

MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE Y APLICACIONES DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EN DIETAS DE CERDOS

L. Rangel^{1*}, J. Polo², J. Campbell², J. Crenshaw³ and L. Russell³
¹APC, Inc Brasil. ² APC Europe, S.A. Granollers, España; ³APC Inc. Ankeny, Iowa, USA ;
Luis.Rangel@functionalproteins.com

Introducción

El plasma porcino atomizado (SDPP del inglés spray-dried porcine plasma) es un ingrediente habitual en las dietas de lechones destetados (Coffey y Cromwell, 2001; van Dijk y col., 2001). El SDPP es un ingrediente con alta calidad proteica que aporta una balanceada fuente de aminoácidos, proteínas diversas (albúmina, inmunoglobulinas, transferrina, haptoglobina, alpha-1-glicoproteínas, ceruloplasmina, etc), factores de complemento, factores de crecimiento, péptidos bioactivos, citoquinas, etc. Algunas de las proteínas y factores de crecimiento presentes en el plasma tienen importantes funciones biológicas en los animales y se ha demostrado que pueden alcanzar en un alto porcentaje el intestino delgado donde pueden seguir ejerciendo parte de sus funciones biológicas. Morel y col. (1995) demostraron que utilizando las inmunoglobulinas como proteínas marcadoras de funcionalidad, observaron que más de un 50% de las IgG ingeridas llegaban intactas al intestino proximal. Igualmente Rodríguez y col. (2007) trabajando con perros y gatos adultos a los que se les administraba plasma porcino en la dieta eran capaces de detectar la presencia de IgG en las heces de estos animales, demostrando que las IgG porcinas resistían parcialmente el proceso digestivo en estos animales carnívoros con digestión pesada e incluso detectaron la presencia de fragmentos Fab en las heces, los cuales contienen el lugar de unión a antígenos, indicando que las IgG porcinas pueden transferir una cierta inmunidad pasiva a nivel intestinal tal y como se ha sugerido para otras especies de mamíferos incluyendo humanos.

La utilización de SDPP es habitual en la industria porcina, especialmente en el pienso de los lechones destetados en los que mejora el consumo, crecimiento y rendimiento. En una publicación reciente (Lallès y col., 2009) en la que reconocidos nutricionistas de 5 institutos/universidades de gran prestigio en Europa indicaban en sus conclusiones que probablemente la mejor estrategia a utilizar en las dietas de los lechones destetados era la suplementación con plasma atomizado. Recientemente Torrallardona (2010) ha realizado un meta-análisis incluyendo datos de 75 pruebas de campo obtenidos de 43 publicaciones y que englobaban en conjunto más de 12000 lechones, y ha demostrado los efectos positivos del plasma respecto a los índices productivos en comparación con diferentes fuentes de proteínas, y a su vez los efectos beneficiosos del plasma cuando se utilizaba en experimentos de desafío a patógenos o en comparación con antibióticos promotores de crecimiento.

Modo de acción del Plasma

La explicación clásica de cómo funciona el plasma nos indicaba de una forma bastante simplista que los efectos del plasma se debían a un incremento en el consumo del pienso debido al hecho de que la palatabilidad de la dieta se mejoraba con la inclusión de SDPP (Ermer y col., 1994). Sin embargo, Torrallardona y col. (2003) indicaban que probablemente el efecto de mayor consumo en la dieta era consecuencia del efecto de esas dietas en mejorar la salud de los lechones, es decir, los animales sanos consumen más pienso que los que sufren algún tipo de alteración o estrés. Esta última explicación parece más correcta y puede explicar el porqué se observa el efecto plasma en condiciones de ambientes con alta presión de patógenos y no en granjas de alta sanidad como ya observaron con anterioridad Coffey y Cromwell (1995) y Stahly y col., (1995).

Jiang y col. (2000) trabajando en una prueba con cerdos alimentados con una cantidad de pienso similar a la que consumía el grupo control, observaron que los efectos beneficiosos del plasma respecto a una serie de mediciones en parámetros fisiológicos eran independientes del consumo, lo cual sugería que el plasma tenía un efecto biológico específico.

Otra hipótesis del modo de acción del plasma ha sido que las IgG presentes en el plasma retienen su actividad frente a patógenos y entero-toxinas y juegan un papel a nivel intestinal inactivando tales patógenos y proveyendo inmunidad pasiva al animal. Esta hipótesis fue sustentada por estudios en los cuales se comprobaba que el plasma reducía la incidencia de diarreas (Gatnau y Zimmerman, 1991; Peet Schwing y col., 1995). Weaver y col., (1995) y Pierce y col. (2005) separaron plasma en tres fracciones de alto, medio y bajo peso molecular que representaban las globulinas, albúmina y fibrina respectivamente y comprobaron su eficacia respecto al plasma. Los resultados mostraron que la fracción con alto peso molecular (mayoritariamente inmunoglobulinas) era la principal responsable del efecto plasma. Las inmunoglobulinas se sabe que mantienen su actividad biológica tras el procesamiento del plasma por secado por atomización (o en inglés spray-drier) (Gatnau y col., 1989) y tal y como inicialmente indicaba Morel y col. (1995) pueden alcanzar intactas el intestino delgado proximal con su capacidad de unirse a patógenos específicos habituales en las granjas de producción comercial.

Otra teoría alternativa sugiere que son las glicoproteínas las responsables del efecto plasma en lugar de las inmunoglobulinas y su efecto lo ejercerían impidiendo la unión de patógenos al receptor específico a nivel intestinal. Así, Sánchez y col. (1993) mostraban a nivel *in vitro* que ciertas glicoproteínas presentes en el plasma eran capaces de actuar como lugar de unión para

la fimbria de *E.coli*. Mouricout y Julien, (1986) observaron que las glicoproteínas de plasma bovino inhibían la adhesión de *E. coli* a enterocitos. Nollet y col. (1999) en estudios con lechones utilizando una fuente de plasma sin inmunoglobulinas específicas frente a *E. coli* F18, mostraban que se impedía la unión de esta bacteria a los enterocitos por competencia con el receptor de esta bacteria en los mismo, lo cual sugería un mecanismo de protección no específico.

Efecto del plasma para reducir la sobre estimulación del sistema inmune y reducir la inflamación intestinal

Sin embargo, estudios recientes utilizando un modelo en rata de inflamación intestinal basado en la administración intraperitoneal de *Staphylococcus aureus* enterotoxina B (SEB) demostraron que las proteínas plasmáticas modulaban la respuesta inmune del tejido linfoide asociado al intestino (GALT del inglés gut associated lymphoid tissue), protegiendo al GALT de una activación excesiva provocada por el desafío con SEB (Moretó y Perez-Bosque, 2009). Estos efectos se acompañaron por una reducción en la producción de citoquinas pro-inflamatorias lo cual indicaba que los cambios en la producción de estas citoquinas podrían estar involucrados en los efectos positivos de las proteínas plasmáticas durante un proceso de inflamación intestinal. Tanto el SDPP como la fracción concentrada en inmunoglobulinas prevenían los efectos negativos del SEB en la permeabilidad intestinal, reduciendo de esa forma la exposición del huésped a microorganismos y antígenos presentes en la comida puedan atravesar el espacio entre la zona mucosal y la serosal de la mucosa intersticial. Estos hallazgos indicaban que el efecto plasma no estaba mediado únicamente por la interacción directa de las inmunoglobulinas presentes en el plasma con los antígenos, dado que en estas pruebas el SEB se administró por vía intra-peritoneal y por tanto esta interacción no pudo darse. Estos resultados, además, indicaban que otras proteínas presentes en el SDPP además de las inmunoglobulinas estaban involucradas en el efecto plasma dado que en muchas ocasiones los resultados obtenidos cuando se utilizaba la dieta con SDPP eran superiores a los que se obtenían con la fracción enriquecida en inmunoglobulinas. Según estos resultados, la reducción en la activación del sistema inmune resultará en un mayor consumo en los animales con la dieta conteniendo SDPP y por tanto una mejora en el crecimiento y salud tal y como anteriormente habían apuntado algunos autores (Touchette y col., 2002; Torrallardona y col., 2003).

Estrés y efecto sobre el crecimiento y salud de los animales

El estrés y la exposición a antígenos produce la activación del sistema inmune y estimulación en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, que a nivel de cerebro reducen la motivación de comer (Kent y col., 1996; van Heugten y col., 1994; Johnson, 1997) e interactúan con la hormona de crecimiento, el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) para suprimir el crecimiento celular (Kelley, 2004). En una situación de activación del sistema inmune, se produce un cambio en el metabolismo del animal y los diferentes tejidos trabajan al unísono para combatir la posible infección.

Se ha calculado que en una situación de activación del sistema inmune, más del 30% de la energía que se consume a través de los alimentos se destina a mantener este sistema de defensa activado, es decir, es energía que el animal no está utilizando para crecimiento, luego, cuanto antes se consiga eliminar el estrés que está provocando tal activación del sistema inmune, antes se recuperará el animal y antes comenzará a utilizar la energía de la dieta para crecimiento. En cerdos destetados a los 28 días de edad y alimentados con dietas sin SDP, se comprobó que la citoquina pro-inflamatoria TNF- α se mantenía elevada en el tejido mucosal en la parte distal del intestino delgado hasta por lo menos 8 días después del destete (Pé y col., 2004), es decir, los resultados indicaban que el propio destete era en si un momento de estrés para los animales y desencadenaba la activación del sistema inmune.

Diversas publicaciones indican que el consumo oral de SDP modula la respuesta inflamatoria. La expresión de citoquinas del mRNA (TNF- α , IL-1 β , y IL-6) se redujo en numerosos tejidos (hipotálamo, pituitaria, adrenal, bazo, timo e hígado) de cerdos alimentados con SDP después de desafíos con lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Touchette y col., 2002). Bosi y col. (2004) observaron al alimentar con plasma cerdos desafiados con enterotoxinas de *E. coli* K88, una reducción en la inflamación intestinal, reducción en la secreción de IgA en saliva, reducción en la expresión pro-inflamatoria de citoquinas en el intestino y una mejora en los índices productivos en comparación con los cerdos del grupo control desafiados sin plasma en la dieta. Posteriormente, Nofrarias y col (2006) observaron que con el consumo del SDP en cerdos destetados sin desafío, se reducía la inflamación intestinal, indicando una reducción en los linfocitos intraepiteliales y la densidad de las células de la lámina propia en el intestino grueso. Estos resultados fueron similares a los descritos anteriormente por Touchette y col., (2002) y Bosi y col (2004) en lechones, pero también con los obtenidos por Moretó y Perez-Bosque (2009) en ratas que indican una menor activación del sistema inmune en animales desafiados y alimentados con plasma. Colectivamente, estos resultados sugieren que las proteínas de plasma secadas facilitan la reparación de tejido, y reducen la sobre-estimulación de la respuesta inflamatoria tanto a nivel sistémico como local.

En muchas ocasiones la inflamación del tejido afectado se produce no por la situación de estrés específica o la presencia del agente patógeno en el mismo, sino por la prolongada activación del sistema inmune (sobre-estimulación del sistema inmune), la cual puede afectar negativamente parámetros de importancia económica como el crecimiento, deposición de tejido magro, reproducción y lactancia. Es por ello que es importante que el sistema inmune vuelva a su nivel basal de forma rápida una vez haya actuado eliminando el agente causante de tal activación. Perez-Bosque y col. (2010) demostraron trabajando con el modelo de rata desafiada con SEB que la administración de SDPP en la dieta, se incrementaba la producción de citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10, el TGF- β , las cuales se veían incrementada incluso en los animales controles con plasma en la dieta y sin desafío, demostrando de ese modo que el plasma reducía de forma significativa la

activación basal del sistema inmune y evitaba una activación del mismo por un tiempo muy prolongado, por lo que se reducían los efectos negativos que comporta tal activación como la inflamación a nivel intestinal. La activación inmunológica puede ocurrir en diferentes etapas del ciclo vital cuando los animales experimentan estrés antigénico, psicológico o ambiental. El estrés por calor es uno de los tipos de estrés ambiental el cual afecta a la función de la barrera intestinal que resulta en la pérdida de líquidos a nivel intestinal y aumento en endotoxinas en el suero (Lambert, 2004). Cuando la función de la barrera intestinal se encuentra comprometida, el sistema inmune es activado resultando en una disminución de la función intestinal (i.e., absorción de nutrientes) la cual finalmente impacta en funciones productivas. Dependiendo del grado de activación inmune y/o estrés, los animales pueden experimentar reducción en el crecimiento (Johnson, 1997; Spurlock y col., 1997), en la producción de leche (O'Brian y col., 2007), o abortos (Erlebacher y col., 2004).

Efecto del plasma en la reducción de inflamaciones a nivel pulmonar

El sistema mucosal realiza las funciones de primera línea de defensa física e inmunológica frente a patógenos invasores además de mediar las interacciones simbióticas entre el huésped y los microorganismos endógenos (bacteria comensal) (Mestecky y col., 2003). A través de la inmunidad innata y adquirida, el sistema inmune mucosal mantiene la homeostasis inmunológica en una vasta extensión de área superficial epitelial, desde las cavidades orales y nasales a la respiratoria y a los tractos intestinales y genito-urinario. Como estos sistemas de mucosas trabajan de forma integrada, se pueden considerar como un único sistema al cual se le denomina sistema mucosal común ó tejido linfoide asociado a mucosas (MALT del inglés mucosal associated lymphoid tissue). El MALT conecta el GALT a nivel de intestino (ej. Placas de Peyer) ó el tejido linfoide asociado a la mucosa nasal (NALT del inglés nasal associated lymphoid tissue) a los lugares efectores, tales como la *lamina propia* del intestino y tractos respiratorios y tejidos glandulares.

La respuesta inmune resultante (mediada por linfocitos T_H1 , T_H2 ó T-citotóxicos) tienen un importante papel en los mecanismos de defensa de las superficies mucosales (Yuki y col., 2003). Un buen ejemplo de la relación entre los sistemas inmunes del GALT y del NALT lo establecieron Agüero y col. (2006) los cuales mostraron que la administración oral de probióticos a

través de bacterias del ácido láctico podía modular parcialmente la respuesta inmune a la neumonía a nivel pulmonar.

Anteriormente, en diversos estudios (Pérez-Bosque y col., 2004; 2006; 2008a; 2010) hemos comentado que la suplementación con SDPP en la dieta podía afectar la respuesta del intestino delgado y grueso en un modelo experimental de inflamación intestinal utilizando ratas desafiadas con SEB. Las preparaciones de plasma utilizadas (SDPP y fracción enriquecida en inmunoglobulinas (PPF del inglés immunoglobulin protein plasma fraction)) podían modular la respuesta inmune mucosal del GALT organizado y difuso. De esta manera se protegía al GALT de una activación excesiva por el desafío con SEB.

Estos hallazgos indicaban que las proteínas plasmáticas modulaban las propiedades funcionales y estructurales de la mucosa intestinal. Con estas premisas y teniendo en cuenta las interconexiones funcionales entre los diferentes tejidos linfoides mucosales del cuerpo, nosotros hipotetizábamos que la administración oral de SDPP y PPF podían modular la respuesta inmune a nivel pulmonar de forma similar a lo que se había observado a nivel de la mucosa intestinal, esto es, reduciendo la activación del sistema inmune mucosal.

Para estudiar esta hipótesis el grupo del Dr. Moretó de la Universidad de Barcelona utilizó un modelo de inflamación pulmonar aguda que utilizaba LPS como antígeno activador de la respuesta inmune. Una inflamación aguda pulmonar es un síndrome clínico que está asociado con disfunciones respiratorias y está causado por agentes directos e indirectos. Todo ello lleva a una inflamación pulmonar, la cual se caracteriza por un reclutamiento/agrupación de leucocitos a nivel pulmonar, y lesiones en el endotelio vascular y epitelio alveolar que incrementa la permeabilidad de los capilares alveolares, llevando a hipoxemia (Strieter y col., 1999). Los macrófagos alveolares y neutrófilos son de las primeras células en interactuar con los microorganismos patógenos invasores y toxinas. Ellos responden produciendo mediadores pro-inflamatorios que incluyen las citoquinas y quimiocinas, especies de oxígeno reactivo y péptidos antimicrobianos los cuales participan en la defensa del anfitrión tal y como se resume en la Figura 1 (Abraham y col., 2000; Koay y col., 2002). Sin embargo, aunque la respuesta inflamatoria es crucial para la defensa efectiva antimicrobiana, una respuesta excesiva puede ser perjudicial, y eventualmente llevar a una disfunción en el órgano afectado (Liew y col., 2005; Abraham y col., 2006).

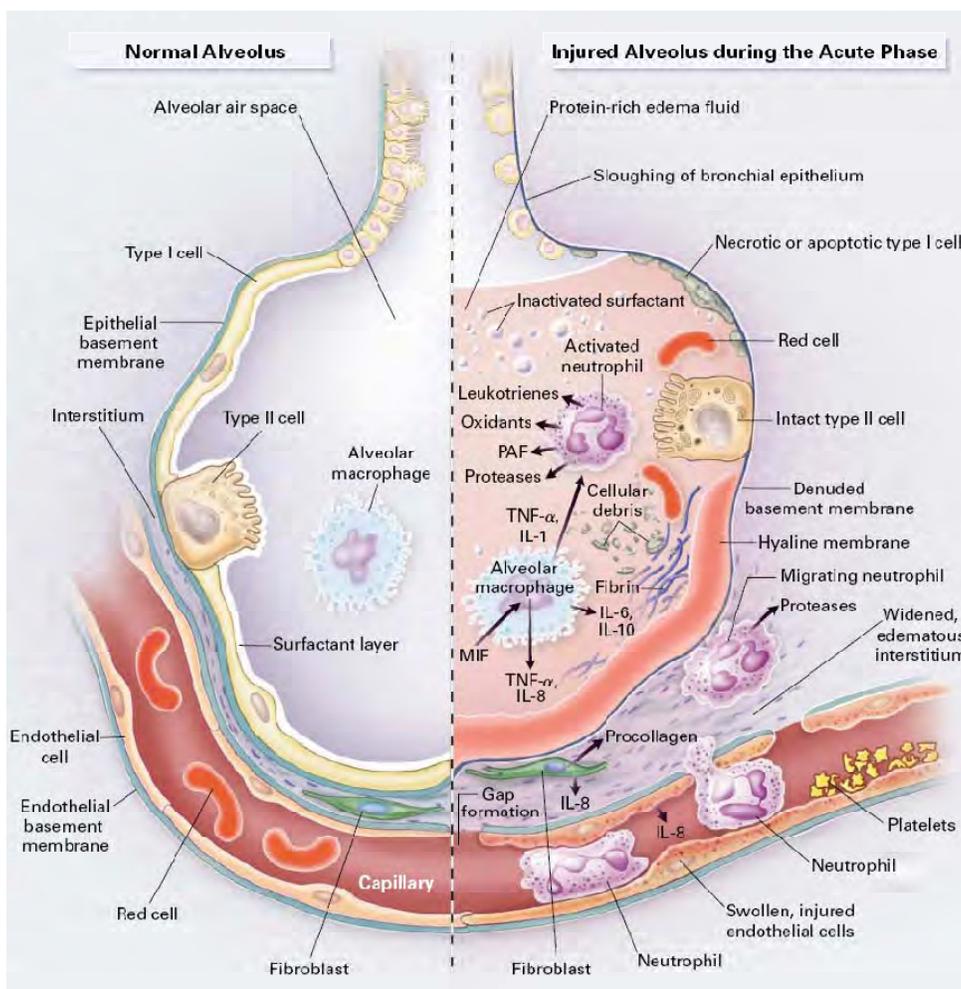


Figura 1. Alveolo normal (parte izquierda) y alveolo inflamado en una fase aguda de lesión pulmonar y síndrome de estrés respiratorio agudo (parte derecha). De Ware y Matthay (2000).

Para estudiar el efecto de las proteínas plasmáticas en un modelo de inflamación aguda pulmonar se trabajó con ratones de la línea C57BL/6 Hsd que fueron alimentados con una dieta suplementada con SDPP al 8% (grupo SDP) o bien una dieta conteniendo un 2% de PPF (grupo PPF) o con proteínas lácteas (grupo Control) desde el día 19 de destete hasta el día 33. Durante el día 32, se le suministró a los ratones una dosis intranasal de lipopolisacáridos de *E. coli* (LPSI 500µg/ Kg Peso Corporal; grupos: LPS-Control, LPS-SDP y LPS-PPF; 7/8 ratones por grupo) ó tampón fosfato salino (1 ml/kg; grupos: Control, SDP y PPF; 7/8 ratones por grupo). Una vez administrado el LPS los animales fueron sacrificados a las 6 horas para el análisis de las concentraciones de citoquinas en el

fluido del lavado broncoalveolar (BALF del inglés broncoalveolar lavage fluid) o a las 24h posteriores a la administración del LPS para el análisis del porcentaje de subpoblaciones linfocitarias y células polimorfonucleares (PMN).

Se observó que el desafío con LPS incrementaba las concentraciones en el BALF de IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α en 45, 143, 1460, 1526-veces respectivamente ($P < 0.0005$). Ambas suplementaciones con proteínas plasmáticas, tanto con SDP como con PPF reducían el efecto al LPS en las concentraciones de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 α , IL-1 β y IL-6 en un 30-50%, ($P < 0.01$) y del TNF- α en un 75% ($P < 0.001$).

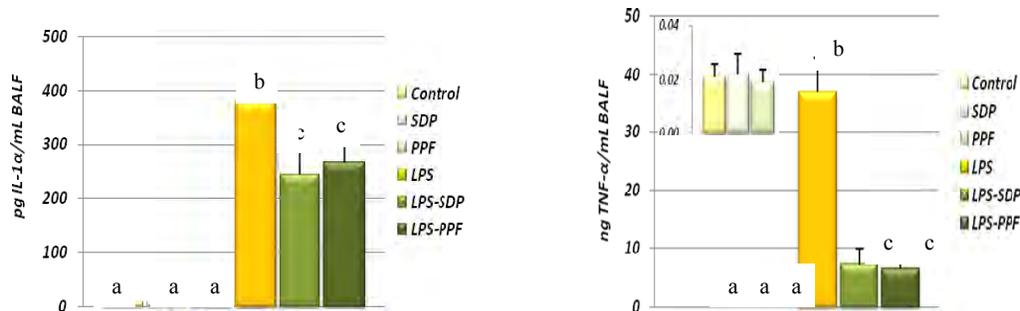


Figura 2. Concentración de IL-1α y TNF-α en BALF. Resultados expresados como Media ± SEM de 7-8 ratones. Medias sin letras comunes difieren significativamente, $P < 0.05$

La administración intranasal de LPS aumentaba en 27 veces el número de leucocitos y cambios en el perfil de células presentes en el BALF (en el grupo control un 3% eran linfocitos y un 97% PMN, mientras que en el grupo desafiado con LPS las proporciones eran de un 40% y 60% respectivamente; $P < 0.001$). La suplementación con SDPP reducía los efectos en la activación de monocitos ($P < 0.05$). Además se observó a nivel de pulmón que la suplementación con

SDPP ó PPF aumentaba la producción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF-β1) en comparación con el grupo control desafiado con LPS. (Tabla 1) Estos resultados en su conjunto indican que las proteínas plasmáticas pueden reducir la sobre-activación del tejido linfoide asociado al sistema inmune nasal en respuesta a un desafío con LPS de inflamación pulmonar aguda (Pérez-Bosque y col., 2008b; Maijón y col., 2009).

Tabla 1 – Respuesta de los índices de activación inmune a nivel pulmonar modulados por las proteínas del plasma.

Índices	Respuesta Relativa ¹		
	LPS vs. control positivo ²	LPS vs. SDP ²	LPS vs. Ig ²
Citoquinas Pro-Inflamatorias BALF³			
IL-1α	↑	↓	↓
IL-1β	↑	↓	↓
IL-6	↑	↓	↓
TNF-α	↑	↓	↓
Citoquinas Anti-inflamatorias en Pulmón			
IL-10	0	↑	↑
TGF-β	↓	↑	↑
Poblaciones linfocitarias y celulares			
Número linfocitos en BALF y Pulmón	↑	↓	↓
Activación Monocitos en BALF	↑	↓	↓
Activación Linfocitos T en pulmón	↑	↓	↓

¹ Respuesta relativa de los índices por comparación de tratamientos al desafío pulmonar con LPS de *E. coli*; 0: sin cambio, ↑: aumento de la respuesta, ↓: reducción de la respuesta.

² Grupos de comparación de tratamientos: grupo control positivo - ratones que no recibieron desafío con LPS, alimentados con dieta control; grupo control negativo que recibió LPS y fue alimentado con la dieta control, sin proteínas del plasma; grupo plasma, que recibió LPS y la dieta con proteínas del plasma y el grupo concentrado de inmunoglobulinas (PPF), que recibió LPS y la dieta con concentrado de Ig.

³ BALF: poblaciones del tejido linfoide asociado al lavado broncoalveolar.

Con estos resultados se demuestra que la administración oral de proteínas plasmáticas ejerce su efecto no únicamente sobre la mucosa intestinal, sino que es capaz de realizar una acción más sistémica a nivel de otras mucosas como la pulmonar. Estos resultados demuestran parte del mecanismo de acción a nivel del sistema mucosal integrado y refuerzan las evidencias demostrada de que la utilización de plasma en explotaciones con problemas de PRRS o Circovirus porcino (PCV-2), dos enfermedades que afectan a nivel respiratorio, resultaba en mejoras en la salud de la

explotación e incremento en los parámetros productivos de la misma (Campbell y col., 2006; Dewey y col., 2006). Igualmente Campbell y col. (2004) trabajando con pollos desafiados con *Pasteurella multocida*, una bacteria que afecta a nivel pulmonar, observó que cuando administraba proteínas plasmáticas en la dieta se mejoraban significativamente los índices de supervivencia comparado con el control.

Conociendo el modo de acción del plasma y su efecto a nivel del sistema mucosal integrado nos permitirá ampliar los campos de actuación y de uso de

las proteínas plasmáticas durante el ciclo de vida del cerdo. Así, sabiendo que se produce estrés fisiológico durante el momento de la concepción, gestación y lactación de las cerdas, especialmente en verano durante estrés por calor, podemos predecir que el plasma funcionará en esas aplicaciones. De hecho estudios y pruebas de campo realizados en esas aplicaciones han demostrado que el plasma mejora los índices de partos (Crenshaw y col., 2008; Vitagliano y col, 2009), peso al destete en primerizas, reduce entradas en celo de las primerizas, aumenta peso camada e individual al destete y animales con valor comercial al destete (Crenshaw y col., 2007; 2008), confirmando de esa forma los resultados obtenidos a nivel experimental con ratones.

En resumen, el plasma y las proteínas plasmáticas son proteínas funcionales que actúan reduciendo la sobre-estimulación del sistema inmune y la inflamación a nivel de mucosas, por lo que su administración en la dieta puede ayudar en las diferentes etapas de desarrollo del animal desde destete, combatir enfermedades, estrés por calor, concepción, gestación y lactación y por tanto abre nuevas posibilidades de uso de estas proteínas para mejorar la salud y bienestar de nuestros animales.

Bibliografía

- Abraham y col., 2000. *Am J. Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1137-L1145.
- Abraham y col., 2006. *J. Immunol.* 176:7753-7760.
- Agüero y col., 2006. *Nutrition* 22:810-819.
- Bosi y col., 2004. *J Anim Sci.* 82(6): 1764-1772.
- Campbell y col., 2004. *Appl. Poult. Res.* 13:388-393.
- Campbell y col., 2006. *Proceed. AASV* pp. 139-142.
- Coffey y Cromwell, 1995. *J Anim Sci.* 73(9): 2532-2539.
- Coffey y Cromwell, 2001. *Pig News Inf.* 22:39N-48N
- Crenshaw y col., 2007. *J. Anim. Sci.* 85:3442-3453
- Crenshaw y col., 2008. *Proceed. A. Lemman Swine Conf.* pp.47.
- Dewey y col., 2006. *Can. J. Vet. Res.* 70:161-167.
- Erlebacher y col., 2004. *J. Clin. Invest.* 114:39-48
- Ermer y col., 1994. *J Anim. Sci.* 72:1548-1554.
- Gatnay y Zimmerman, 1991. *J. Anim. Sci.* 69(Suppl. 1): 103(Abstr.).
- Gatnau y col., 1989. *J. Anim. Sci.* 67(Suppl. 1): 244.
- Jiang y col., 2000. *J. Nutr.* 130:21-26
- Johnson, 1997. *J Anim Sci.* 75: 1244-1255.
- Kelley, 2004. *Brain Behav Immunol* 18:95-113
- Kent y col., 1996. *Neurosci Biobehav Rev.* 20:171-175.
- Koay y col., 2002. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:572-578.
- Lallès y col., 2009. *Animal*: doi:10.1017/S175173110900398X.
- Lambert, 2004. *Ecerc. Sport. Sci. Rev.* 32:185-190.
- Liew y col., 2005. *Nat. Rev. Immunol.* 5:446-458.
- Maijò y col., 2009. *Proceed. AASV Congress. Dallas March 7-10.*
- Mestecky y col., 2003. *En: Fund. Immun ch. 31 (Ed. Paul, W. E) Acad., San Diego, USA.*
- Morel y col., 1995. *Proceed. APSA Conf. Manipulating pig production V.* p.181
- Moretó y Pérez-Bosque 2009. *J Anim Sci.* 87 (E. Suppl.) E92-E100
- Mouricout y Julien, 1986. *Microb. Letters* 37:145-149.
- Nofrarias y col., 2006. *J Anim Sci.* 84(10): 2735-2742.
- Nollet y col., 1999. *Microbiol.* 65:37-45
- O'Brian y col., 2007. *J. Dairy Sci.* 90(Suppl. 1):58-59.
- Peet-Schwering y col. 1995. *Proef.*
- Proefstation.Varkenshouderij No. 4.127:24 pp.
- Pérez-Bosque y col., 2004. *J. Nutr.* 134:2667-2672
- Pérez-Bosque y col., 2006. *J. Nutr.* 136:2838-2843
- Pérez-Bosque y col., 2008a. *J. Nutr.* 138:533-537
- Pérez-Bosque y col., 2008b. *Proceed. ADSA-ASAS Joint Meeting. J. Anim. Sci. Vol. 86, E-Suppl. 2*
- Pérez-Bosque y col., 2010. *J. Nutr.* 140:25-30
- Pie y col., 2004. *J. Nutr.* 134:641-647.
- Pierce y col., 2005. *J Anim Sci.* 83(12): 2876-2885.
- Rodríguez y col., 2007. *Anim Feed Sci & Technol.* 139:201-211
- Sánchez y col., 1993. *Microb. Pathog.* 15:407-419
- Spurlock y col., 1997. *J. Anim. Sci.* 75:720-726.
- Stahly y col., 1995. *J. Anim. Sci.* 73(Suppl. 1):81(Abstr.).
- Strieter y col., 1999. *Thomas A. Neff Lecture. Chest* 116: 103S-110S.
- Torrallardona y col., 2003. *J Anim Sci.* 81(5): 1220-1226.
- Torrallardona, D. 2010. *Asian-Aust. J Anim Sci.* 23(1): 131-148.
- Touchette y col., 2002. *J Anim Sci.* 80(2): 494-501.
- Van Dijk y col., 2001. *Livest. Prod. Sci.* 68:263-274.
- Van Heugten y col., 1994. *J. Anim. Sci.* 72:2661-2669.
- Vitagliano y col., 2009. *Proceed. A. Lemman Swine Conference*
- Ware y Mattay, 2000. *N. Engl J Med.* 342:1334-1349.
- Weaver y col., 1995. *J. Anim. Sci.* 73(Suppl. 1):81 (Abstr.).
- Yuki y Kiyono, 2003. *Rev Med. Virol* 13:293-310.