) no hi ha un efecte antimicrobià directe, sinó que es necessiten dosis properes a 10.000 ppm per obtenir efectes antimicrobians en el contingut jejunal. Malgrat l'anterior, sembla evident que la suplementació amb XT incrementa el nombre de lactobacils a la part distal de l'intestí prim o a l'IG (Castillo, 2006; Manzanilla, 2006), amb propietats immunoestimulants i potencialment beneficioses pels animals (Vitini *et al.*, 2000; Schley i Field, 2002; Babinska *et al.*, 2005). Recentment, també s'ha demostrat que el cinamaldehyd o la capsaïcina, i altres extractes de vegetals, modifiquen els patrons fermentatius en el rumen dels vedells (Cardozo *et al.*, 2006). Sigui com sigui, sembla clar l'efecte marcat que tenen els diferents additius sobre el perfil bacterià dels animals. Castillo *et al.* (2006), en un estudi paral·lel, a part de l'XT (0.03%) van avaluar dos additius més: un antibiòtic (0.04% avilamicina) i un acidificant

(0.3% butirat sòdic). Es va poder observar com el perfil de poblacions bacterianes intestinals estudiades per tècniques moleculars depenien més de l'additiu present a la dieta (antibiòtic, acidificant i extracte de plantes), que no pas de paràmetres tant importants com la mare o el corral. Malauradament, no es disposen de dades del grup SDPP per aquest paràmetre.

L'experiment amb la dieta XT ha permès estudiar només algun dels possibles efectes d'algun dels seus components. Per una banda, l'administració de l'extracte de plantes en forma comercial (mescla de components) no permet desxifrar el mecanisme d'acció de cada component. Així que caldria estudiar primer cadascuna de les substàncies per separat, sobretot si es té en compte que a la bibliografia encara no hi ha dades sobre aquest tipus d'assaigs. D'altra banda, la dosi també és un factor determinant. Malgrat que els efectes antimicrobians s'obtinguin a dosis altes, per obtenir altres tipus d'efectes les dosis requerides són menors, que és el que passa per exemple amb el temps de buidat gàstric a causa de la capsciacina (Chang *et al.*, 1999). Així que, en algun dels casos, i en funció de la dosi, la mescla de diferents components també podria tenir un efecte additiu o complementari (Manzanilla, 2006).

7.2. El consum de fibra alimentària en els porcs d'engreix

Previ a l'anàlisi global dels resultats, hi ha alguns elements del disseny experimental dels experiments III i IV que mereixen ser destacats. Entre els més rellevants:

- L'ús del porc en aquests estudis permet que alguns dels resultats puguin ser extrapolables als humans ja que en termes d'anatomia, fisiologia, nutrició i microbiota GI el porc és molt més similar a l'espècie humana que no pas els altres animals domèstics o de laboratori (Graham i Aman, 1986; Miller i Ullrey, 1987; Rowan *et al.*, 1994; Topping i Clifton, 2001; Liebler-Tenorio i Pabst, 2006), malgrat que un dels elements limitant del model sigui el baix nivell de grassa de les dietes. D'altra banda, això també implica que altres estudis amb animals de laboratori herbívors (hàmsster, conill porquí, etc.), carnívors (gos) o omnívors com el porc però fermentadors cecals (rata), amb tractes GI molt diferenciats, siguin de difícil comparació amb els del porc (Stevens i Hume, 1998).
- L'edat dels animals utilitzats en els diferents experiments pot ser un factor determinant ja que, a part de condicionar la formulació del pinso, està estretament lligada amb la capacitat fermentativa de l'IG i a l'aprofitament de l'energia que se'n fa, que incrementa amb el pes viu dels animals (Le Goff *et al.*, 2003; Anguita, 2006; Martínez-Puig, 2006).
- El temps necessari perquè tingui lloc una adaptació digestiva a la nova dieta és un altre factor a considerar. Govers *et al.* (1999) determinen un mínim de 2 setmanes tot i que podria ser més. En efecte, les conseqüències d'aquesta adaptació digestiva no tenen una traducció evident sobre la morfologia intestinal o les poblacions leucocitàries fins al dia 22 o 42 en l'experiment III o el dia 55 en l'experiment IV. Això concorda, per exemple, amb les 5-6 setmanes necessàries per adequar la capacitat fermentativa de la microbiota intestinal a una inclusió elevada de MR a la dieta (Martínez-Puig, 2006) o altres fonts de DF com el blat de moro molt de forma grollera, la polpa de remolatxa o el segó de blat (Castillo *et al.*, 2007). En contrast amb el procés adaptatiu, hi ha un efecte a curt termini inherent al propi canvi de dieta, que en el nostre cas és aparentment limitat, independent del tipus de dieta i no va més enllà dels 7 dies.
- Òbviamment, els mètodes i procediments analítics condicionen l'assoliment dels objectius plantejats. Malgrat que alguns paràmetres es puguin utilitzar de forma genèrica en molts estudis nutricionals (pesos, digestibilitats, composició i

característiques bàsiques de la digesta, característiques de la microbiota, paràmetres morfològics microscòpics, hemograma i fórmula leucocitària, etc.), altres serien indicats en funció del mecanisme d'acció o de l'efecte esperat (citolisi *in vitro*, capacitat de retenció d'aigua; subpoblacions leucocitàries i la seva funcionalitat, immunohistoquímica per proliferació cel·lular, apoptosi, etc.). Tot això, sense oblidar els trams intestinals sobre els que cal incidir en funció de l'estratègia nutricional a analitzar. En efecte, l'experiment IV canvia o incorpora noves tècniques laboratorials adequades a la hipòtesi experimental del midó resistent. D'altra banda, aquest mateix experiment posa en evidència que l'ús de paràmetres/mètodes analítics més específics poden permetre observar efectes que amb determinacions més generals no s'observen (per exemple, cèl·lules caliciformes vs. cèl·lules PAS+ o AB+; nombre de mitosis vs. cèl·lules PCNA+; IEL vs. cèl·lules CD3+).

La DF pot tenir un impacte positiu sobre la salut intestinal a través de l'increment de la massa digestiva que redueix la constipació i dilueix les toxines i carcinògens, o a través dels productes derivats de la fermentació dels CH amb efectes beneficiosos sobre la mucosa intestinal (Cummings *et al.*, 1992). Si bé això podria ser així en algunes malalties digestives d'humans, com la malaltia inflamatòria de l'IG o el risc de càncer de colon (Govers *et al.*, 1999; Jacobasch *et al.*, 1999), els resultats en els porcs no són concloents (Pluske *et al.*, 1996a; Kirkwood *et al.*, 2000; Lindecrona *et al.*, 2003; Hopwood *et al.*, 2004). Les modificacions en l'ambient intestinal relacionades amb les característiques del contingut digestiu i la microbiota podrien jugar un rol important en la funcionalitat intestinal i, per tant, en la salut de l'animal. Els experiments III i IV demostren que els efectes de la DF són variables en funció del tipus de fibra de la dieta. Per tant, una aproximació simplista als efectes i possibles mecanismes d'acció, avantatges i/o inconvenients que ocasiona la DF no seria vàlida.

La inclusió de fibra a la dieta (grups GRO, POLPA, SEGÓ i MCP) va incrementar el pes del tracte GI, bàsicament per un augment del pes del colon i especialment del seu contingut, encara que amb magnitud variable en funció del tractament. De tots ells, només la inclusió de midó cru de patata va provocar un increment del pes del teixit colònic per una hipertròfia muscular. Probablement, perquè el contingut que arriba al

colon en el MCP és molt superior (1.7 kg més que el seu control) si ho comparem amb els grups GRO, POLPA o SEGÓ (0.2, 0.3 i 0.0 kg més que el seu control, respectivament). D'altra banda, l'edat dels animals també podria ser influent. En aquest sentit, tal com era esperable (Brunsgaard, 1997), els animals de l'experiment IV, amb 8-12 setmanes més d'edat que els de l'experiment III, tenien un teixit ceco-colònic molt més pesat i, per tant, més voluminós i amb més capacitat per adaptar-se a majors incorporacions de material no digerit. El gruix de la paret colònica també era numèricament superior en aquests animals més adults (1.003 vs. 1.380 μm), amb un increment de la capa muscular (443 vs. 479 μm), però no de la profunditat de les criptes (421 vs. 423 μm).

El major pes del tracte digestiu dels animals alimentats amb més fibra pot provocar una disminució del rendiment en canal (Rijnen *et al.*, 2000), tot i que variable en funció de la ració i, en conjunt, menor en els animals de més edat (2, 1, 6 i 10 % per les dietes MCP, GROLLER, POLPA, SEGÓ, respectivament). Per tant, l'elecció dels ingredients fibrosos podria ser important a l'hora de minimitzar les pèrdues per baix rendiment en canal, tot i que l'increment del pes i la major capacitat fermentativa podrien ajudar també a minorar-les.

En contraposició a les potencials pèrdues per baix rendiment productiu o en canal, les dietes amb alts nivells de DF que incrementen el pes del contingut intestinal poden ocasionar efectes beneficiosos sobre la mucosa intestinal ja que permeten diluir els possibles agents irritants, toxines o carcinògens i incrementar el trànsit de la digesta que també redueix el temps de contacte dels components nocius amb la mucosa colònica (Payler *et al.*, 1975; Newmark i Lupton, 1990; Cummings *et al.*, 1992). Aquest fenomen, descrit majoritàriament en humans o rates, era esperable que succeís en la dieta SEGÓ, com a font rica amb fibra poc fermentable (Govers *et al.*, 1999). El pes del contingut de l'IG no va incrementar en la dieta SEGÓ, però sí la presència de PNA al llarg de tot el colon encara que de forma moderada. Probablement, la poca diferència en nivells de PNA de la ració entre les dietes CT i SEGÓ, o el fet que en els porcs la digestió de PNA abans del cec és major que en humans (Mathers, 1991), va dificultar l'observació de diferències més marcades.

L'experiment III posa en evidència l'activació del sistema immunitari sistèmic que té lloc una setmana després d'introduir els animals a un nou ambient i a una nova dieta, i especialment a les dietes GRO i SEGÓ. En canvi, a l'experiment IV, on els animals ja estaven adaptats a les instal·lacions experimentals, això succeeix de forma més limitada i només esdevé significatiu en introduir la segona dieta BM en comparació amb la de MCP. Així doncs, aquests resultats suggeririen que l'activació del SI sistèmic podria dependre més del canvi a un nou ambient que de la introducció d'una nova dieta, tot i que algunes dietes dificulten més que unes altres l'adaptació a curt termini en porcs de creixement-engreix. En aquest sentit, a nivell local, el canvi a una dieta rica en fibra sí que pot provocar transitòriament cert grau d'activació immunitària en forma de colitis (experiment III), de característiques similars però de menor intensitat que l'observada durant el pas de la llet materna a l'aliment sòlid en garrins (experiment I).

D'altra banda, els resultats dels experiments III i IV també demostren que després d'aquesta primera fase, existeix un procés d'adaptació digestiva que té lloc a llarg termini. L'administració de substrats poc digestibles provoca un major pes i longitud de l'IG o la hipertròfia de la capa muscular amb la finalitat de retenir el contingut digestiu i la microbiota el temps suficient perquè tingui lloc la fermentació de la matèria orgànica que arriba a l'IG. Probablement, això sigui més evident en l'experiment IV que en el III, ja que la capacitat d'adaptació digestiva incrementa amb l'edat, per increment de la grandària i la capacitat intestinal de l'animal (Whittemore *et al.*, 2003). Paral·lelament, existeix també una adaptació i diferenciació de la microbiota, en funció del substrat. En aquests mateixos animals, l'adaptació bacteriana és més ràpida en substrats solubles i més fermentables com la POLPA (Roca-Canudas *et al.*, 2006), i l'administració a llarg termini de MCP diferencia la població bacteriana cap a una microbiota més amilolítica i butirogènica (Martínez-Puig, 2006). Així, la quantitat i les característiques del substrat, així com l'acció que exerceix la microbiota sobre ell, determinen la quantitat i el perfil d'AGV produïts a les diferents parts de l'IG, que van ser clarament diferents en funció de les diferents fonts de DF en els experiments III i IV.

Els resultats d'aquests experiments també indiquen que la mucosa intestinal i les poblacions leucocitàries del GALT i sistèmiques respondrien en concordança amb aquesta adaptació digestiva i especialització de la capacitat fermentativa, en base als mecanismes discutits en els apartats 5.4. i 6.4. L'estudi al llarg del temps de les poblacions leucocitàries en sang perifèrica permet caracteritzar aquesta evolució. Així, a l'experiment IV, no és fins els dies 55, 62 i en endavant (a manca de dades entre els dies 7 i 55) quan la reducció del nombre de limfòcits, neutròfils i poblacions CD4+ en sang es fa estadísticament significativa en els porcs alimentats amb MCP, tot i que el dia 7 aquestes diferències ja s'intuïen. A l'experiment III, malgrat que els efectes sistèmics van ser més puntuals, el seguiment de l'evolució de l'intestí també demostra una reducció ràpida i marcada dels limfòcits de l'epiteli i de la LP (dia 22 i en endavant) en els porcs de la dieta POLPA, d'acord amb l'adaptació relativament favorable i ràpida que tenen aquests animals al nou substrat fermentable (Anguita, 2006; Roca-Canudas *et al.*, 2006). Altres paràmetres, com el nombre de cèl·lules caliciformes, amb independència que el seu nombre incrementi amb l'edat (Brunsgaard, 1997), no varien a causa de la dieta fins més tard, a les 6 setmanes (Experiment III) i l'efecte dieta es continua observant a les 13 setmanes (Experiment IV). Contràriament, els efectes de la DF sobre la capa muscular ja s'observen el dia 7 (experiment III), i també es mantenen a llarg termini (6 i 13 setmanes, pels experiments III i IV). En conjunt, aquests resultats indiquen que a llarg termini s'observen canvis immunitaris i en l'estructura intestinal, probablement a conseqüència de l'adaptació digestiva i de la microbiota intestinal a un aportament elevat de substrat fermentable. En general, són necessàries varies setmanes perquè tinguin lloc aquest tipus de respostes ja que calen 2 (Cummings i Englyst, 1995), 3 (Phillips *et al.*, 1995), 4 (van Munster *et al.*, 1994; Noakes *et al.*, 1996) o 5 setmanes (Govers *et al.*, 1999; Martínez-Puig *et al.*, 2003), en funció de l'espècie, tipus i quantitat de substrat fermentable per establitzar la fermentació de l'IG.

De les quatre dietes amb major nivell de fibra, les dietes POLPA i MCP són les que probablement provoquen major fermentació dels CH a l'IG, que s'evidencia per un increment de l'emplenat de l'intestí, amb majors concentracions d'AGV i/o diferències en el seu perfil, i una reducció de l'amoni i del pH a l'IG. En ambdues dietes, això coincideix amb menor nombre de limfòcits a l'epiteli i/o a la làmina pròpia i de nòduls limfàtics a la mucosa en els punts de major degradació de la polpa de remolatxa o el midó cru de patata. Els mecanismes pels quals la DF afecta la funció immune de l'intestí

encara no han estat del tot establerts. Schley i Field (2000) proposen diferents vies no excloents: i) contacte directe de bacteries (en especial bacteries àcid làctiques) o parts de bacteries amb cèl·lules immunitàries de l'intestí, ii) producció d'AGV per fermentació de la DF o bé, iii) modulació de la producció de mucines.

En aquest sentit, la microbiota pot jugar un paper determinant, i sobretot les bacteries àcid làctiques que incrementen el nombre d'IEL i limfòcits a la LP, conforme l'observat també en l'experiment II durant la fase posterior al deslletament (McCracken i Lorenz, 2001; Schley i Field, 2002; Babinska *et al.*, 2005). De fet, Rothkotter *et al.* (1999) comparant l'IP de porcs de diferents edats i estats sanitaris va arribar a la conclusió que els antígens microbians, i no els alimentaris, són els que provoquen un augment dels limfòcits a l'epiteli. Tanmateix, potser a part de la càrrega bacteriana hi ha altres característiques de la microbiota que són rellevants, ja que ni el nombre total de bacteries, ni d'enterobacteries, ni de lactobacils va variar. De fet, ambdues dietes tenien major biodiversitat microbiana a l'IG, indicatiu d'una microbiota més estable (Castillo, 2006; Martínez-Puig, 2006; Roca-Canudas *et al.*, 2006) i, per tant, hi podria haver una menor reactivitat immunitària. A més, els IEL de l'IG podrien ser més sensibles als canvis de la microbiota intestinal en comparació amb els de l'IP, ja que són predominantment $\alpha\beta$ (Beagley *et al.*, 1995), que depenen més de la colonització bacteriana que els $\gamma\delta$ (Bandeira *et al.*, 1990).

Pel que fa als AGV derivats de l'acció fermentativa de la microbiota, es coneix que l'acetat, el butirat i el propionat inhibeixen *in vitro* la proliferació dels limfòcits (Franklin *et al.*, 1991; Curi *et al.*, 1993; Wajner *et al.*, 1999), encara que l'acetat i el propionat de forma menys marcada i en alguns casos amb efectes oposats als observats amb el butirat (Cavaglieri *et al.*, 2003). Endemés, el butirat pot inhibir *in vitro* la producció de IL-2 i IFN- γ , i la funció estimuladora de les cèl·lules presentadores d'antigen (Bohmig *et al.*, 1997). Els experiments III i IV corroboren *in vivo* que els AGV poden tenir certes propietats antiinflamatòries, encara que no de forma generalitzada. Així, per exemple, un increment de la concentració d'AGV no implica *per se* una reducció del nombre de leucòcits intestinals, que és el que s'observa en el cas de la dieta GRO. Probablement, el perfil d'AGV produïts tingui un paper preponderant. En aquest sentit, la fermentació del midó cru de patata és capaç de modular les poblacions leucocitàries per acció de la major presència de butirat, sense necessitat de

variar la concentració total d'AGV. Tanmateix, potser això només es compleix quan els perfils d'AGV es decanten cap a un tipus concret d'AGV (dieta MCP), ja que amb diferències menys acusades (dieta POLPA) l'efecte particular de cada AGV podria ser irrellevant.

Per últim, la producció de mucines, i les característiques de l'ambient intestinal (citotoxicitat del contingut intestinal, pH, presència d'aigua, d'amoníac, etc.) també poden determinar respostes diferenciades respecte la integritat de la mucosa colònica i modular directa o indirectament les respostes immunitàries (Brunsgaard, 1998; Schley i Field, 2002). No obstant això, les alteracions són sovint menors, i els efectes poc consistents o puntuals per un determinat tipus de DF. Per exemple, malgrat totes les fibres alimentàries poden incrementar la secreció de mucines al llarg de l'intestí (Schmidt-Wittig *et al.*, 1996; Barcelo *et al.*, 2000; Guarner, 2006), la dieta MCP, probablement per la major producció d'AGV, va incrementar el nombre les cèl·lules caliciformes al colon però només d'aquelles riques amb sulfomucines, mentre que les dietes amb majors nivells de PNA les van reduir a llarg termini i al colon distal per causes desconegudes.

En canvi, els efectes de la mòlta grollera del blat de moro o de la inclusió de segó de blat sobre les característiques del contingut de l'IG són menys evidents, en comparació amb la dieta POLPA. Malgrat això, la dieta GRO incrementa el contingut de l'IG i dels productes derivats de la seva fermentació. Aquests canvis, aparentment, no milloren l'ambient intestinal ans el contrari; podrien provocar un detriment en la funció de barrera mucosa ja que s'incrementen els nòduls limfàtics a l'IG, relacionats amb la presentació antigènica, alhora que provoca una activació de la resposta immunitària a la il-PP (majors proporcions de macròfags, cèl·lules activades i limfòcits T citotòxics) de forma tardana (6 setmanes), quan l'ambient digestiu ja hauria d'estar teòricament estabilitzat. A part, l'increment de midó en el colon d'aquests animals (Anguita, 2006) tampoc s'acompanya de criptes més profundes per una fermentació butírica, ni de major producció de mucines amb efecte protector sobre la mucosa. En canvi, altres estudis on el cereal principal era l'ordi o el blat, la seva mòlta incrementava la proliferació epitelial i la producció de les mucines i n'afectava la seva composició, suggerint una major protecció enfront infeccions intestinals (Brunsgaard, 1998).

La mòlta grollera del blat de moro (54% de la ració) o la inclusió de 25-35% de midó cru de patata són fonts de midó resistent tipus I o II, respectivament. En efecte, en ambdós casos, la quantitat de midó (MR) que assoleix l'IG és el doble que en el respectiu grup control (Anguita, 2006 i apartat 6.3.2.). Tanmateix, els animals del MCP tenen el doble de MR als trams proximals de l'IG que els de la dieta GRO (165.7 vs. 86.4 g/kg). És més, els animals del MCP no eliminen pràcticament midó pel recte, mentre que els del grup GRO sí. En conjunt, aquests resultats indicarien que el midó cru de patata és aparentment més fermentable i, per tant, explicarien perquè només en el cas de la fermentació del MCP es produeixen altes concentracions de butirats, seguint la desaparició del midó que en gran mesura té lloc al cec i colon proximal (Scheppach *et al.*, 1988; Phillips *et al.*, 1995; Martínez-Puig *et al.*, 2007). Encara que no sempre (Hedemann *et al.*, 2005), els estudis que han obtingut increments de la producció de butirats al cec i colon modificant la grandària de la partícula ho han aconseguit molent tota la dieta (Mikkelsen *et al.*, 2004; Anguita, 2006). A part, els estudis que han avaluat la mòlta grollera de la dieta, han observat que els efectes positius es deuen principalment als canvis que s'observen en les característiques fisicoquímiques i propietats microbianes del contingut estomacal, que actua de barrera protectora prevenint l'entrada d'agents patògens a trams posteriors (Mikkelsen *et al.*, 2004).

El segó de blat és el substrat que va afectar menys les propietats fisicoquímiques del contingut colònic amb una baixa fermentació dels CH. Chase-Topping *et al.* (2007) proposen la implicació d'aquest ingredient, pels seus alts nivells en PNA, en la patogènia de les colitis no específiques en porcs d'engreix. En canvi, altres estudis associen una major incidència de disenteria porcina en animals alimentats amb PNA solubles i midó resistent que els alimentats amb més PNA insolubles menys fermentables (Durmic *et al.*, 1998; Pluske *et al.*, 1998). L'habilitat del patògen per sobreviure a l'ambient digestiu seria determinant (Hopwood *et al.*, 2004), però també els efectes que pugui exercir la fibra sobre la funcionalitat i la integritat de la barrera protectora, que ha de permetre alhora la captació de substàncies cap a la circulació sistèmica i l'exclusió de components patògens (Baumgart i Dignass, 2002). En aquest sentit, els animals alimentats amb majors nivells de segó de blat presenten una major fermentació proteica a l'IG, una microbiota més inestable i canviant i un contingut colònic potencialment més nociu per la mucosa (Anguita, 2006; Castillo, 2006). Amb la probable contribució d'aquests factors, el SI sofreix importants canvis els quals

comencen amb una activació inicial que es prolonga en el temps i que també afecta la funcionalitat de les cèl·lules leucocitàries. Malgrat no s'ha realitzat cap infecció experimental, no es pot descartar que això suposi un factor de risc per desordres entèrics. Estudis recents on també varien les proporcions de diferents ingredients fibrosos, entre ells la polpa de remolatxa, el blat o el midó de patata, demostren que racions amb substrats més fermentables poden millorar la salut intestinal dels garrins recent deslletats, per increment de la producció d'AGV (acètic i butíric) i canvis en la composició microbiana (Bikker *et al.*, 2006).

En definitiva, l'eficàcia funcional intestinal (salut intestinal), entesa com la capacitat de l'organisme de respondre eficientment a un desafiament i de restaurar i mantenir el balanç intern, podria ser estudiada en termes de funcionalitat del tracte gastrointestinal, microbiota comensal i estructura de la mucosa, que inclouria la paret intestinal i el teixit limfoide associat a l'intestí. Per una banda, l'experiment IV demostra que la ingestió a llarg termini de MCP indueix canvis pronunciats en l'ambient colònic i en millora la integritat de la mucosa intestinal, modificant la morfologia colònica i paràmetres immunològics que probablement podrien estar associats amb beneficis sobre la salut. D'altra banda, de les dietes analitzades a l'experiment IV, la POLPA segurament és la que pot afavorir més l'adaptació dels animals a la dieta d'engreix, en base a la menor presentació de nòduls limfàtics i la reducció de l'infiltrat inflamatori a la mucosa del colon proximal. Mentre que les altres dietes no aportarien beneficis apreciables (dieta GRO) o, en últim cas, comprometrien la integritat de la paret intestinal del colon i podrien modular substancialment la resposta immunitària (dieta SEGÓ).

Les mesures morfològiques dels experiments III i IV (longituds de vellositats i criptes, densitat de criptes, gruix de la capa muscular, nombre de mitosis, de cèl·lules caliciformes o d'IEL, i activitat apoptòtica o proliferativa dels colonòcits) estan en un rang comparable amb les dades obtingudes per a porcs en creixement (Hall i Byrne, 1989; Brunsgaard, 1997; McCullogh *et al.*, 1998; Rothkotter *et al.*, 1999a; Mentschel i Claus, 2003; Wong i Gibson, 2003). En canvi, no existeix una quantificació detallada de la infiltració de limfòcits T a la mucosa del colon ni de la presència de cèl·lules apoptòtiques en regions limfoides de l'intestí (il-PP, LP o nòduls limfàtics del colon) en porcs en creixement, essent, probablement, la que es fa en aquesta tesi una de les primeres.

Per últim, cal destacar que la compilació dels resultats hematològics i de les poblacions leucocitàries en sang perifèrica, dels experiments II, III i IV, permet establir els nivells fisiològics des de les 3 fins a les 22 setmanes de vida, que equival a la pràctica totalitat de la vida productiva del porc en condicions comercials. Aquesta evolució pot utilitzar-se com a referència per a altres estudis que valorin la resposta a canvis d'allotjament, dieta, estrès i/o l'exposició a agents infecciosos. Per exemple, algunes de les poblacions immunitàries sanguínies analitzades en aquesta tesi (CD8+, MHC II+), i també altres (CD16+), ja s'han utilitzat per predir els rendiments productius durant la fase d'engreix en porcs (Galina-Pantoja *et al.*, 2006). De forma similar, també s'ha establert una evolució en les poblacions immunitàries del GALT, il-PP i LN, que s'han determinat en diferents moments entre les 3 i les 14 setmanes de vida. Òbviament, altres treballs ja havien determinat el nivell de poblacions immunitàries en sang perifèrica o el GALT, però majoritàriament només durant les primeres setmanes de vida dels garrins (Yang i Parkhouse, 1996; Pabst i Rothkotter, 1999; Solano-Aguilar *et al.*, 2000; Solano-Aguilar *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2006b; Galina-Pantoja *et al.*, 2006) o al llarg de la vida de l'animal però sols analitzant les poblacions cel·lulars T (Joling *et al.*, 1994; Zuckermann i Gaskins, 1996).

Capítol 8

CONCLUSIONS

Dels resultats exposats en aquesta tesi doctoral, es poden extreure les següents conclusions:

1. L'estudi de l'estructura intestinal, mitjançant la valoració de paràmetres morfomètrics per mètodes histològics, i la determinació de poblacions leucocitàries en el GALT i en sang perifèrica permeten avaluar l'adaptació dels porcs a la introducció d'una nova dieta.
2. Les alteracions en el complex vellositat-crípta observades a l'IP durant el deslletament dels garrins, juntament amb els canvis inflamatoris i degeneratius observats a l'IG, limiten la capacitat digestiva i absortiva dels animals i podrien justificar el menor ritme de creixement observat durant aquest període.
3. La incorporació de 6% de plasma porcí assecat en la dieta de garrins deslletats redueix el grau d'activació del sistema immunitari, facilitant l'adaptació digestiva post-deslletament, i incrementa l'eficiència alimentària.
4. L'addició d'un 0.03% de preparat d'extracte de plantes, que contenia carvacrol (*Origanum* sp.), cinamaldehyd (*Cinnamomum* sp.) i oleoresina de capsicum (*Capsicum annum*), a la dieta de garrins deslletats no té efectes clars ni consistents sobre la morfologia i el sistema immunitari intestinal.
5. La incorporació de fibra a la dieta dels porcs d'engreix, per la molta grollera del blat de moro (4 mm) o per la incorporació d'ingredients fibrosos com la polpa de remolatxa (8%) o el segó de blat (10%) provoca una lleu resposta inflamatòria inicial i transitòria al colon proximal i al gangli limfàtic associat.
6. La incorporació de polpa de remolatxa (8%) a la dieta dels porcs d'engreix podria facilitar l'adaptació, ja que redueix la presència de cèl·lules immunitàries al colon proximal, a llarg plaç. En canvi, la inclusió de segó de blat (10%) a la dieta dels porcs d'engreix provoca una activació inespecífica del sistema immunitari intestinal.

7. El consum prolongat de midó cru de patata (25-35%), com a font de midó resistent, millora la integritat de la mucosa colònica, alhora que provoca una menor activació limfocitària intestinal i sistèmica en porcs d'engreix.

Capítol 9

BIBLIOGRAFIA

- AACC (2001) The definition of dietary fibre. Report of the dietary fibre definition comitee of the American Association of Cereal Chemists. . *Cereal Foods World* 46, 112-129.
- AOAC (1995) *Official Methods of Analysis*, 16th Ed ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.
- Alvarez B, Sanchez C, Bullido R, Marina A, Lunney J, Alonso F, Ezquerro A and Dominguez J (2000) A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Tissue Antigens* 55, 342-351.
- Allee GL and Touchette KL (1999) Efectos de la nutrición sobre la salud intestinal i el crecimiento de lechones. *XV Curso de especialización; Avances en nutrición y alimentación animal*, 125-144.
- Anderson KL (2003) The complex world of gastrointestinal bacteria. *Can J Anim Sci* 83.
- Andrés N (2006) Efecto de los nucleótidos y la pulpa de garrofa sobre la salud intestinal de lechones destetados. Treball de Recerca. Bellaterra, Barcelona: Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Anguita M (2006) Physicochemical characteristics of vegetal feedstuffs in growing pig diets influence of the carbohydrate fraction on the energy value and the gastrointestinal tract environment. PhD Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Anguita M, Gasa J, Nofrarias M, Martín-Orúe SM and Pérez JF (2007) Effect of coarse ground corn, sugar beet pulp and wheat bran on voluntary intake and physicochemical characteristics of digesta of growing pigs. *Livestock Science* 107, 182-191.
- Aruoma OI (1996) Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radic Biol Med* 20, 675-705.
- Asp NG, Tovar J and Bairoliya S (1992) Determination of resistant starch in vitro with three different methods, and in vivo with a rat model. *Eur J Clin Nutr* 46 Suppl 2, S117-119.
- Babinska I, Rotkiewicz T and Otrocka-Domagala I (2005) The effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. administration on the morphology of the gastrointestinal tract, liver and pancreas in piglets. *Pol J Vet Sci* 8, 29-35.
- Bach Knudsen KE (1997) Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim Feed Sci Tech* 67, 319-338.
- Bach Knudsen KE, Jorgensen H and Canibe N (2000) Quantification of the absorption of nutrients derived from carbohydrate assimilation: model experiment with catheterised pigs fed on wheat- or oat-based rolls. *Br J Nutr* 84, 449-458.
- Bach Knudsen KE, Serena A, Kjaer AK, Jorgensen H and Engberg R (2005) Rye bread enhances the production and plasma concentration of butyrate but not the plasma concentrations of glucose and insulin in pigs. *J Nutr* 135, 1696-1704.
- Baghurst PA, Baghurst KI and Record SJ (1996) Dietary fiber, non-starch polysaccharides and resistant starch - a review. *Food Aust* 48, S3-S35.
- Bailey M, Haverson K, Inman C, Harris C, Jones P, Corfield G, Miller B and Stokes C (2005) The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. *Proc Nutr Soc* 64, 451-457.
- Bailey M, Miller BG, Telford E, Stokes CR and Bourne FJ (1993) Specific immunological unresponsiveness following active primary responses to proteins in the weaning diet of piglets. *Int Arch Allergy Immunol* 101, 266-271.

- Bailey M, Plunkett F, Clarke A, Sturgess D, Haverson K and Stokes C (1998) Activation of T cells from the intestinal lamina propria of the pig. *Scand J Immunol* 48, 177-182.
- Bailey M, Plunkett FJ, Rothkotter HJ, Vega-Lopez MA, Haverson K and Stokes CR (2001) Regulation of mucosal immune responses in effector sites. *Proc Nutr Soc* 60, 427-435.
- Bandeira A, Mota-Santos T, Itohara S, Degermann S, Heusser C, Tonegawa S and Coutinho A (1990) Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J Exp Med* 172, 239-244.
- Banks WJ (1993) *Applied veterinary histology*, 3rd. ed. Harbound: Mosby.
- Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvialle JA, Cuber JC and Plaisancie P (2000) Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* 46, 218-224.
- Barker IK, Dreumel AA and Palmer N (1993) The alimentary system. In *Pathology of domestic animals*, pp. 2:1-318 [KVF Jubb, PC Kennedy and N Palmer, editors]. New York: Academic Press Inc.
- Baum B, Liebler-Tenorio EM, Enss ML, Pohlenz JF and Breves G (2002) *Saccharomyces boulardii* and *bacillus cereus* var. *Toyoi* influence the morphology and the mucins of the intestine of pigs. *Z Gastroenterol* 40, 277-284.
- Baumgart DC and Dignass AU (2002) Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 685-694.
- Beagley KW, Fujihashi K, Lagoo AS, Lagoo-Deenadaylan S, Black CA, Murray AM, Sharmanov AT, Yamamoto M, McGhee JR, Elson CO and et al. (1995) Differences in intraepithelial lymphocyte T cell subsets isolated from murine small versus large intestine. *J Immunol* 154, 5611-5619.
- Bergman EN (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev* 70, 567-590.
- Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD and Hecht G (2003) Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52, 439-451.
- Bianchi AT, Zwart RJ, Jeurissen SH and Moonen-Leusen HW (1992) Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Vet Immunol Immunopathol* 33, 201-221.
- Bikker P, Dirkzwager A, Fledderus J, Trevisi P, le Huerou-Luron I, Lalles JP and Awati A (2006) The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. *J Anim Sci* 84, 3337-3345.
- Bingham SA (1990) Mechanisms and experimental and epidemiological evidence relating dietary fibre (non-starch polysaccharides) and starch to protection against large bowel cancer. *Proc Nutr Soc* 49, 153-171.
- Björck I (1996) *Starch: analitical aspects*. En: *Carbohydrates in food*, Eliasson AC ed. New York, EEUU: Marcel Dekker.
- Blodgett DJ, Schurig GG and Kornegay ET (1986) Immunomodulation in weanling swine with dietary selenium. *Am J Vet Res* 47, 1517-1519.
- Bohmig GA, Krieger PM, Saemann MD, Wenhardt C, Pohanka E and Zlabinger GJ (1997) n-butyrate downregulates the stimulatory function of peripheral blood-derived antigen-presenting cells: a potential mechanism for modulating T-cell responses by short-chain fatty acids. *Immunology* 92, 234-243.

- Boismenu R and Havran WL (1994) Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science* 266, 1253-1255.
- Bosi P, Casini L, Finamore A, Cremokolini C, Merialdi G, Trevisi P, Nobili F and Mengheri E (2004) Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J Anim Sci* 82, 1764-1772.
- Boyaka PN, Marinaro M, Jackson RJ, van Ginkel FW, Cormet-Boyaka E, Kirk KL, Kensil CR and McGhee JR (2001) Oral QS-21 requires early IL-4 help for induction of mucosal and systemic immunity. *J Immunol* 166, 2283-2290.
- Brown DC, Maxwell CV, Erf GF, Davis ME, Singh S and Johnson ZB (2006a) The influence of different management systems and age on intestinal morphology, immune cell numbers and mucin production from goblet cells in post-weaning pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 111, 187-198.
- Brown DC, Maxwell CV, Erf GF, Davis ME, Singh S and Johnson ZB (2006b) Ontogeny of T lymphocytes and intestinal morphological characteristics in neonatal pigs at different ages in the postnatal period. *J Anim Sci* 84, 567-578.
- Brown I, McNaught KJ and Moloney E (1995) Hi-maizeTM : new directions in starch technology and nutrition. *Food Aust* 47, 272-275.
- Brunsgaard G (1997) Morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and crypt fission in cecum and colon of growing pigs. *Dig Dis Sci* 42, 2384-2393.
- Brunsgaard G (1998) Effects of cereal type and feed particle size on morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and lectin binding patterns in the large intestine of pigs. *J Anim Sci* 76, 2787-2798.
- Brunsgaard G, Eggum BO and Sandstrom B (1995) Gastrointestinal growth in rats as influenced by indigestible polysaccharides and adaptation period. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 111, 369-377.
- Buddington RK and Weiher E (1999) The application of ecological principles and fermentable fibers to manage the gastrointestinal tract ecosystem. *J Nutr* 129, 1446S-1450S.
- Bullido R, Gomez del Moral M, Domenech N, Alonso F, Ezquerro A and Dominguez J (1997) Monoclonal antibodies to a high molecular weight isoform of porcine CD45: biochemical and tissue distribution analyses. *Vet Immunol Immunopathol* 56, 151-162.
- Burrin DG and Stoll B (2003) Enhancing intestinal function to improve growth and efficiency. *9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs* 1, 123-125.
- Bustos-Fernandez L, de Paolo IL, Hamamura S, Gonzalez E, Celener D, Caldarini MI and Tiscornia OM (1978) Does secretin influence rat colonic absorption and secretion? *Am J Gastroenterol* 70, 265-269.
- Calder PC (1998) Dietary fatty acids and the immune system. *Nutr Rev* 56, S70-83.
- Canibe N and Jensen BB (2003) Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *J Anim Sci* 81, 2019-2031.
- Cardozo PW, Calsamiglia S, Ferret A and Kamel C (2006) Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *J Anim Sci* 84, 2801-2808.
- Carroll JA, Touchette KJ, Matteri RL, Dyer CJ and Allee GL (2002) Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: II. Effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of weaned pigs. *J Anim Sci* 80, 502-509.

- Casterline JL, Oles CJ and Ku Y (1997) In vitro fermentation of various food fiber fractions. *J Agric Food Chem* 45, 2463-2467.
- Castillo M (2006) Development of gut microbiota in the pig: modulation of bacterial communities by different feeding strategies. PhD Thesis., Universitat Autònoma de Barcelona.
- Castillo M, Martín-Orúe SM, Anguita M, Pérez JF and Gasa J (2005) Adaptación de la microbiota gastrointestinal del cerdo a diferentes tipos de fibra. *ITEA. XI Jornadas sobre Producción Animal*.
- Castillo M, Martín-Orúe SM, Anguita M, Pérez JF and Gasa J (2007) Adaptation of gut microbiota to corn physical structure and different types of dietary fibre. *Livest Sci* in press.
- Cavaglieri CR, Martins EF, Colleone VV, Rodrigues C, Vecchia MG and Curi R (2000) Fiber-rich diets alter rat intestinal leukocytes metabolism. *J Nutr Biochem* 11, 555-561.
- Cavaglieri CR, Nishiyama A, Fernandes LC, Curi R, Miles EA and Calder PC (2003) Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci* 73, 1683-1690.
- Cebra JJ (1999) Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* 69, 1046S-1051S.
- Cera KR, Mahan DC, Cross RF, Reinhart GA and Whitmoyer RE (1998) Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *J Anim Sci* 66, 574-584.
- Clarke RM (1973) Progress in measuring epithelial turnover in the villus of the small intestine. *Digestion* 8, 161-175.
- Claus R, Losel D, Lacorn M, Mentschel J and Schenkel H (2003) Effects of butyrate on apoptosis in the pig colon and its consequences for skatole formation and tissue accumulation. *J Anim Sci* 81, 239-248.
- Clemens ET, Stevens CE and Southworth M (1975) Sites of organic acid production and pattern of digesta movement in the gastrointestinal tract of swine. *J Nutr* 105, 759-768.
- Coffey RD and Cromwell GL (1995) The impact of environment and antimicrobial agents on the growth response of early-weaned pigs to spray-dried porcine plasma. *J Anim Sci* 73, 2532-2539.
- Coffey RD and Cromwell GL (2001) Use of spray-dried animal plasma in diets for weanling pigs. *Pigs News Inf* 22, 39-48.
- Cook RW (1996) Small intestine. In *Pathology of the pig, a diagnostic guide*, pp. 57-87 [LD Sims, Glastonbury, J.R.W., editor]: Agriculture Victoria.
- Correa-Matos NJ, Donovan SM, Isaacson RE, Gaskins HR, White BA and Tappenden KA (2003) Fermentable fiber reduces recovery time and improves intestinal function in piglets following *Salmonella typhimurium* infection. *J Nutr* 133, 1845-1852.
- Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12, 564-582.
- Cummings JH (1983) Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. *Lancet* 1, 1206-1209.
- Cummings JH, Bingham SA, Heaton KW and Eastwood MA (1992) Fecal weight, colon cancer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology* 103, 1783-1789.

- Cummings JH and Englyst HN (1995) Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *Am J Clin Nutr* 61, 938S-945S.
- Curi R, Bond JA, Calder PC and Newsholme EA (1993) Propionate regulates lymphocyte proliferation and metabolism. *Gen Pharmacol* 24, 591-597.
- Chae BJ, Han IK, Kim JH, Yang CJ, Hancock JD, Kim IH and Anderson DA (1999) Effects of dietary protein sources on ileal digestibility and growth performance for early-weaned pigs. *Liv Prod Sci* 58, 45-54.
- Chae BJ, Lohakare JD, Moon WK, Lee SL, Park YH and Hahn TW (2006) Effects of supplementation of beta-glucan on the growth performance and immunity in broilers. *Res Vet Sci* 80, 291-298.
- Chae C and Lee YS (1995) Age-related lectin histochemical changes in the porcine small intestine. *J Vet Med Sci* 57, 883-889.
- Champ M (1992) Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study. *Eur J Clin Nutr* 46 Suppl 2, S51-62.
- Chang FY, Chen CY, Chen TS, Lee SD, Doong ML and Wang PS (1999) Variation of capsaicin-sensitive motor activities along the rat gastrointestinal tract. *Chin J Physiol* 42, 41-45.
- Chase-Topping ME, Gunn G, Strachan WD, Edwards SA, Smith WJ, Hillman K, Stefopoulou SN and Thomson JR (2007) Epidemiology of porcine non-specific colitis on Scottish farms. *Vet J* 173, 353-360.
- Cheroutre H (2004) Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu Rev Immunol* 22, 217-246.
- Chianini F (2002) Immunohistochemical characterization of microscopic lesions in postweaning multisystemic wasting syndrome naturally affected conventional pigs. PhD Thesis., Universitat Autònoma de Barcelona.
- Chianini F, Majo N, Segales J, Dominguez J and Domingo M (2001) Immunohistological study of the immune system cells in paraffin-embedded tissues of conventional pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 82, 245-255.
- Chu RM, Glock RD and Ross RF (1979) Gut-associated lymphoid tissues of young swine with emphasis on dome epithelium of aggregated lymph nodules (Peyer's patches) of the small intestine. *Am J Vet Res* 40, 1720-1728.
- D.E.M. (2000) *Diccionari enciclopèdic de medicina.*, 2a edició. ed. Barcelona.: Enciclopèdia catalana.
- Davis ME, Brown DC, Baker A, Bos K, Dirain MS, Halbrook E, C.V. M and Rehberger T (2006) Effect of direct-fed microbial antibiotic supplementation on gastrointestinal microflora, morphology and immune populations of weanling pigs. *10th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs* pp.34.
- Davis ME, Brown DC, C.V. M, Rehberger T, Touchette KL and Coalson JA (2003) Influence of *Lactobacillus brevis* 1E-1 on the gastrointestinal microflora, gut morphology, and pig performance pre- and post-weaning. *9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs* 2, 265.
- Davis WC, Zuckermann FA, Hamilton MJ, Barbosa JI, Saalmuller A, Binns RM and Licence ST (1998) Analysis of monoclonal antibodies that recognize gamma delta T/null cells. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 305-316.
- Deitch EA (1993) Nutrition and the gut mucosal barrier. *Curr Opin Gen Surg*, 85-91.
- Delves PJ and Roitt IM (2000a) The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343, 37-49.
- Delves PJ and Roitt IM (2000b) The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343, 108-117.

- Demas GE, Chefer V, Talan MI and Nelson RJ (1997) Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am J Physiol* 273, R1631-1637.
- Denham S, Shimizu M, Bianchi AT, Zwart RJ, Carr MM and Parkhouse RM (1994) Monoclonal antibodies recognising differentiation antigens on porcine B cells. *Vet Immunol Immunopathol* 43, 259-267.
- Denham S, Zwart RJ, Whittall JT, Pampusch M, Corteyn AH, Bianchi AT, Murtaugh MP, Parkhouse RM, Tlaskalova H, Sinkora J, Sinkora M and Rehakova Z (1998) Monoclonal antibodies putatively identifying porcine B cells. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 317-328.
- Deplancke B and Gaskins HR (2001) Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* 73, 1131S-1141S.
- Deprez P, Van den Hende C, Muylle E and Oyaert W (1986) The influence of the administration of sow's milk on the post-weaning excretion of hemolytic *E. coli* in the pig. *Vet Res Commun* 10, 469-478.
- Didry N, Dubreuil L and Pinkas M (1994) Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm Acta Helv* 69, 25-28.
- Directiva 86/609/CEE del Consejo, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científico.
- Domenechini C, Di Giancamillo A, Savoini G, Paratte R, Bontempo V and Dell'Orto V (2004) Structural patterns of swine ileal mucosa following L-glutamine and nucleotide administration during the weaning period. An histochemical and histometrical study. *Histol Histopathol* 19, 49-58.
- Dominguez J, Ezquerro A, Alonso F, McCullough K, Summerfield A, Bianchi A, Zwart RJ, Kim YB, Blecha F, Eicher S, Murtaugh M, Pampusch M and Burger K (1998) Porcine myelomonocytic markers: summary of the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 329-341.
- Dongowski G, Huth M and Gebhardt E (2003) Steroids in the intestinal tract of rats are affected by dietary-fibre-rich barley-based diets. *Br J Nutr* 90, 895-906.
- Dorman HJ and Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88, 308-316.
- Dreau D, Lalles JP, LeJan C, Toullec R and Salmon H (1995) Hypersensitivity to soybean proteins in early weaned piglets: humoral and cellular components. *Adv Exp Med Biol* 371B, 865-869.
- Dreau D, Lalles JP, Philouze-Rome V, Toullec R and Salmon H (1994) Local and systemic immune responses to soybean protein ingestion in early-weaned pigs. *J Anim Sci* 72, 2090-2098.
- Drut R and Drut RM (1992) Hyperplasia of lymphoglandular complexes in colon segments in Hirschsprung's disease: a form of diversion colitis. *Pediatr Pathol* 12, 575-581.
- Duncan AL and Lysons RJ (1987) Diagnosis of colitis in pigs. *Vet Rec* 121, 430.
- Dunsford BR and Haensly WE (1991) Effect of dietary cholesterol and carbohydrate on small intestinal structure and function in prematurely weaned rats. *J Anim Sci* 69, 2894-2903.
- Dunsford BR, Haensly WE and Knabe DA (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.

- Dunsford BR, Knabe DA and Haensly WE (1989) Effect of dietary soybean meal on the microscopic anatomy of the small intestine in the early-weaned pig. *J Anim Sci* 67, 1855-1863.
- Durmic Z, Pethick DW, Pluske JR and Hampson DJ (1998) Changes in bacterial populations in the colon of pigs fed different sources of dietary fibre, and the development of swine dysentery after experimental infection. *J Appl Microbiol* 85, 574-582.
- Dyce KM, Sack WO and Wensing CJG (2002) The abdomen of the pig. In *Textbook of Veterinary Anatomy*, pp. 776-785: Saunders.
- Ebert EC (1998) Tumour necrosis factor- α enhances intraepithelial lymphocyte proliferation and migration. *Gut* 42, 650-655.
- Edwards CA and Parret AM (2002) Intestinal flora during the first months of life: new prospective. *Br J Nutr* 88, S11-S18.
- Eftimiadi C, Valente S, Mangiante S and Ferrarini M (1995) Butyric acid, a metabolic end product of anaerobic bacteria, inhibits B-lymphocyte function. *Minerva Stomatol* 44, 445-447.
- Englyst H and Macfarlane GT (1987) Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 95, 163-171.
- Englyst HN, Kingman SM and Cummings JH (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur J Clin Nutr* 46 Suppl 2, S33-50.
- Evans DL and Jaso-Friedmann L (1993) Natural killer (NK) cells in domestic animals: phenotype, target cell specificity and cytokine regulation. *Vet Res Commun* 17, 429-447.
- Evensen O (1993) An immunohistochemical study on the cytogenetic origin of pulmonary multinucleate giant cells in porcine dermatosis vegetans. *Vet Pathol* 30, 162-170.
- Fagarasan S and Honjo T (2004) Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. *Curr Opin Immunol* 16, 277-283.
- FAO/OIE/WHO, 2003. 1st Joint Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment, Geneva, <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/nov2003/en>.
- FAO/WHO, 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.
- Fernandez F, Hinton M and Van Gils B (2002) Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to Salmonella Enteritidis colonization. *Avian Pathol* 31, 49-58.
- Field CJ, McBurney MI, Massimino S, Hayek MG and Sunvold GD (1999) The fermentable fiber content of the diet alters the function and composition of canine gut associated lymphoid tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 72, 325-341.
- Fiocchi C (1998) Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115, 182-205.
- Fontaine N, Meslin JC, Lory S and Andrieux C (1996) 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* 75, 881-892.
- Francesc O, Brufau J and Badiola I (2002) Efectos de la dieta sobre la integridad intestinal. *II Congreso de Producción y Sanidad Animal*, p.43.
- François AC (1962) Mode of action of antibiotics on growth. World Review of Nutrition and Dietetics, 3: 21-64. 1962. . *World Rev Nutr Diet* 3, 21-64.

- Frankel WL, Zhang W, Singh A, Klurfeld DM, Don S, Sakata T, Modlin I and Rombeau JL (1994) Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology* 106, 375-380.
- Franklin ST, Young JW and Nonnecke BJ (1991) Effects of ketones, acetate, butyrate, and glucose on bovine lymphocyte proliferation. *J Dairy Sci* 74, 2507-2514.
- Galfi P and Bokori J (1990) Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. *Acta Vet Hung* 38, 3-17.
- Galina-Pantoja L, Mellencamp MA, Bastiaansen J, Cabrera R, Solano-Aguilar G and Lunney JK (2006) Relationship between immune cell phenotypes and pig growth in a commercial farm. *Anim Biotechnol* 17, 81-98.
- Gaskins HR (1998) *Immunological development and mucosal defense in the pig intestine*. In: Wiseman J, Varley MA, Chadwick JP. Eds. Progress in Pig Science. Thrumpton, UK: Nottingham University Press.
- Gaskins HR (2003) The commensal microbiota and development of mucosal defense in the mammalian intestine. *9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. 1.
- Gatnau R, Paul PS and Zimmerman DR (1989) Spray dried porcine plasma as a source of immunoglobulins for newborn piglets. *J Anim Sci* 67 (Suppl. 1), 244 (abs.).
- Gatnau R and Zimmerman DR (1991) Determination of optimum levels of spray dried porcine plasma in diets for weanling pigs. *J Anim Sci* 69, 369 (abs.).
- Gibson GR and Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401-1412.
- Glitsso LV, Brunsgaard G, Hojsgaard S, Sandstrom B and Bach Knudsen KE (1998) Intestinal degradation in pigs of rye dietary fibre with different structural characteristics. *Br J Nutr* 80, 457-468.
- Goering HK and Van Soest PJ (1970) *Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications)*. Washington, DC: ARS and USDA.
- Goodlad RA, Ratcliffe B, Fordham JP and Wright NA (1989) Does dietary fibre stimulate intestinal epithelial cell proliferation in germ free rats? *Gut* 30, 820-825.
- Goodlad RA, Ratcliffe B, Lee CY and Wright NA (1995) Dietary fibre and the gastrointestinal tract: differing trophic effects on muscle and mucosa of the stomach, small intestine and colon. *Eur J Clin Nutr* 49 Suppl 3, S178-181.
- Goodlad RA and Wright NA (1983) Effects of addition of kaolin or cellulose to an elemental diet on intestinal cell proliferation in the mouse. *Br J Nutr* 50, 91-98.
- Govers MJ, Gannon NJ, Dunshea FR, Gibson PR and Muir JG (1999) Wheat bran affects the site of fermentation of resistant starch and luminal indexes related to colon cancer risk: a study in pigs. *Gut* 45, 840-847.
- Govers MJ, Lapre JA, De Vries HT and Van der Meer R (1993) Dietary soybean protein compared with casein damages colonic epithelium and stimulates colonic epithelial proliferation in rats. *J Nutr* 123, 1709-1713.
- Graham H and Aman P (1986) The pig as a model in dietary fiber digestion studies. *Scand J Gastroenterol* 22, 55-61.
- Gu X, Li D and She R (2002) Effect of weaning on small intestinal structure and function in the piglet. *Arch Tierernahr* 56, 275-286.
- Guarner F (2006) Prebiotics and mucosal barrier function. *J Nutr* 136, 2269; author reply 2270-2261.
- Guilford WG, Center SA, Strombeck DR, Williams DA and Meyer DJ (1996) *Strombeck's small animal Gastroenterology*, 3rd. Edition ed. Tokyo: W.B. Saunders Company.

- Guy-Grand D and Vassalli P (1991) Origin of gut intraepithelial lymphocytes. *Immunol Res* 10, 296-301.
- Hall GA and Byrne TF (1989) Effects of age and diet on small intestinal structure and function in gnotobiotic piglets. *Res Vet Sci* 47, 387-392.
- Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T, Kiyono H, Yamamoto H and Ishikawa H (2002) Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* 168, 57-64.
- Hampson DJ (1986) Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Res Vet Sci* 40, 32-40.
- Hass R, Busche R, Luciano L, Reale E and Engelhardt WV (1997) Lack of butyrate is associated with induction of Bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig. *Gastroenterology* 112, 875-881.
- Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E and Shires J (2001) Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2, 997-1003.
- Hayday AC, Roberts S and Ramsburg E (2000) gammadelta cells and the regulation of mucosal immune responses. *Am J Respir Crit Care Med* 162, S161-163.
- Hedemann MS, Eskildsen M, Laerke HN, Pedersen C, Lindberg JE, Laurinen P and Knudsen KE (2006) Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties. *J Anim Sci* 84, 1375-1386.
- Hedemann MS, Mikkelsen LL, Naughton PJ and Jensen BB (2005) Effect of feed particle size and feed processing on morphological characteristics in the small and large intestine of pigs and on adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 in the ileum in vitro. *J Anim Sci* 83, 1554-1562.
- Higgins JA (2004) Resistant starch: metabolic effects and potential health benefits. *J AOAC Int* 87, 761-768.
- Hiss S and Sauerwein H (2003) Influence of dietary ss-glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 87, 2-11.
- Hizukuri S (1996) *Starch: analytical aspects*. En: *Carbohydrates in food*, Eliasson AC ed. New York, EEUU: Marcel Dekker.
- Holtmeier W, Kaller J, Geisel W, Pabst R, Caspary WF and Rothkotter HJ (2002) Development and compartmentalization of the porcine TCR delta repertoire at mucosal and extraintestinal sites: the pig as a model for analyzing the effects of age and microbial factors. *J Immunol* 169, 1993-2002.
- Hontecillas R, Wannemeulher MJ, Zimmerman DR, Hutto DL, Wilson JH, Ahn DU and Bassaganya-Riera J (2002) Nutritional regulation of porcine bacterial-induced colitis by conjugated linoleic acid. *J Nutr* 132, 2019-2027.
- Hopwood DE, Pethick DW, Pluske JR and Hampson DJ (2004) Addition of pearl barley to a rice-based diet for newly weaned piglets increases the viscosity of the intestinal contents, reduces starch digestibility and exacerbates post-weaning colibacillosis. *Br J Nutr* 92, 419-427.
- Howell NK and Lawrie RA (1983) Functional aspects of blood plasma proteins. I. Separation and characterisation. *J Food Technol* 18, 747-762.
- Imoto S and Namioka S (1978) VFA production in the pig large intestine. *J Anim Sci* 47, 467-478.
- Ishizuka S, Tanaka S, Xu H and Hara H (2004) Fermentable dietary fiber potentiates the localization of immune cells in the rat large intestinal crypts. *Exp Biol Med (Maywood)* 229, 876-884.

- ISU (1996) *Life Cycle Swine Nutrition*, 7th. edition ed: Iowa State University.
- Jacobasch G, Schmiedl D, Kruschewski M and Schmehl K (1999) Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis* 14, 201-211.
- Jaeger LA, Lamar CH and Turek JJ (1989) Lectin binding to small intestinal goblet cells of newborn, suckling, and weaned pigs. *Am J Vet Res* 50, 1984-1987.
- James PS (1993) The gastrointestinal mucosal immune system. *Digestive diseases* 1, 146-156.
- Janeway CA (2001) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. The development and survival of lymphocytes.*, Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. (Eds.) ed. New York: Garland Publishing.
- Janne P, Carpentier Y and Willems G (1977) Colonic mucosal atrophy induced by a liquid elemental diet in rats. *Am J Dig Dis* 22, 808-812.
- Jenkins AP and Thompson RP (1994) Mechanisms of small intestinal adaptation. *Dig Dis* 12, 15-27.
- Jensen BB (1998) The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J Anim Feed Sci* 7, 45-64.
- Jensen BB, Hojberg O, Mikkelsen LL, Hedemann MS and Canibe N (2003) Enhancing intestinal function to treat and prevent intestinal disease. *9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs* 1, 103-120.
- Jiang R, Chang X, Stoll B, Fan MZ, Arthington J, Weaver E, Campbell J and Burrin DG (2000) Dietary plasma protein reduces small intestinal growth and lamina propria cell density in early weaned pigs. *J Nutr* 130, 21-26.
- Jin L, Reynolds LP, Redmer DA, Caton JS and Crenshaw JD (1994) Effects of dietary fiber on intestinal growth, cell proliferation, and morphology in growing pigs. *J Anim Sci* 72, 2270-2278.
- Joling P, Bianchi AT, Kappe AL and Zwart RJ (1994) Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen, and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age. *Vet Immunol Immunopathol* 40, 105-117.
- Jorgensen H, Zhao XQ and Eggum BO (1996) The influence of dietary fibre and environmental temperature on the development of the gastrointestinal tract, digestibility, degree of fermentation in the hind-gut and energy metabolism in pigs. *Br J Nutr* 75, 365-378.
- Jouany JP (1982) Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sciences des Aliments* 2, 131-144.
- Kagnoff MF (1993) Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterology* 105, 1275-1280.
- Kamel C (2001) Tracing modes of action and the roles of plant extracts in non-ruminants. *Recent Adv Anim Nutr*, 135-150.
- Kastel R, Revajova V, Magic D, Pistl J, Levkut M, Bindas L, Sajbidor J and Horvath M (1999) Effect of oil containing n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) on the immune response and growth factors in piglets. *Acta Vet Hung* 47, 325-334.
- Katayama M, Xu D, Specian RD and Deitch EA (1997) Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation: effects of protein malnutrition and endotoxin in rats. *Ann Surg* 225, 317-326.
- Kats LJ, Nelssen, J.L., Tokach MD, Goodband RD, Hansen JA and Laurin JL (1994) The effect of spray-dried porcine plasma on growth performance in early-weaned pigs. *J Anim Sci* 75 (Suppl. 1), 58 (abs.).

- Kayser O, Kolodziej H and Kiderlen AF (2001) Immunomodulatory principles of *Pelargonium sidoides*. *Phytother Res* 15, 122-126.
- Kelsall BL and Strober W (1996) Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 183, 237-247.
- Kelley DS and Daudu PA (1993) Fat intake and immune response. *Prog Food Nutr Sci* 17, 41-63.
- Kelly D, Smyth JA and McCracken KJ (1990) Effect of creep feeding on structural and functional changes of the gut of early weaned pigs. *Res Vet Sci* 48, 350-356.
- Kelly D, Smyth JA and McCracken KJ (1991a) 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* 65, 169-180.
- Kelly D, Smyth JA and McCracken KJ (1991b) Digestive development of the early-weaned pig. 2. Effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. *Br J Nutr* 65, 181-188.
- Kerr BJ, Yen JT, Nienaber JA and Easter RA (2003) Influences of dietary protein level, amino acid supplementation and environmental temperature on performance, body composition, organ weights and total heat production of growing pigs. *J Anim Sci* 81, 1998-2007.
- Key FB, McClean D and Mathers JC (1996) Tissue hypertrophy and epithelial proliferation rate in the gut of rats fed on bread and haricot beans (*Phaseolus vulgaris*). *Br J Nutr* 76, 273-286.
- Kim CS, Kawada T, Kim BS, Han IS, Choe SY, Kurata T and Yu R (2003) Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cell Signal* 15, 299-306.
- King MR, Kelly D, Morel PCH and Pluske JR (2003) Weaning the pig: concepts and consequences. In *Aspects of intestinal immunity in the pig around weaning*, pp. 219-258 [JR Pluske, J Le Dividich and MW Vergesten, editors]. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Kirkwood TN, Huang SX, McFall M and Aherne FX (2000) Dietary factors do not influence the clinical expression of swine dysentery. *Swine Health Prod* 8, 73-76.
- Koh WS, Yoon SY, Kwon BM, Jeong TC, Nam KS and Han MY (1998) Cinnamaldehyde inhibits lymphocyte proliferation and modulates T-cell differentiation. *Int J Immunopharmacol* 20, 643-660.
- Kong KF, Y.L. Y, Liu HJ, Yin FG, Li TJ, Huang RL, Kang P, Xing FF, Wu GY, M.Z. F, Yang CB and He QH (2006) Dietary supplementation with the ultra-fine powder of Chinese herbs enhances cellular and humoral immunities in early weaned piglets. *10th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs* pp.9.
- Koopmans SJ, Guzik AC, van der Meulen J, Dekker R, Kogut J, Kerr BJ and Southern LL (2006) Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets. *J Anim Sci* 84, 963-971.
- Kritas SK and Morrison RB (2007) Effect of orally administered *Lactobacillus casei* on porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus vaccination in pigs. *Vet Microbiol* 119, 248-255.
- Kudoh K, Shimizu J, Ishiyama A, Wada M, Takita T, Kanke Y and Innami S (1999) Secretion and excretion of immunoglobulin A to cecum and feces differ with type of indigestible saccharides. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 45, 173-181.

- Kudoh K, Shimizu J, Wada M, Takita T, Kanke Y and Innami S (1998) Effect of indigestible saccharides on B lymphocyte response of intestinal mucosa and cecal fermentation in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 44, 103-112.
- Kulkarni AD, Fanslow WC, Drath DB, Rudolph FB and Van Buren CT (1986) Influence of dietary nucleotide restriction on bacterial sepsis and phagocytic cell function in mice. *Arch Surg* 121, 169-172.
- Kuo S, El Guindy A, Panwala CM, Hagan PM and Camerini V (2001) Differential appearance of T cell subsets in the large and small intestine of neonatal mice. *Pediatr Res* 49, 543-551.
- Lamm DL and Riggs DR (2001) Enhanced immunocompetence by garlic: role in bladder cancer and other malignancies. *J Nutr* 131, 1067S-1070S.
- Langendijk P, Bolhuis JE and Laurensen BFA (2006) Pre- and postnatal exposure to garlic and anised flavor influences pre- and postweaning feed intake. *10th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*.
- Langkamp-Henken B, Glezer JA and Kudsk KA (1992) Immunologic structure and function of the gastrointestinal tract. *Nutr Clin Pract* 7, 100-108.
- Lapre JA, De Vries HT, Koeman JH and Van der Meer R (1993) The antiproliferative effect of dietary calcium on colonic epithelium is mediated by luminal surfactants and dependent on the type of dietary fat. *Cancer Res* 53, 784-789.
- Law GK, Bertolo RF, Adjiri-Awere A, Pencharz PB and Ball RO (2007) Adequate Oral Threonine Is Critical for Mucin Production and Gut Function in Neonatal Piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Lawlor PG, Food C, Fitzpatrick E, Lynch PB, Caffrey PJ and Brophy PO (2000) The effect of weaning on the intestinal morphology of young piglets. *8th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*.
- Le Dividich J and Herpin P (1994) Effects of climatic conditions on the performance, metabolism and health status of weaned piglets: a review. *Livest. Prod. Sci.* 38:79-90. *Livest Prod Sci* 38.
- Le Goff G, Noblet J and Cherbut C (2003) Intrinsic ability of the faecal microbial flora to ferment dietary fibre at different growth stages of pigs. *Livest Prod Sci* 81, 75-87.
- Le Leu RK, Brown IL, Hu Y, Bird AR, Jackson M, Esterman A and Young GP (2005) A synbiotic combination of resistant starch and Bifidobacterium lactis facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *J Nutr* 135, 996-1001.
- Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M and Moller K (2002) Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* 68, 673-690.
- Li DF, Nelssen JL, Reddy PG, Blecha F, Hancock JD, Allee GL, Goodband RD and Klemm RD (1990a) Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. *J Anim Sci* 68, 1790-1799.
- Li DF, Nelssen JL, Reddy PG, Blecha F, Klemm R and Goodband RD (1991) Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs. *J Anim Sci* 69, 4062-4069.
- Li DF, Thaler RC, Nelssen JL, Harmon DL, Allee GL and Weeden TL (1990b) Effect of fat sources and combinations on starter pig performance, nutrient digestibility and intestinal morphology. *J Anim Sci* 68, 3694-3704.
- Li J, Li DF, Xing JJ, Cheng ZB and Lai CH (2006) Effects of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and

- somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Anim Sci* 84, 2374-2381.
- Lieblier-Tenorio EM and Pabst R (2006) MALT structure and function in farm animals. *Vet Res* 37, 257-280.
- Lim BO, Yamada K, Nonaka M, Kuramoto Y, Hung P and Sugano M (1997) Dietary fibers modulate indices of intestinal immune function in rats. *J Nutr* 127, 663-667.
- Lim CC, Ferguson LR and Tannock GW (2005) Dietary fibres as "prebiotics": implications for colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res* 49, 609-619.
- Lima DQ (1997) Efecto de los galactomananos sobre la colonización de ciegos de pollos por *Salmonella enteritidis* y sobre la disponibilidad de nutrientes. Tesis Doctoral, Universitat de Lleida.
- Lin HC and Visek WJ (1991) Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. *J Nutr* 121, 887-893.
- Lindecrona RH, Jensen TJ, Jensen BB, Leser TD, Jiufeng S and Møller J (2003) The influence of diet on the development of swine dysentery upon experimental infection. *Anim Sci* 76, 81-87.
- Lizardo R, Mas F, Torrallardona D and Brufau J (2001) Effect of carob pulp powder on performance and health of weaning pig. *52th EAAP Annual Meeting*.
- Lopez-Pedrosa JM, Ramirez M, Torres MI and Gil A (1999) Dietary phospholipids rich in long-chain polyunsaturated fatty acids improve the repair of small intestine in previously malnourished piglets. *J Nutr* 129, 1149-1155.
- Lopez Bote CJ, Isabel B and Flores JM (2001) Effect of dietary linoleic acid concentration and vitamin E supplementation on cell desquamation and susceptibility to oxidative damage of pig jejunal mucosa. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 85, 22-28.
- Lowry SR (1992) Use and misuse of multiple comparisons in animal experiments. *J Anim Sci* 70, 1971-1977.
- Luciano L, Hass R, Busche R, von Engelhardt W and Reale E (1996) Withdrawal of butyrate from the colonic mucosa triggers "mass apoptosis" primarily in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Cell Tissue Res* 286, 81-92.
- Lunney JK (1994) Current status of the swine leukocyte antigen complex. *Vet Immunol Immunopathol* 43, 19-28.
- Lunney JK and Pescovitz MD (1987) Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. *Vet Immunol Immunopathol* 17, 135-144.
- MacLennan IC, Gulbranson-Judge A, Toellner KM, Casamayor-Palleja M, Chan E, Sze DM, Luther SA and Orbea HA (1997) The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol Rev* 156, 53-66.
- Macpherson AJ, GeuKing MB and McCoy KD (2005) Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology* 115, 153-162.
- Madara JL (1989) Loosening tight junctions. Lessons from the intestine. *J Clin Invest* 83, 1089-1094.
- Makkink CA, Negulescu GP, Qin G and Verstegen MW (1994) Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets. *Br J Nutr* 72, 353-368.
- Maloy KJ and Powrie F (2001) Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2, 816-822.

- Manzanilla EG (2006) Evaluation of in-feed additives in early-weaned pigs: Study of the XTRACT, a plant extracts based additive. PhD Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Manzanilla EG, Nofrarias M, Anguita M, Castillo M, Perez JF, Martin-Orue SM, Kamel C and Gasa J (2006) Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J Anim Sci* 84, 2743-2751.
- Manzanilla EG, Perez JF, Martin M, Kamel C, Baucells F and Gasa J (2004) Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J Anim Sci* 82, 3210-3218.
- Manzano M, Abadia-Molina AC, Garcia-Olivares E, Gil A and Rueda R (2002) Absolute counts and distribution of lymphocyte subsets in small intestine of BALB/c mice change during weaning. *J Nutr* 132, 2757-2762.
- Manzano M, Abadia-Molina AC, Olivares EG, Gil A and Rueda R (2003) Dietary nucleotides accelerate changes in intestinal lymphocyte maturation in weanling mice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 37, 453-461.
- Marinho MC, Pinho MA, Lordelo LF, Cunha LF and Freire JPB (2006) Effect of prebiotic or probiotic supplementation and ileo rectal anastomosis on intestinal morphology of weaned pigs *10th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, 33.
- Markowska-Daniel I, Szczotka A, Bednarek D and Pejsak Z (2003) Preliminary study of the influence of plasma proteins on immunological and production parameters in pigs. *Pol J Vet Sci* 6, 275-277.
- Martínez-Puig D, Castillo M, Nofrarias M, Creus E and Pérez JF (in press) Long-term effects of feeding large amounts of resistant starch on the digestive tract: a study in pigs. *J Sci Food Agr (accepted)*.
- Martínez-Puig D (2006) Implicaciones digestivas i metabòlicas del consum de almidón resistente en el cerdo, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Martínez-Puig D, Borda E, Manzanilla EG, Chetrit C and Pérez JF (2005) Dietary nucleotides supplementation alleviates villus atrophy and improves immune response of early weaned piglets. *J Anim Sci* 83: suppl. 1.
- Martínez-Puig D, Perez JF, Castillo M, Andaluz A, Anguita M, Morales J and Gasa J (2003) Consumption of raw potato starch increases colon length and fecal excretion of purine bases in growing pigs. *J Nutr* 133, 134-139.
- Mathers JC (1991) Digestion of non-starch polysaccharides by non-ruminant omnivores. *Proc Nutr Soc* 50, 161-172.
- McBurney MI, Horvath PJ, Jeraci JL and Van Soest PJ (1985) Effect of in vitro fermentation using human faecal inoculum on the water-holding capacity of dietary fibre. *Br J Nutr* 53, 17-24.
- McCance RA (1974) The effect of age on the weights and lengths of pigs' intestines. *J Anat* 117, 475-479.
- McCracken BA, Gaskins HR, Ruwe-Kaiser PJ, Klasing KC and Jewell DE (1995) Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning. *J Nutr* 125, 2838-2845.
- McCracken BA, Spurlock ME, Roos MA, Zuckermann FA and Gaskins HR (1999) Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J Nutr* 129, 613-619.
- McCracken BA, Zijlstra RT, Donovan SM, Odle J, Lien EL and Gaskins HR (1998) Neither intact nor hydrolyzed soy proteins elicit intestinal inflammation in neonatal piglets. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 22, 91-97.

- McCracken VJ and Lorenz RG (2001) The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol* 3, 1-11.
- McCullogh JS, Ratcliffe B, Mandir N, Carr KE and Goodlad RA (1998) Dietary fibre and intestinal microflora: effects on intestinal morphometry and crypt branching. *Gut* 42, 799-806.
- McDonald DE, Pethick DW, Mullan BP and Hampson DJ (2001) Increasing viscosity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in newly-weaned pigs. *Br J Nutr* 86, 487-498.
- McNeal MM, Rae MN, Conner ME and Ward RL (1998) Stimulation of local immunity and protection in mice by intramuscular immunization with triple- or double-layered rotavirus particles and QS-21. *Virology* 243, 158-166.
- McOrist S and Neef N (1996) The large intestine. In *Pathology of the pig, a diagnostic guide*, pp. 89-108 [LD Sims, Glastonbury, J.R.W., editor]: Agriculture Victoria.
- Meisel H (1997) Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43, 119-128.
- Mentschel J and Claus R (2003) Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. *Metabolism* 52, 1400-1405.
- Meyer TA, Lindemann MD, Schillo KK and Cromwell GL (2003) Effects of n6/n3 fatty acid ratios in young pig diets on performance and immune function. *J. Anim. Sci.* 81(Suppl. 1):47.
- Miceli MC and Parnes JR (1993) Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv Immunol* 53, 59-122.
- Middleton E, Jr. and Kandaswami C (1992) Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol* 43, 1167-1179.
- Mikkelsen LL, Naughton PJ, Hedemann MS and Jensen BB (2004) Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70, 3485-3492.
- Milner JA (2001) A historical perspective on garlic and cancer. *J Nutr* 131, 1027S-1031S.
- Miller BG, Newby TJ, Stokes CR and Bourne FJ (1984) Influence of diet on postweaning malabsorption and diarrhoea in the pig. *Res Vet Sci* 36, 187-193.
- Miller ER and Ullrey DE (1987) The pig as a model for human nutrition. *Annu Rev Nutr* 7, 361-382.
- Miura T, Ohno N, Miura NN, Adachi Y, Shimada S and Yadomae T (1999) Antigen-specific response of murine immune system toward a yeast beta-glucan preparation, zymosan. *FEMS Immunol Med Microbiol* 24, 131-139.
- Montagne L, Boudry G, Favier C, Le Huerou-Luron I, Lalles JP and Seve B (2007) Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. *Br J Nutr* 97, 45-57.
- Morales R, Francesch M, Auclair E, Garcia F, Ducatell R, Van Immersel F, Andrea N and Brufau J (2005) Effect of yeast cell wall on performance, intestinal morphology and immune response of broilers chickens fed low or high non-starch polysaccharides diets. In: "Antimicrobial Growth Promoters: Worldwide Ban on the Horizon?"
- Mouricout M, Petit JM, Carias JR and Julien R (1990) Glycoprotein glycans that inhibit adhesion of *Escherichia coli* mediated by K99 fimbriae: treatment of experimental colibacillosis. *Infect Immun* 58, 98-106.

- Mowat AM and Viney JL (1997) The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156, 145-166.
- Nabuurs MJ, Hoogendoorn A, van der Molen EJ and van Osta AL (1993) Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in The Netherlands. *Res Vet Sci* 55, 78-84.
- Nagai T, Ishizuka S, Hara H and Aoyama Y (2000) Dietary sugar beet fiber prevents the increase in aberrant crypt foci induced by gamma-irradiation in the colorectum of rats treated with an immunosuppressant. *J Nutr* 130, 1682-1687.
- Ndiweni N and Finch JM (1995) Effects of in vitro supplementation of bovine mammary gland macrophages and peripheral blood lymphocytes with alpha-tocopherol and sodium selenite: implications for udder defences. *Vet Immunol Immunopathol* 47, 111-121.
- Newby TJ, Stokes CR, Huntley J, Evans P and Bourne FJ (1979) The immune response of the pig following oral immunisation with soluble protein. *Vet Immunol Immunopathol* 1, 37-47.
- Newman MJ, Wu JY, Gardner BH, Munroe KJ, Leombruno D, Recchia J, Kensil CR and Coughlin RT (1992) Saponin adjuvant induction of ovalbumin-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses. *J Immunol* 148, 2357-2362.
- Newmark HL and Lupton JR (1990) Determinants and consequences of colonic luminal pH: implications for colon cancer. *Nutr Cancer* 14, 161-173.
- Noakes M, Clifton PM, Nestel PJ, Le Leu R and McIntosh G (1996) Effect of high-amylose starch and oat bran on metabolic variables and bowel function in subjects with hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr* 64, 944-951.
- NRC (1998) *Nutrient requirements of swine, 10th edition.*, 10th Ed. ed. Washington, D.C. (USA): The National Academy Press.
- Nyachoti CM, Omogbenigun FO, Rademacher M and Blank G (2006) Performance responses and indicators of gastrointestinal health in early-weaned pigs fed low-protein amino acid-supplemented diets. *J Anim Sci* 84, 125-134.
- O'Leary AD and Sweeney EC (1986) Lymphoglandular complexes of the colon: structure and distribution. *Histopathology* 10, 267-283.
- Ordeix L, Fondevila D, de Mora F, Fondati A and Ferrer L (2001) Assessment of proliferative activity of canine dermal mast cells by bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen labelling. *Vet Dermatol* 12, 321-325.
- Ouhida I, Perez JF and Gasa J (2002) Soybean (Glycine max) cell wall composition and availability to feed enzymes. *J Agric Food Chem* 50, 1933-1938.
- Owen KQ, Nelssen JL, Goodband RD, Tokach MD, Friesen KG, Richert BT, Smith JW and Russell LE (1995) Effects of various fractions of spray-dried porcine plasma on performance of early weaned pigs. *J Anim Sci* 73, 81 (abs.).
- Owusu-Asiedu A, Baidoot SK, Nyachoti CM and Marquardt RR (2002) Response of early-weaned pigs to spray-dried porcine or animal plasma-based diets supplemented with egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Anim Sci* 80, 2895-2903.
- Pabst R and Rothkotter HJ (1999) Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 72, 167-173.
- Page SW (2003) *The role of enteric antibiotics in livestock production*. Canberra, Australia: Avcare Limited.
- Pappaterra GJ (2002) Efecto in vitro e in vivo de un inmunomodulador compuesto por LPS de *E.Coli* y *propionibacterium granulosum* sobre el sistema immune del cerdo., Universitat Autònoma de Barcelona.

- Partanen KH and Mroz Z (1999) Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr Res Rev* 12.
- Partridge GG (2001) The role and efficacy of carbohydrase enzymes in pig nutrition. In: *Enzymes in farm animal nutrition* pp. 161-198 [MR Bedford and G Partridge, editors]. Marlborough, Wiltshire, UK.
- Paubert-Braquet M, Xiao-Hu G, Gaudichon C, Hedef N, Serikoff A, Bouley C, Bonavida B and Braquet P (1995) Enhancement of host resistance against *Salmonella typhimurium* in mice fed a diet supplemented with yogurt or milks fermented with various *Lactobacillus casei* strains. *Int J Immunother* 11, 153-161.
- Payler DK, Pomare EW, Heaton KW and Harvey RF (1975) The effect of wheat bran on intestinal transit. *Gut* 16, 209-213.
- Pell JD, Gee JM, Wortley GM and Johnson IT (1992) Dietary corn oil and guar gum stimulate intestinal crypt cell proliferation in rats by independent but potentially synergistic mechanisms. *J Nutr* 122, 2447-2456.
- Pell JD, Johnson IT and Goodlad RA (1995) The effects of and interactions between fermentable dietary fiber and lipid in germfree and conventional mice. *Gastroenterology* 108, 1745-1752.
- Pérez-Bosque A (2005) Efectes de la suplementació dietètica amb proteïnes plasmàtiques sobre les propietats de barrera i de defensa de la mucosa intestinal en un model d'inflamació. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Perez-Bosque A, Pelegri C, Vicario M, Castell M, Russell L, Campbell JM, Quigley JD, 3rd, Polo J, Amat C and Moreto M (2004) Dietary plasma protein affects the immune response of weaned rats challenged with *S. aureus* Superantigen B. *J Nutr* 134, 2667-2672.
- Pérez JF and Gasa J (2002) Importancia de los carbohidratos de la dieta y de la utilización de aditivos sobre la salud intestinal del ganado porcino. *XVIII Curso de especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal.* , 53-70.
- Perez R, Stevenson F, Johnson J, Morgan M, Erickson K, Hubbard NE, Morand L, Rudich S, Katznelson S and German JB (1998) Sodium butyrate upregulates Kupffer cell PGE2 production and modulates immune function. *J Surg Res* 78, 1-6.
- Pescovitz MD, Aasted B, Canals A, Dominguez J, Vizcaino JS, Pospisil R, Sinkora J, Salmon H, Valpotic I, Davis WC and et al. (1994a) Analysis of monoclonal antibodies reactive with the porcine CD2 antigen. *Vet Immunol Immunopathol* 43, 229-232.
- Pescovitz MD, Book BK, Aasted B, Dominguez J, Ezquerro A, Trebichavsky I, Novikov B, Valpotic I, Sver L, Nielsen J, Arn S, Sachs DH, Lunney JK, Boyd PC, Walker J, Lee R, Davis W, Barbosa IR, Zuckermann F and Saalmuller A (1998) Summary of workshop findings for antibodies reacting with porcine T-cells and activation antigens: results from the Second International Swine CD Workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 251-260.
- Pescovitz MD, Lunney JK and Sachs DH (1984) Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol* 133, 368-375.
- Pescovitz MD, Sakopoulos AG, Gaddy JA, Husmann RJ and Zuckermann FA (1994b) Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T-cells. *Vet Immunol Immunopathol* 43, 53-62.
- Pettigrew JE (2000) Mannan oligosaccharides effects on performance reviewed. *Feedstuffs* 25, 12-14.

- Phillips J, Muir JG, Birkett A, Lu ZX, Jones GP, O'Dea K and Young GP (1995) Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. *Am J Clin Nutr* 62, 121-130.
- Pickering LK, Granoff DM, Erickson JR, Masor ML, Cordle CT, Schaller JP, Winship TR, Paule CL and Hilty MD (1998) Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotides. *Pediatrics* 101, 242-249.
- Pie S, Lalles JP, Blazy F, Laffitte J, Seve B and Oswald IP (2004) Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* 134, 641-647.
- Piel C, Montagne L, Seve B and Lalles JP (2005) Increasing digesta viscosity using carboxymethylcellulose in weaned piglets stimulates ileal goblet cell numbers and maturation. *J Nutr* 135, 86-91.
- Pierce JL, Cromwell GL, Lindemann MD and Coffey RD (1995) Assessment of the three fractions of spray-dried porcine plasma on performance of early-weaned pigs. *J Anim Sci* 73, 81 (abs.).
- Pigman W and Horton D (1972) *Structure and stereochemistry of the monosaccharides. Page 1 in The carbohydrates: chemistry and biochemistry.* , W. Pigman and D. Horton. ed: Academic Press, New York.
- Pirvulescu M, Bucur E, Neculescu M, Popa AV, Popovici A, Samarineanu M, Sorescu I and Stanica A (2002) The testing of the anti-infectious properties of the product Caromic used in the diet of weaned piglets. *Report Institute Pasteur. Bucharest, Romania*, pp. 50.
- Pistoia V (1997) Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today* 18, 343-350.
- Piva A, Panciroli A, Meola E and Formigoni A (1996) Lactitol enhances short-chain fatty acid and gas production by swine cecal microflora to a greater extent when fermenting low rather than high fiber diets. *J Nutr* 126, 280-289.
- Platel K and Srinivasan K (1996) Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. *Int J Food Sci Nutr* 47, 55-59.
- Pluske JR, Durmic Z, Pethick DW, Mullan BP and Hampson DJ (1998) Confirmation of the role of rapidly fermentable carbohydrates in the expression of swine dysentery in pigs after experimental infection. *J Nutr* 128, 1737-1744.
- Pluske JR, Hampson DJ and Williams IH (1997) Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest Prod Sci* 51, 215-236.
- Pluske JR, Siba PM, Pethick DW, Durmic Z, Mullan BP and Hampson DJ (1996a) The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine. *J Nutr* 126, 2920-2933.
- Pluske JR, Thompson MJ, Atwood CS, Bird PH, Williams IH and Hartmann PE (1996b) Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. *Br J Nutr* 76, 409-422.
- Pond WG, Varel VH, Dickson JS and Haschek WM (1989) Comparative response of swine and rats to high-fiber or high-protein diets. *J Anim Sci* 67, 716-723.
- Porras M, Martin MT, Soler M and Vergara P (2004) Intestinal motor disorders associated with cyclical bacterial overgrowth in a rat model of enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G58-64.

- Privulescu M (1999) Humoral and Cellular Immune Responses to Bio-Mos in Piglets. *15th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry*.
- Quigley JD, 3rd and Wolfe TM (2003) Effects of spray-dried animal plasma in calf milk replacer on health and growth of dairy calves. *J Dairy Sci* 86, 586-592.
- Ramakrishna BS, Nance SH, Roberts-Thomson IC and Roediger WE (1990) The effects of enterotoxins and short-chain fatty acids on water and electrolyte fluxes in ileal and colonic loops in vivo in the rat. *Digestion* 45, 93-101.
- Ramos JA (1989) Estudio inmunohistológico del sistema inmune del cerdo. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Reddy AM, Seo JH, Ryu SY, Kim YS, Kim YS, Min KR and Kim Y (2004) Cinnamaldehyde and 2-methoxycinnamaldehyde as NF-kappaB inhibitors from *Cinnamomum cassia*. *Planta Med* 70, 823-827.
- Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento Europea y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.
- Reglamento (CE) n° 1292/2005 de la Comisión de 5 de agosto de 2005 por el que se modifica el anexo IV del Reglamento (CE) no 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la alimentación animal.
- Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal.
- Reglamento (CE) n° 2821/98 del Consejo de 17 de diciembre de 1998 por el que se modifica la Directiva 70/524/CEE sobre los aditivos en la alimentación animal, en lo que respecta a la revocación de la autorización de determinados antibióticos.
- Resendes AR, Majo N, Segales J, Espadamala J, Mateu E, Chianini F, Nofrarias M and Domingo M (2004) Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 99, 203-213.
- Rijnen MMJA, Dekker RA, Bakker GCM, Verjesten MWA and Schrama JW (2000) Effects of dietary fermentable carbohydrates on the empty weights of the gastrointestinal tract in growing pigs. *8th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*.
- Robert ME (2004) Microscopic colitis: pathologic considerations, changing dogma. *J Clin Gastroenterol* 38, S18-26.
- Roca-Canudas M, Anguita M, Nofrarias M, Majó N, Pérez de Rozas AM, Martín-Orue SM, Pérez JF, Pujols J, Segalés J and Badiola I (In press) Effects of different types of dietary non-digestible carbohydrates on the physico-chemical properties and microbiota of proximal colon digesta of growing pigs. *Livest Sci* 109, 85-88.
- Roediger WE (1982) Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 83, 424-429.
- Roediger WE and Millard S (1995) Selective inhibition of fatty acid oxidation in colonocytes by ibuprofen: a cause of colitis? *Gut* 36, 55-59.
- Rothkotter H, Mollhoff S and Pabst R (1999a) The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs. *Scand J Immunol* 50, 31-38.
- Rothkotter HJ, Pabst R and Bailey M (1999b) Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vet Immunol Immunopathol* 72, 157-165.

- Rothkotter HJ, Ulbrich H and Pabst R (1991) The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatr Res* 29, 237-242.
- Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN, Maher K and Tasman-Jones C (1994) Comparison of the ileal and fecal digestibility of dietary amino acids in adult humans evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *Br J Nutr* 71, 29-42.
- Rueda R, Gomez-Leon C and Gil A (2002) Ribonucleic acid hydrolysis by intestinal explants of neonatal piglets. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35, 685-690.
- Saalmuller A, Aasted B, Canals A, Dominguez J, Goldman T, Lunney JK, Maurer S, Pescovitz MD, Pospisil R, Salmon H and et al. (1994) Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD5. *Vet Immunol Immunopathol* 43, 237-242.
- Saalmuller A, Pauly T, Lunney JK, Boyd P, Aasted B, Sachs DH, Arn S, Bianchi A, Binns RM, Licence S, Whyte A, Blecha F, Chen Z, Chu RM, Davis WC, Denham S, Yang H, Whittall T, Parkhouse RM, Dominguez J, Ezquerro A, Alonso F, Horstick G, Howard C, Zuckermann F and et al. (1998) Overview of the Second International Workshop to define swine cluster of differentiation (CD) antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 207-228.
- Saalmuller A, Reddehase MJ, Buhning HJ, Jonjic S and Koszinowski UH (1987) Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur J Immunol* 17, 1297-1301.
- Saalmuller A, Weiland F and Reddehase MJ (1991) Resting porcine T lymphocytes expressing class II major histocompatibility antigen. *Immunobiology* 183, 102-114.
- Sakagami Y, Murata H, Tsutomu N, Inatomi Y, Watabe K, Iinuma M, Tanaka T, Murata J and Lang FA (2001) Inhibitory effect of plant extracts on production of verotoxin by enterohemorrhagic escherichia coli O157:H7. *J Health Sci* 47, 473-477.
- Sakata T (1987) Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br J Nutr* 58, 95-103.
- Sanchez R, Kanarek L, Koninkx J, Hendriks H, Lintermans P, Bertels A, Charlier G and Van Driessche E (1993) Inhibition of adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli cells expressing F17 fimbriae to small intestinal mucus and brush-border membranes of young calves. *Microb Pathog* 15, 207-219.
- Sancho R, Lucena C, Macho A, Calzado MA, Blanco-Molina M, Minassi A, Appendino G and Munoz E (2002) Immunosuppressive activity of capsaicinoids: capsiate derived from sweet peppers inhibits NF-kappaB activation and is a potent antiinflammatory compound in vivo. *Eur J Immunol* 32, 1753-1763.
- Santomá G (1998) Estimuladores de la inmunidad. *XIV Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal.* , 140-170.
- Satchithanandam S, Vargofcak-Apker M, Calvert RJ, Leeds AR and Cassidy MM (1990) Alteration of gastrointestinal mucin by fiber feeding in rats. *J Nutr* 120, 1179-1184.
- Scheppach W, Fabian C, Sachs M and Kasper H (1988) The effect of starch malabsorption on fecal short-chain fatty acid excretion in man. *Scand J Gastroenterol* 23, 755-759.
- Schley PD and Field CJ (2002) The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br J Nutr* 87 Suppl 2, S221-230.

- Schmidt-Wittig U, Enss ML, Coenen M, Gartner K and Hedrich HJ (1996) Response of rat colonic mucosa to a high fiber diet. *Ann Nutr Metab* 40, 343-350.
- Schraek L, Altherr B and Schmidt MFG (2006) Influence of *Bacillus cereus* probiotic on intestinal immune system of piglets. *10th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs* pp.32.
- Shan BE, Yoshida Y, Sugiura T and Yamashita U (1999) Stimulating activity of Chinese medicinal herbs on human lymphocytes in vitro. *Int J Immunopharmacol* 21, 149-159.
- Sharma R and Schumacher U (1995) Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats. *Dig Dis Sci* 40, 2532-2539.
- Sharma R and Schumacher U (2001) Carbohydrate expression in the intestinal mucosa. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 160, III-IX, 1-91.
- Siba PM, Pethick DW and Hampson DJ (1996) Pigs experimentally infected with *Serpulina hyodysenteriae* can be protected from developing swine dysentery by feeding them a highly digestible diet. *Epidemiol Infect* 116, 207-216.
- Simister NE and Rees AR (1985) Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur J Immunol* 15, 733-738.
- Simon O, Vahjen W and Schared L (2003) Micro-organisms as feed additives - Probiotics. *9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs* Volume 1 pp. 295-318.
- Sinkora J, Rehakova Z, Haverson K, Sinkora M, Dominguez J and Huang CA (2001) Monoclonal antibodies putatively recognising activation and differentiation antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 80, 143-164.
- Sisson S (1975) Porcine digestive system. In *Sisson and Grossman's The Anatomy of the Domestic Animals.*, pp. 1268-1282 [R Geety, editor]. Philadelphia: WB Saunders Company.
- Smith WJ and Nelson EP (1987) Grower scour/non-specific colitis. *Vet Rec* 121, 334.
- Soergel KH (1994) Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *Clin Invest* 72, 742-748.
- Solano-Aguilar GI, Vengroski KG, Beshah E, Douglass LW and Lunney JK (2001) Characterization of lymphocyte subsets from mucosal tissues in neonatal swine. *Dev Comp Immunol* 25, 245-263.
- Solano-Aguilar GI, Vengroski KG, Beshah E and Lunney JK (2000) Isolation and purification of lymphocyte subsets from gut-associated lymphoid tissue in neonatal swine. *J Immunol Methods* 241, 185-199.
- Solbach W, Moll H and Rollinghoff M (1991) Lymphocytes play the music but the macrophage calls the tune. *Immunol Today* 12, 4-6.
- Soltys J and Quinn MT (1999) Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infect Immun* 67, 6293-6302.
- Sollid LM (2000) Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 18, 53-81.
- Spencer J, Finn T and Isaacson PG (1986) Human Peyer's patches: an immunohistochemical study. *Gut* 27, 405-410.
- Spencer JD, Touchette KJ, Liu HJ, Allee GL, Newcomb MD, Kerley MS and Pace LW (1997) Effect of spray-dried plasma and fructooligosaccharide on nursery pig performance and small intestinal morphology of weaned pigs. *J Anim Sci* 75, 199 (Abs).
- Spreeuwenberg MAM (2002) Diet composition and gut integrity in weaned piglets., Wageningen University.

- Spring P and Privulescu M (1998) Mannan-oligosaccharide: its logical role as a natural feed additive for piglets. In *Biotechnology in the Feed Industry. 14th Alltech Annual Symposium*, 553-561.
- Spring P, Wenk C, Dawson KA and Newman KE (2000) The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poult Sci* 79, 205-211.
- Spurlock ME, Frank GR, Willis GM, Kuske JL and Cornelius SG (1997) Effect of dietary energy source and immunological challenge on growth performance and immunological variables in growing pigs. *J Anim Sci* 75, 720-726.
- Stanogias G and Pearce GR (1985) The digestion of fibre by pigs. 3. Effects of the amount and type of fibre on physical characteristics of segments of the gastrointestinal tract. *Br J Nutr* 53, 537-548.
- Stark A, Nyska A, Zuckerman A and Madar Z (1995) Changes in intestinal tunica muscularis following dietary fiber feeding in rats. A morphometric study using image analysis. *Dig Dis Sci* 40, 960-966.
- Stevens CE and Hume ID (1998) Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol Rev* 78, 393-427.
- Stokes CR and Bailey M (2000) The porcine gastrointestinal lamina propria: an appropriate target for mucosal immunisation? *J Biotechnol* 83, 51-55.
- Stoll B, Henry J, Reeds PJ, Yu H, Jahoor F and Burrin DG (1998) Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J Nutr* 128, 606-614.
- Strobel S and Mowat AM (1998) Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* 19, 173-181.
- Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Healy HP, Dawson KA, Merchen NR and Fahey GC, Jr. (2002) Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J Nutr* 132, 980-989.
- Sweeney B, Puri P and Reen DJ (2005) Modulation of immune cell function by polyunsaturated fatty acids. *Pediatr Surg Int* 21, 335-340.
- Tabeling R, Schwier S and Kamphues J (2003) Effects of different feeding and housing conditions on dry matter content and consistency of faeces in sows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 87, 116-121.
- Tanabe H, Sugiyama K, Matsuda T, Kiriya S and Morita T (2005) Small intestinal mucins are secreted in proportion to the settling volume in water of dietary indigestible components in rats. *J Nutr* 135, 2431-2437.
- Tanimoto T and Ohtsuki Y (1996) Evaluation of antibodies reactive with porcine lymphocytes and lymphoma cells in formalin-fixed, paraffin-embedded, antigen-retrieved tissue sections. *Am J Vet Res* 57, 853-859.
- Tappenden KA, Thomson AB, Wild GE and McBurney MI (1997) Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition enhances functional adaptation to intestinal resection in rats. *Gastroenterology* 112, 792-802.
- Taylor DJ, Estrada A and Pradal P (1987) Grower scour and non-specific colitis. *Vet Rec* 121, 479-480.
- Ten Bruggencate SJ, Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML and Van der Meer R (2003) Dietary fructo-oligosaccharides dose-dependently increase translocation of salmonella in rats. *J Nutr* 133, 2313-2318.

- Theander O, Aman P, Westerlund E and Graham H (1990) The Uppsala method for rapid analysis of total dietary fiber. *Adv Exp Med Biol* 270, 273-281.
- Thomson JR, Smith WJ and Murray BP (1998) Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. *Vet Rec* 142, 235-239.
- Thoreux K, Balas D, Bouley C and Senegas-Balas F (1998) Diet supplemented with yoghurt or milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 stimulates growth and brush-border enzyme activities in mouse small intestine. *Digestion* 59, 349-359.
- Titgemeyer EC, Bourquin LD, Fahey GC, Jr. and Garleb KA (1991) Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria in vitro. *Am J Clin Nutr* 53, 1418-1424.
- Titkemeyer CW and Calhoun ML (1955) A comparative study of the structure of the small intestines of domestic animals. *Am J Vet Res* 16, 152-157.
- Todd D, Singh AJ, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA and Bortell R (1999) A new isolation method for rat intraepithelial lymphocytes. *J Immunol Methods* 224, 111-127.
- Topping DL and Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81, 1031-1064.
- Topping DL, Gooden JM, Brown IL, Biebrick DA, McGrath L, Trimble RP, Choct M and Illman RJ (1997) A high amylose (amylomaize) starch raises proximal large bowel starch and increases colon length in pigs. *J Nutr* 127, 615-622.
- Torrallardona D, Conde MR, Badiola I, Polo J and Brufau J (2003) Effect of fishmeal replacement with spray-dried animal plasma and colistin on intestinal structure, intestinal microbiology, and performance of weanling pigs challenged with *Escherichia coli* K99. *J Anim Sci* 81, 1220-1226.
- Touchette KJ, Allee GL, Newcomb MD, Pace LW and Ellersieck MR (1997) Impact of feed intake and spray-dried porcine plasma on nursery performance and intestinal morphology of weaned pigs. *J Anim Sci* 75 (Suppl. 1), 198 (Abs.).
- Touchette KJ, Carroll JA, Allee GL, Matteri RL, Dyer CJ, Beausang LA and Zannelli ME (2002) Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: I. Effects on the immune axis of weaned pigs. *J Anim Sci* 80, 494-501.
- Treanor D and Sheahan K (2002) Microscopic colitis: lymphocytic and collagenous colitis. *Curr Diagn Pathol* 8.
- Tsukahara T, Iwasaki Y, Nakayama K and Ushida K (2003) Stimulation of butyrate production in the large intestine of weaning piglets by dietary fructooligosaccharides and its influence on the histological variables of the large intestinal mucosa. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 49, 414-421.
- Turner JL, Dritz SS, Higgins JJ, Herkelman KL and Minton JE (2002a) Effects of a *Quillaja saponaria* extract on growth performance and immune function of weanling pigs challenged with *Salmonella typhimurium*. *J Anim Sci* 80, 1939-1946.
- Turner JL, Dritz SS, Higgins JJ and Minton JE (2002b) Effects of *Ascophyllum nodosum* extract on growth performance and immune function of young pigs challenged with *Salmonella typhimurium*. *J Anim Sci* 80, 1947-1953.
- van Beers-Schreurs HM, Nabuurs MJ, Vellenga L, Kalsbeek-van der Valk HJ, Wensing T and Breukink HJ (1998a) Weaning and the weanling diet influence the villous

- height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *J Nutr* 128, 947-953.
- van Beers-Schreurs HM, Nabuurs MJ, Vellenga L, Wensing T and Breukink HJ (1998b) Role of the large intestine in the pathogenesis of diarrhea in weaned pigs. *Am J Vet Res* 59, 696-703.
- Van Dijk AJ, Niewold TA, Margry RJ, van den Hoven SG, Nabuurs MJ, Stockhofe-Zurwieden N and Beynen AC (2001) Small intestinal morphology in weaned piglets fed a diet containing spray-dried porcine plasma. *Res Vet Sci* 71, 17-22.
- Van Dijk AJ, Niewold TA, Nabuurs MJ, Van Hees J, De Bot P, Stockhofe-Zurwieden N, Ubbink-Blanksma M and Beynen AC (2002) Small intestinal morphology and disaccharidase activities in early-weaned piglets fed a diet containing spray-dried porcine plasma. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49, 81-86.
- van Heugten E, Funderburke DW and Dorton KL (2003a) Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *J Anim Sci* 81, 1004-1012.
- van Heugten E, Spears JW, Kegley EB, Ward JD and Qureshi MA (2003b) Effects of organic forms of zinc on growth performance, tissue zinc distribution, and immune response of weanling pigs. *J Anim Sci* 81, 2063-2071.
- Van Klinken BJ, Van der Wal JW, Einerhand AW, Buller HA and Dekker J (1999) Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut* 44, 387-393.
- van Munster IP, Tangerman A and Nagengast FM (1994) Effect of resistant starch on colonic fermentation, bile acid metabolism, and mucosal proliferation. *Dig Dis Sci* 39, 834-842.
- Van Parijs L, Biuckians A, Ibragimov A, Alt FW, Willerford DM and Abbas AK (1997) Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J Immunol* 158, 3738-3745.
- Vedonk JMA, Spreeuwenberg MAM, Bakker GCM and Vergesten MWA (2001) Nutrient intake level affects histology and permeability of small intestine in newly weaned piglets. *Digestive physiology of pigs: Proceedings of the 8th Symposium.*, 332-334.
- Vega-Lopez MA, Arenas-Contreras G, Bailey M, Gonzalez-Pozos S, Stokes CR, Ortega MG and Mondragon-Flores R (2001) Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. *Dev Immunol* 8, 147-158.
- Vega-Lopez MA, Bailey M, Telemo E and Stokes CR (1995) Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 44, 319-327.
- Vega-Lopez MA, Telemo E, Bailey M, Stevens K and Stokes CR (1993) Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet Immunol Immunopathol* 37, 49-60.
- Velazquez G, Borbolla AG, Mariscal-Ladin G, Reis de Souza T and Pinella A (2005a) Effects of oregano, cinnamon and chili pepper herbal extracts as growth promoters on growth performance of young pigs. *J Anim Sci Vol.83* 83 (Suppl. 1).
- Velazquez G, Borbolla AG, Mariscal-Ladin G, Reis de Souza T and Pinella A (2005b) Intestinal morphology of weaned pigs fed diets containing herbal extracts as growth promoters. *J Anim Sci Vol.83* 83 (Suppl. 1).

- Velazquez OC, Lederer HM and Rombeau JL (1997) Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* 427, 123-134.
- Vente-Spreeuwenberg MA, Verdonk JM, Verstegen MW and Beynen AC (2003) Villus height and gut development in weaned piglets receiving diets containing either glucose, lactose or starch. *Br J Nutr* 90, 907-913.
- Visek WJ (1984) *Human-Nutrition and Health*: Illinois Research
- Vitini E, Alvarez S, Medina M, Medici M, de Budeguer MV and Perdigon G (2000) Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* 24, 223-232.
- Wachtershauser A and Stein J (2000) Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur J Nutr* 39, 164-171.
- Wajner M, Santos KD, Schlottfeldt JL, Rocha MP and Wannmacher CM (1999) Inhibition of mitogen-activated proliferation of human peripheral lymphocytes in vitro by propionic acid. *Clin Sci (Lond)* 96, 99-103.
- Walker RI and Owen RL (1990) Intestinal barriers to bacteria and their toxins. *Annu Rev Med* 41, 393-400.
- Walter BM and Bilkei G (2004) Immunostimulatory effect of dietary oregano etheric oils on lymphocytes from growth-retarded, low-weight growing-finishing pigs and productivity. *Tijdschr Diergeneeskde* 129, 178-181.
- Wang Q (1995) Pathologically and experimentally induced intestinal barrier changes evaluated by permeability measurements, Lund University.
- Weaver LT, Gonnella PA, Israel EJ and Walker WA (1990) Uptake and transport of epidermal growth factor by the small intestinal epithelium of the fetal rat. *Gastroenterology* 98, 828-837.
- Weinberg RS, Ji X, Sutton M, Perrine S, Galperin Y, Li Q, Liebhaber SA, Stamatoyannopoulos G and Atweh GF (2005) Butyrate increases the efficiency of translation of gamma-globin mRNA. *Blood* 105, 1807-1809.
- Weinstein PD and Cebra JJ (1991) The preference for switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells is likely due to the intrinsic influence of their microenvironment. *J Immunol* 147, 4126-4135.
- Whittemore EC, Emmans GC, Kyriazakis I, Knap PW, Simmins PH and Jagger S (2003) The relationship between live weight and the intake of bulky foods in pigs. *Proc Nutr Soc* 19.
- Wilson AD, Stokes CR and Bourne FJ (1989) Effect of age on absorption and immune responses to weaning or introduction of novel dietary antigens in pigs. *Res Vet Sci* 46, 180-186.
- Williams BA, Verstegen MWA and Tamminga S (2001) Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutr Res Rev* 14, 207-227.
- Williams N (1998) T cells on the mucosal frontline. *Science* 280, 198-200.
- Williams NH, Stahly TS and Zimmerman DR (1997) Effect of chronic immune system activation on the rate, efficiency, and composition of growth and lysine needs of pigs fed from 6 to 27 kg. *J Anim Sci* 75, 2463-2471.
- Wong CS and Gibson PR (2003) The trophic effect of dietary fibre is not associated with a change in total crypt number in the distal colon of rats. *Carcinogenesis* 24, 343-348.
- Worsaae H and Schmidt M (1980) Plasma cortisol and behaviour in early weaned piglets. *Acta Vet Scand* 21, 640-657.
- Woudstra T and Thomson AB (2002) Nutrient absorption and intestinal adaptation with ageing. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16, 1-15.

- Wu G (1998) Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr* 128, 1249-1252.
- Wu G and Knabe DA (1994) Free and protein-bound amino acids in sow's colostrum and milk. *J Nutr* 124, 415-424.
- Wyatt GM, Horn N, Gee JM and Johnson IT (1988) Intestinal microflora and gastrointestinal adaptation in the rat in response to non-digestible dietary polysaccharides. *Br J Nutr* 60, 197-207.
- Yang H and Parkhouse RM (1996) Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 89, 76-83.
- Younes H, Remesy C, Behr S and Demigne C (1997) Fermentable carbohydrate exerts a urea-lowering effect in normal and nephrectomized rats. *Am J Physiol* 272, G515-521.
- Yu B and Chiou WS (1997) The morphological changes of intestinal mucosa in growing rabbits. *Lab Anim* 31, 254-263.
- Yun CH, Estrada A, Van Kessel A, Gajadhar AA, Redmond MJ and Laarveld B (1997) beta-(1-->3, 1-->4) oat glucan enhances resistance to *Eimeria vermiformis* infection in immunosuppressed mice. *Int J Parasitol* 27, 329-337.
- Zijlstra RT, Whang KY, Easter RA and Odle J (1996) Effect of feeding a milk replacer to early-weaned pigs on growth, body composition, and small intestinal morphology, compared with suckled littermates. *J Anim Sci* 74, 2948-2959.
- Zuckermann FA (1999) Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 72, 55-66.
- Zuckermann FA and Gaskins HR (1996) Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. *Immunology* 87, 493-499.