

# NEGOCIACIONES ENTRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EL HUÉSPED, EN EL CONTEXTO DE LA EFICIENCIA EN EL CRECIMIENTO ANIMAL

H. R. Gaskins  
Departamentos de Ciencias Animales y Biopatología Veterinaria  
División de Ciencias Nutricionales  
Instituto de Biología Genómica  
Universidad de Illinois en Urbana-Champaign  
1207 West Gregory Drive  
Urbana, Illinois 61801, USA  
Tel: 217-244-3165  
Fax: 217-333-8804  
Email: hgaskins@uiuc.edu

## Introducción

Todos los grupos principales de microbios están representados en la microbiota gastrointestinal de los mamíferos, predominando las bacterias (Savage, 1977; Mackie *et al.*, 1999). Es importante recordar que el número de células bacterianas es 10 veces superior al número de células de todo el animal huésped, ejerciendo una profunda influencia sobre los procesos inmunológicos, nutricionales, fisiológicos y de protección de dicho animal (Berg y Savage, 1972; Berg, 1996).

En general se considera que la microbiota intestinal del cerdo y de los demás mamíferos es benéfica para el huésped. Las bacterias nativas le proporcionan nutrientes, incluyendo ácidos grasos de cadena corta, vitamina K, vitaminas del complejo B y aminoácidos (Savage, 1986; Wostmann, 1996). Las bacterias intestinales también impiden la colonización con microorganismos patógenos al competir con más éxito por los nutrientes o por los sitios de adhesión al epitelio (Rolfe, 1997). Más aún, los compuestos antimicrobianos producidos por estas bacterias intestinales, además de los ácidos grasos volátiles y los ácidos biliares modificados químicamente, crean un ambiente local que, por lo general, es desfavorable para el crecimiento de los patógenos entéricos (Rolfe, 1997). Aun cuando es cierto que las bacterias comensales proporcionan tanto nutrientes como funciones de defensa para el animal huésped, también está claro que éste invierte muchos de sus recursos en esfuerzos de defensa, primero para secuestrar a los microbios intestinales -tanto patógenos como apatógenos- aislándolos de la superficie intestinal, y en segundo lugar para montar rápidamente respuestas inflamatorias e inmunitarias contra los microorganismos que logran atravesar las defensas epiteliales.

Esta relación de comensalismo se ha seleccionado durante el tiempo evolutivo, dando como resultado una microbiota estable en los animales maduros, que generalmente es similar tanto en composición como en función en una amplia gama de especies animales. A pesar de la estabilidad evolutiva, la microbiota intestinal se desarrolla en los animales individuales siguiendo un patrón característico de sucesos que requiere la adaptación sustancial por el huésped durante las primeras etapas de la vida. El impacto de la microbiota en desarrollo y de las actividades metabólicas de las comunidades en su clímax requiere consideración especial cuando se le analiza dentro del contexto de la producción animal, cuyo principal objetivo es la eficiencia en el crecimiento.

Mucho de nuestro conocimiento acerca de las contribuciones del sistema inmune en las mucosas deriva de los estudios realizados en animales libres de gérmenes (*GF*, por sus siglas en inglés). Estos datos ilustran la naturaleza protectora de las bacterias comensales, así como el papel que desempeñan en el desarrollo del sistema inmune en las mucosas del huésped. Presentaremos aquí una breve revisión de 1) La estructura y función de los mecanismos de defensa en las mucosas, 2) Estudios en animales libres de gérmenes que respaldan el concepto de que el sistema inmune en las mucosas evolucionó, en gran medida, en respuesta a la microbiota normal y 3) El concepto de una microbiota intestinal óptima, en términos de la salud animal versus su crecimiento.

### **Los Mecanismos de Defensa en las Mucosas: Su Estructura y Función**

*Biocapa de moco.* Las funciones de defensa en el intestino están organizadas de manera estratificada, comenzando con la capa de moco asociada con la microbiota. La capa de moco en forma de gel es un componente estructural de la superficie mucosa que actúa como medio de protección, lubricación y transporte entre el contenido presente en la luz intestinal y el recubrimiento epitelial. El moco es una mezcla heterogénea de secreciones, compuesta aproximadamente en un 95% por agua y contiene electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), carbohidratos, proteínas, aminoácidos y lípidos (Verdugo, 1990). Las propiedades viscoelásticas del moco, que lo hacen similar a un polímero, derivan de los principales componentes de las glucoproteínas que forman un gel, denominadas mucinas (Forstner *et al.*, 1995). Las mucinas constan de una columna vertebral de péptidos que contienen regiones (“dominios”) alternadas glicosiladas y no glicosiladas. Las regiones glicosiladas comprenden del 70 al 80% del polímero. Las cadenas laterales de oligosacáridos están unidas al eje formado por péptidos mediante enlaces O-glicosídicos entre la treonina o la serina sobre el núcleo o eje de péptidos y la N-acetilgalactosamina sobre las cadenas de azúcares (Neutra y Forstner, 1987). La N-acetilglucosamina, la N-acetilgalactosamina, la galactosa y la fructosa son los cuatro oligosacáridos principales de la mucina (Neutra y Forstner, 1987). Con frecuencia se agregan grupos terminales de sulfato o ácido siálico a las cadenas de oligosacáridos, lo cual determina la naturaleza polianiónica de las mucinas cuando el pH es neutro o casi neutro (Neutra y Forstner, 1987). Las mucinas secretoras de los intestinos delgado y grueso se sintetizan y se secretan por las células epiteliales columnares especializadas conocidas como células caliciformes, debido a su característica forma de copa o cáliz (Neutra y Forstner, 1987).

Apenas comenzamos a tener una revelación de la complejidad y especialmente la magnitud de la capa de moco gracias al desarrollo de técnicas histológicas que permiten su preservación (Matsuo *et al.*, 1997). Los cambios ontogénicos en la composición de la capa de moco que ocurren después de modificaciones sucesivas en la microbiota intestinal y la adquisición de funciones inmunes, son consistentes con el papel crucial que desempeñan las células caliciformes para secretar moco y para la homeostasis intestinal (Neutra y Forstner, 1987; Deplancke y Gaskins, 2001). Los cambios ya sea en el número de células caliciformes o en la composición química del moco intestinal, se detectan de manera consistente en respuesta a diversas agresiones que ocurren en el lumen (Neutra *et al.*, 1982; Olubuyide *et al.*, 1984; Dunsford *et al.*, 1991; Sharma y Schumacher, 1995). Hemos observado un incremento en el número de células caliciformes en el intestino delgado de lechones neonatos alimentados parenteralmente desde el nacimiento, así como un incremento en las células caliciformes secretoras de sulfomucina en las criptas del íleon de animales alimentados por vía parenteral (Ganessunker *et al.*, 1999; Conour *et al.*, 2002). Los cambios en las poblaciones de células caliciformes en el modelo de lechones nutridos totalmente por vía parenteral se correlacionó con cambios en los perfiles de la población microbiana, aumento en la inflamación y disminución en la integridad de la barrera de la mucosa, en respuesta a la falta de nutrición enteral (Ganessunker *et al.*, 1999; Conour *et al.*, 2002; Deplancke *et al.*, 2002). Estos datos y otros publicados más recientemente por otros autores indican que el moco se debe considerar como un componente dinámico del mecanismo de defensa intestinal y no simplemente como una barrera estática y viscosa que imparte protección física. Todavía falta por descubrir las redes reguladoras que tienen interfaces con estas células caliciformes secretoras de moco, para poder adoptar completamente este modelo.

La protección del epitelio contra los microbios intestinales depende de la capacidad de los carbohidratos de la mucina ya sea para unirse a los receptores microbianos o para repelerlos (Neutra y Forstner, 1987). Las bacterias intestinales que no son capaces de unirse al moco se excretan gracias a la peristalsis mediante la defecación o han desarrollado características de crecimiento que les permiten sobrevivir en el contenido luminal mixto. Existe la creencia general de que las bacterias que residen en el moco impiden la adhesión de los microorganismos patógenos al ocupar sitios de unión competitivos. Aun cuando existe evidencia *in vitro* que respalda esta idea, todavía hace falta contar con muchos datos *in situ* para verificarla o refutarla. Por ejemplo, existe poca información sobre la taxonomía o sobre la distribución temporal o espacial de los grupos de bacterias que residen preferentemente en el moco intestinal. Esta limitación deriva de las dificultades asociadas con la conservación de la capa de moco cuando se utilizan los protocolos convencionales de fijación de los tejidos y de los sesgos inherentes a las técnicas microbiológicas dependientes de los cultivos (Mackie *et al.*, 1999). El entendimiento de la magnitud y de la naturaleza de estas interacciones requiere identificar a la microbiota asociada con el moco, así como aclarar la base molecular de los mecanismos de señalización entre el huésped y los microbios existentes en esta matriz

*Epitelio intestinal.* El monoestrato de células epiteliales subyacente a la capa de moco está organizado en dos compartimientos morfológica y funcionalmente distintos, a saber: Las regiones de las criptas que contienen las células madre y las células de Paneth, y las vellosidades (intestino delgado) o los cúmulos epiteliales (intestino grueso) que contienen uno de varios tipos de células epiteliales diferenciados de manera terminal (Gaskins, 1997; Hauck *et al.*, 2005). La formación de estrechas uniones entre células epiteliales adyacentes del epitelio maduro proporciona una barrera física contra el ambiente externo. La continua descamación y renovación del epitelio limita todavía más las oportunidades de los patógenos para colonizar las células epiteliales (Potten y Loeffler, 1990). Además de estas importantes funciones innatas, las células epiteliales del intestino ejercen funciones inmunológicas, incluyendo la conservación de los antígenos a través de las moléculas del gran complejo de histocompatibilidad (*MHC*, por sus siglas en inglés) y de la capacidad de sintetizar y secretar numerosas citocinas inflamatorias y reguladoras (Gaskins, 1997). Las citocinas bioactivas, producidas por las células epiteliales, principalmente las que son producidas también por los macrófagos, revelan información sobre el estado relativo de la salud intestinal o de los linfocitos T intraepiteliales (*IEL*, por sus siglas en inglés), y las células inmunes de la lámina propia subyacente. Las citocinas derivadas del epitelio intestinal también desempeñan papeles clave en el desarrollo celular y en la funcionalidad de los linfocitos T intraepiteliales y de los compartimientos de la lámina propia; sin embargo, todavía no se han definido bien las citocinas específicas involucradas ni sus modos de acción.

Estos hallazgos señalan la importancia de comprender la magnitud y la naturaleza de la adherencia bacteriana al intestino, tal vez con un enfoque particular hacia el patrón espacial de las poblaciones adherentes a lo largo del tracto gastrointestinal. La colonización del intestino delgado, aunque sea con microorganismos comensales, puede producir un incremento en la sensibilidad a estímulos lumbinales que, de lo contrario, serían inofensivos. Estas consideraciones pueden ser particularmente importantes para el crecimiento del animal, dados los costos de la energía y el nitrógeno probablemente asociados con las respuestas secretoras del intestino. Un mejor entendimiento de la base bioquímica de la adhesión de las bacterias también puede conducirnos, por ejemplo, al descubrimiento de maneras no farmacológicas de controlar la colonización a través del uso de epítopes sintéticos o naturales que simulen los sitios de fijación a la mucosa.

*Lámina propia.* Debajo del monoestrato de células epiteliales de la lámina propia residen poblaciones difusas de linfocitos T y B, células plasmáticas, macrófagos, células cebadas, eosinófilos y cantidades más pequeñas de células dendríticas y neutrófilos, además de fibroblastos biológicamente activos (Hinterleitner y Powell, 1991; Kagnoff, 1993). Además, la lámina propia está bien vascularizada y densamente inervada con plexos ricos de los nervios entéricos, que desempeñan un papel crítico en la motilidad intestinal, la cual constituye también una importante función innata de defensa.

Las complejas redes de comunicación que existen entre las células epiteliales y las de la submucosa, se reflejan de mejor manera mediante las respuestas inflamatorias

concentradas a causa de agresiones lumbales (Gaskins, 1997). Por ejemplo, en respuesta a las toxinas bacterianas y los antígenos del alimento, las células activadas de la lámina propia secretan citocinas y lípidos bioactivos, que de manera colectiva incrementan la motilidad intestinal y el flujo de sangre a la zona, mientras inhiben la absorción y estimulan la secreción de agua e iones por el epitelio. Cuando se integran, estas respuestas fisiológicas culminan en una diarrea secretoria, que es el síntoma más común de inflamación intestinal, independientemente de cuál haya sido la agresión inicial (Hinterleitner y Powell, 1991).

*Linfocitos T intestinales.* Los linfocitos T del intestino que residen en los sitios de contacto inicial con los patógenos entéricos, son componentes claves de la defensa en el "frente de batalla". Las poblaciones de células T intestinales incluyen 1) los linfocitos intraepiteliales (*IEL*) que se encuentran entre o inmediatamente debajo del monoestrato epitelial, 2) las células T de la lámina propia, ubicadas entre las vellosidades o las criptas, lejos de la capa epitelial, y 3) las que residen en las placas de Peyer (Guy-Grand *et al.*, 1993). Además de su localización anatómica, los subgrupos de células T intestinales se distinguen por su patrón de apariencia ontogénica, su sitio de maduración, su expresión de moléculas superficiales de diferenciación (ej. CD4 vs. CD8) y por el subtipo de receptores de las células T (*TCR*;  $\alpha\beta$  o  $\delta\gamma$ ) (Gaskins, 1997).

Los efectos de las bacterias comensales sobre el desarrollo de las células T intestinales parecen variar de acuerdo con el fenotipo de las células T. Las placas de Peyer contienen áreas de células T con los tipos CD4 o CD8, que utilizan el *TCR*  $\alpha\beta$  y estas poblaciones disminuyen en el estado "libre de gérmenes" junto con una reducción general en la celularidad linfocitaria (Macpherson *et al.*, 2001). De los linfocitos T intraepiteliales, el número de células con *TCR*  $\delta\gamma$  se ve relativamente poco afectado por las condiciones que caracterizan a los animales libres de gérmenes; sin embargo, las células con *TCR*  $\alpha\beta$  -positivas disminuyen en número y no ocurre el incremento normal del desarrollo en esta población (Guy-Grand *et al.*, 1993; Umesaki *et al.*, 1993; Helgeland *et al.*, 1996; Helgeland *et al.*, 1997).

*IgA secretora.* La IgA de las secreciones es la barrera inmunológica mejor descrita en las mucosas. Es sintetizada por los linfocitos B que se originan en la médula ósea y emigran hacia las placas de Peyer, que son grupos de centros germinales organizados que se encuentran a lo largo del intestino (Mestecky, 1987; Kraehenbuhl y Neutra, 1992; Kagnoff, 1993). Inicialmente, los antígenos lumbales se transportan mediante células epiteliales especializadas (células membranosas o células M) que recubren a las placas de Peyer, a un área interfolicular donde son presentadas por el APC residente a las células T de ayuda ( $T_H$ ), las cuales a su vez secretan citocinas que estimulan a los linfocitos B, mismos que sufren un cambio hacia el fenotipo de IgA+ específico de esta clase de inmunoglobulinas (Kagnoff, 1993). Después de abandonar las placas de Peyer y pasar a la circulación sistémica, los linfocitos B IgA<sup>+</sup> emigran para alojarse en las superficies mucosas donde, después de una nueva exposición al antígeno, las células plasmáticas secretan IgA específicas del antígeno, que es transportada a través del epitelio por un receptor especializado (componente secretorio) y se libera en la superficie de la mucosa (Mostov, 1994). Los anticuerpos IgA de la

mucosa brindan protección principalmente para prevenir la adherencia de bacterias y toxinas a las células epiteliales, proceso conocido comúnmente como exclusión inmune (Kraehenbuhl y Neutra, 1992; Kagnoff, 1993; Stokes y Bourne, 1989).

El alojamiento de los linfocitos B diferenciados para IgA<sup>+</sup> procedentes de las placas de Peyer en otros sitios de mucosa, incluyendo a los pulmones, el tracto reproductor de la hembra y la glándula mamaria, proporciona un mecanismo mediante el cual la exposición a un patógeno en un sitio de la mucosa da como resultado una inmunidad distribuida ampliamente en otras superficies mucosas. Este concepto se conoce comúnmente como “sistema inmune común en las mucosas” (Mestecky, 1987).

La influencia de los antígenos lumbales y particularmente de la microbiota intestinal sobre el desarrollo postnatal de la IgA secretoria se ha realzado en estudios con animales que demuestran que tanto el tamaño como el número de las placas de Peyer se reducen significativamente en cerdos libres de gérmenes (Pabst *et al.*, 1988; Rothkötter y Pabst, 1989; Rothkötter *et al.*, 1991) y en roedores. Este fenómeno se ha estudiado con más profundidad en roedores, habiéndose demostrado que la monoasociación de los animales libres de gérmenes con ciertas bacterias comensales puede restablecer el desarrollo normal del sistema de la IgA secretoria (Cebra *et al.*, 1980; McCracken y Gaskins, 1999).

### **Lecciones Aprendidas con el Estado de los Animales “Libres de Gérmenes”**

*Características de los animales libres de gérmenes (GF).* Las características inmunológicas de los animales libres de gérmenes se distinguen fácilmente de los convencionales (CV) que albergan una microbiota. Por ejemplo, la mayoría de los órganos de importancia inmunológica como el intestino delgado y los ganglios linfáticos mesentéricos, son más pequeños, pesan menos y presentan menor celularidad en los animales libres de gérmenes (Gordon y Wostmann, 1960; Gordon *et al.*, 1966). Además, los ganglios linfáticos, el bazo y otros tejidos linfoides tienen pocos centros germinales (centros en los que ocurre la presentación del antígeno, conducentes a la proliferación de las células B y a la diferenciación de las células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Thorbecke, 1959; Gordon y Wostmann, 1960; Pollard, 1967a). Se sospecha que los centros germinales presentes en los animales libres de gérmenes son resultado de: a) actividad basal, b) antígenos de la dieta, o c) capacidad de respuesta a virus endógenos (Pollard, 1967a,b). El timo crece más lentamente en los animales libres de gérmenes y nunca alcanza el tamaño del que se encuentra en los animales convencionales, aun cuando sigue un patrón de crecimiento y posterior regresión similar al que se observa en aquéllos (Bealmear, 1965, 1980). La atrofia del timo tiene un efecto directo sobre el desarrollo de las poblaciones de células T periféricas, así como un efecto indirecto sobre el desarrollo de anticuerpos a través de un menor número de células T de ayuda requeridas para la maduración y activación de las células B.

Todavía no se ha caracterizado bien la inmunidad mediada por células en los ratones libres de gérmenes, pero existen evidencias de hipersensibilidad de tipo retardado y respuestas normales a los aloinjertos en ratones libres de gérmenes (MacDonald y

Carter, 1978; Bealmeear, 1965). Con respecto a la inmunidad humoral, los ratones libres de gérmenes tienen bajas concentraciones de inmunoglobulinas (Wostmann, 1961; Sell, 1964a,b) y muy poca cantidad de IgA, o bien ésta no es detectable (Asofsky y Hylton, 1967). Los ratones libres de gérmenes sí desarrollan respuestas de anticuerpos contra los antígenos, pero en concentraciones menores a las observadas en ratones convencionales (Olson y Wostman, 1966a,b). Los ratones libres de gérmenes también son significativamente más resistentes que los convencionales a la letalidad inducida por lipopolisacáridos (Kiyono *et al.*, 1980). La transferencia de células T de ratones convencionales a ratones libres de gérmenes redujo esta resistencia, lo cual generó la hipótesis de que las bacterias Gram negativas en el intestino contribuyen a la producción de una población de células T que regula las respuestas de las células B a los lipopolisacáridos (McGhee *et al.*, 1980).

Se han demostrado diferencias sustanciales entre los animales libres de gérmenes y los convencionales en lo que se refiere al número y función de los macrófagos, que se encuentran entre los tipos de células que responden más a las alteraciones microbianas. Por ejemplo, hablando de animales convencionales, los macrófagos de los animales axénicos son: 1) Más escasos (Woolverton *et al.*, 1992); 2) Menos activos metabólicamente (Heise y Myrvik, 1966); 3) Menos capaces de degradar a los antígenos (Bauer *et al.*, 1966); 4) Menos capaces de responder a los estímulos quimiotácticos (Abrams y Bishop, 1965; Jungi y McGregor, 1978; Morland *et al.*, 1979); 5) Menos capaces de demostrar actividad tumoricida (Johnson y Balish, 1981); y 6) Menos capaces en su actividad microbicida contra ciertos patógenos (MacDonald y Carter, 1978).

*Reasociación entre los animales libres de gérmenes y las bacterias comensales.* Después de introducir un repertorio completo de bacterias comensales, los animales libres de gérmenes desarrollan una fisiología comparable a la de los animales convencionales. En un lapso de 2 días el ciego se hace más pequeño y sus paredes más gruesas, con contenido más sólido que el de los animales libres de gérmenes. El bazo, los ganglios linfáticos y las placas de Peyer desarrollan centros germinales y comienzan a crecer hasta alcanzar las dimensiones observadas en los animales convencionales, dentro de una semana después de la asociación. La lámina propia aumenta en grosor y celularidad, y las concentraciones séricas de inmunoglobulinas también aumentan (Olson y Wostmann, 1966b; Carter y Pollard, 1971; Bealmer, 1980). Se cree que las bacterias coliformes, que colonizan al huésped inmediatamente después de la exposición, son las responsables de estos cambios, toda vez que los anaerobios estrictos no colonizan sino hasta mucho tiempo después (Mayhew y Pollard, 1971). Las respuestas entre los diferentes huéspedes a determinadas especies bacterianas específicas animaron a Dubos *et al.* (1965) a sugerir que, entre las bacterias que se encuentran normalmente en el intestino, algunas son verdaderamente simbióticas y constituyen la microbiota nativa (que en inglés llaman "*indígena*"), mientras que otros microbios intestinales pueden ingresar al huésped debido a su presencia en el ambiente, pero sin establecer una relación simbiótica. Muchos estudios subsiguientes han demostrado que la reacción del huésped a las especies individuales varía dependiendo de la especie microbiana, y que algunas provocan una poderosa

respuesta inmune mientras que otras ejercen acaso un efecto poco notable (Wagner, 1959; Carter y Pollard, 1971, 1973; Balish *et al.*, 1972; Berg y Savage, 1972; Foo y Lee, 1972; Moreau *et al.*, 1978; Morishita y Mitsuoka, 1973; Wells y Balish, 1980; Lee, 1984; McCracken y Gaskins, 1999).

Usando cerdos convencionales y libres de gérmenes de diferentes edades, Rothkötter y colaboradores (1989, 1991) publicaron datos de gran utilidad acerca de la influencia de la edad y la microbiota intestinal sobre la composición celular del sistema inmune intestinal. Las comparaciones crudas de los compartimientos epitelial y de la lámina propia demostraron que la producción total de células inmunes en el intestino de los lechones jóvenes (5 días de edad) era sólo el 10% del obtenido en animales de mayor edad (45 días de vida) y que los números de linfocitos intestinales en los cerdos de 9 meses de edad era aproximadamente un 50% menor al que se encuentra en los animales de 14 meses de edad. La producción celular y los patrones de las subclases linfocitarias en el intestino de los lechones libres de gérmenes de 45 días de edad fueron comparables a los de los animales convencionales de 5 días de edad. Estos datos demuestran todavía más que la microbiota comensal es un importante estímulo para el desarrollo postnatal de los compartimientos celulares encargados de la inmunidad intestinal.

### **Resumen y Conclusiones**

Las adaptaciones intestinales que se desarrollan en respuesta a la microbiota comensal implican costos que se hacen más aparentes cuando se consideran en el contexto contemporáneo de la eficiencia del crecimiento animal. Específicamente, los tejidos gastrointestinales representan aproximadamente el 6% del peso corporal, pero son responsables del 10 al 20% de la producción de CO<sub>2</sub> en todo el organismo (Stoll *et al.*, 1999), de hasta el 50% de la reconversión de algunos aminoácidos esenciales (Stoll *et al.*, 1998; Van Goudoever *et al.*, 2000), y consumen aproximadamente el 35% del nitrógeno proteico total ingerido por el animal (Reeds *et al.*, 1999). Más aún, sólo el 10% de la proteína total sintetizada por el tracto gastrointestinal se acumula como masa nueva. Aun cuando con frecuencia se considera que significa una alta tasa de proteólisis intracelular, las investigaciones recientes sugieren que la diferencia entre la reconversión de proteína en las mucosas y la acumulación de proteína en el tejido, reflejan en gran medida una pérdida de proteínas mediante células epiteliales descamadas o los productos secretados, como lo es el moco (Reeds *et al.*, 1993; Fuller y Reeds, 1998).

La colonización bacteriana del intestino ejerce un impacto negativo sobre la eficiencia del crecimiento animal y esto está bien documentado en los estudios realizados con animales libres de gérmenes, y cada vez hay más evidencias de que los efectos promotores del crecimiento de los antibióticos probablemente reflejen su capacidad tanto de disminuir la colonización bacteriana en el intestino como de modificar los perfiles de la microcomunidad. Por ejemplo, los antibióticos orales no inducen a una respuesta del crecimiento en los animales libres de gérmenes (Coates *et al.*, 1963), mientras que la colonización de los animales libres de gérmenes con bacterias intestinales normales deprime el crecimiento (Coates, 1980). Se cree que esta



depresión del crecimiento es resultado de un mayor costo de mantenimiento asociado con las respuestas del huésped a la variedad de procesos catabólicos mediadores del crecimiento bacteriano en el intestino (Gaskins, 2001). No obstante, son muy pocos los datos cuantitativos que respaldan o refutan este concepto.

La sensibilidad del huésped a la microbiota intestinal se sugiere más fuertemente por las diferencias paralelas del desarrollo, así como diferencias regionales en la estructura y función intestinales y en la densidad microbiana, además de la reducción en la destrucción y regeneración celular epitelial y la actividad secretora del intestino de los animales libres de gérmenes. Por lo tanto, deben existir señales reguladoras que permitan al huésped “monitorear” la magnitud de la colonización bacteriana y su actividad. De ser así, deberán existir oportunidades de mejorar la eficiencia en el crecimiento animal mediante la manipulación del equilibrio dinámico entre la microbiota intestinal y las funciones de defensa del huésped. Estos aspectos realzan el importante punto de que, aun cuando supuestamente existe una microbiota que optimiza la salud intestinal, el mantenimiento de esta población forma parte de los requerimientos de nutrientes del huésped y, por lo tanto, afecta toda la eficiencia del crecimiento corporal.

### **Reconocimientos**

La investigación a que hacemos referencia aquí está respaldada por fondos del programa 42.0 de otorgamientos competitivos del *USDA-NRI* (Asignación no. 02-03669), y por la estación experimental agrícola de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign.

### **Referencias**

Abrams, G., and J. E. Bishop. 1965. Normal flora and leukocyte mobilization. *Arch. Pathol.* 79:213-217.

Asofsky, R., and M. B. Hylton. 1967. Some characteristics of a secretory immunoglobulin (IgA) in germfree and conventional mice. *Symposium on Gnotobiotic Research, Madison, Wisconsin*, p.6.

Balish, E., C. E. Yale, and R. Hong. 1972. Serum proteins of gnotobiotic rats. *Infect. Immun.* 6:112-118.

Bauer, H., F. Paronetto, W. A. Burns and, A. Einheber. 1966. The enhancing effect of the microbial flora on macrophage function and the immune response: a study in germfree mice. *J. Exp. Med.* 123:1013-1024.

Bealmear, P. M. 1965. Comparative study of the thymus of germfree and conventional CFW mice. Doctoral dissertation. University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana.

Bealmear, P. M. 1980. Host defense mechanisms in gnotobiotic animals. In: Gershwin E., Marchant B. (eds.) *Immunologic Defects in Laboratory Animals*, Plenum Press, New York, Vol. 2., pp. 261-350.

- Berg, R. D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4:430-435.
- Berg, R.D., and D. C. Savage. 1972. Immunological responses and microorganisms indigenous to the gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 25:1364-1371.
- Carter, P. B., and M. Pollard. 1971. Host responses to "normal" microbial flora in germ-free mice. *J. Reticuloendothelial. Soc.* 9:580-587.
- Carter, P. B., and M. Pollard. 1973. Studies with *Lactobacillus casei* in gnotobiotic mice. In: Heneghan J.B. (ed.) *Germfree Research: Biological Effect of Gnotobiotic Environments*, Academic Press, New York, pp. 379-383.
- Cebra, J J., P. J. Gearhart, J. F. Halsey, J. L. Hurwitz, and R. D. Shahin. 1980 Role of environmental antigens in the ontogeny of the secretory immune response. *J. Reticuloendothelial. Soc.* 28:61S-71S.
- Coates, M. E., R. Fuller, G. F. Harrison, M. Lev, and S. F. Suffolk. 1963. A comparison of the growth of chicks in the Gustafsson germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin. *Brit. J. Nutr.* 17:141-151.
- Coates, M. E. 1980. The gut microflora and growth. In: Lawrence T.L.J. (ed.) *Growth in Animals*, Butterworths, pp. 175-188.
- Conour, J. E., D. Ganessunker, K. A. Tappenden, S. M. Donovan, and H. R. Gaskins. 2002. Acidomucin goblet cell expansion induced by parenteral nutrition in the small intestine of piglets. *Am. J. Physiol.* 283:G1185-1196.
- Deplancke, B., and H. R. Gaskins. 2001. Microbial modulation of innate defense: Goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:1131S-41S.
- Deplancke, B., O. Vidal, D. Ganessunker, S. M. Donovan, R. I. Mackie, and H. R. Gaskins. 2002. Selective growth of mucolytic bacteria including *Clostridium perfringens* in a neonatal piglet model of total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 76:1117-11125.
- Dubos, R., W. Schaedler, R. Costello, and P. Hoet. 1965. Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 122:67-75.
- Dunsford, B.R., W. E. Haensly, and D. A. Knabe. 1991. Effects of diet on acidic and neutral goblet cell populations in the small intestine of early-weaned pigs. *Am. J. Vet. Res.* 52:1743-46.
- Foo, M.C., and A. Lee. 1972. Immunological tolerance of mice to members of the autochthonous intestinal microflora. *Infect. Immun.* 6:525-532.

Forstner, J.F., M. G. Oliver, and F. A. Sylvester. 1995. Chapter 5, Production, structure and biologic relevance of gastrointestinal mucins. In: *Infections of the Gastrointestinal Tract*, Raven Press, New York.

Fuller, M. F., and P. J. Reeds. 1998. Nitrogen cycling in the gut. *Annu. Rev. Nutr.* 18:385-411. Ganessunker, D., H. R. Gaskins, F. A. Zuckermann, and S. M. Donovan. 1999. Total parenteral nutrition alters intestinal immune cell composition in neonatal piglets. *JPEN.* 23:337-344.

Gaskins, H. R. 1997. Immunological aspects of host/microbiota interactions at the intestinal epithelium. In: Mackie R.I., White B.A., Isaacson R.E. (eds.) *Gastrointestinal Microbiology*, Vol. 2., Chapman and Hall, New York, pp. 537-587.

Gaskins, H. R. 2001. Intestinal bacteria and their influence on swine growth. In: Lewis A.J., Southern L.L. (eds.) *Swine Nutrition*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 585-608.

Gordon, H.A., E. Bruckner-Kardoss, T. E. Staley, M. Wagner, and B. S. Wostmann. 1966. Characteristics of the germfree rat. *Acta Anatomica* 64:367-379.

Gordon, H.A., and B. S. Wostmann. 1960. Morphological studies on the germfree albino rat. *Anat. Rec.* 137:65-74.

Guy-Grand, D., B. Rocha, and P. Vassalli. 1993. Origin and development of gut intraepithelial lymphocytes. In: Kiyono H., McGhee J.R. (eds.) *Mucosal Immunology: Intraepithelial Lymphocytes*, Raven Press, New York, pp. 21-31.

Hauck, A. L., K. S. Swanson, P. J. Kenis, D. E. Leckband, H. R. Gaskins, and L. B. Schook. 2005. Twists and turns in the development and maintenance of the mammalian small intestine epithelium. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 75:58-71.

Heise, E. R., and Q. N. Myrvik. 1966. Levels of lysosomal hydrolases in alveolar and peritoneal macrophages from conventional and germ-free rats. *Fed. Proc.* 25:439 (abstract).

Helgeland, L., J. T. Vaage, B. Rolstad, T. Midvedt, and P. Brandzaeg. 1996. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunol.* 89:494-501.

Helgeland, L., J. T. Vaage, B. Rolstad, T. S. Halstensen, T. Midvedt, and P. Brandzaeg. 1997. Regional phenotypic specialization of intraepithelial lymphocytes in the rat intestine does not depend on microbial colonization. *Scand. J. Immunol.* 46:349-357.

Hinterleitner, T.A., and D. W. Powell. 1991. Immune system control of intestinal ion transport. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 197:249-260.

- Johnson, W. J., and E. Balish. 1980. Macrophage function in germ-free, athymic (nu/nu), and conventional-flora (nu/+) mice. *J. Reticuloendothelial Soc.* 28:55-66.
- Johnson, W. J., and E. Balish. 1981. Direct tumor cell and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by macrophages from germfree and conventional rats. *J. Reticuloendothelial Soc.* 29:205-214.
- Jungi, T.W., McGregor D.D. 1978. Impaired chemotactic responsiveness of macrophages from gnotobiotic rats. *Infection and Immunity* 19:553-560.
- Kagnoff, M. F. 1993. Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterol.* 105:1275-1280.
- Kiyono, H., J. R. McGhee, and S. M. Michalek. 1980. Lipopolysaccharide regulation of the immune response: Comparison of responses to LPS in germfree, *Escherichia coli*-monoassociated and conventional mice. *J. Immunol.* 124:36-41.
- Kraehenbuhl, J-P., and M. R. Neutra. 1992. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol, Rev.* 72:853-879.
- Lee, A. 1984. Neglected niches: The microbial ecology of the gastrointestinal tract. In: Marshall K., (ed.) *Advances in Microbial Ecology*, Plenum Press, New York.
- MacDonald, T. T., and P. B. Carter. 1978. Contact sensitivity in the germ-free mouse. *J. Reticuloendothelial Soc.* 24:287-93.
- Mackie, R. I., A. Sghir, and H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:1035S-1045S.
- Macpherson, A. J., L. Hunziker, K. McCoy, and A. Lamarre. 2001. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect.* 3:1021-1035.
- Matsuo, K, H. Ota, T. Akamatsu, A. Sugiyama, and T. Katsuyama. 1997. Histochemistry of the surface mucous layer of the human colon. *Gut* 40:782-789.
- Mayhew, J. W., and M. Pollard. 1971. Unpublished observations reported in: Carter P. B., and M. Pollard. 1971. Host responses to "normal" microbial flora in germfree mice. *J. Reticuloendothelial Soc.* 9:580-587.
- McCracken, V. J., and H. R. Gaskins. 1999. Intestinal microbes and the immune system. In: Tannock G. W. (ed) *Probiotics: A Critical Review*, Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, pp. 85-111.
- McGhee, J. R., H. Kiyono, S. M. Michalek, J. L. Babb, D. L. Rosenstreich, and S. E. Mergenhagen 1980. Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: T

lymphocytes from normal mice suppress mitogenic and immunogenic responses to LPS. *J. Immunol.* 124:1603-1611.

Mestecky, J. 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune response in external secretions. *J. Clin. Immunol.* 7:265-276.

Moreau, M.C., R. Ducluzeau, D. Guy-Grand, and M. C. Muller. 1978. Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal organs. *Infect. Immun.* 21:532-539.

Morishita, Y., and T. Mitsuoka. 1973. Antibody responses in germ-free chickens to bacteria isolated from various sources. *Jap. J. Microbiol.* 17:181-187.

Morland, B., A. I. Smievoll, and T. Midtvedt. 1979. Comparison of peritoneal macrophages from germfree and conventional mice. *Infect. Immun.* 26:11290-1136.

Mostov, K.E. 1994. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* 12:63-84.

Neish, A. S., A. T. Gewirtz, H. Zeng, A. N. Young, M. E. Hobert, V. Karmali, A. S. Rao, and J. L. Madara. 2000. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$  ubiquitination. *Science* 289:1560-1563.

Neutra, M. R., L. J. O'Malley, and R. D. Specian. 1982. Regulation of intestinal goblet cell secretion. II. A survey of potential secretagogues. *Am. J. Physiol.* 242:G380-G387.

Neutra, M.R., and J. F. Forstner. 1987. Gastrointestinal mucus: Synthesis, secretion and function. In: Johnson L.R. (ed.) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2<sup>nd</sup> edition, Raven Press, New York.

Olson, G. B., and B. S. Wostmann. 1966a Cellular and humoral immune response of germfree mice stimulated with 7S HGG or *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol.* 97:275-286.

Olson, G. B., and B. S. Wostmann. 1966b. Lymphocytopoiesis, plasmacytopoiesis and cellular proliferation in nonantigenically stimulated germfree mice. *J. Immunol.* 97:267-274.

Olubuyide, I. O., R. C. Williamson, J. B. Bristol, and A. E. Read. 1984. Goblet cell hyperplasia is a feature of the adaptive response to jejunoileal bypass in rats. *Gut* 25:62-68.

Pabst, R., M. Geist, H. J. Rothkötter, and F. J. Fritz. 1988. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunol.* 64:539-544.

- Pollard, M. 1967a. Germinal centers in germfree animals. In: Cottier H., Odartchenko R., Schindler C., Congdon C. (eds.) *Germinal Centers in Immune Response*, Springer-Verlag, New York, pp. 343-346.
- Pollard, M. 1967b. Host responses to neoplastic diseases. *Proceedings Institute of Medicine Chicago* 26:9.
- Potten, C. S., and M. Loeffler. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties: Lessons for and from the crypt. *Development* 110:1001-1020.
- Reeds P. J. , D. G. Burrin, T. A. Davis, and M. L. Fiorotto. 1993. Postnatal growth of gut and muscle: competitors or collaborators. *Proc. Nutr. Soc.* 52:57-67.
- Reeds, P. J., D. G. Burrin, B. Stoll, and J. B. van Goudoever. 1999. Consequences and regulation of gut metabolism. In: Lobley G.E., White A., MacRae J.C. (eds.) *Protein Metabolism and Nutrition*, Wageningen Pers, The Netherlands, pp. 127-153.
- Rolfe, R. 1997. Colonization resistance. In: Mackie, R.I., White, B.A., Isaacson, R.E. (eds.) *Gastrointestinal Microbiology*, Vol. 2., Chapman and Hall, New York, pp. 501-536.
- Rothkötter, H.,J., and R. Pabst. 1989. Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs. *Immunol.* 67:103-108.
- Rothkötter, H. J., H. Ulrich, and R. Pabst. 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.
- Savage, D. C. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu, Rev. Microbiol.* 31:107-133.
- Savage, D. C. 1986. Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annu. Rev Nutr.* 6:155-178.
- Sell, S. 1964a.  $\gamma$ -Globulin metabolism in germfree guinea pigs. *J. Immunol.* 92:559-564.
- Sell, S. 1964b. Immunoglobulins of the germfree guinea pig. *J. Immunol.* 93:122-131.
- Sharma, R., and U. Schumacher. 1995. Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats. *Dig. Dis. Sci.* 40:2532-2539.
- Stokes, C.,R., and J. F. Bourne. 1989. Mucosal immunity. In: Halliwell, R.E.W., (ed.) *Veterinary Clinical Immunology*, Harcourt Brace Jovanovich, Philadelphia, pp. 164-192.
- Stoll, B., J. Henry, P. J. Reeds, H. Yu, F. Jahoor, and D. G. Burrin. 1998. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J. Nutr.* 128:606-614.

- Stoll, B., D. G. Burrin, J. Henry, H. Yu, F. Jahoor, and P. J. Reeds. 1999. Substrate oxidation by the portal drained viscera of fed piglets. *Am. J Physiol.* 277:E168-E175.
- Thorbecke, G. J. 1959. Some histological and functional aspects of lymphoid tissue in germfree animals. I. Morphological studies. *Ann. New York Acad. Sci.* 78:237-246.
- Umesaki, Y., H. Setoyama, S. Matsumoto, and Y. Okada. 1993. Expansion of alpha beta T-cell receptor bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germfree mice and its independence from thymus. *Immunol.* 79:32-37.
- Van Goudoever, J. B., B. Stoll, J. Henry, D. G. Burrin, and P. J. Reeds. 2000. Adaptive regulation of intestinal lysine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11620-11625.
- Verdugo, P. 1990. Goblet cell secretion and mucogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* 52:157-176.
- Wagner, M. 1959. Serological aspects of germfree life. *Ann. New York Acad. Sci.* 78:261-271.
- Wells, C. L., and E. Balish. 1980. Modulation of rats' immune status by monoassociation with anaerobic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 26:1192-1198.
- Woolverton, C. J., L. C. Holt, D. Mitchell, and R. B. Sartor. 1992. Identification and characterization of rat intestinal lamina propria cells: consequences of microbial colonization. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 34:127-138.
- Wostmann, B. S. 1961. Recent studies on the serum proteins of germfree animals. *Ann. New York Acad. Sci.* 94:272-283.
- Wostmann, B. S. 1996. Nutrition. In: Wostmann, B.S. (ed) *Germfree and Gnotobiotic Animal Models*, CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 71-87.