

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

La inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* en la dieta de lechones modifica la fisiología digestiva

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

PRESENTA:

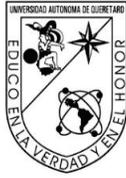
Dr. MVZ. Dairon Más Toro

DIRIGIDO POR:

Dra. Tércia Cesária Reis de Souza

Campus Juriquilla,
Santiago de Querétaro, Qro. México

Octubre 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

La inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* en la dieta de lechones modifica la fisiología digestiva

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

PRESENTA:

Dr. MVZ Dairon Más Toro

DIRIGIDO POR:

Dra. Tércia Cesária Reis De Souza

Dra. Tércia Cesária Reis de Souza
Presidente

Dr. Gerardo Mariscal Landín
Secretario

Dr. Konisgmar Escobar García
Vocal

Dr. José Guadalupe Gómez Soto
Suplente

Dra. Araceli Aguilera Barreyro
Suplente

Centro universitario, Querétaro, Qro.

Octubre de 2019

México

PENSAMIENTO...

*Quien nunca descansa,
Quien con el corazón y con la sangre
piensa en lograr lo imposible,
Ese triunfa.*

Ernesto Che Guevara

DEDICATORIA

A mis padres Marcis y Jose Ángel.

A la memoria de mi abuela Xiomara y mi primo Macuto.

A mis abuelos María Caridad y Jose Ángel.

A mis hermanos, Kiniandis, Yordanis y Yelandi.

A mis profesoras Dra. Tercia y Dra. Araceli.

A mis profesores y amigos, Yordan, Román y Olmo.

A todos mis amigos, en especial a Alejandro, Richard, Diego y Mario.

A todas mis amigas, en especial a Dalilis, Ivonne, Andrea y Miriam.

A todos mis tíos y tías.

A toda mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Resulta difícil escribir en tan breves líneas mi agradecimiento a todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron con la realización de este trabajo.

A Dios por permitir mi existencia, cuidarme y guiarme en la difícil tarea de vivir.

A mi madre Marcis y a mi padre Jose Ángel por su apoyo durante toda mi carrera, por su educación y por enseñarme a levantarme cada día después de un disgusto.

A mi difunta abuela Xiomara, mi abuelo Jose Ángel y mi abuela María Caridad por su educación y cuidado.

A mi hermano Kiniandis por confiar en mí y por su atención hacia mis estudios en todo momento.

A mi difunto primo Macuto, por guiarme con su ejemplo, fuerza y valentía.

A “mamá Maida” por acogerme como un hijo y brindarme su apoyo incondicional, sin su apoyo hubiera sido imposible estar en México.

A la Dra. Tércia Cesária Reis de Souza, por no solo ser mi directora sino por ser mi madre científica, por apoyarme y confiar en mi en los momentos difíciles, por toda la formación profesional enseñada, por enseñarme a ser más sincero y trabajador cada día, sin su conducción sería casi imposible la realización de este trabajo.

A los profesores Dra. Araceli Aguilera, Dr. Konisgmar Escobar, Dr. Jose Gómez y Dr. Gerardo Mariscal, por atender todas mis inquietudes y ayudarme en la realización de esta investigación.

A todos mis profesores, en especial a Yordan Martínez, Román Rodríguez y Carlos Olmo, por enseñarme un sinnúmero de conocimientos y mostrarme su más sincera amistad.

A mis amigos: Alejandro, Diego, Ivonne, Andrea y Sandra por su amistad sincera, a Dalilis por ser más que una amiga una hermana y a Mario y Richard por su completo apoyo e incondicionalidad en todo momento.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Ciencias Naturales, en especial al Laboratorio de Nutrición Animal, por brindar todas las facilidades para la realización de este proyecto.

A las técnicas del Laboratorio de Nutrición Animal, Leticia y Aurora, por su guía y ayuda desinteresada.

A CONACyT por su apoyo con el proyecto CB-2012-01000000000179898.

A la MSPAS y al CONACyT por brindarme la beca y poder desarrollar mi investigación.

Al FOFI-UAQ 2018 por el financiamiento parcial para la realización de este proyecto.

A todos, mi eterno agradecimiento

Dairon Más Toro

ÍNDICE

<i>PENSAMIENTO</i>	i
<i>DEDICATORIA</i>	ii
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	iii
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. ¿Por qué producir carne de cerdo?.....	4
2.2. ¿Cómo alimentar al cerdo para incrementar la producción?.....	6
2.3. ¿Qué es la salud intestinal?.....	8
2.3.1. Sistema digestivo de los cerdos.....	9
2.3.2. Secreciones del aparato digestivo.....	10
2.3.3. Regulación de la actividad intestinal:.....	15
2.3.4. Microbiota.....	17
2.3.5. El intestino como sistema inmune.....	23
2.3.6. Bienestar-Destete.....	25
2.3.7. Dieta.....	26
2.4. Antibióticos promotores de crecimiento.....	26
2.4.1. Uso de los antibióticos promotores de crecimiento.....	26
2.5. Alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento.....	29
2.5.1. Alimentos funcionales y nutraceuticos.....	29
2.6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36

2.7. <i>Saccharomyces boulardii</i>	36
III. HIPÓTESIS	37
IV. OBJETIVOS	39
4.1. Objetivo general.....	39
4.2. Objetivos específicos.....	39
V. MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1. Ubicación experimental.....	40
5.2. Animales, dieta y tratamientos experimentales.....	40
5.3. Condiciones experimentales.....	42
5.4. Toma de muestras.....	42
5.5. Actividad enzimática del páncreas.....	42
5.6. Determinación de ácidos grasos volátiles.....	44
5.7. Determinación de la distribución de las poblaciones bacterianas.....	44
5.7.1. Extracción y purificación de ADN.....	44
5.7.2. Amplificación del ADN.....	44
5.7.3. Gel de electroforesis y análisis de bandas.....	45
5.8. Análisis estadísticos.....	46
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1. Actividad enzimática del páncreas.....	47
6.2. Perfil de los ácidos grasos volátiles del contenido del colon.....	53
6.3. Distribución de las poblaciones bacterianas del colon.....	60
CONCLUSIONES	66
RECOMENDACIONES	67
LITERATURA CITADA	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Enzimas del jugo pancreático -----	13
Cuadro 2. Hormonas gastrointestinales -----	16
Cuadro 3. Clasificación funcional de las bacterias y principales productos-----	18
Cuadro 4. Ingredientes y composición química de la dieta basal, porcentaje en base al alimento ofrecido-----	41
Cuadro 5. Reactivos para la elaboración de la PCR mix -----	45
Cuadro 6. Ciclo de amplificación PCR -----	46
Cuadro 7. Perfil de ácidos grasos volátiles ($\mu\text{mol/g}$) en el contenido del colon de lechones, a los 7 y 14 días posdestete -----	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Población mundial desde 1951 hasta 2019 -----	4
Figura 2. Estimación del crecimiento poblacional hasta 2050 -----	5
Figura 3. Actividad específica de la Amilasa pancreática -----	48
Figura 4. Actividad específica de la Tripsina pancreática -----	52
Figura 5. Actividad específica de la Quimotripsina pancreática-----	52
Figura 6. Distribución de las poblaciones bacterianas del colon de lechones a los 7 (A) y 14 (B) días postdestete -----	62
Figura 7. Distribución de las poblaciones bacterianas del colon de lechones a los 14 días postdestete -----	63

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de la inclusión de un antibiótico (LincoSpectin), *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces boulardii* en la dieta para lechones recién destetados sobre algunas características de la fisiología digestiva. Se utilizaron un total de 40 lechones Fertilis 20×G Performance de 19.8 ± 1.56 días de edad, con 6.2 ± 1.79 kg de peso vivo, los lechones se distribuyeron según un diseño completamente al azar en 4 tratamientos, con 10 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos experimentales consistieron en una dieta basal (control negativo) sin antibiótico, una con antibiótico, una con *S. cerevisiae* o con *S. boulardii*. A los 7 y 14 días posdestete se sacrificaron 5 cerdos por tratamiento. Los resultados muestran que a los 7 días posdestete, los animales alimentados con LincoSpectin y *S. boulardii* aumentaron la actividad de la amilasa pancreática con respecto a los animales que consumieron las dietas con *S. cerevisiae* y la dieta basal ($P < 0.001$). Además, la actividad de la tripsina de los cerdos alimentados con la dieta de *S. cerevisiae* se incrementó ($P < 0.05$) con respecto a los lechones del tratamiento con *S. boulardii*. Asimismo, la actividad de la quimotripsina aumentó en los lechones alimentados con *S. cerevisiae* y la dieta basal, con relación a los demás tratamientos ($P < 0.05$). A los 14 días posdestete, la actividad de la amilasa de los lechones del tratamiento con *S. cerevisiae* fue menor que los lechones de la dieta basal ($P < 0.05$) y la actividad de la tripsina y quimotripsina no mostró diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$). La inclusión de *S. boulardii* provocó la mayor producción de ácido acético, propiónico y butírico, mientras que los animales del control negativo tuvieron la mayor concentración de ácido valérico, ácido isobutírico, isovalérico e isocaproico, a los 7 y 14 días. A los 7 días posdestete se observó una gran relación entre la distribución bacteriana en los animales que consumieron antibiótico, *S. cerevisiae* y *S. boulardii*. Sin embargo, a los 14 días posdestete, los lechones del tratamiento con *S. cerevisiae* no tuvieron agrupación de las poblaciones bacterianas, mientras que los tratamientos con dieta basal y *S. boulardii*, tuvieron gran agrupación de las poblaciones bacterianas. La inclusión de LincoSpectin, *S. cerevisiae* o *S. boulardii* a la dieta de lechones recién destetados modifica la actividad de las enzimas pancreáticas, el perfil de ácidos grasos volátiles y la distribución de las poblaciones bacterianas del colon.

Palabras clave: levadura, probiótico, destete, enzima pancreática, ácido graso volátil, microbiota

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of the inclusion of an antibiotic (LincoSpectin), *Saccharomyces cerevisiae* or *Saccharomyces boulardii* in the diet for freshly weaned piglets on some characteristics of digestive physiology. A total of 40 Fertilis 20×G Performance piglets of 19.8 ± 1.56 days of age were used, with 6.2 ± 1.79 kg of live weight, the piglets were distributed according to a completely randomized design in 4 treatments, with 10 repetitions per treatment. The experimental treatments consisted of a basal diet (negative control) without antibiotic, one with antibiotic, one with *S. cerevisiae* or with *S. boulardii*. At 7 and 14 days post-southeast 5 pigs were slaughtered per treatment. The results show that at 7 days post-southeast, the animals fed with LincoSpectin and *S. boulardii* increased the activity of pancreatic amylase with respect to the animals that consumed the diets with *S. cerevisiae* and the basal diet ($P < 0.001$). In addition, the trypsin activity of pigs fed the *S. cerevisiae* diet was increased ($P < 0.05$) with respect to piglets treated with *S. boulardii*. Likewise, chymotrypsin activity increased in piglets fed *S. cerevisiae* and the basal diet, in relation to the other treatments ($P < 0.05$). At 14 days post-southeast, the amylase activity of the piglets of the *S. cerevisiae* treatment was lower than the piglets of the basal diet ($P < 0.05$) and the activity of trypsin and chymotrypsin showed no differences between treatments ($P > 0.05$). The inclusion of *S. boulardii* caused the highest production of acetic, propionic and butyric acid, while the negative control animals had the highest concentration of valeric acid, isobutyric acid, isovaleric and isocaproic acid, at 7 and 14 days. At 7 days post-southeast a great relationship was observed between the bacterial distribution in the animals that consumed antibiotics, *S. cerevisiae* and *S. boulardii*. However, at 14 days post-southeast, the piglets from the *S. cerevisiae* treatment did not have a grouping of the bacterial populations, while the treatments with a basal diet and *S. boulardii* had a large grouping of the bacterial populations. The inclusion of LincoSpectin, *S. cerevisiae* or *S. boulardii* in the diet of freshly weaned piglets modifies the activity of pancreatic enzymes, the profile of volatile fatty acids and the distribution of bacterial populations of the colon.

Keywords: yeast, probiotic, weaning, pancreatic enzyme, volatile fatty acid, microbiota

I. INTRODUCCIÓN

El consumidor moderno busca alimentos con características nutritivas excepcionales y que a la vez aporten salud y bienestar, es por eso que las características cualitativas de los alimentos son de carácter prioritario (Arvanitoyannis *et al.*, 2017). A nivel mundial, la producción porcina representa una opción importante para suministrar al hombre proteínas de origen animal, significativa no solo por la preferencia de la población, sino porque produce la mayor cantidad de carne en un período de tiempo más corto (Más *et al.*, 2016). En la búsqueda de alternativas para la producción y comercialización de carne, se presta cada vez mayor atención al cerdo como fuente estable y saludable de proteínas para la alimentación humana (Yan *et al.*, 2012).

En los nuevos esquemas de producción, los lechones que se destetan precozmente (entre los 15 y 28 días de edad) son sometidos a estrés ambiental y nutricional, lo que provoca la proliferación de bacterias patógenas intestinales (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Salmonella Typhimurium*), síndrome diarreico, retraso en el crecimiento y trastornos en su sistema inmunológico (Campbell *et al.*, 2013). La mortalidad en lechones es una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria porcina, con tasas que varían entre el 10 y el 20 % (Cai *et al.*, 2014).

Los antibióticos se han suplementado en las dietas de los animales para corregir los problemas del tracto gastrointestinal (TGI), incrementar los indicadores productivos y reducir la incidencia de diarrea (Hernández y Curbelo, 2015). Sin embargo, en los últimos años, la comunidad científica tiene gran interés en eliminar o minimizar el uso de antibióticos a niveles sub-terapéuticos como promotores de crecimiento, debido a que estos pueden incrementar el número de cepas bacterianas resistentes, así como transferir resistencia cruzada a otros microorganismos, con implicaciones negativas para la salud humana y animal (Figuroa *et al.*, 2006).

Por tal razón, en la actualidad existe una tendencia, cada vez más creciente, a la utilización de aditivos inocuos, como alimentos funcionales y nutraceúticos (Pandey *et al.*,

2019). Según Wan *et al.* (2018) y Nawab *et al.* (2019), los probióticos son considerados una alternativa para reemplazar los antibióticos, desde el punto de vista técnico, económico y biológico por la seguridad de su inclusión y su efecto sobre la fisiología de los animales. Las investigaciones muestran que los probióticos suplementados en las dietas de cerdos tienen un efecto positivo sobre el aumento del peso vivo, salud intestinal, digestibilidad de los nutrientes, respuesta inmune, capacidad antioxidante, disminución de la incidencia de diarrea, modulación de una mejor exclusión bacteriana competitiva benéfica, aumento de la producción de AGVs de cadena no ramificada y disminución de los AGVs de cadena ramificada (Asaduzzaman *et al.*, 2018; Anadón *et al.*, 2019).

La *S. cerevisiae* es un hongo unicelular, específicamente una levadura utilizada industrialmente en la fermentación de sustratos para la obtención de alimentos y bebidas, tales como pan, vino y cerveza (Wang *et al.*, 2015). Además de las bondades que presenta *S. cerevisiae* en la industria de bebidas y alimentos ha sido empleada como probiótico en las dietas de los animales para disminuir el uso de antibióticos promotores de crecimiento (APC), debido a sus efectos sobre los indicadores productivos, microbiota intestinal, índice de diarreas, respuesta antiinflamatoria intestinal, salud e integridad de la mucosa intestinal, además de la secreción de metabolitos que mejoran la respuesta inmunológica (Zanello *et al.*, 2011).

Por otro lado, la *S. boulardii* es una cepa de levadura tropical aislada por primera vez en las frutas del lichi y del mangostán en 1923 por el científico francés Henri Boulard. Es muy parecida a la *S. cerevisiae* pero distinta en muchas de sus características taxonómicas, metabólicas y genéticas (Malgoire *et al.*, 2005; Łukaszewicz, 2012). No obstante, otros autores consideran la *S. boulardii* una subespecie de la *S. cerevisiae* (Gagnon *et al.*, 2007).

S. boulardii ha probado ayudar a mantener y restaurar la flora intestinal natural en el intestino grueso y delgado y se clasifica como probiótico cuando es suministrada de forma viva y prebiótico cuando se suministra de manera muerta teniendo en cuenta las características que ofrece la pared celular. Martins *et al.* (2013), reportaron que la variedad *boulardii* es efectiva contra bacterias patógenas y disminuye la inflamación causada por

enfermedades en el TGI. Además, tiene el potencial de influir en la diversidad bacteriana (Gagnon *et al.*, 2007), reduce la translocación bacteriana (Lessard *et al.*, 2009) y disminuye la unión de *E. coli* enterotoxigénica a la mucosa ileal (Daudelin *et al.*, 2011).

En este sentido, Sanders *et al.* (2018) informaron que algunos beneficios clínicos probablemente se derivan de estos mecanismos compartidos, lo que sugiere que existen efectos probióticos específicos de especie o de subespecie. A pesar de todos los beneficios de las *Saccharomyces*, no se dispone de información suficiente acerca de su empleo como probiótico en las dietas de los cerdos recién destetados.

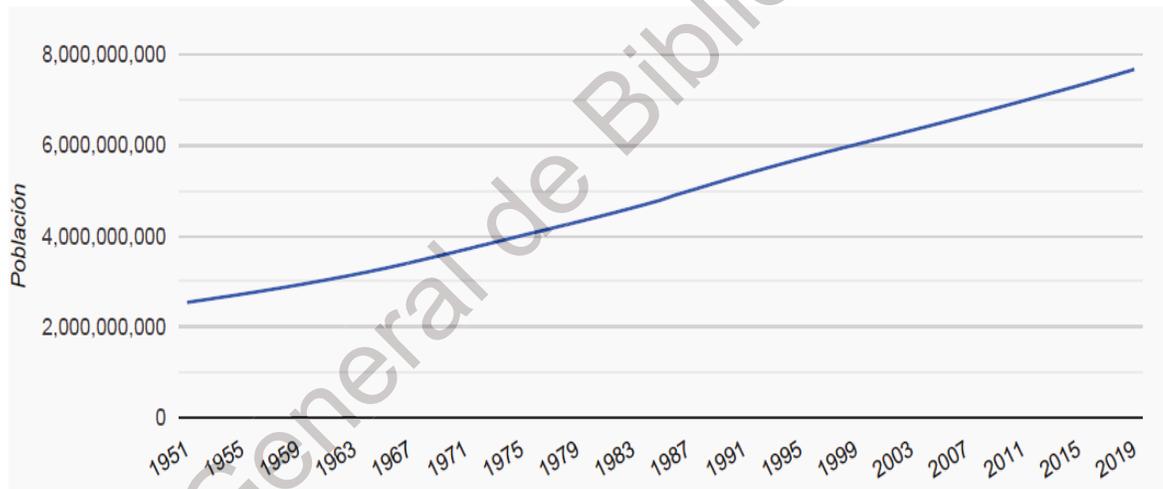
El estudio de estas cepas de levaduras en forma de un aditivo probiótico constituye una atractiva alternativa para ser considerada en la alimentación de especies monogástricas y en particular para los cerdos que poseen baja inmunidad específica, alta presencia de bacterias patógenas latentes y altos niveles de estrés posdestete. Ya que podría mejorar las condiciones del TGI y la fisiología digestiva de los lechones recién destetados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ¿Por qué producir carne de cerdo?

Desde la década de los años 50's del pasado siglo hasta la fecha, el crecimiento de la población se ha incrementado considerablemente desde 2,540,807,495 en el año 1951 hasta 7,669,109,078 habitantes al 1 de enero de 2019 (Figura 1). En América Latina ya son 600 millones de habitantes, equivalentes al 8,6 % del total de la población mundial, específicamente en México, hay 134,114,268 personas, siendo el décimo país más poblado del mundo (ONU, 2019).

Figura 3. Población mundial desde 1951 hasta 2019 (ONU, 2019).

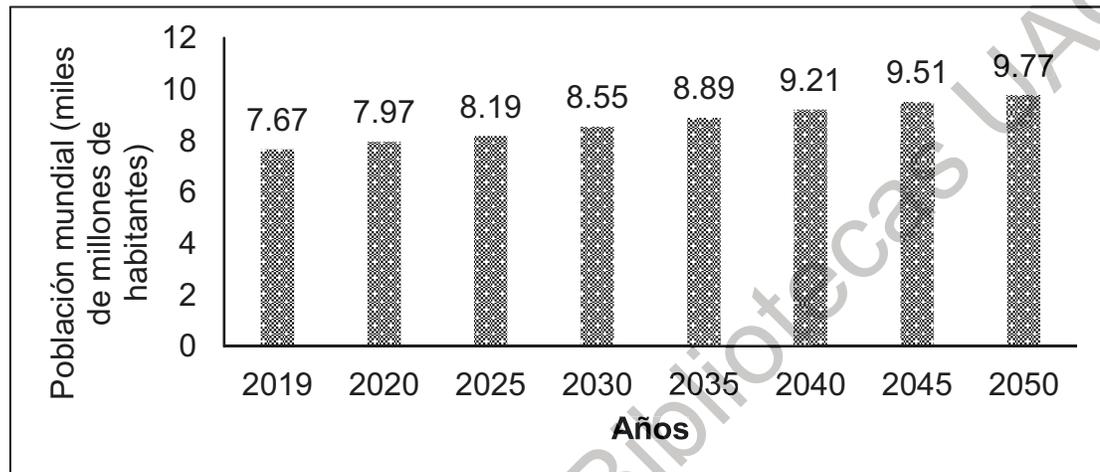


Asimismo, se estima que el crecimiento poblacional acelerado continúe desenfundadamente. Según el Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas (ONU, 2019), en el planeta Tierra para el año 2050 vivirán más de 9.7 mil millones de personas (Figura 2) y en América Latina habrá 750 millones de habitantes (FAO, 2019a).

Vale la pena destacar que existe una relación directamente proporcional entre el crecimiento poblacional y la cantidad de hambrientos en el planeta. Debido a la guerra económica entre las grandes potencias mundiales, el encarecimiento gradual, y al parecer imparable, del costo de los alimentos y el aumento de la pobreza, debido a la inequidad entre

pobres y ricos, en América Latina existen más de 56 millones de personas hambrientas (FAO, 2019a).

Figura 4. Estimación del crecimiento poblacional hasta 2050 (ONU, 2019).



Ante esta situación, la Organización de Naciones Unidas (ONU, 2019) ha declarado la producción de alimento como el desafío número uno, a cumplir con urgencia y prioridad. Se estima que la producción de alimentos para el año 2050 incremente en un 70 %, no obstante, se deben tener en cuenta los efectos del cambio climático y el calentamiento global.

Por otro lado, a pesar del incremento de las personas veganas y vegetarianas (Dodd *et al.*, 2019) y la propaganda negativa sobre los efectos perjudiciales de la carne de cerdo para la salud humana (Licata, 2019); cada vez se presta mayor atención al cerdo como fuente estable y saludable de proteínas para la alimentación humana (Chang *et al.*, 2019), debido a su precio accesible y la creciente confianza de los consumidores. Según la FAO (2019b) el consumo *per capita* mundial anual de carne de cerdo en el 2018 fue de 12.3 kg de carne en canal, más que el de carne de res (6.5 kg) y menor que la de pollo (14.2 kg). Se estima que el consumo mundial crezca 1.6 % este año (USDA, 2019).

También, la carne de cerdo en 2018 fue de mayor producción que la carne de pollo y res, las tres de mayor preferencia y consumo mundial. De acuerdo con la USDA (2019) la tasa de producción mundial para el 2019 será de 1.4 %, con un máximo histórico de producción de 114.6 millones de toneladas. Los principales productores mundiales son:

China, la Unión Europea (UE), Estados Unidos (EU), Rusia y Brasil, sin embargo, China con 49.6 %, la UE con 18.7 %, y EU con 8.7 %, del total mundial, son los más importantes consumidores.

En México en el 2018, la carne de cerdo ocupó la tercera posición entre los productos cárnicos, con 1.5 millones de toneladas, después de la carne de pollo con 3.31 millones de toneladas y la carne de res con 1.98 millones de toneladas. De acuerdo con datos de la FAO (2019b), el consumo *per capita* anual de carne de cerdo en México es de 12.8 kg, mayor que el de la carne de res (9.1 kg), pero menor que la carne de pollo (27.6 kg). Vale la pena destacar que la producción mexicana de cerdo es insuficiente para cubrir la demanda, por tanto, es necesario importar carne, principalmente de Estados Unidos y Canadá. Para el año actual se prevé un aumento en las exportaciones y una disminución en las importaciones, debido a un incremento en la producción (3.5 %) y una disminución en el consumo (1 %) (SIAP, 2019).

La actividad porcícola en México enfrenta diversos retos relacionados con la productividad, los costos de producción y la integración más eficiente de la cadena de valor, entre otros (Gaucín, 2019). La premisa de los productores porcícolas es garantizar altos niveles de productividad y rentabilidad en esta especie, para así garantizar la satisfacción de la población, en cantidad y calidad necesarios.

2.2. ¿Cómo alimentar al cerdo para incrementar la producción?

Los cerdos son animales heterótrofos y necesitan carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas, agua y minerales, para la síntesis y conservación de muchos de los compuestos de sus células constituyentes (Villem, 1988). El cerdo es un animal monogástrico de características alimenticias omnívoras que consume alimentos de origen vegetal y animal.

Como se menciona en el numeral 2.1, el cerdo ocupa el primer lugar en el mundo como productor de carnes rojas. Los altos niveles de producción del cerdo se deben a su alta prolificidad, fácil manejo, gran adaptabilidad a diferentes ambientes y a cualquier grado de especialización (pequeña, mediana o gran escala), además, consume gran diversidad y volumen de alimentos, principalmente, los no convencionales que compiten menos con el

consumo humano. Es una especie que posee alta eficiencia biológica en la transformación de los alimentos en carne y grasa, sobre todo, las características y sabor de sus carnes permite la elaboración de gran cantidad de derivados.

Vale la pena destacar que con los adelantos científicos la producción de cerdos no solo se encamina para producir carne y derivados, sino que otras aplicaciones y utilidades se le descubren: de su páncreas se obtiene insulina indispensable para diabéticos, se hacen implantes de algunas partes del páncreas en el hombre (Sanchez Rivero, 2007; Sabogal *et al.*, 2017); de la glándula pituitaria se obtiene la hormona ACTH, para el tratamiento de reumatismos y otras dolencias de curso inflamatorio (Suarez, 1951); de la tiroides se formulan medicamentos para personas con trastornos en dicha glándula (Mayo Clinic, 2018); del corazón se obtienen válvulas para trasplantes en humanos (Anónimo, 2013); de la piel se hacen injertos exitosos en caso de quemaduras graves; de la sangre de cerdos genéticamente modificados se puede producir hemoglobina humana, pudiendo ser conservada por meses (Bazán Milián *et al.*, 2004).

La alta eficiencia y rentabilidad de la industria porcina depende del sistema de producción aplicado. Según la FAO (2019b), los sistemas de producción se clasifican según sus insumos en altos, medios y bajos, además pueden ser intensivos, extensivos e intermedios según su nivel de tecnificación. En cualquiera de los sistemas empleados la alimentación representa el 80 % de los costos de producción, por eso se presta especial atención a la formulación y balanceo de las raciones que reciben los animales.

Específicamente en los sistemas intensivos se emplean animales de un alto valor genético que demandan una estricta formulación de sus raciones, en base a la digestibilidad ileal de los nutrientes esenciales. Las dietas deben cumplir con los requerimientos en cantidades y calidad necesarios para permitir la expresión del máximo potencial genético de los animales (Rostagno *et al.*, 2011).

A nivel mundial los sistemas de alimentación porcinos están divididos por fases, según la categoría, el sexo, la edad, peso, etc. Para la categoría de destete-crecimiento, el NRC (2012) recomienda que las dietas para cerdos deben ser formuladas por el peso de los cerdos,

según los requerimientos de nutrientes esenciales de los cerdos teniendo en cuenta que estos cambian constantemente según varios factores. Por otro lado, Rostagno *et al.* (2011), sugiere un sistema trifásico, según las condiciones del Brasil. En México se utiliza principalmente las recomendaciones de la NRC, no obstante, no se formula estrictamente según el peso de los lechones, está en dependencia del poder económico de los dueños de los sistemas de crianza semi-intensivos.

Los requerimientos nutricionales de los cerdos dependen de varios factores, como raza, linaje genético, sexo, heterosis, etapa de desarrollo del animal, consumo de ración, nivel energético de la dieta, disponibilidad de nutrientes, temperatura ambiente, humedad del aire, estado sanitario del animal, entre otros (Rostagno *et al.*, 2011). Además, la preocupación principal no debe ser apenas la de formular raciones de costo mínimo. Es importante la elaboración de raciones que permitan un menor costo de producción, o sea, que proporcionen la mejor productividad posible a un menor costo (Rostagno *et al.*, 2011).

Todas las categorías de producción son importantes, no obstante, se debe prestar mayor atención a la alimentación de los lechones recién destetados. El destete de los lechones provoca diferentes situaciones de estrés, principalmente de tipo alimenticio, ya que, al separarlos de su madre pasan de una dieta líquida a sólida, con otros niveles y tipos de nutrientes, lo que estimula una disminución del consumo en las primeras semanas, síndrome diarreico y retraso en el crecimiento (Campbell *et al.*, 2013). También, el poco desarrollo del sistema digestivo, inmunológico, endocrino y la microbiota intestinal benéfica, provoca una disminución en la salud intestinal y pérdidas en los costos de producción (Reis de Souza *et al.*, 2012).

2.3. ¿Qué es la salud intestinal?

El tracto gastrointestinal es un ecosistema activo en constante cambio, por lo tanto, la salud intestinal podría ser definida como la capacidad del TGI de mantenerse en equilibrio (Melin *et al.*, 1997). Sin embargo, según Kogut y Arsenault (2016), aún no existe una definición científica para el concepto de salud intestinal, a pesar de ser un tema cada vez más importante y popular en la nutrición animal.

La integración de la morfofisiología, secreciones digestivas, microbiología (microbiota) e inmunología intestinal, determinan el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis (Celi *et al.*, 2019), que combinado con el efecto de la dieta y los aditivos pueden lograr condiciones de salud y bienestar en los animales, que disminuyen los costos productivos y aumentan los indicadores de calidad (Pluske y Zentek, 2019).

2.3.1. Sistema digestivo de los cerdos

Los cerdos obtienen sus nutrientes, agua y electrolitos mediante el sistema digestivo. Anatómicamente el TGI está formado por: la boca, glándulas salivales, faringe, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), intestino grueso (ciego, colon y recto), además de las glándulas anexas: hígado y páncreas (Grossman y Sisson, 2000). Desde el punto de vista histológico está formado por cuatro capas principales: la mucosa, que comprende células epiteliales (enterocitos, células endocrinas y otras); la lámina propia y la *muscularis mucosae*; la submucosa; dos capas musculares, una interna gruesa y circular y otra externa fina y longitudinal (Cunningham y Klein, 2014).

El TGI tiene seis funciones principales: ingestión, motilidad, secreción, digestión, absorción y almacenamiento (Cunningham y Klein, 2014). Además, elimina los desechos sólidos y es barrera protectora contra microorganismos y parásitos.

La ingestión es el proceso mecánico de toma de los alimentos, masticación y deglución. La motilidad intestinal permite llevar los alimentos de un lugar al siguiente, romperlos físicamente y mezclarlos con las secreciones digestivas. Las secreciones digestivas son esenciales para desarrollar el entorno acuso óptimo para la digestión y absorción, no obstante, para mantener la homeostasis corporal se hace imperativa la necesidad de reabsorber los electrolitos y agua secretados en el lumen intestinal. La digestión se realiza por la acción de enzimas digestivas que hidrolizan las macromoléculas del alimento en compuestos más simples capaces de atravesar las membranas intestinales. Después de la digestión se realiza el transporte de moléculas simples a través de las paredes de las vías digestivas, este proceso se conoce como absorción (Villem, 1988; Cunningham y Klein, 2014).

El correcto funcionamiento morfofisiológico del sistema digestivo, regula la homeostasis del organismo, permite la entrada de nutrientes al sistema sanguíneo, el desarrollo productivo de los animales y el mantenimiento de la salud intestinal.

2.3.2. Secreciones del aparato digestivo

Los procesos de digestión y absorción solo pueden desarrollarse en el entorno acuoso proporcionado por las secreciones digestivas de los órganos intestinales o las glándulas anexas (Cunningham y Klein, 2014). Una correcta funcionalidad de la digestión y absorción permite la entrada eficiente de nutrientes y electrolitos al organismos, manteniendo y regulando la homeostasis del animal.

Las secreciones del aparato digestivo comienzan desde la boca, a medida que se mastican los alimentos se van mezclando con secreciones producidas por las glándulas salivales: parótidas, mandibulares y sublinguales. Además de lubricar el bolo alimenticio para facilitar la deglución, la saliva tiene propiedades antibacterianas por la presencia de anticuerpos y enzimas lisozimas. También, presenta actividad digestiva incompleta, contiene amilasa salival y lipasa lingual, encargadas de iniciar la degradación de los carbohidratos y lípidos. Asimismo, las secreciones salivales actúan como reguladoras de la temperatura corporal (Cunningham y Klein, 2014).

La zona glandular de la mucosa gástrica está dividida en tres regiones: mucosa del cardias, mucosa parietal y mucosa pilórica, las glándulas presentes en estas zonas presentan diferentes funciones, tales como: secreción de HCl, secreción de mucus, producción de células de la mucosa gástrica, secreción de pepsinógeno y quimosinógeno (precursores inactivos de las enzimas gástricas pepsina y quimosina) y producción de la hormona gastrina (células G de la mucosa pilórica). Vale la pena destacar que las secreciones de HCl y gastrina se estimulan por la liberación de acetilcolina, debido a que la presencia de alimento no digerido en el estómago envía impulsos parasimpáticos vagales sobre el sistema nervioso entérico. Asimismo, por acción de la gastrina y la acetilcolina se produce histamina en la mucosa parietal, encargada de amplificar la producción de ácido gástrico (Cunningham y Klein, 2014).

También en el intestino delgado se secretan electrolitos, hormonas y enzimas que contribuyen al proceso de digestión y absorción del alimento. Las principales hormonas que se producen en el duodeno y el yeyuno son: secretina, gastrina, colecistocinina, péptido inhibidor gástrico y motilina. Asimismo, se producen enzimas disacaridasas encargadas de la fase membranosa de la digestión de los carbohidratos: lactasa, maltasa, isomaltasa, sacarasa, además de la enzima enterocinasa encargada de activar la tripsina pancreática (Cunningham y Klein, 2014).

La hormona secretina es producida por las células S del duodeno y la parte superior del yeyuno. Las células G del duodeno secretan la hormona gastrina al igual que la mucosa del antro y el píloro del estómago. La colecistocinina es producida por las células endocrinas I y las neuronas entéricas del duodeno, además se puede producir también en el yeyuno y el íleon. El péptido inhibidor gástrico es producido por las células K del intestino proximal. La motilina es sintetizada por las células M del duodeno y en menor medida por el yeyuno. Las enzimas disacaridasas se producen en el interior de los enterocitos y luego se proyectan hacia la superficie luminal de la membrana apical. La enterocinasa es producida por las células de la mucosa duodenal (Guyton *et al.*, 2006; Cunningham y Klein, 2014).

El hígado, la glándula más grande del organismo, tiene muchas funciones, entre las que se encuentra la secreción de bilis al sistema digestivo, muy importante para la digestión de las grasas (Grossman y Sisson, 2000). La bilis está formada por ácidos biliares (ácido cólico, desoxicólico, hiodeoxicólico, quenodesoxicólico, ursodesoxicólico, además, los secundarios los ácidos litocólico, glicocólico y taurocólico), también presenta agua, fosfolípidos (lecitina), colesterol y pigmentos biliares (bilirrubina y biliverdina) (Guyton *et al.*, 2006).

El páncreas es una masa difusa e irregular de tejido situado entre el asa duodenal (Grossman y Sisson, 2000), formado por dos tipos de tejido glandular (Cunningham y Klein, 2014), lo que le permite tener una función endocrina (producción hormonal) y otra exocrina (secreciones digestivas) (Villem, 1988). Menos del 10 % de la masa del páncreas corresponde a una pequeña porción de células conocidas como islotes de Langerhans, encargados de la producción de las hormonas insulina y glucagón (Reece *et al.*, 2015). La mayor parte del

tejido pancreático es el páncreas exocrino, implicado en la elaboración de secreciones digestivas conocidas como jugo pancreático. El jugo pancreático es un líquido claro y acuoso, que se vierte al duodeno, con pH aproximado de 8.5, definitivamente alcalino y esencial para neutralizar el quimo ácido procedente del estómago, además de su composición hidroelectrolítica es rico en enzimas que hidrolizan proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Villem, 1988; Cunningham y Klein, 2014).

2.3.2.1. Enzimas pancreáticas

La digestión de las proteínas y los carbohidratos en los cerdos se lleva a cabo mediante diferentes tipos de enzimas digestivas en las diferentes partes del tracto gastrointestinal: α -amilasa pancreática 2A, α -amilasa pancreática 2B, carboxipeptidasa pancreática B1, quimotripsina B, quimotripsina C, lipasa pancreática, tripsina, enteroquinasa; maltasa, isomaltasa, sacarasa, lactasa, dipeptidasa-II y dipeptidasa-III (He *et al.*, 2016).

Las enzimas pancreáticas son producidas en el retículo endoplasmático rugoso de las células acinares del páncreas (Cunningham y Klein, 2014). Se clasifican en 4 grupos: glucolíticas, lipolíticas, proteolíticas y nucleolíticas, son las principales enzimas encargadas de la digestión de carbohidratos, lípidos y proteínas (Sastre *et al.*, 2005). En el Cuadro 1 se muestran las principales enzimas producidas por el páncreas.

Cuadro 1. Enzimas del jugo pancreático.

Enzima	Zimógeno	Activador	Función-acción
Tripsina	Tripsinógeno	Enterocinasa	Rompe enlaces peptídicos en las posiciones del carboxilo de aminoácidos adyacentes a Arg o Lis

Quimotripsina	Quimotripsinógeno	Tripsina	En el carboxilo terminal hidroliza restos de Trp, Tir, Fen y Met
Elastasa	Proelastasa	Tripsina	Rompe enlaces peptídicos
Carboxipeptidasa A	Procarboxipeptidasa A	Tripsina	Escinde restos de Fen, Tir y Trp del extremo carboxi-terminal de un polipéptido
Carboxipeptidasa B	Procarboxipeptidasa B	Tripsina	Escinde restos de Arg y Lis del extremo carboxiterminal de un polipéptido
Fosfolipasa A ₂	Profosfolipasa A ₂	Tripsina	Escinde ácidos grasos de los fosfolípidos (p. ej., lecitina)
Amilasa	–	–	Digiere el almidón a pequeños polímeros de maltosa, maltotriosa, isomaltosa y dextrinas límite
Lipasa	–	–	Escinde AG del glicerol
Carboxilesterasa	–	–	Hidroliza ésteres de colesterol
Ribonucleasa	–	–	Escinde ARN para formar cadenas cortas
Desoxirribonucleasa	–	–	Escinde ADN para formar cadenas cortas

Adaptado de Sastre *et al.* (2005).

En el momento del destete ocurre una profunda modificación en el proceso de digestión de la caseína, de los lípidos emulsificados y de la lactosa provenientes de la leche materna. En esta etapa las enzimas digestivas deben estar aptas para digerir proteínas de origen vegetal, gránulos de almidón y estructuras celulares. En realidad, los tres primeros días después del destete constituyen un período difícil para el lechón; durante este tiempo, la actividad de las

enzimas pancreáticas y en el contenido del yeyuno no responde a la fuente de proteína del alimento. La principal actividad hidrolítica para digerir los carbohidratos, proteínas y lípidos es proporcionada por el páncreas. Gran parte de estas enzimas están presentes en el páncreas del feto porcino, pero a un nivel bajo. Así al nacimiento el aparato enzimático del páncreas está prácticamente completo, pero la actividad enzimática es débil y estable. La presencia de inhibidores en el calostro, en la leche o en el jugo pancreático son factores limitantes a esta actividad. En los primeros estudios sobre el desarrollo de las enzimas pancreáticas del nacimiento hasta el destete a la semana de vida de los lechones, se observó que las modificaciones en la secreción y actividad de algunas enzimas coinciden con el cambio en la composición de la dieta debido al consumo del alimento complementario. La ingestión de alimentos puede ser el principal factor que modula la síntesis y secreción de las enzimas (Reis de Souza y Mariscal Landín, 1997).

La enzima hidrolasa encargada de la fase luminal de la digestión del glucógeno y el almidón es la α -amilasa, encargada de catalizar la reacción de hidrólisis de los enlaces α [1-4] de la amilosa, un polisacárido formado por unidades repetidas de glucosa con enlaces α [1-4]), y la amilopectina, un polisacárido similar a la amilosa pero con ramificaciones de glucosa que presentan enlaces α [1-6] que no se hidrolizan por la acción de la α -amilasa, tanto la amilosa como la amilopectina son las formas estructurales más importantes del almidón alimenticio (Cunningham y Klein, 2014).

Vale la pena destacar que los microorganismos saprofitos del TGI pueden producir β -amilasa, que actúa en el extremo no reductor de la cadena de almidón, catalizando la hidrólisis del segundo enlace α [1-4]. Asimismo, existe una γ -amilasa, producida por microorganismos, que además de romper el último enlace α [1-4] glicosídico en el extremo no reductor de la cadena de amilosa y amilopectina, también puede romper los enlaces glicosídicos α [1-6] (de la Cruz *et al.*, 2016).

La lipasa pancreática es la enzima encargada de la digestión de las grasas después de ser emulsificadas por la acción de la bilis. La lipasa pancreática actúa sobre los triacilglicéridos para dar ácidos grasos libres y mono-acilglicéridos. Es importante conocer

que la acción de la lipasa depende totalmente de la denominada activación de interfase con la colipasa, forman un complejo de unión con una interfase hidrófoba/hidrofilica, en presencia de las sales biliares. La colipasa es una glucoproteína hidrófoba formada a partir de la procolipasa de la secreción pancreática por acción de la tripsina (Sastre *et al.*, 2005).

Las principales enzimas proteolíticas pancreáticas, tripsina, quimotripsina y elastasa son endopeptidasas que rompen los enlaces peptídicos, mientras que las carboxipeptidasas A y B son exopeptidasas y actúan en el grupo carboxilo terminal de algunos aminoácidos específicos (Cuadro 1). Teniendo en cuenta el potente efecto proteolítico de las enzimas pancreáticas, estas son segregadas en forma de zimógenos o proenzimas, para evitar daños a las células productoras y los conductos pancreáticos, una vez en la luz intestinal, se activan por la tripsina quien puede ser activada por si misma o por la enterocinasa (Sastre *et al.*, 2005; Cunningham y Klein, 2014).

La tripsina escinde enlaces peptídicos de los que forma parte el grupo carboxílico de un aminoácido básico, como la lisina o la arginina (Sánchez-Bernal *et al.*, 2002), tiene un pH óptimo aproximando de 8 y la temperatura óptima es de 37 °C. La quimotripsina hidroliza enlaces peptídicos en los que intervienen grupos carbonilo de aminoácidos aromáticos, tales como: triptófano, tirosina, fenilalanina y metionina (no aromático) (Sánchez-Bernal *et al.*, 2002).

2.3.3. Regulación de la actividad intestinal:

Para mantener la homeostasis, cumplir con sus funciones básicas y crear el ambiente adecuado para la salud intestinal, el sistema digestivo consta de dos sistemas de control: intrínseco y extrínseco.

El Cuadro 2 muestra la acción de cada hormona del sistema de control intrínseco hormonal y el estímulo que la provoca.

Cuadro 2. Hormonas gastrointestinales (Cunningham y Klein, 2014).

Hormona	Lugar de producción	Acción	Estímulo liberador
Secretina	Duodeno y yeyuno superior	Estimulación la secreción de bicarbonato e inhibe la de ácido (antiácido natural)	Ácidos, lípidos y proteínas
Gastrina	Estómago y duodeno	Estimula la secreción de ácido y el crecimiento del epitelio estomacal (marcador de cáncer)	Proteínas y aumento de la acidez gástrica
Colecistocinina	Duodeno, yeyuno e íleon	Estimula la secreción pancreática de enzimas y las contracciones de la vesícula biliar; inhibe la ingesta de alimentos y el vaciado del estómago	Lípidos y proteínas
Polipéptido inhibidor gástrico	Duodeno y yeyuno	Inhibe las secreciones gástricas y estimula la secreción de insulina	Lípidos y glucosa
Motilina	Duodeno y yeyuno	Inducción de la fase III del complejo motor de migración durante el ayuno	Acetilcolina

Según Cunningham y Klein (2014), el sistema de control intrínseco está situado en la pared del TGI y tiene dos componentes: el control neuronal efectuado por el sistema nervioso enteral y el control hormonal por las hormonas secretina, gastrina, colecistocinina, péptido inhibidor gástrico y motilina (Cuadro 2). Asimismo, pero ubicado fuera de la pared del TGI, el sistema de control extrínseco consta de dos mecanismos de regulación: el neuronal por la acción de los nervios vago y esplácnico, y el hormonal limitado sola a la hormona aldosterona.

2.3.4. Microbiota

La salud intestinal y la homeostasis de los animales depende indispensablemente del equilibrio simbiótico que se establece entre el TGI del hospedero y los microorganismos benéficos que lo colonizan (Celi *et al.*, 2017).

En el interior del tracto digestivo de los animales, una gran diversidad de especies bacterianas compite y coexisten por sus necesidades nutricionales y de espacio durante los procesos de colonización, establecimiento y crecimiento (Marchesi *et al.*, 2016). De forma paralela estas bacterias interactúan con el hospedero a diferentes niveles participando en los procesos digestivos (Celi *et al.*, 2017).

En este sentido, varios autores reportan que la microbiota intestinal aporta diversas funciones fisiológicas, tales como: protección, estructura y también metabólicas. La microbiota intestinal contribuye para la regulación de la homeostasis del huésped, permitiendo óptima digestión y absorción de nutrientes y electrolitos, regulación del metabolismo energético, prevención de enfermedades infecciones y modulación del sistema inmunológico (Lee y Hase, 2014; Marchesi *et al.*, 2016).

Es importante destacar que los microorganismos intestinales utilizan para su desarrollo casi todos los tipos de sustratos tales como: alimentos ingeridos, *mucus*, secreciones digestivas y células descamadas. En la parte anterior del TGI la microbiota tiene acceso al alimento exógeno, mientras que en el intestino grueso solamente los nutrientes no digeridos por las enzimas del hospedero y los sustratos endógenos son disponibles (Bernalier-Donadille, 2010).

Las bacterias se pueden clasificar en función de los sustratos que utilizan y los productos finales de su fermentación (Cuadro 3), se debe tener en cuenta que una misma bacteria puede cumplir más de una función metabólica y tener más de un tipo de sustrato.

Cuadro 3. Clasificación funcional de las bacterias y principales productos.

Bacterias	Sustrato	Principales productos
-----------	----------	-----------------------

Celulolíticas	Carbohidratos estructurales de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y sustancias pectínicas)	Ácidos grasos volátiles (AGV) (principalmente ácido acético)
Amilolíticas	Carbohidratos amiláceos de reserva de granos (almidón)	AGV, principalmente ácido propiónico
Sacarolíticas	Carbohidratos simples	AGV, principalmente ácido butírico
Lactolíticas	Lactosa y lactato	Principalmente ácidos propiónico y láctico
Lipolíticas	Lípidos	Ácidos grasos libres y AGV (principalmente ácido propiónico)
Proteolíticas	Proteínas	AGV ramificados y amoníaco
Metanógenas	-	Metano
Ureolíticas	Urea	CO ₂ y amoníaco

Adaptado de Relling y Mattioli (2008).

Por otro lado, los animales jóvenes presentan un ecosistema microbiológico digestivo inestable y más fácilmente perturbable en comparación con animales adultos. Por ende, en animales recién destetados se puede observar una menor cantidad de especies bacterianas en el TGI respecto al tracto digestivo de animales adultos, esto ocurrirá hasta que las poblaciones bacterianas del tracto digestivo no estén bien establecidas y alcancen su madurez (Reis de Souza *et al.*, 2012).

2.3.4.1. Ácidos grasos volátiles

Como se observa en el Cuadro 2, la fermentación bacteriana de carbohidratos, lípidos y proteínas produce ácidos grasos volátiles (AGV's). Los ácidos grasos volátiles son ácidos grasos de cadena corta que se producen principalmente en el intestino grueso y brindan nutrición y protección al intestino (Reis de Souza y Mariscal Landín, 1997).

Los AGV's según la estructura de la cadena carbonada se clasifican en ramificados y no ramificados. Entre los AGV's no ramificados se encuentran: el ácido acético, propiónico, butírico y valérico, producidos principalmente por la fermentación microbiana de los carbohidratos (Huang *et al.*, 2016). Los ácidos grasos de cadena ramificada son el ácido isobutírico, isovalérico e isocaproico, se sintetizan por la fermentación de bacterias proteolíticas sobre los α -cetoácidos que se derivan de la valina, leucina y la isoleucina (Hermes *et al.*, 2009; Murínová y Dercová, 2014).

En síntesis, las alteraciones en la microbiota intestinal debido a diferentes factores, puede producir trastornos en el metabolismo de los AGV's, causar daños a la mucosa y disminuir el estado de salud intestinal de los cerdos recién destetados.

2.3.4.2. Factores que afectan la microbiota

Los factores que afectan la microbiota intestinal influyen en la diversidad, cantidad y relación de las familias bacterianas que colonizan el TGI, quizás por disminución de un tipo de bacterias y a su vez el estímulo de crecimiento de otro perfil bacteriano o viceversa. Según Savage (1984) estos factores pueden ser agrupados en dos grupos: alogénicos y autogénicos.

2.3.4.2.1. Factores alogénicos

Los factores alogénicos son aquellos ejercidos por el hospedero, entre los que se encuentran el estrés, pH, edad, ambiente, dieta, sistema inmune y la motilidad intestinal.

El estrés es un síndrome multifactorial que altera el equilibrio hormonal del sistema hipotálamo-hipófisis con otras glándulas endocrinas como las suprarrenales y la tiroides. Las hormonas secretadas de manera irregular por el sistema endocrino pueden afectar la relación microbiana. En este sentido, Liu *et al.* (2008) reportaron el incremento de bacterias patógenas, *E. Clostridium perfringens* y *Salmonella Typhimurium*, en cerdos destetados.

Cada microorganismo requiere de condiciones específicas para su óptimo desarrollo y crecimiento, y una de ellas es el pH. Es conocido que valores bajos de pH en el TGI favorecen la disminución de la población de bacterias entéricas patógenas, debido a la destrucción de

las enzimas o a la pérdida de la función de estas, así como a la dificultad en el transporte intracelular. La disminución del pH intestinal por el aumento de las concentraciones de AGV's (Taciak *et al.*, 2010) puede inhibir el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas (Józefiak *et al.*, 2008) y estimular el crecimiento de bacterias benéficas.

También es importante conocer que los nutrientes en la dieta modifican el perfil bacteriano (Herrero de Lucas *et al.*, 2018). Según Everaert *et al.* (2017), una dieta alta en proteínas estimula una población bacteriana abundante en bacterias patógenas. Por otra parte, se sabe que las dietas fibrosas favorecen el desarrollo de los microorganismos celulolíticos (Lee *et al.*, 2016). En este sentido, Williams *et al.* (2005) reportaron que la presencia de un tipo de bacteria específico según el tipo de sustrato puede estimular un perfil heterogéneo de la microbiota en una parte determinada del intestino. Los antibióticos promotores de crecimiento, prebióticos y probióticos en la dieta, pueden modificar la correlación bacteriana (Herrero de Lucas *et al.*, 2018; Anadón *et al.*, 2019).

En dependencia de la edad del animal varían las características fisiológicas del mismo y esto, a su vez, repercute en la microbiota intestinal. En la primera semana de vida aparecen determinadas especies de estreptococos las cuales posteriormente son sustituidas por otras especies de ese mismo género (Everaert *et al.*, 2017). A medida que el aparato digestivo madura se implanta la flora normal del tracto (Kim *et al.*, 2011). Estos autores reportaron un incremento de los géneros pertenecientes al *phylum* Firmicutes a medida que aumentaba la edad de los cerdos, mientras que se disminuían las familias *Enterobacteriaceae* (Kim *et al.*, 2011).

Por otro lado, el sistema inmune del TGI, tiene probablemente como efecto más importante la producción de IgA, una inmunoglobulina que posee un componente secretorio, el cual le permite la asociación con el mucus del epitelio y le confiere resistencia a la degradación enzimática (Herrero de Lucas *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019). Esta inmunoglobulina actúa cubriendo la superficie de la bacteria, lo que impide de esta forma la adhesión de las mismas al epitelio y facilita su identificación por células fagocíticas (O'Doherty *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019).

La motilidad intestinal juega un papel muy importante en el manteniendo de la microbiota benéfica del TGI. Es un factor importante que permite al hospedero mantener la microbiota en un rango determinado. Una detención de movimientos peristálticos provocaría un sobre-crecimiento de las bacterias en el intestino, lo que conllevaría a severos problemas para el hospedero como son: mala absorción de nutrientes, pérdida de la homeostasis y daños a la mucosa (Herrero de Lucas *et al.*, 2018).

2.3.4.2.2. Factores autogénicos

Por otro lado, los factores que permiten la autorregulación de la microbiota son los llamados factores autogénicos, que comprenden la competencia por nutrientes, producción de metabolitos inhibidores y competencia por los sitios de asociación.

Varios autores han reportado sobre la exclusión competitiva que se establece en el TGI por las diferentes familias bacterianas. Esto se basa en la teoría del quimiostato, la cual plantea que una mezcla de bacterias en un cultivo de flujo continuo donde compiten por los nutrientes esenciales para el crecimiento (Speirs *et al.*, 2006). El principal factor limitante de la multiplicación de estos microorganismos es la escasez de una fuente de nutrientes utilizables. Asaduzzaman *et al.* (2018) informaron que los probióticos pueden aumentar las poblaciones de bacterias benéficas en el TGI e incrementar la competencia por los sustratos en esta porción, así como disminuir la presencia de bacterias patógenas adheridas en las células de la mucosa intestinal.

Los microorganismos intestinales no solo compiten por los sustratos, sino que también se autorregulan mediante la competencia por los sitios de asociación. Para sobrevivir en el ecosistema del tracto digestivo, muchos microorganismos están obligados a asociarse con la mucosa intestinal. Esta unión permite que la microbiota no sea arrastrada del intestino por el flujo peristáltico. Por eso en la actualidad se habla de una microbiota de la luz intestinal y otra adherida a la mucosa, con características muy diferentes entre ellas (Zhang *et al.*, 2018).

Se ha planteado que dos o más cepas bacterianas que compiten por un mismo nutriente limitante pueden coexistir si la cepa menos eficiente metabólicamente encuentra algún sitio

de adhesión disponible en el epitelio (Zhang *et al.*, 2018). Existen evidencias de que los microorganismos usados como probióticos tienen la habilidad de competir exitosamente por sitios de adhesión con patógenos como *E. coli* (Daudelin *et al.*, 2011).

Es importante destacar que no todas las relaciones que se producen son adversas, sino que también se desarrollan relaciones de cooperación. Según Zhang *et al.* (2018), un microorganismo puede convertir un sustrato no utilizable por otro microorganismo, en un producto que si puede ser asimilado por este último. Muchos microorganismos sintetizan vitaminas que pueden ser aprovechadas por otros que también la necesitan, pero no son capaces de producirlas (Ramakrishna, 2013). También las bacterias celulolíticas y amilolíticas descomponen los carbohidratos estructurales hasta glucosa (Augustine y Joseph, 2018), la cual si puede ser degradada por las demás bacterias del intestino.

La microbiota intestinal produce metabolitos tóxicos que pueden inhibir el crecimiento y supervivencia de otros microorganismos intestinales, principalmente bacterias patógenas. Algunos de estos metabolitos inhibitorios entre los que se encuentran el H₂S (Hine *et al.*, 2018), H₂O₂ (Imlay, 2019), péptidos y proteínas antimicrobianas (Kombrink *et al.*, 2019), amonio, los ácidos biliares libres y AGV's pueden actuar directamente sobre los microorganismos o crear condiciones ambientales desfavorables a este como son la disminución del pH y el equilibrio ácido-básico. En este sentido, Williams *et al.* (2005) reportaron que las concentraciones de AGV's y amonio pueden disminuir las poblaciones de bacterias patógenas, al disminuir el pH intestinal.

Todas estas interrelaciones hacen posible la regulación de la microbiota intestinal de forma tal que esta se mantenga en condiciones de equilibrio. También la manipulación de la composición de la microbiota gastrointestinal a través de aditivos nutraceúticos en la dieta representa una herramienta interesante para evitar problemas intestinales y promover el desempeño del animal. Los probióticos deben crear condiciones en el TGI que generen y mantengan un equilibrio entre el huésped y la microbiota intestinal. En los últimos años ha tenido un gran impacto el hecho de que los microorganismos indígenas promuevan la estimulación del sistema inmune en el TGI.

2.3.5. El intestino como sistema inmune

El tracto digestivo por su tamaño está expuesto a una gran cantidad de agentes perjudiciales y se considera la principal puerta de entrada de patógenos al cuerpo, causantes de enfermedades entéricas y orgánicas, que destruyen el estado de salud intestinal y la homeostasis. El sistema inmunitario se encarga de controlar y regular la entrada de esos agentes patógenos al organismo, por tanto, es indispensable para la homeostasis y la salud intestinal de los lechones recién destetados (Stokes y Vega Lopez, 1994).

Vale la pena destacar que los lechones recién destetados presentan un sistema inmune inmaduro y no están preparados para enfrentar los desórdenes que se producen en la microbiota, producto del destete precoz en los sistemas de producción actuales (Lallès *et al.*, 2007).

La mayor cantidad de factores involucrados en la inmunidad innata (inespecífica) y adquirida (específica) de los cerdos, residen en la mucosa del TGI (Stokes y Vega Lopez, 1994). Debido a la inmadurez inmunológica que sufren los lechones recién destetados, sus sistemas de defensas se basan principalmente en la respuesta inmune innata .

Como primera barrera física se encuentra la mucosa, que no solo actúa contra patógenos, sino que protege ante toxinas y alimentos en mal estado, luego aparece el mucus rico en factores solubles tales como: mucinas, enzimas, proteínas de fase aguda e interferones que constituyen una barrera bioquímica (Hannant, 2002). También, las condiciones de pH, poliaminas, enzimas proteolíticos pancreáticas y las sales biliares fungen como defensa química. Asimismo, la flora saprofita crea microambientes beneficiosos para mantener la homeostasis y evitar la entrada de patógenos al cuerpo. Si las barreras antes mencionadas son vulneradas por los patógenos existen células especializadas entre las que se encuentran los polimorfonucleares, macrófagos y *natural killer*, encargadas de fagocitar y eliminar agentes nocivos (Collado *et al.*, 2008; Tizard, 2013).

Aunque muy poco desarrollado y en una presencia leve, los componentes de la respuesta inmune adquirida que constituyen la parte de la memoria inmunológica tienen actividad muy específica contra agentes patógenos. Están formados por los linfocitos T y B, responsables de la respuesta celular y humoral, respectivamente (Velásquez, 2005). Existen dos tipos principales de linfocitos T, los cooperadores T_h ($Th0$, $Th1$ y $Th2$) que activan los macrófagos y linfocitos B, y

los linfocitos citotóxicos Tc, destructores de células infectadas por bacterias y virus. Los linfocitos B son productores de células plasmáticas que producen las inmunoglobulinas Ig, encargadas de la memoria contra determinados microorganismos (Hernández, 2009; Tizard, 2013).

Cuando los lechones son destetados pierden la protección inmune brindada por el calostro y la leche materna, además se enfrentan a situaciones estresantes que trastornan equilibrio microbiano y la homeostasis (Campbell *et al.*, 2013). Por tanto, se hace indispensable suministrar una dieta que no solo aporte las cantidades adecuadas de nutrientes esenciales, sino que también estimule la inmunidad del animal.

2.3.5.1. Mucosa

La mucosa gastrointestinal está compuesta por una capa mucosa superpuesta a una única capa de células epiteliales intestinales y un conjunto subyacente de células, formado por células mesenquimales, células dendríticas, linfocitos y macrófagos, que forman el tejido linfoide asociado al intestino (GALT por sus siglas en inglés). Las células epiteliales intestinales (IEC por sus siglas en inglés) son centrales a este sistema, ya que segregan y regulan la composición de la capa mucosa y también interactúan con las células subyacentes (Hannant, 2002).

El epitelio de la mucosa del TGI y el tejido GALT asociado son los primeros sitios, en el huésped, que están expuestos a las variaciones en la ingesta de nutrientes. Poco se conoce, relativamente, sobre cómo los nutrientes pueden alterar el desarrollo y la función del GALT, sin embargo, se ha observado que la dieta logra modular el desarrollo del GALT, ya que el suministro de una fórmula a base de caseína a lechones recién nacidos puede comprometer el desarrollo del GALT y el sistema inmunológico (Celi *et al.*, 2017).

La ingesta de nutrientes y la colonización de la microbiota promueven el desarrollo del GALT, que ocurre en paralelo al desarrollo del tracto gastrointestinal, redundando en un sistema inmunológico funcional. El GALT promueve la funcionalidad gastrointestinal, al distinguir los agentes patógenos y no patógenos y las amenazas transmitidas por los alimentos

al huésped. Esta orientación homeostática se ve continuamente desafiada por eventos fisiológicos y una aceleración en el desempeño productivo, que pueden llevar a una desregulación de la respuesta inmunológica en el tracto gastrointestinal (Celi *et al.*, 2017).

2.3.6. Bienestar-Destete

Tanto factores externos como internos modulan el estado de salud intestinal de los animales. Para obtener valores productivos rentables, en los sistemas de producción se le debe brindar a los cerdos ciertas condiciones de bienestar que garanticen una buena salud que permitan desarrollar todo el potencial genético de los animales, para producir mayores cantidades de carne en el menor tiempo posible.

Cuando se les brindan a los animales las condiciones ambientales idóneas (confort climático), salubridad (confort sanitario), espacio vital y frente de comedero (confort físico), óptima densidad de alojamiento (confort social) y se cubren sus necesidades básicas de agua y nutrientes esenciales, según la etapa fisiológica específica de su vida productiva, pudiera decirse que existe bienestar animal (Paramio *et al.*, 2010; Fraser *et al.*, 2013; Losada-Espinosa *et al.*, 2017).

No obstante, durante el destete los animales pierden su bienestar por diferentes factores desencadenan el síndrome estrés, lo que provoca pérdidas considerables para la economía. En este sentido, (Reis de Souza *et al.*, 2010) reportaron que durante el destete los lechones sufren la separación de la madre y de la camada, cambio del medio ambiente (instalaciones) y de alimentación, lo cual genera un estrés que altera su desarrollo gastrointestinal y por ende su capacidad productiva. Vale la pena destacar, que los cerdos al momento del destete están preparados fisiológicamente para utilizar la leche de la madre como fuente primaria de nutrientes y no están aptos morfofisiológica, microbiológica e inmunológicamente para digerir dietas no lácteas basadas en carbohidratos, proteínas y grasas complejas (Reis de Souza *et al.*, 2012)

En este período crítico de la vida del cerdo ocurren trastornos gastrointestinales, disminución del consumo de alimento, problemas de mala digestión y absorción, síndrome diarreico y retraso en el crecimiento, debido a una baja actividad de las proteasas, secreción

limitada de HCl, valores de pH insuficientes, desequilibrio bacteriano y disminución de la homeostasis por pérdidas de electrolitos y agua (Gresse *et al.*, 2017; Nawab *et al.*, 2019).

2.3.7. Dieta

Los nutrientes ingeridos tienen un rol significativo en el desarrollo, funcionalidad y salud del tracto gastrointestinal. En este sentido, Celi *et al.* (2017) mencionaron que los ingredientes, nutrientes y aditivos de la dieta influyen en el desarrollo y la función del sistema digestivo, incluyendo el sistema inmunológico y la microbiota asociados.

Varias investigaciones demuestran el efecto de suplementos alimentarios, alimentos e ingredientes funcionales, no solo para apoyar el desempeño productivo del animal, sino que también tratan de mantener la salud y el bienestar (Starkey, 2014; Hoste *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, el uso de ingredientes funcionales apoya la maduración del sistema inmunológico, modula el equilibrio ácido-básico y mejora la respuesta inflamatoria (Celi *et al.*, 2019).

Por lo antes mencionado, para optimizar las dietas y la nutrición de los lechones recién destetados, deben tenerse en cuenta los diversos aspectos de la funcionalidad gastrointestinal, inmunología, microbiota y bienestar que contribuyen para mejorar la salud animal (Allen *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2014). Las propiedades funcionales y promotores de crecimiento de los ingredientes y aditivos del alimento balanceado deben estar encaminados a mejorar la salud gastrointestinal y corregir los problemas causados por el destete.

2.4. Antibióticos promotores de crecimiento

2.4.1. Uso de los antibióticos promotores de crecimiento

Los antibióticos se han suplementado en las dietas de los animales con el objetivo de corregir los problemas del tracto gastrointestinal, modular la microbiota, ayudar la inmunidad e incrementar los indicadores productivos (Hernández y Curbelo, 2015).

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos o de forma sintética, que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden, eventualmente, destruirlos. El primer antibiótico sulfamídico fue anunciado en 1935 dando inicio a la era moderna de la terapéutica antimicrobiana, caracterizada por una enorme disminución de la morbilidad y de la mortalidad para muchas enfermedades infecciosas (Kirchhelle, 2018).

Las propiedades promotoras del crecimiento de diversos antibióticos y productos antimicrobianos se descubrieron a finales de los años cuarenta, al introducir el micelio de la producción de clortetraciclina en dietas destinadas a pollos (Hernández y Curbelo, 2015).

Entre los antibióticos usados como promotores de crecimiento en cerdos, se encuentra el LincoSpectin 100, que es una combinación de dos antibióticos, lincomicina y espectinomicina, teniendo un espectro de actividad complementario y más amplio (Escobar García *et al.*, 2014).

La Lincomicina es un antibiótico del grupo de las lincosamidas. Presenta un mecanismo de acción y un espectro bacteriano muy semejante al de los macrólidos. Actúa inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas al unirse a la subunidad 50s del ribosoma, impidiendo el acoplamiento de las moléculas del RNA de transferencia (Barreno y Jair, 2018). Es primeramente bacteriostático, pero a altas concentraciones puede ser bactericida. Es activo fundamentalmente frente a gérmenes Gram + y micoplasmas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. (cepas β -hemolíticas), *Str viridans*, *Clostridium tetani*, *C. perfringens*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira* spp. y *Mycoplasmas* (Zoetis, 2013).

La Espectinomicina es un antibiótico bacteriostático; algunos autores lo incluyen dentro del grupo de los aminoglucósidos, mientras que otros lo consideran independiente de este grupo, debido a que tiene una estructura química diferente a estos, aunque su mecanismo de acción y espectro bacteriano es bastante semejante. Actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana, al fijarse sobre la subunidad 30s del ribosoma. Perturba la ordenación del RNA

mensajero y provoca una lectura incorrecta del código genético por el RNA de transferencia. Es activo frente a gérmenes Gram + y Gram - (Brugueras y García, 1998).

Existe un efecto sinérgico en la asociación de Lincomicina y Espectinomina en la proporción 1:1 y 1:2, traduciéndose en una mayor eficacia frente a distintos procesos patológicos (diarrea porcina) que la que tiene cuando estas dos sustancias actúan por separado. Los parámetros farmacocinéticos de la asociación no se ven modificadas, coincidiendo con los que tienen cada uno de los principios activos por separado (McOrist *et al.*, 2000).

El mecanismo de acción de los antimicrobianos aún no se comprende completamente, pero existen numerosos informes que indican que tienen un efecto reductor de las enfermedades en los cerdos (NRC, 2012). Este efecto probablemente se afirma al mejorar la inmunidad de los cerdos y al controlar los patógenos intestinales. Los antimicrobianos también pueden mejorar la digestibilidad de energía y nutrientes en las dietas alimentadas a cerdos, lo que da como resultado que haya más nutrientes disponibles para síntesis tisular. La mejora de la digestibilidad de los nutrientes y la energía puede ser el resultado de cambios en la población microbiana intestinal, pero también se puede observar un espesor reducido de la pared intestinal en cerdos alimentados con dietas que contienen antimicrobianos (Stewart *et al.*, 2010).

A pesar de los beneficios del uso de APC en las dietas de los cerdos, estos enmascaran la mala calidad del alimento, dificultan mejoras en formulación y desarrollo de alternativas, limitan posibilidades terapéuticas por desarrollo de resistencias, ocultan enfermedades subclínicas y el estrés por mal manejo, permiten mayores densidades de cría, aumentan pool ambiental de genes resistentes, transfieren resistencias a microorganismo en humanos y acortan la vida de antibióticos médicos (Figuroa *et al.*, 2006; Povolo y Ackermann, 2019). Por lo tanto, la comunidad internacional busca nuevas alternativas para sustituir los antibióticos utilizados en dosis sub-terapéuticas.

A partir del 1 de enero de 2006, en la Unión Europea y en otros países del mundo, se prohibió el empleo de APC (Santovito *et al.*, 2018). La comunidad científica y la industria

del sector ganadero estudian e introducen nuevos aditivos seguros e inocuos para mejorar los indicadores de salud y productivos de los animales, tales como los fitobióticos productos herbales, ácidos orgánicos, enzimas exógenas, enzimas recombinantes, nucleótidos y ácidos grasos poliinsaturados, nucleótidos, nutrientes aislados (vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos), simbióticos, prebióticos y probióticos (Nawab *et al.*, 2019; Pandey *et al.*, 2019).

En México, se continúan usando APC, no obstante, se limita su uso en dosis terapéuticas (Vazquez, 2019). Existe una Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos, que no prohíbe el uso de APC, pero si limita la creación de nuevos productos, además trata de regular e informar sobre la resistencia que causan los APC (Diario Oficial de la Federación, 2018).

2.5. Alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento

En la búsqueda de las alternativas al uso de APC se presta mayor atención a la utilización de aditivos inocuos, como alimentos funcionales y nutraceúticos (Pandey *et al.*, 2019), que además de incrementar los indicadores productivos de los animales, mejoren las condiciones del TGI, modulen una exclusión competitiva benéfica, estimulen la respuesta inmune y antiinflamatoria, saludable para los cerdos recién destetados.

2.5.1. Alimentos funcionales y nutraceúticos

El poder funcional de los alimentos sobre la salud es de origen milenario, principalmente a lo largo de la historia de la cultura oriental, donde los alimentos y la medicina son considerados igualmente importantes en la prevención y curación de enfermedades. La relación alimento-medicina es conocida por la cultura China hacia el año 1000 AC. El "Yellow Emperor's Internal Classic" es probablemente el primer libro clásico de medicina China, (745-221 a.C.) donde se encuentran diversas prescripciones de dietas médicas (Solos *et al.*, 2014).

Muchos productos, desde la antigüedad, han sido utilizados como alimentos, y como medicina, tales como el jengibre, la menta, el ajo, el azafrán. La filosofía del "alimento como medicina" es la que soporta el paradigma de los alimentos funcionales (Singh *et al.*, 2018). También el padre de la medicina, Hipócrates de Cos (460 a.C. - 370 a.C.) en una de sus citas dice "Que tu medicina sea tu alimento, y el alimento tu medicina".

Un alimento puede ser considerado funcional si logra demostrar satisfactoriamente que posee un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo, mejora el estado de salud y de bienestar o bien reduce el riesgo de una enfermedad, más allá de los efectos nutricionales habituales (Nawab *et al.*, 2019).

El término "nutracéutico" se puede definir como cualquier alimento o partículas de alimentos que juegan un papel esencial en el mantenimiento de la función corporal normal que proporciona beneficios para la salud, incluida la prevención y el tratamiento de una enfermedad (Das *et al.*, 2012).

2.5.1.1. Plantas medicinales y aceites esenciales

Las plantas medicinales se han empleado desde hace muchos años con el objetivo de prevenir o curar enfermedades que afecta a humanos y animales. Se calcula que de las 300,000 especies de plantas que se conocen en la actualidad, de ellas el 15 % se consideran medicinales, en México se han registrado alrededor de 30,000 especies de plantas y el 50 % de estas son consideradas medicinales (Ávila-Uribe *et al.*, 2016). Las plantas medicinales son aquellas que contienen, en alguno de sus órganos, principios activos. Por lo general los principios activos están comprendidos dentro de los llamados "productos naturales o metabolitos secundarios", que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y de distribución restringida (Más Toro *et al.*, 2017; Balarezo López, 2018).

Se han reportado muchos beneficios de los polvos de plantas medicinales, como el incremento de la digestibilidad de nutrientes en el TGI, estabilidad inmunológica, exclusión competitiva de microorganismos y la salud intestinal en cerdos aparentemente normales y expuestas a diferentes estrés (Aroche-Ginarte *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019).

Los aceites esenciales son derivados de las plantas medicinales, pueden ejercer sus efectos antimicrobianos al causar cambios en la solubilidad de los lípidos en la superficie de la bacteria, sin embargo, también se han demostrado otros mecanismos, como la desintegración de la membrana externa (Martínez *et al.*, 2015).

Los productos botánicos más comunes utilizados en las dietas para los cerdos son el *Allium sativum* (ajo), *Origanum vulgare* (orégano), *Salvia officinalis*, *Macleaya cordata*, *Psidium guajava* L. (guayaba), *Moringa oleifera* Lam., *Anacardium occidentale* L. (marañón) y *Morinda citrifolia* L. (noni). También se han propuesto mezclas de extractos de plantas como alternativas a los antibióticos en los alimentos para cerdos (Martínez *et al.*, 2015; Más *et al.*, 2016; Aroche-Ginarte *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019).

2.5.1.2. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son ampliamente utilizados en las dietas para animales. Se definen como ácidos carboxílicos con una estructura química de R-COOH y eso incluye ácidos grasos, sin embargo, no todos los ácidos orgánicos se usan como aditivos para los alimentos (Suiryanrayna y Ramana, 2015).

Teniendo en cuenta las buenas características físicas y químicas de los ácidos orgánicos, además de su fácil inclusión en las dietas, en la industria porcícola se usan comúnmente ácidos orgánicos de cadena corta como el ácido fórmico (C1), ácido acético (C2), propiónico (C3) y butírico (C4), además de otros ácidos orgánicos: ácidos láctico, málico, tartárico, fumárico y cítrico (Suiryanrayna y Ramana, 2015).

La suplementación dietética de ácido orgánico ganó una gran atención como alternativa debido a su efecto sobre las bacterias patógenas. Pueden reducir el pH en el TGI, lo que mejora la utilización de diferentes nutrientes en las dietas de los cerdos (Suiryanrayna y Ramana, 2015).

2.5.1.3. Enzimas sintéticas

Para incrementar la digestibilidad de la fibra y los indicadores productivos en los cerdos, se agregan enzimas que hidrolizan carbohidratos principalmente a las dietas que contienen cebada, trigo o avena. El principal polisacárido no amiláceo en la cebada es el β -glucano y el principal polisacárido no amiláceo en el trigo es el arabinosilano. La adición de β -glucanasa pueda mejorar la utilización de cebada y sus subproductos, mientras que la adición de xilanasa puede mejorar el valor alimenticio del trigo y sus subproductos (NRC, 2012).

También se emplean como nutraceúticos las enzimas celulasa, galactanasa, mananasa y pectinasa, estas mejoran la digestibilidad de la materia seca, energía, proteína cruda, fibra dietética total y fósforo además incrementan la eficiencia alimenticia, la ganancia diaria de peso, el rendimiento productivo de los cerdos y disminuyen la incidencia de colitis en lechones destetados (NRC, 2012).

Por otro lado, el impacto de las enzimas exógenas en las emisiones gaseosas es poco conocido y los resultados han sido contradictorios. En este punto, por lo tanto, no es posible predecir claramente los efectos de las enzimas sobre el olor o las emisiones de amoníaco (NRC, 2012).

2.5.1.4. Prebióticos

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta, que producen efectos beneficiosos, estimulan selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero (Anadón *et al.*, 2019). Incluye oligosacáridos fácilmente fermentables por algunas bacterias, pero no hidrolizables por las enzimas del intestino, como fructo-oligosacáridos, β -glucanos, galacto-oligosacáridos y trans-galactooligosacáridos (Collins y Reid, 2016; Mitmesser y Combs, 2016).

Se considera que estos oligosacáridos mejoran el rendimiento del cerdo al estimular la proliferación de Bacteroidetes, *Lactobacillus* spp., *Prevotella* y Bifidobacterias en el intestino grueso, lo que a su vez aumenta la concentración de ácido láctico y reduce el pH del colon (Zhao *et al.*, 2019). Solo las bifidobacterias y lactobacilos pueden fermentar los oligosacáridos, mientras que los patógenos como *Salmonella* y *E. coli* no pueden (Flickinger *et al.*, 2003).

Los prebióticos también pueden mejorar las secreciones intestinales y el crecimiento de la mucosa digestiva y se ha probado su capacidad para mejorar el crecimiento de los cerdos y suprimir la colonización de bacterias patógenas en diferentes fracciones de fibra. También que los galacto-oligosacáridos estimulan el crecimiento bacteriano beneficioso en el intestino grueso y mejoran la salud intestinal (Rastall y Gibson, 2015; Zhao *et al.*, 2019). Por ejemplo, las bifidobacterias pueden suprimir el crecimiento de bacterias patógenas (*E. coli* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*) al estimular la producción de acetato, lo que disminuye aún más el pH y reduce la incidencia de diarrea (Bondue *et al.*, 2016).

Los mananoligosacáridos pueden mejorar la salud y el rendimiento. Los resultados de varios experimentos indicaron que el rendimiento del crecimiento, la salud intestinal y el estatus inmunológico de los cerdos puede mejorarse mediante la inclusión de mananoligosacáridos en la dieta (Li *et al.*, 2017).

La inulina y la oligofruktosa, clasificadas como fibra dietética, son otro ejemplo de prebióticos (Mittesser y Combs, 2016). Constituyen ingredientes alimenticios naturales, extraídos de las raíces de la *Cichorium intybus* (achicoria) y se encuentran presentes además en otras plantas como la *Allium sativum* (ajo), *Allium cepa* (cebolla), *Asparagus officinalis* (espárrago), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Heliantus tuberosus* (alcachofa de Jerusalén), *Allium ampeloprasum* (puerros) y *Musa paradisiaca* (plátano) (Gibson y Roberfroid, 2008; Singh y Chahal, 2018).

Estos compuestos modulan positivamente la fisiología del sistema gastrointestinal, fundamentalmente en cuanto al aumento del peso de las heces y la frecuencia de evacuación intestinal. Actualmente, se estudian otros efectos como el aumento de la absorción de calcio,

la estimulación del sistema inmunológico y la reducción del riesgo de cáncer de colon (Hernández y Curbelo, 2015).

La eficacia de los prebióticos está ligada a su capacidad de resistir la digestión en el intestino delgado y alcanzar el intestino grueso, donde serían utilizados selectivamente por un restringido grupo de microorganismos, fundamentalmente *Bifidobacterias* y *Lactobacillus* (Playne *et al.*, 2003). Por lo que, con la adición de productos prebióticos en las dietas de animales, se modifica la composición de la microbiota intestinal con la finalidad que proporcione efectos benéficos en la salud.

2.5.1.5. Probióticos

La fundamentación del uso de los probióticos se inicia a principios del siglo XX, cuando en el año 1908 el Doctor Élie Metchnikof planteó que la ingestión de bacterias ácido-lácticas podía tener efectos beneficiosos en la microbiota intestinal (Metchnikoff y Mitchell, 2018).

Este concepto fue evolucionando y fueron Lilley y Stiwel (1965) quienes introdujeron el término probiótico. Lo definieron como sustancias producidas por un microorganismo que favorecen el crecimiento y desarrollo de otros. Parker (1974) los definió como organismos que contribuyen favorablemente al equilibrio microbiano del sistema digestivo.

Fuller (1989) lo definió como "un suplemento alimenticio microbiano vivo, que afecta beneficiosamente al animal huésped al mejorar su equilibrio microbiano intestinal". Según Łukaszewicz (2012), en 1996, Mary Ellen Sanders escribió: "Los probióticos, simplemente definidos, son microbios consumidos para el efecto de la salud. El término probiótico se usa en aplicaciones alimentarias. El término bioterapéutico se usa en aplicaciones clínicas".

La FAO y la OMS en el 2001, redefinieron el concepto como: microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto beneficioso en la salud del hospedero, al mejorar la población microbiana intestinal del huésped, mejorar la resistencia a la colonización frente a los patógenos y estimular las respuestas inmunes

(Nawab *et al.*, 2019). Actualmente, este es el más aceptado por la comunidad científica porque además del mejoramiento del balance microbiano intestinal se incluyen otros efectos que influyen en el estado de salud del hospedero.

Los probióticos se pueden dividir en tres categorías principales: 1. Bacilo (bacterias formadoras de esporas Gram +); 2. Bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*); 3. Levadura (*Saccharomyces*) (Kenny *et al.*, 2011).

Entre los organismos más utilizados en este grupo se encuentran *Lactobacillus* spp., *Bacillus lichiniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* y otros (Nawab *et al.*, 2019).

La propiedad significativa de los probióticos es la capacidad de reducir la incidencia y la gravedad de las enfermedades debido al desarrollo de resistencia a la colonización o efectos inhibitorios hacia los patógenos. Sin embargo, los probióticos obstaculizan las bacterias patógenas tanto *in vitro* como *in vivo* por diferentes mecanismos de acción, el método exacto en el que ejercen sus efectos positivos no se ha determinado completamente (Kechagia *et al.*, 2013).

Sin embargo, se sabe que los probióticos modulan la exclusión competitiva benéfica al competir con los microorganismos patógenos por los sustratos en el TGI, también producen sustancias antimicrobianas que tienen propiedades bacteriostáticas o bactericidas, reduce el pH luminal e inhibe el crecimiento de bacterias Gram -, al producir peróxido de hidrógeno, al mismo tiempo mejoran el estatus inmunológico al estabilizar la integridad intestinal y mejorar la respuesta inmune innata intestinal a través de la secreción de cloruro o aumentando la producción de mucus, asimismo, inhiben la expresión de toxinas en bacterias patógenas y neutraliza los patógenos produciendo enterotoxinas, igualmente aumentan la digestibilidad de los nutrientes, incrementan la actividad de las enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal, mejorando la digestión y absorción de nutrientes, además tienen actividad antioxidante lo que permite mitigar el estrés, principalmente en los lechones recién destetados (Nawab *et al.*, 2019).

Se han reportado respuestas positivas a la inclusión de probióticos en las dietas para cerdos en crecimiento, disminuyen la mortalidad antes del destete y la incidencia de diarrea después del destete, mejora del comportamiento productivo (Liao y Nyachoti, 2017). La inclusión de *Lactobacillus* spp., *Pediococcus pentosaceus*, *B. subtilis* y *S. boulardii*, mejoran la incidencia de diarrea y el comportamiento productivo de los lechones (Giang *et al.*, 2012). La inclusión de *Enterococcus faecium* en las dietas de lechones destetados reduce las especies intestinales de *E. coli*, *Clostridium* y *Enterobacterium* (Bajagai *et al.*, 2016), además incrementa el comportamiento productivo de los lechones (Wang *et al.*, 2016).

Las respuestas positivas de la inclusión de *Saccharomyces* en las dietas para los cerdos pueden deberse a que las levaduras puede suprimir la concentración de poblaciones bacterianas coliformes en el tracto intestinal de los cerdos (White *et al.*, 2002). Sin embargo, la respuesta de las poblaciones microbianas al agregar levadura o cultivos de levadura a las dietas alimentadas con lechones destetados o en crecimiento ha sido inconsistente (NRC, 2012).

2.6. *Saccharomyces cerevisiae*

La *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular, una levadura utilizada industrialmente en la fermentación de sustratos para la obtención de alimentos y bebidas, tales como pan, vino y cerveza (Wang *et al.*, 2015). Además de las bondades que presenta *S. cerevisiae* en la industria de bebidas y alimentos ha sido empleado como probiótico en las dietas de los animales para disminuir el uso de APC, debido a sus efectos sobre los indicadores productivos, microbiota intestinal, índice de diarreas, respuesta antiinflamatoria, salud e integridad de la mucosa intestinal, además de la segregación de metabolitos que mejoran la respuesta inmunológica (Liao y Nyachoti, 2017).

2.7. *Saccharomyces boulardii*

La *Saccharomyces boulardii* es una cepa de levadura tropical aislada por primera vez de las frutas del lichi y del mangostán en 1923 por el científico francés Henri Boulard. Es muy parecida a la *S. cerevisiae* pero distinta en muchas de sus características taxonómicas,

metabólicas y genéticas (Malgoire *et al.*, 2005; Edwards-Ingram *et al.*, 2007). No obstante, otros autores consideran la *S. boulardii* una subespecie de la *S. cerevisiae* (Gagnon *et al.*, 2007); en este sentido Rajkowska y Kunicka-Styczyńska (2009) indicaron que de acuerdo con la nomenclatura actual del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN), las levaduras *S. boulardii* deben denominarse *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Sin embargo, debe señalarse que reducir fuertemente la capacidad de aparearse con otras cepas pone a *S. boulardii* en la forma evolutiva de convertirse en una especie separada (Łukaszewicz, 2012). Por lo tanto, en la actualidad según el número 252598 de identificación del taxon de *Saccharomyces* identifica la *S. boulardii* como una especie independiente de la *S. cerevisiae* (NCBI:txid252598, 2019).

Por otro lado, la *S. boulardii* ha probado ayudar a mantener y restaurar la flora intestinal natural en el intestino grueso y delgado y se lo clasifica como probiótico cuando es suministrada de forma viva y prebiótico cuando se suministra de manera muerta teniendo en cuenta las características que ofrece su pared celular (Qin *et al.*, 2018). Martins *et al.* (2013) y Liao y Nyachoti (2017), informaron que la variedad *S. boulardii* es efectiva contra bacterias patógenas y disminuye la inflamación causada por enfermedades en el TGI. Además, tiene el potencial de influir en la diversidad bacteriana (Gagnon *et al.*, 2007), reduce la translocación bacteriana (Lessard *et al.*, 2009) y disminuye la unión de *E. coli* enterotoxigénica a la mucosa ileal (Daudelin *et al.*, 2011).

A pesar de los beneficios de las levaduras *S. cerevisiae* y *S. boulardii*, al ser utilizadas en las dietas de los animales como probióticos, no se encontró evidencia de su efecto sobre las enzimas pancreáticas, ácidos grasos volátiles y microbiota del colon de lechones recién destetados.

III. HIPÓTESIS

La inclusión de antibiótico, *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces boulardii* en las dietas para lechones recién destetados, modula diferenciadamente la actividad de la

tripsina, quimotripsina y amilasa pancreática, la producción de ácidos grasos volátiles del colon y la distribución de la población bacteriana en el colon.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la inclusión de antibiótico, *S. cerevisiae* o *S. boulardii* en la dieta, sobre algunas características de la fisiología digestiva del lechón recién destetado.

4.2. Objetivos específicos

En lechones recién destetados, comparar los efectos de la adición de *S. cerevisiae*, *S. boulardii* o un antibiótico en la dieta sobre:

- La actividad enzimática específica de la tripsina, quimotripsina y amilasa pancreática.
- El perfil de ácidos grasos volátiles en el contenido del colon.
- La distribución de las poblaciones bacterianas en el contenido del colon.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación experimental

La investigación se llevó a cabo en la granja porcina experimental del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología (CENID-Fisiología) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en la localidad de Ajuchitlán, municipio Colón, Querétaro, México. La actividad enzimática, el perfil de ácidos grasos volátiles y la distribución de las poblaciones bacterianas, se determinaron en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, México. El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (78FCN2017). El experimento se desarrolló siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Diario Oficial de la Federación, 2001), también los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana sobre los métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres (Diario Oficial de la Federación, 2015); así como los lineamientos de la *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (CIOMS, 2012).

5.2. Animales, dieta y tratamientos experimentales

Un total de 40 lechones Fertilis 20×G Performance (Genetiporc[®], PIC México, Querétaro, México) de 19.8 ± 1.56 días de edad, con 6.2 ± 1.79 kg de peso aproximadamente, se ubicaron durante 2 semanas, según un diseño completamente al azar con 4 tratamientos, 10 repeticiones por tratamiento donde cada lechón fue una repetición.

Se formularon cuatro dietas iso-proteicas e iso-energéticas para cubrir los requerimientos nutricionales de los lechones recién destetados. Las dietas se formularon a base de maíz y pasta de soya, según lo recomendado por el NRC (2012). La composición química de la dieta basal se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Ingredientes y composición química de la dieta basal, porcentaje en base al alimento ofrecido.

Ingredientes	%	Composición química	
Maíz	47.1	Materia seca (%)	89.5
Pasta de soya	15	Proteína cruda (%)	21.8
HPM *	9.23	FDN (%)	12.3
Suero de leche	24.7	EM (kcal·kg ⁻¹)	3,300
Aceite de maíz	1.49		
Lisina	0.25		
Aminogut **	0.8		
Treonina	0.1		
Triptófano	0.05		
FD ***	0.9		
Vitaminas †	0.08		
Minerales ^Θ	0.12		
Biocolina	0.04		
Gustor §	0.2		

* HPM: Harina de pescado Menhaden. ** Aminogut: L-glutamina y ácido L-glutámico (1:1), (Ajinomoto, Japón). *** Fosfato dicálcico † Vitaminas por kg de dieta: vitamina A 10200 UI; vitamina D 1980 UI; vitamina E 60 UI; Vitamina K 1.20 mg; colina 967 mg; niacina 36 mg; pantotenato 17 mg; riboflavina 7.2 mg; vitamina B12 38 µg; tiamina 0.3 mg; piridoxina 0.31 mg; biotina 0.08 mg; folato 0,75 mg. ^Θ Minerales por kg de dieta: cobre 14.4 mg; yodo 800 mg; hierro 105 mg; manganeso 36 mg; selenio 0.3 mg; zinc 144 mg. § Gustor: butirato de sodio (Norel, España)

A la dieta basal se le incluyó *S. cerevisiae*, *S. boulardii* o un antibiótico promotor de crecimiento a expensas del maíz, por ende, se constituyeron cuatro tratamientos experimentales: el tratamiento 1 (Control -) Dieta basal (Cuadro 4); Tratamiento 2 (Sc), Dieta basal + 0.8 % de *Saccharomyces cerevisiae* (Yea-Sacc strain 1026, Alltech, EUA); Tratamiento 3 (Sb): Dieta basal + 0.1 % de *Saccharomyces boulardii* (Levucell SB, CNCM I-1079, Lallemand Animal Nutrition, Canadá); Tratamiento 4 (Control +): Dieta basal + 0.05 % de un antibiótico (LincoSpectin: 2.2 g lincomicina, 2.2 g espectinomicina, Zoetis, EUA).

5.3. Condiciones experimentales

El experimento se desarrolló bajo condiciones de ambiente controlado (30 y 28 ± 2 °C durante la primera y segunda semana pos-destete, respectivamente). Los cerdos se alojaron en una jaula colectiva metálica de 38 cm de altura, 115 cm de ancho y 150 cm de largo, con piso de rejilla. Los lechones recibieron alimentos y agua *ad-libitum* a través de una tetina/jaula y un comedero tipo tolva con 6 bocas. No se emplearon medicamentos, ni se brindó atención veterinaria terapéutica durante la etapa experimental.

5.4. Toma de muestras

Los días 7 y 14 de experimentación se sacrificaron cinco cerdos por tratamiento siguiendo los lineamientos de la NOM-033-SAG/ZOO-2014 (Diario Oficial de la Federación, 2015). Antes del sacrificio los cerdos se mantuvieron en ayuno por aproximadamente 8 horas, solo con agua *ad libitum*. Los animales primeramente se tranquilizaron con azaperona (Sural[®]) a una dosis de 20 mg/kg de peso vivo, una vez obtenidas las muestras biológicas, los lechones se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (Pentotal[®]), se procedió a la apertura de la cavidad abdominal para la colecta del contenido del colon, para la determinación de AGV's y la microbiota. Las muestras se congelaron a -40 °C y -80 °C, respectivamente, hasta su posterior análisis en el laboratorio. El páncreas se cortó en dos porciones, sobre una superficie fría, para determinar la actividad enzimática y se guardaron a -40 °C.

5.5. Actividad enzimática del páncreas

Para la determinación de la actividad de la amilasa, la tripsina y la quimotripsina pancreática, se pesó aproximadamente 1 g de páncreas previamente congelados, para homogenizar los cortes de páncreas en suero fisiológico 0.9 %, se utilizó un polytron marca OMNI, modelo TH-115, las muestras homogenizadas fueron almacenadas a -40 °C hasta su posterior uso.

La determinación de la actividad de la amilasa pancreática (UI/mg de proteína), fue mediante espectrofotometría, empleando como sustrato almidón soluble (Productos Químicos Monterrey, NL, México), la absorbancia del almidón remanente a los 30 minutos de la hidrólisis se determinó con un espectrofotómetro Genesys™ 10uv (Thermo Scientific, Madison, WI, EUA), con densidad óptica (DO) de 580 nm (Métais, 1968).

La actividad de la tripsina (UI/mg de proteína) fue determinada por la técnica de titulación de punto final con un pH final de 7.9, según lo descrito por Reboud *et al.* (1962), empleando un titulador Mettler DL12. La activación de tripsinógeno contenido en las muestras de páncreas homogenizados se realizó 24 horas antes de la titulación, con la enzima Tripsina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Se empleó el BAEE (N_{α} -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester Hydrochloride) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) como sustrato para medir la actividad de la enzima.

La actividad de la quimotripsina (UI/mg de proteína) fue determinada por espectrofotometría de cinética con una densidad óptica (DO) de 286 nm (Bergmeyer, 1974), en un espectrofotómetro Genesys™ 10uv (Thermo Scientific, Madison, WI, EUA). Para la activación de quimotripsinógeno, 24 horas antes se agregó a la muestra de páncreas homogenizada la enzima Tripsina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Se utilizó como sustrato de la quimotripsina activada el BTEE (N-Benzoyl-L-Tyrosine Ethyl Ester) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania).

El contenido de proteína total del páncreas se determinó mediante la técnica de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones (0, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/ml) de Albúmina Sérica Bovina (Bio-Rad, CA, EUA) como proteína estándar. La densidad óptica se determinó con un espectrofotómetro Genesys™ 10uv (Thermo Scientific, Madison, WI, EUA) con una absorbancia de 716 nm.

La actividad específica de cada enzima (UI/mg proteína) se obtuvo dividiendo la actividad total de la enzima (UI/g páncreas) entre la concentración total de proteína (mg de proteína/g páncreas) en la muestra de páncreas.

5.6. Determinación de ácidos grasos volátiles

Se pesaron aproximadamente 2 g de contenido del colon en tubos de centrifuga con tapa previamente identificados. Se agregó agua HPLC de acuerdo con la cantidad de muestra en el tubo (por 2 g de muestra, 3 ml de agua HPLC). Se agitó cada tubo en un vortex por 30 segundos. Los tubos se centrifugaron en una centrifuga Beckman Coulter durante 30 minutos a una velocidad de 4000 rpm, a una temperatura de 4 °C. Se obtuvo el sobrenadante con una jeringa de 3 ml colocando posteriormente un filtro. Se vació el contenido previamente filtrado a un tubo pequeño color ámbar. Los tubos ámbar fueron almacenados en congelación a -40 °C para posteriormente realizar la determinación de los ácidos grasos volátiles.

La concentración de los ácidos grasos volátiles de cadena no ramificada (acético, propiónico, butírico y valérico) y de cadena ramificada (isobutírico, isovalérico e isocaproico), se determinó mediante cromatografía de gases (Roberts *et al.*, 2007).

5.7. Determinación de la distribución de las poblaciones bacterianas

5.7.1. Extracción y purificación de ADN

Para la extracción de ADN de las muestras de contenido del colon se utilizó el kit de extracción DNeasy® PowerLyzer® PowerSoil® Kit (100) (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se utilizó el PowerLyzer™ 24 (MO BIO Laboratories, EUA) para homogenizar las muestras. Posteriormente, los tubos se centrifugaron en una centrifuga refrigerada con 4 °C marca Eppendorf Centrifuge 5417 R (Hamburg, Alemania). La cantidad y calidad del ADN se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA), para posteriormente someter las muestras a PCR y electroforesis en gel de agarosa. El ADN se congeló a -20 °C para su posterior uso (Nava-Morales, 2009).

5.7.2. Amplificación del ADN

Una vez obtenido el ADN bacteriano, se implementó la técnica del RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), que consistió en realizar una reacción de la polimerasa en

Reactivos para la PCR mix (25 µl)	Número de ciclos	Volumen (µl)	Temperatura	Tiempo (minutos)
Ex Taq Buffer 10x			2.5	
Desnaturalización inicial del ADN	1		94°C	03:00
Digestión del ADN	35		94°C	0:45
Aligación de los oligonucleótidos	35		55°C	1:00
Extensión TaKaRa	35		72°C	2:00
ADN (ng/µl)	1		72°C	07:00
H2O Estéril de producto obtenido	1		14.36	∞

cadena en un termociclador de punto final Bio-Rad T100™ Thermal Cycle (Bio-Rad, CA, EUA), para amplificar el espacio intergénico de los genes que codifican las subunidades ribosomales 16S rRNA y 23S rRNA, específicas de bacterias (Nava-Morales, 2009). Se emplearon las sondas universales: ITSF (5'GTCGTAACAAGGTAGCCGTA) y ITSReub (5'GCCAAGGCATCCACC). Se realizó la mezcla para el PCR con los reactivos que describen en el Cuadro 5, para obtener así un volumen total de producto de PCR de 25 µl. El ciclo de la PCR se realizó según el protocolo descrito en el Cuadro 6 (Nava-Morales, 2009).

Cuadro 5. Reactivos para la elaboración de la PCR mix.

Cuadro 6. Ciclo de amplificación PCR

5.7.3. Gel de electroforesis y análisis de bandas

Con los productos de la PCR se realizaron análisis de electroforesis a 60 volts por 70 minutos en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio. Los geles fueron revelados en un Fotodocumentador Universal Hood II (Bio-Rad, CA, EUA). Se obtuvo una serie de bandas de diferentes pesos moleculares, de acuerdo con la población bacteriana presente. Las bandas obtenidas se analizaron con el software especializado Quantity One® (Bio-Rad, CA, EUA). En cada carril del gel las bandas se identificaron como ausentes (marcadas con un 0) y la presentes (marcadas con un 1) (Nava-Morales, 2009).

5.8. Análisis estadísticos

Los datos de la actividad enzimática y concentración de AGV's se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple para un diseño completamente aleatorizado, previa verificación de la normalidad de los datos por la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) y para la uniformidad de la varianza la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Se empleó la Dócima de Duncan (1955) para determinar las diferencias entre medias, con $P < 0.05$, según el software estadístico SPSS versión 23. Los patrones de bandeos se analizaron utilizando el paquete estadístico PAST[®]. Se realizó un análisis de coordenadas principales y uno de varianza multivariado no paramétrico para determinar la diferencia estadística entre tratamientos de la distribución bacteriana, según el índice de similitud de Jaccard (Milligan y Cooper, 1986). Para todas las pruebas determinadas la unidad experimental fue el lechón.

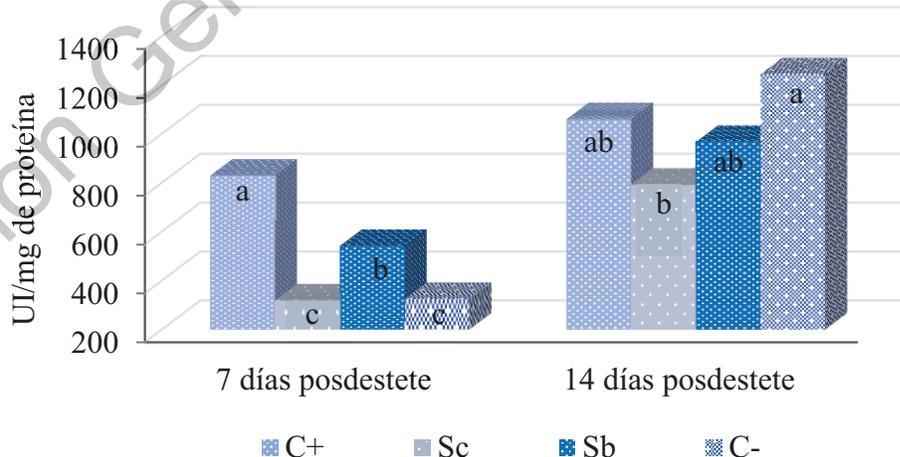
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Actividad enzimática del páncreas

En la Figura 3 se observa la actividad específica de amilasa pancreática, a los 7 y 14 días posdestete. A los 7 días posdestete, se observaron diferencias ($P<0.05$) entre los tratamientos experimentales. Los animales que consumieron la dieta con antibiótico tuvieron una mayor ($P<0.001$) actividad específica de la amilasa en relación con los demás animales. Asimismo, en los lechones alimentados con *S. boulardii* la actividad específica de la amilasa fue mayor ($P<0.001$) con respecto a los animales que consumieron *S. cerevisiae* y el control negativo, pero fue menor que los animales de la dieta con antibiótico ($P<0.001$). Sin embargo, entre los animales de la dieta con *S. cerevisiae* y el control negativo no presentaron diferencias ($P>0.05$).

A los 14 días posdestete, los lechones que consumieron la dieta con *S. cerevisiae* tuvieron una menor actividad de la amilasa pancreática con relación al control negativo ($P<0.05$), mientras que, comparada con los demás tratamientos no mostró diferencias ($P>0.05$).

Figura 3. Actividad específica de la Amilasa pancreática



^{abc}Letras diferentes en barras del mismo día difieren ($P<0.05$).

Durante los primeros días posterior al destete, la producción enzimática del páncreas es insuficiente para digerir los carbohidratos y proteínas del nuevo alimento (Makkink *et al.*, 1994), no obstante, es esperado y necesario que las enzimas pancreáticas y su expresión génica incrementen con la edad (He *et al.*, 2016), para que el proceso digestivo se realice de la manera adecuada. Esto es más desafiante para la digestión del almidón que es un nutrimento ausente en la alimentación láctea.

Lindemann *et al.* (1986) observaron la presencia de actividad de la amilasa pancreática antes del destete, probablemente porque los lechones tuvieron acceso al alimento de las madres. Sin embargo, las condiciones experimentales del presente trabajo no permitieron el acceso al alimento materno, por lo tanto, se esperaría una ausencia de actividad antes del destete y una menor actividad en la primera semana posdestete, como lo muestra los presentes resultados (Figura 3).

La menor actividad de la amilasa pancreática en la primera semana posdestete, probablemente puede ser explicada por la inmadurez del sistema enzimático durante los tres primeros días posdestete (Lindemann *et al.*, 1986; Makkink *et al.*, 1994). El incremento del consumo de alimento en los días posteriores y la composición de la dieta ingerida pueden ser los principales factores que modulan la síntesis y secreción de las enzimas (Owsley *et al.*, 1986; Reis de Souza y Mariscal Landín, 1997). El cambio drástico de la fuente y cantidad de carbohidratos ingerida, de mucha lactosa a mucho almidón, al destete, probablemente fue un estímulo muy importante para la actividad de la amilasa pancreática, ya que la cantidad de enzimas pancreáticas secretadas es proporcional a la cantidad de sustrato presente en el intestino delgado (Owsley *et al.*, 1986).

El incremento del consumo de alimento entre la primera y segunda semana posdestete y la adaptación del lechón a las condiciones nutricionales y ambientales, pueden explicar el aumento de la actividad específica de la amilasa pancreática del día 7 al 14 posdestete (Figura 3), independientemente de la dieta experimental consumida.

Más allá de los efectos de los cambios nutricionales a nivel de los ingredientes mayores que componen la dieta, los presentes resultados muestran que los aditivos (antibiótico y

levaduras vivas) que se incorporaron a la dieta en pequeñas cantidades, también juegan un papel importante en la actividad de las enzimas digestivas. Estos aditivos probablemente causan cambios en la ecofisiología del intestino delgado, los cuales pueden modular la respuesta pancreática en términos de síntesis y secreción de las enzimas.

El antibiótico, LincoSpectin, adicionado a la dieta basal en el presente trabajo, es de amplio espectro y tiene una actividad bacteriostática principalmente sobre especies de los géneros *Proteus*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Brachyspira*, *Lawsonia*, *Escherichia*, *Salmonella*, entre otros (Zoetis, 2013). Las especies de bacterias intestinales que pertenecen a estos géneros utilizan carbohidratos para obtener energía como parte de su desarrollo, además producen carbohidrasas (Relling y Mattioli, 2008). Quizás una disminución de este perfil bacteriano por la acción del antibiótico provocó una mayor concentración de sustrato en el intestino delgado y por ende una mayor estimulación para la producción de amilasa pancreática. Por otro lado, en los animales que consumieron la dieta control negativo, sin ningún aditivo, la actividad bacteriana disminuye la concentración de los carbohidratos solubles en el intestino delgado, estimulando en menor proporción la actividad de la amilasa pancreática. Sin embargo, estas aseveraciones deberán ser comprobadas en otros experimentos.

El remplazo del antibiótico por las levaduras vivas mostró ser menos eficiente para estimular la actividad de la amilasa pancreática en la primera semana posdestete, pero ambas levaduras se comportaron de manera diferente. Mientras que el efecto de la inclusión de *S. boulardii* a la dieta sobre la actividad de la amilasa pancreática se asemejó más al del antibiótico ($P > 0.05$), el efecto de la adición de *S. cerevisiae* fue igual al de la dieta sin antibiótico. Probablemente los mecanismos de acción de las dos levaduras vivas sobre las poblaciones bacterianas son similares al discutido anteriormente; sin embargo, hacen falta más estudios para comprobar esta hipótesis.

En la revisión de la literatura no se encontraron trabajos con cerdos que relacionen la actividad enzimática con las levaduras *S. cerevisiae* y *S. boulardii*. Sin embargo, en ratones, el tratamiento oral con *S. boulardii* mostró un incremento en la actividad total de las

disacaridasas del borde de cepillo (Buts *et al.*, 1994). También, en peces, Tovar *et al.* (2002) observaron un incremento de la actividad de la amilasa pancreática en larvas en su inicio de desarrollo alimentadas con *S. cerevisiae*. Los autores relacionan esta mejora en la actividad enzimática a las poliaminas (espermidina y espermina) que están presentes en las levaduras (Whitney y Morris, 1978; Buts, 2005). Se sabe que estas poliaminas tienen un efecto trófico sobre la mucosa intestinal y son importantes para la maduración del sistema digestivo, la expresión de enzimas de borde de cepillo y los mecanismos de transporte de membrana (Buts, 2005). También se sabe que las concentraciones de poliaminas varían de acuerdo con la cepa y las condiciones de cultivo (Whitney y Morris, 1978). Probablemente en el presente estudio la *S. boulardii* produjo una mayor cantidad de estas poliaminas, sin embargo, esto deberá ser comprobado.

Al día 14 posdestete, todos los lechones incrementaron la actividad específica de la amilasa pancreática, sugiriendo que los animales ya se habían adaptado al nuevo alimento. Sin embargo, a pesar de que las diferencias no fueron significativas, el consumo de *S. cerevisiae* estimuló en menor proporción esta enzima. Como ya se mencionó anteriormente, es necesario estudiar más la relación de las levaduras y la actividad de la amilasa pancreática.

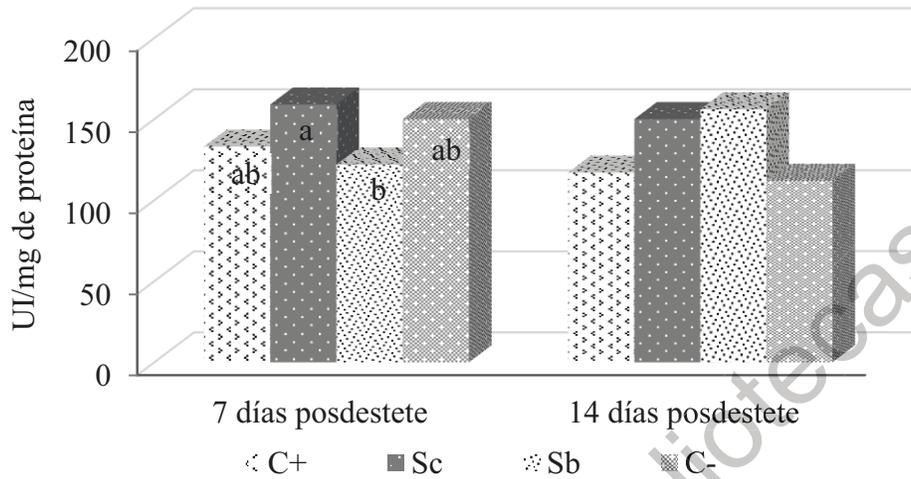
La actividad específica de la tripsina a los 7 días posdestete fue mayor con la inclusión de *S. cerevisiae* a la dieta basal en relación con la adición de *S. boulardii* ($P < 0.05$), pero fue igual ($P > 0.05$) a los animales de las dietas control positivo y negativo (Figura 4).

Asimismo, la actividad específica de la quimotripsina pancreática a los 7 días posdestete aumentó con la adición de *S. cerevisiae* y el control negativo, en relación con los tratamientos con *S. boulardii* y el control positivo ($P < 0.05$) (Figura 5).

La actividad específica de la tripsina y quimotripsina pancreática no mostró diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$), a los 14 días posdestete. Sin embargo, hubo una tendencia a ser mayor ($P = 0.11$ y $P = 0.06$, para tripsina y quimotripsina, respectivamente) en los animales que consumieron las dietas con *S. cerevisiae* y *S. boulardii*.

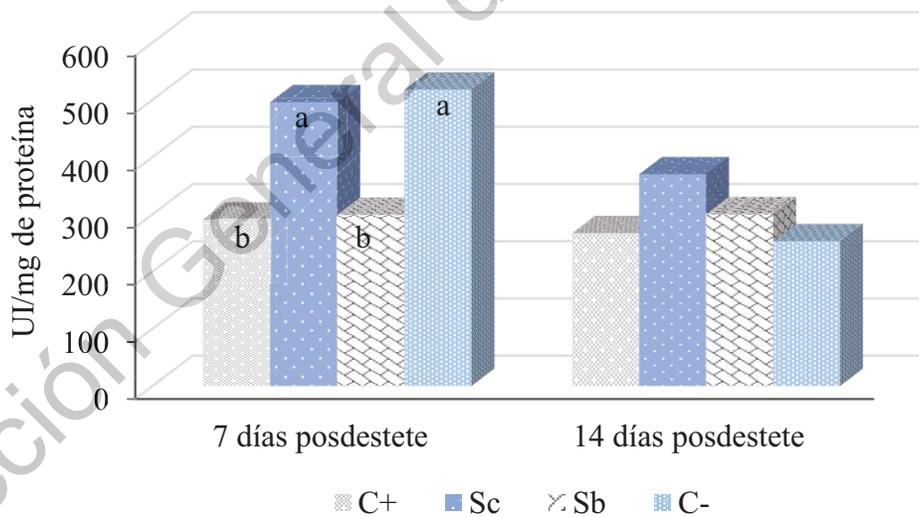
^{ab}Letras diferentes en barras del mismo día difieren ($P < 0.05$).

Figura 4. Actividad específica de la Tripsina



^{ab}Letras diferentes en barras del mismo día difieren ($P < 0.05$).

Figura 5. Actividad específica de la Quimotripsina



La actividad de la tripsina y quimotripsina tuvo un comportamiento distinto (Figuras 4 y 5) del observado con la amilasa pancreática (Figura 3), en relación con las semanas posdestete. Esto porque, ya está establecido que la adaptación de la función pancreática es específica para cada enzima (Zabielski *et al.*, 1999). Owsley *et al.* (1986) mostraron que la actividad de la tripsina no varía en las primeras semanas posdestete y que la actividad de la

quimotripsina disminuye a partir de los 27 días de edad, en el presente trabajo los lechones tenían 34 días de edad.

Lindemann *et al.* (1986) mencionan que, excepto por el período poco después del nacimiento y después del destete, el cerdo parece tener suficiente capacidad enzimática para digerir proteínas a un ritmo similar a la necesidad que posiblemente podría presentarse en función de la capacidad física del tracto digestivo. Los resultados del presente trabajo sugieren que la actividad de las proteasas estudiadas fue suficiente para la digestión de las proteínas desde la primera semana posdestete, pues en la segunda semana esta actividad se redujo ligeramente en casi todos los lechones. Esto probablemente está relacionado con la alta digestibilidad de las fuentes proteicas utilizadas para la formulación de las dietas experimentales (Cuadro 4).

Debido a las características de las fuentes de proteína, así como del nivel de proteína cruda, que fueran los mismos en todas las dietas experimentales, no se esperaban diferencias en las actividades de las proteasas entre los animales que consumieron los diferentes tratamientos. Sin embargo, se observa que, mientras el antibiótico adicionado a la dieta basal no afectó la actividad de las proteasas en la primera semana posdestete, el tipo de levadura adicionada a la dieta basal fue un factor modulador. A diferencia de la amilasa pancreática, la *S. cerevisiae* fue un estimulador más eficiente que la *S. boulardii*; principalmente para la quimotripsina.

La disminución de la actividad de las proteasas a los 7 días posdestete en animales que consumieron en su dieta *S. boulardii* en relación a los de *S. cerevisiae*, quizás se deba a la que en los lechones del grupo *S. boulardii* disminuyan las proteínas en la luz intestinal, ya que estas estimulan la producción de las proteasas vía secreción de CCK (Cunningham y Klein, 2014), lo que pudo haber ocurrido por los mecanismos que se mencionan a continuación.

1) Incremento de bacterias proteolíticas: en los cerdos que consumieron *S. boulardii* probablemente ocurrió un aumento de las bacterias proteolíticas en la luz intestinal y una disminución de las amilolíticas. Pues se observó una mayor actividad específica de la amilasa

pancreática, probablemente una menor fermentación de los carbohidratos dejándolos libre en la luz del intestino delgado y consecuentemente estimulando la secreción de amilasa (Figura 3). Varios autores han reportado que la disminución de un perfil bacteriano posibilita el crecimiento de otros tipos de bacterias (Williams *et al.*, 2005; Herrero de Lucas *et al.*, 2018).

2) Acción de las levaduras sobre las proteínas dietéticas en la luz intestinal. Varios autores mencionan que la *S. cerevisiae* no afecta la digestibilidad de las proteínas y del nitrógeno de la dieta (Ko *et al.*, 2000; Sweeney *et al.*, 2012), lo que incrementa la disponibilidad de proteína en el intestino delgado y consecuentemente aumenta la estimulación del páncreas y la actividad de las proteasas pancreáticas (Figura 4 y 5). Sin embargo, esta explicación debe ser tomada con cautela, pues otros autores como Hahn *et al.* (2006) encontraron que la suplementación del β -glucanos obtenidos de diferentes cepas de *S. cerevisiae* aumentó linealmente la digestibilidad de proteína cruda en cerdos destetados.

Por otro lado, la *S. boulardii* secreta varias enzimas proteolíticas, como por ejemplo la leucina-aminopeptidasa con la finalidad de utilizar estas proteínas y péptidos de los alimentos para sus propios fines (Buts *et al.*, 2002), reduciendo la disponibilidad de proteína en el intestino delgado y consecuentemente disminuyendo la estimulación del páncreas y la actividad de las proteasas pancreáticas (Figura 4 y 5). En este sentido, Moré y Vandenplas (2018) demostraron que la inclusión de *S. boulardii* en la dieta mejora la digestibilidad de las proteínas.

6.2. Perfil de los ácidos grasos volátiles del contenido del colon

El Cuadro 7 muestra el perfil de ácidos grasos de cadena corta del contenido del colon, a los 7 y 14 días posdestete. Los animales de los cuatro tratamientos experimentales produjeron diferentes cantidades de ácidos grasos volátiles ($P < 0.001$). La inclusión de *S. boulardii* en la dieta provocó la mayor producción de los ácidos grasos no ramificados (AGVNR) de acético, propiónico, butírico, y de los ácidos grasos volátiles totales. También, la inclusión de *S. cerevisiae* en la dieta incrementó la concentración de los AGVNR acético, propiónico y butírico en comparación con los controles positivo y negativo ($P < 0.001$), pero en menor proporción que la *S. boulardii* ($P < 0.001$). Sin embargo, los animales del control

negativo produjeron la mayor ($P<0.001$) cantidad de ácido valérico y de AGVR (isobutírico, isovalérico, isocaproico) en comparación con los demás tratamientos, mientras que la *S. cerevisiae* y *S. boulardii* estimularon las menores producciones de AGVR ($P<0.001$) (Cuadro 7). Los animales alimentados con la dieta con antibiótico tuvieron la menor producción de AGVNR y una cantidad moderada de AGVR.

A los 14 días posdestete se observó un patrón de fermentación similar al día 7 posdestete, sin embargo, las concentraciones fueron mayor la segunda semana con relación a la primera.

Las bacterias benéficas y otros componentes de la microbiota intestinal mediante la fermentación de los carbohidratos, provocan la formación de AGVNR tales como: acético, propiónico, butírico y valérico (Huang *et al.*, 2016). Por otro lado, los AGVR, incluidos el isobutírico, isovalérico e isocaproico, se producen durante la fermentación de proteínas y aminoácidos ramificados, que realizan las bacterias proteolíticas intestinales (Hermes *et al.*, 2009). Según Murínová y Dercová (2014) los AGVR se sintetizan a partir de α -cetoácidos que se derivan de la valina y la leucina como precursores de los ácidos grasos de cadena isoramificada y de la isoleucina como precursor de AGVR. Quizás un incremento de los AGVNR y una disminución de los AGVR como fue observado en el presente trabajo, pudiera ser favorecedor para la salud intestinal de los lechones recién destetados.

La inclusión de *S. boulardii* en la dieta de lechones recién destetados, a los 7 y 14 días posdestete, incrementó la producción de los principales AGVNR (ácidos acético, propiónico y butírico) producidos en el colon esto mejora la salud intestinal y la nutrición de las células colónicas (Lan *et al.*, 2015). Breves *et al.* (2000) y Schneider *et al.* (2005) también encontraron un incremento en las concentraciones de ácido butírico y otros ácidos grasos de cadena no ramificada en el colon, cuando incluyeron *S. boulardii* en la dieta.

Tratamientos experimentales

Variables	Control +	Sc	Sb	Control -	EEM±	Valor de <i>P</i>
<i>7 días posdestete</i>						
Acético	28.1 ^c	92.5 ^b	138.9 ^a	22.1 ^d	0.23	<0.001
Propiónico	8.3 ^d	29.0 ^b	53.2 ^a	10.8 ^c	0.15	<0.001
Butírico	11.4 ^d	35.2 ^b	61.4 ^a	12.2 ^c	0.10	<0.001
Valérico	3.9 ^b	1.3 ^d	1.6 ^c	10.5 ^a	0.05	<0.001
AGVNR	51.7 ^d	158.0 ^b	255.0 ^a	55.7 ^c	0.18	<0.001
Isobutírico	5.9 ^b	2.3 ^d	2.9 ^c	67.2 ^a	0.16	<0.001
Isovalérico	4.6 ^b	2.1 ^c	2.0 ^c	41.5 ^a	0.06	<0.001
Isocaproico	4.8 ^b	1.0 ^d	1.3 ^c	11.5 ^a	0.05	<0.001
AGVR	15.3 ^b	5.3 ^d	6.3 ^c	120.3 ^a	0.16	<0.001
Totales	66.9 ^d	163.3 ^c	261.3 ^a	176.0 ^b	0.27	<0.001
<i>14 días posdestete</i>						
Acético	33.2 ^c	113.4 ^b	171.8 ^a	26.5 ^d	0.31	<0.001
Propiónico	10.5 ^d	37.7 ^b	63.1 ^a	14.3 ^c	0.82	<0.001
Butírico	13.5 ^d	40.8 ^b	73.6 ^a	14.5 ^c	0.06	<0.001
Valérico	5.4 ^b	1.5 ^d	2.4 ^c	12.8 ^a	0.04	<0.001
AGVNR	62.7 ^d	193.4 ^b	310.9 ^a	68.0 ^c	0.93	<0.001
Isobutírico	7.4 ^b	2.7 ^d	3.4 ^c	81.1 ^a	0.13	<0.001
Isovalérico	6.5 ^b	2.2 ^d	2.7 ^c	51.2 ^a	0.07	<0.001
Isocaproico	6.5 ^b	0.9 ^d	1.7 ^c	14.1 ^a	0.07	<0.001
AGVR	20.3 ^b	5.9 ^d	7.9 ^c	146.4 ^a	0.19	<0.001
Totales	83.0 ^d	199.3 ^c	318.7 ^a	214.4 ^b	0.94	<0.001

Cuadro 7. Perfil de ácidos grasos volátiles ($\mu\text{mol/g}$) en el contenido del colon de lechones, a los 7 y 14 días posdestete.

^{a,b,c,d}. Medias con letras diferentes en la misma fila difieren a $P < 0.001$.

Asimismo, Marchesi *et al.* (2016) mencionaron que los ácidos AGVNR sirven como una importante fuente de energía para la pared intestinal y proporcionan aproximadamente la mitad del requerimiento energético diario de los colonocitos en humanos.

Una mayor concentración de ácido acético permite un ahorro alrededor del 30 % del requerimiento de energía de los lechones durante el estrés producido por el destete (Escobar García *et al.*, 2014), ya que el ácido acético se puede transformar en ácido butírico, que proporciona entre el 70 % y el 90 % de la energía requerida por el metabolismo de los colonocitos (Williams *et al.*, 2005). Además de su importante aporte energético, el ácido butírico presenta beneficios para la salud regulando la expresión de genes en los colonocitos y exhibiendo propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Lan *et al.*, 2015).

Quizás el incremento de los ácidos grasos de cadena no ramificada en el tratamiento con *S. boulardii*, fue probablemente debido a la presencia de β -glucanos, mano-proteínas y quitina en la pared celular de la levadura (Hudson *et al.*, 2016), que sirven como excelentes sustratos para la fermentación microbiana, especialmente para varios microorganismos productores de ácidos grasos no ramificados (Moré y Swidsinski, 2015). Esto sugiere un efecto prebiótico de la levadura y no solamente probiótico, no obstante, se necesitaría comprobar la viabilidad de la levadura en el colon para demostrar este planteamiento.

A pesar de que la *S. cerevisiae* y la *S. boulardii* tienen grandes semejanzas genéticas y morfofisiológicas (Fietto *et al.*, 2004; Edwards-Ingram *et al.*, 2007), la pared celular de la *S. boulardii* es más gruesa que la pared celular de la *S. cerevisiae* (Hudson *et al.*, 2016), además, ambas levaduras presentan β -glucanos en su pared celular, que pudieran servir como sustrato de las enterobacterias una vez que las levaduras mueran en el intestino, sin embargo, los β -glucanos de la pared celular de la *S. cerevisiae* están compuestos principalmente por aproximadamente un 85 % de enlaces ramificados $\beta(1-3)$ glucano de alto peso molecular y 3 % de enlaces intercadena glucosídicos $\beta(1-6)$ (Manners *et al.*, 1973). Según Sweeney *et al.* (2012), el 90 % de los β -glucanos de la *S. cerevisiae* son insolubles en agua, quizás debido a su complejidad estructural.

En este sentido, Sweeney *et al.* (2012) encontraron que los β -glucanos insolubles de la *S. cerevisiae* estimulan en el colon proximal un perfil de ácido acético, propiónico y valérico, diferente perfil de ácidos grasos volátiles estimulados por los β -glucanos solubles del alga marina *Laminaria digitata*, lo que sugiere que los β -glucanos solubles e insolubles presentan efectos diferentes sobre la producción de ácidos grasos volátiles.

Tal vez esta complejidad estructural e insolubilidad de la pared celular de la *S. cerevisiae* provoque una menor fermentación bacteriana lo que disminuye las probabilidades que la levadura sea empleada como prebiótico después de morir en el intestino. Por ende, el tratamiento con *S. cerevisiae* tuvo menor concentración de ácidos grasos volátiles en correspondencia con el tratamiento con *S. boulardii*. Oeztuerk *et al.* (2005), al simular una fermentación microbiana ruminal *in vitro*, reportaron que la *S. boulardii* tuvo efecto prebiótico cuando aumentó las concentraciones de ácidos grasos no ramificados. Según lo antes mencionado se sugiere que las levaduras *Saccharomyces* pueden ser empleadas como prebióticos y probióticos en las dietas animales, para modular un perfil de ácidos grasos volátiles benéfico para la salud intestinal.

Los presentes resultados coinciden con Escobar García *et al.* (2014) quienes encontraron un incremento de los ácidos acético, propiónico y butírico en el colon de lechones destetados, al utilizar probióticos en las dietas, sin embargo, utilizaron dos especies de *Bacillus* con dietas bajas en proteína. Varias investigaciones demuestran el efecto de levaduras vivas y bacterias principalmente ácido lácticas como probióticos en las dietas de animales y humanos (Asaduzzaman *et al.*, 2018; Anadón *et al.*, 2019).

Igualmente, Escobar García *et al.* (2014) reportaron un incremento de los ácidos grasos de cadena ramificada: isobutírico, isovalérico e isocaproico, en el colon de lechones alimentados con una dieta alta en proteína (20 %) pero sin antibiótico ni probiótico, similar a lo ocurrido en nuestro estudio con el tratamiento control negativo (Cuadro 7). Verbeke *et al.* (2015) informaron que los ácidos grasos de cadena ramificada tienen efecto negativos para las células epiteliales. Los ácidos grasos isobutírico e isovalérico, inducen apoptosis en las células del epitelio intestinal (Sakurazawa y Ohkusa, 2005), además pueden afectar el

intercambio de iones en el colon y actúan como reguladores en la absorción de Na^+ en el colon (Blachier *et al.*, 2007).

Según Birkett *et al.* (1996), los AGVR se pueden reducir por un aumento de la cantidad de carbohidratos fermentables que llegan al colon en forma de almidón resistente. En este sentido, Escobar García *et al.* (2014) encontraron una disminución de ácidos grasos ramificados en el colon, cuando redujeron el nivel de proteína de la dieta a expensas del maíz.

Quizás la presencia de probióticos en la dieta estimula la fermentación bacteriana de los carbohidratos, independientemente del nivel de proteína utilizado, mientras que una dieta alta en proteínas sin antibióticos ni probióticos (control negativo) permite el crecimiento de microorganismos capaces de fermentar proteínas. Es importante recordar que las enzimas tripsina y quimotripsina, a los 7 días posdestete, incrementaron en el control negativo (Figuras 4 y 5) quizás por una mayor presencia de sustrato (proteína) en la luz del intestino proximal, lo que permite un incremento de proteínas no digeridas en el intestino posterior por la insuficiencia digestiva de los lechones recién destetados (Reis de Souza y Mariscal Landín, 1997) y por ende una mayor concentración de ácidos grasos de cadena ramificada.

El tratamiento con LincoSpectin presentó los menores valores de ácidos grasos de cadena no ramificada y de ácidos grasos totales, a los 7 y 14 días experimentales (Cuadro 7), semejante con los resultados de Escobar García *et al.* (2014). Posiblemente, debido a una disminución de la fermentación microbiana por el efecto bacteriostático que tiene el antibiótico sobre la microbiota intestinal (Becattini *et al.*, 2016). Otros autores también reportaron que los antibióticos disminuyen la fermentación bacteriana intestinal, modificando el perfil de ácidos grasos de cadena corta (Crossland *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2019).

Macfarlane y Macfarlane (2003), reportaron que la cantidad y composición de los ácidos grasos volátiles producidos en el intestino grueso depende de la cantidad y constitución de la microbiota residente y el sustrato fermentable que llega al intestino distal.

Por otro lado, la utilización de *S. cerevisiae* en la dieta para lechones disminuyó las concentraciones de ácidos grasos volátiles (Mathew *et al.*, 1998). Plata *et al.* (1994) reportaron que la inclusión de *S. cerevisiae* en el rumen de vacas Holstein, no afectó el perfil de ácidos grasos volátiles. Anteriormente, Malcolm y Kiesling (1990) y Williams *et al.* (1991), encontraron que la *S. cerevisiae* disminuía las concentraciones de acetato y aumentaba las concentraciones de propionato, quizás debido que la *S. cerevisiae* puede utilizar el ácido acético como sustrato para su metabolismo (Chu *et al.*, 1981), quizás una menor viabilidad de la *S. cerevisiae* en el colon de lechones a los 7 y 14 días postdestete, disminuyó la utilización de ácido acético y por ende este se mantuvo en mayores concentraciones que el ácido propiónico (Cuadro 7).

El uso de probióticos en la alimentación de varias especies de peces también incrementa las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico (Allameh *et al.*, 2017; Asaduzzaman *et al.*, 2018). Han *et al.* (2018) reportaron que los ácidos grasos de cadena corta son los principales metabolitos de las *Lactobacillaceae* y tienen gran actividad contra enterobacterias, tales como *E. coli*. Asimismo, Lawhon *et al.* (2002) informaron que el ácido butírico disminuye la expresión del gen de virulencia y la invasión de *Salmonella* en células epiteliales *in vitro*.

Los ácidos grasos volátiles participan en el metabolismo lipídico y energético, y aumentan el peso corporal (Qin *et al.*, 2019). Birkett *et al.* (1996) encontraron mayores concentraciones de propionato y butirato en el ciego de ratones obesos en correspondencia con animales magros. Una disminución de las concentraciones de acetato pudiera inhibir la lipogénesis, mientras que el aumento de propionato contribuiría a la inhibición de la conversión de acetato en lípidos en el hígado y el tejido adiposo (Hong *et al.*, 2005). Tal vez el mayor contenido de ácidos acético, propiónico y butírico en los tratamientos con *Saccharomyces* (Cuadro 7) impidió la deposición de lípidos en el hígado y el tejido adiposo de los lechones a los 7 días postdestete, por ende, no hubo diferencias entre tratamientos en el peso vivo (Bautista, 2019) ni el peso relativo del hígado (Martínez, 2019). Sin embargo, a los 14 días postdestete, el tratamiento con antibiótico mantuvo sus concentraciones de ácidos grasos de cadena no ramificada (Cuadro 7) e incrementó el peso vivo (Martínez, 2019)

mientras que los restantes tratamientos incrementaron las concentraciones de ácidos grasos no ramificados.

Es importante destacar que el incremento de los ácidos grasos de cadena corta puede disminuir el pH intestinal (Taciak *et al.*, 2010) e inhibir el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas (Józefiak *et al.*, 2008). El aumento de las concentraciones de AGVNR en los tratamientos con *S. cerevisiae* y *S. boulardii*, pudo influir en el pH del colon (Martínez *et al.*, 2019) y quizás modular cambios en la distribución de las poblaciones bacterianas del colon de los lechones a los 7 y 14 días posdestete.

Según los datos presentados en este numeral, los ácidos acético, propiónico y butírico, no solo aportan nutrientes para las células intestinales, sino que también promueve el crecimiento de microorganismos beneficiosos, modifican el pH intestinal, inhibe el crecimiento de bacterias patógenos, mejoran la exclusión competitiva benéfica en el intestino grueso y mejoran la salud intestinal de los animales. No obstante, los ácidos grasos de cadena ramificada pueden ser perjudiciales para la salud e integridad intestinal. La mayor proporción de AGVNR/AGVR presentada por los animales alimentados con la *S. cerevisiae* y la *S. boulardii* demuestra el efecto benéfico de estas levaduras al ser usadas como probióticos en las dietas de lechones recién destetados.

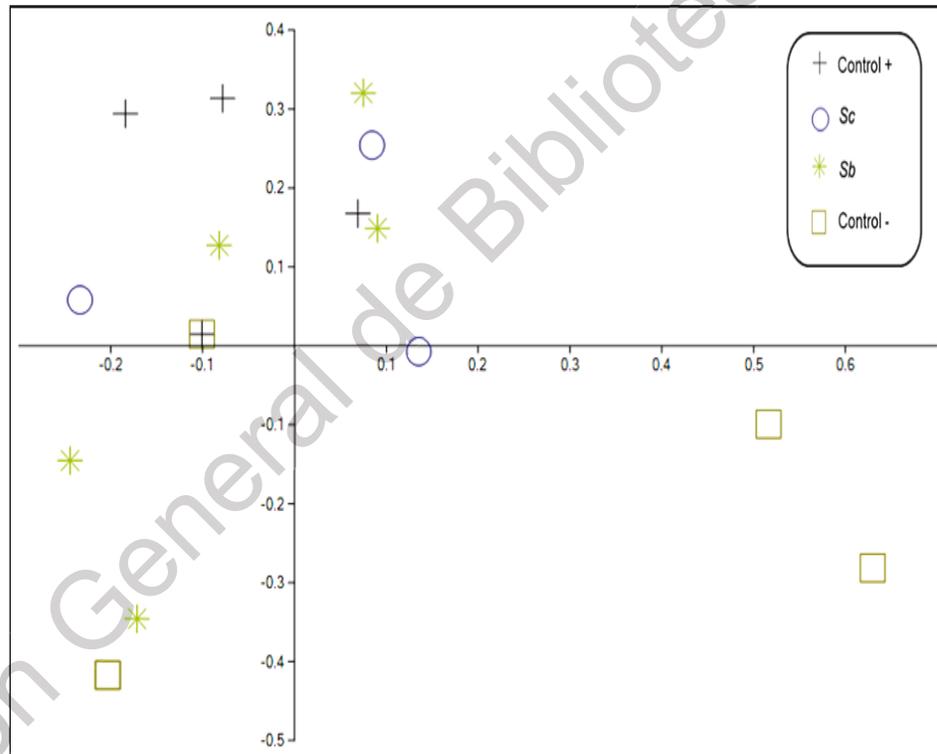
6.3. Distribución de las poblaciones bacterianas del colon

La Figura 6 muestra la distribución de las poblaciones bacterianas del contenido del colon, a los 7 días posdestete. La ubicación de los puntos en el gráfico de coordenadas principales (Figura 6) muestra que existe una gran relación entre las poblaciones bacterianas del colon en los animales de los tratamientos: con antibiótico, *S. cerevisiae* y *S. boulardii*, mientras que los cerdos del tratamiento control negativo muestra una mayor distribución bacteriana.

Después de 14 días de consumir las dietas experimentales, se observa que los lechones del tratamiento con antibiótico tuvieron una alta distribución en su población microbiana, mientras que la dieta del control negativo agrupó las bacterias (Figura 7). La inclusión de *S.*

cerevisiae no tuvo efecto sobre la agrupación de las poblaciones bacterianas (se necesitan más pruebas para comprobar este planteamiento). No obstante, la *S. boulardii* en la dieta, provocó una mayor agrupación de las poblaciones bacterianas, similar al control negativo (Figura 7). Quizás un mayor establecimiento de la flora microbiana intestinal normal, al inhibir o estimular el crecimiento de determinadas familias, permitió un patrón de bandeo más agrupado en las muestras.

Figura 6. Distribución de las poblaciones bacterianas del colon de lechones a los 7 días posdestete.

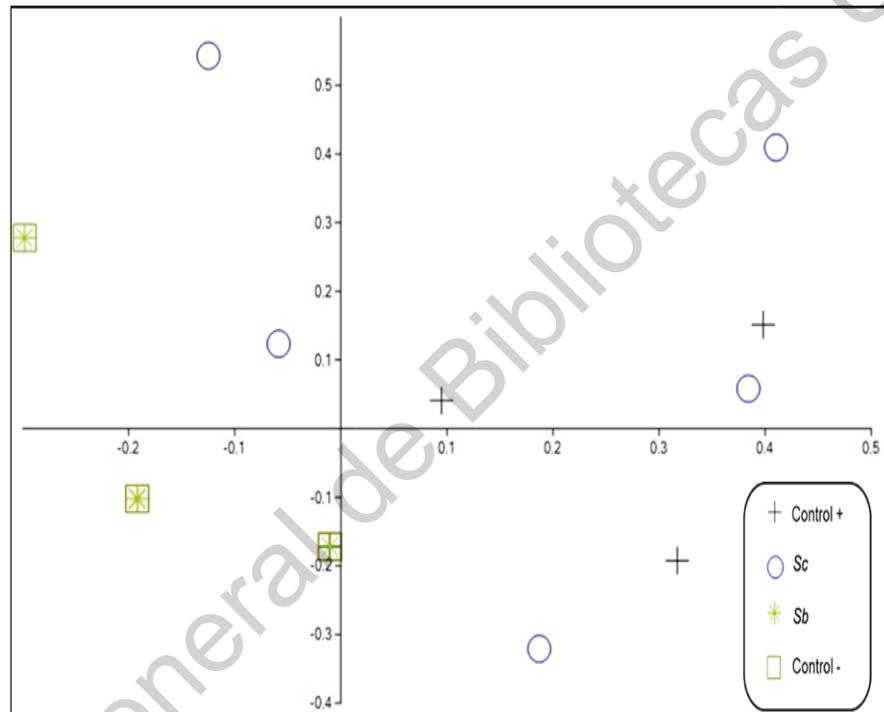


Herrero de Lucas *et al.* (2018) informaron que la microbiota intestinal es afectada por varios factores: condiciones ambientales, la edad, el destete (estrés), la composición de la dieta en términos de calidad y cantidad, el uso de antibióticos y los probióticos.

Vale la pena destacar que el antibiótico LincoSpectin actúa principalmente sobre microorganismos patógenos y oportunistas del TGI. Durante el destete, las patógenos oportunistas aumentan por efecto negativo del estrés posdestete sobre el equilibrio

microbiano benéfico para el animal. Quizás una inhibición de las *Enterobacteriaceae* por el efecto bacteriostático del antibiótico provoque una disminución en la diversidad de las poblaciones microbianas en los animales (Figura 6).

Figura 7. Distribución de las poblaciones bacterianas del colon de lechones a los 14 días postdestete.



Tal vez esto demuestra que la dieta con antibiótico disminuyó las bacterias principalmente amilolíticas que utilizan los carbohidratos como sustrato, por ende, existe una mayor concentración de almidón en el intestino delgado lo que estimula una mayor producción de amilasa pancreática (Figura 3), además del aumento de las concentraciones del almidón en el colon, entonces al haber menor presencia de bacterias amilolíticas disminuye la fermentación bacteriana en comparación con la dieta sin antibiótico (Cuadro 7). Asimismo, la disminución de bacterias amilolíticas permite el crecimiento de bacterias proteolíticas, quizás sean las que se observan más agrupadas en el tratamiento con antibiótico (Figura 6), lo que induce una menor actividad de la enzima quimotripsina (Figura 5) en correspondencia con el tratamiento sin antibiótico ni probióticos.

Asimismo, pero en menor medida que el antibiótico, la *S. boulardii* tiene actividad contra bacterias patógenas, lo que posibilita una disminución en la diversidad de la microbiota, en este sentido Sweeney *et al.* (2012) reportaron que los β -glucanos tienen efecto sobre las poblaciones de *Enterobacteriaceae* en el colon sin influir en las poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias. También, una menor distribución en las poblaciones bacterianas del colon con la inclusión de *S. boulardii* pudo ser debido al incremento en las concentraciones de AGVNR (Cuadro 7) los que disminuyen el pH en el colon (Martínez *et al.*, 2019) y a su vez inhiben el crecimiento de bacterias patógenas en el intestino grueso.

Sin embargo, la inclusión de *S. cerevisiae* no estimuló una agrupación sobre la microbiota (Figura 6, A), asimismo, Mathew *et al.* (1998), indicaron que la inclusión de levadura *S. cerevisiae* no tiene ningún efecto en las poblaciones microbianas *E. coli*, *lactobacilli*, *streptococci*. También Li *et al.* (2006) encontraron que la adición de *S. cerevisiae* no influyó sobre las poblaciones de *E. coli*, bacterias aeróbicas, lactobacilos, bacterias anaerobias o recuentos de levaduras en el colon.

Por otro lado, Everaert *et al.* (2017), durante el destete se cambia los animales de su entorno normal además se elimina una dieta semilíquida rica en lactosa por otra sólida y abundante en proteína y almidón. Según Schmidt *et al.* (2011), el cambio de entorno en animales muy jóvenes (por ejemplo, al trasladar los lechones de su madre a unidades de crianza artificial) conduce a un desarrollo diferente de la microbiota intestinal, lo que pudiera explicar la poca relación entre la distribución bacteriana de los animales del control negativo a los 7 días.

Los presentes resultados coinciden con Limón Sánchez *et al.* (2015) quien encontró a los 7 días posdestete, una gran diversidad de la microbiota en el tratamiento sin antibiótico ni probióticos. Quizás la mayor distribución de las poblaciones bacterianas en los animales del control negativo se deba al desequilibrio microbiano que sufre el intestino después del destete (Gresse *et al.*, 2017). Vale la pena destacar que, las comunidades bacterianas están compuestas principalmente por Firmicutes y Bacteroidetes, que representaron más del 90 % del total de los *phylum* presentes en el intestino grueso (Kim *et al.*, 2011).

Por otro lado, a los 14 días el tratamiento con antibiótico en dosis sub-terapéutica no estimuló una distribución bacteriana específica, quizás debido a que los niveles de inclusión en la dieta no fueron suficientes para disminuir las poblaciones bacterianas. Ríos-Fuenmayor *et al.* (1992), reportaron niveles óptimos de inclusión del LincoSpectin de 637 mg/día, los lechones del tratamiento con antibiótico consumieron aproximadamente 250 mg/día. Además, el fabricante del LincoSpectin utilizado en este estudio indica una dosis sub-terapéutica de 15 mg por kg de peso durante 7 días (Zoetis, 2013), lo que pudiera explicar el bajo efecto de este tratamiento a los 14 sobre las poblaciones microbianas.

No obstante, en los animales que consumieron la dieta sin antibióticos se observó una mayor agrupación de las bacterias, quizás por la disminución del estrés, la adaptación a las nuevas condiciones de vida y el incremento de la edad. En este sentido, Kim *et al.* (2011) encontraron que a medida que los cerdos envejecían, había un aumento de las proporciones de Firmicutes, Spirochaetes y *phyla* sin clasificar y una disminución en la proporción de *Bacteroidetes*.

También, las comunidades bacterianas de todas las muestras estudiadas por Kim *et al.* (2011) estaban compuestas principalmente por Firmicutes y Bacteroidetes, que representaron más del 90 % del total de secuencias. Los principales géneros que aumentaron con la edad fueron: *Prevotella*, *Anaerobacter*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Coprococcus*, *Sporacetigenium*, *Megasphaera Subdoligranulum*, *Blautia*, *Oscillibacter*, *Faecalibacterium*, *Pseudobutyrvibrio*, *Dialister*, *Sarcina* y *Roseburia*. Entre los 15 géneros abundantes, la frecuencia de detección de los géneros *Anaerobacter*, *Sporacetigenium*, *Oscillibacter* y *Sarcina* aumentó constantemente a medida que los cerdos envejecieron, mientras que la de los géneros *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Faecalibacterium* y *Dialister* disminuyeron (Kim *et al.*, 2011).

También es importante saber que los nutrientes en la dieta modifican el perfil bacteriano. Según Everaert *et al.* (2017), una dieta alta en proteínas estimula una población bacteriana abundante en bacterias patógenas. Asimismo, Limón Sánchez *et al.* (2015) reportaron que los animales alimentados con dietas altas en proteínas a los 7 días postdestete

tuvieron una baja relación bacteriana mientras que los lechones que consumieron dietas bajas en proteínas estimularon una mayor agrupación en la microbiota. En este sentido, Williams *et al.* (2005), reportaron que la presencia de un tipo de bacteria específico según el tipo de sustrato puede estimular un perfil heterogéneo de la microbiota en una parte determinada del intestino.

Muchos componentes de la dieta y los metabolitos bacterianos derivados de proteínas y aminoácidos, como los ácidos grasos de cadena corta afectan la relación entre la microbiota intestinal y la mucosa intestinal, y esta relación podría evolucionar de acuerdo con la etapa de la vida (Qin *et al.*, 2019).

Dirección General de Bibliotecas UJAQ

CONCLUSIONES

- La inclusión de LincoSpectin y *Saccharomyces boulardii* en la dieta de lechones recién destetados, incrementó la actividad específica de la amilasa pancreática en comparación con la inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* y una dieta sin antibióticos, a los 7 días posdestete.
- La inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de lechones recién destetados, incrementó la actividad específica de la tripsina pancreática en comparación con la *Saccharomyces boulardii*, a los 7 días posdestete.
- La inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de lechones recién destetados, incrementa la actividad específica de la quimotripsina pancreática en comparación con la adición de *Saccharomyces boulardii* y la dieta con antibióticos, a los 7 posdestete.
- La inclusión de *Saccharomyces boulardii* y *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de lechones recién destetados aumenta la producción de ácidos grasos volátiles de cadena no ramificada y disminuye los ácidos grasos volátiles de cadena ramificada, en comparación con dietas con y sin antibióticos, a los 7 y 14 días posdestete.
- La inclusión de *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* y un antibiótico en la dieta de lechones recién destetados disminuye la distribución de las poblaciones bacterianas del colon, a los 7 días posdestete.
- La inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de lechones recién destetados, no agrupa las poblaciones bacterianas del colon a los 14 días posdestete.

RECOMENDACIONES

✓ Controlar estrictamente el ayuno de los animales antes del sacrificio, para evitar los errores que pueden ocurrir por los diferentes tiempos de ayuno de los lechones sobre la actividad de las enzimas pancreáticas.

✓ Estudiar más la relación de las levaduras y la actividad de la amilasa pancreática, para comprender el mecanismo de acción que tienen las levaduras sobre la actividad enzimática.

✓ Determinar el perfil de la microbiota del yeyuno, íleon y colon, para poder definir cuáles son las familias bacterianas presentes en las porciones intestinales.

LITERATURA CITADA

- Allameh, S. K., Ringø, E., Yusoff, F. M., Daud, H. M., & Ideris, A. (2017). Dietary supplement of *Enterococcus faecalis* on digestive enzyme activities, short-chain fatty acid production, immune system response and disease resistance of Javanese carp (*Puntius gonionotus*, Bleeker 1850). *Aquaculture Nutrition*, 23(2), 331–338.
- Allen, H. K., Levine, U. Y., Looft, T., Bandrick, M., & Casey, T. A. (2013). Treatment, promotion, commotion: Antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends in Microbiology*, 21(3), 114–119.
- Anadón, A., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2019). Prebiotics and Probiotics in Feed and Animal Health. In *Nutraceuticals in Veterinary Medicine* (pp. 261–285). Cham: Springer International Publishing.
- Anónimo. (2013). Válvulas de cerdo en humanos. Retrieved August 20, 2019, from <http://elcerdonuestroaliadoenlasalud.blogspot.com/>
- Aroche-Ginarte, R., Martínez-Aguilar, Y., Ayala-González, L., Rodríguez-Bertot, R., & Rodríguez-Fraga, Y. (2017). Comportamiento productivo e incidencia de diarrea en cerdos posdestete suplementados con polvo mixto de hojas de plantas con propiedades nutraceuticas. *Ciencia y Agricultura*, 14(2), 19–26.
- Arvanitoyannis, I. S., Kotsanopoulos, K. V., & Savva, A. G. (2017). Use of ultrasounds in the food industry—Methods and effects on quality, safety, and organoleptic characteristics of foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(1), 109–128.
- Asaduzzaman, M., Iehata, S., Akter, S., Kader, M. A., Ghosh, S. K., Khan, M. N. A., & Abol-Munafi, A. B. (2018). Effects of host gut-derived probiotic bacteria on gut morphology, microbiota composition and volatile short chain fatty acids production of Malaysian Mahseer *Tor tambroides*. *Aquaculture Reports*, 9, 53–61.

- Augustine, A., & Joseph, I. (2018). Four novel strains of cellulolytic symbiotic bacteria isolated and characterized from GI tract of marine fishes of various feeding habits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 706–714.
- Ávila-Uribe, M. M., García-Zárate, S. N., Sepúlveda-Barrera, A. S., & Godínez-Rodríguez, M. A. (2016). Plantas medicinales en dos poblados del municipio de San Martín de las Pirámides, Estado de México. *Polibotánica*, (42), 215–245.
- Bajagai, Y. S., Klieve, A. V., Dart, P. J., & Bryden, W. L. (2016). *Probiotics in animal nutrition and health. Production, impact and regulation*. FAO, Rome, Italy.
- Balarezo López, G. (2018). Plantas medicinales: Una farmacia natural para la salud pública. *Paideia*, 6(7), 159–170.
- Barreno, M., & Jair, A. (2018). *Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos de Crinum x amabile*. Tesis de Licenciatura en Bioquímica Farmacéutica, Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Bautista, S. (2019). *Modulación de la respuesta inflamatoria intestinal a través de la inclusión de Saccharomyces cerevisiae y Saccharomyces boulardii en la dieta iniciadora de lechones*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.
- Bazán Milián, M., González Jiménez, N., & Delgado Bereijo, L. (2004). Xenotransplante. Estado actual. Limitantes y expectativas. *Revista Cubana de Cirugía*, 43(2), 0–0.
- Becattini, S., Taur, Y., & Pamer, E. G. (2016). Antibiotic-Induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 22(6), 458–478.
- Bergmeyer, H. U. (1974). *Methoden der enzymatischen analyse*. Verlag Chemie. Verlag Chemie, Weinheim, Alemania.
- Bernalier-Donadille, A. (2010). Fermentative metabolism by the human gut microbiota. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 34(Suppl 1), S16–S22.

- Birkett, A., Muir, J., Phillips, J., Jones, G., & O'Dea, K. (1996). Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63(5), 766–772.
- Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J. F., & Tomé, D. (2007). Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids*, 33(4), 547–562.
- Bondue, P., Crèvecoeur, S., Brose, F., Daube, G., Seghaye, M.-C., Griffiths, M. W., & Delcenserie, V. (2016). Cell-free spent media obtained from *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium crudilactis* grown in media supplemented with 3'-sialyllactose modulate virulence gene expression in *Escherichia coli* o157:h7 and *Salmonella Typhimurium*. *Frontiers in Microbiology*, 7(September), 1460.
- Breves, G., Faul, K., Schröder, B., Holst, H., Caspary, W. F., & Stein, J. (2000). Application of the colon-simulation technique for studying the effects of *Saccharomyces boulardii* on basic parameters of porcine cecal microbial metabolism disturbed by clindamycin. *Digestion*, 61(3), 193–200.
- Brugueras, M. C., & García, M. M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica. Parte II. Otros grupos de antibióticos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), 362–373.
- Buts, J. P. (2005). Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. *Revista de Gastroenterología Del Perú*, 25(1), 176–188.
- Buts, J. P., De Keyser, N., Stilmant, C., Sokal, E., & Marandi, S. (2002). *Saccharomyces boulardii* enhances N-terminal peptide hydrolysis in suckling rat small intestine by endoluminal release of a zinc-binding metalloprotease. *Pediatric Research*, 51(4 I), 528–534.
- Buts, J. P., Keyser, N. De, & Raedemaeker, L. De. (1994). *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatric Research*, 36(4), 522–527.

- Cai, Y. H., Aguilar, Y. M., Yu, L., Wang, Y., Liu, H. B., Liu, G., & Yin, Y. L. (2014). Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus plantarum* on growth performance and serum concentration of amino acids in weaned piglets. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 14(3), 411–420.
- Campbell, J. M., Crenshaw, J. D., & Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 19.
- Cao, G. T., Zhan, X. A., Zhang, L. L., Zeng, X. F., Chen, A. G., & Yang, C. M. (2019). Effects of dietary *Bacillus amyloliquefaciens* on mucosal immunity, cecal volatile fatty acids and microbial diversity in broiler chickens. *Indian Journal of Animal Research*, 53(1), 77–83.
- Celi, P., Cowieson, A., Fru-Nji, F., Steinert, R., Klünter, A. M., & Verlhac, V. (2017). Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. *Animal Feed Science and Technology*, 234, 88–100.
- Celi, P., Verlhac, V., Pérez, E., Schmeisser, J., & Klünter, A. M. (2019). Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science and Technology*, 250, 9–31.
- Chang, S. Y., Belal, S. A., Kang, D. R., Choi, Y. Il, Kim, Y. H., Choe, H. S., & Shim, K. S. (2019). Erratum to: Influence of probiotics-friendly pig production on meat quality and physicochemical characteristics. *Food Science of Animal Resources*, 39(1), 177–178.
- Chen, J., Kang, B., Yao, K., Fu, C., & Zhao, Y. (2019). Effects of dietary *Macleaya cordata* extract on growth performance, immune responses, antioxidant capacity, and intestinal development in weaned piglets. *Journal of Applied Animal Research*, 47(1), 349–356.
- Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., & Yuan, Z. (2014). Antibiotic alternatives: The substitution of antibiotics in animal husbandry? *Frontiers in Microbiology*, 5(May), 217.
- Chu, M. I., Harting, A., Freese, E. B., & Freese, E. (1981). Adaptation of glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* to gluconeogenic growth and sporulation. *Microbiology*, 125(2), 421–430.

- CIOMS, I. (2012). International guiding principles for biomedical research involving animals.
- Mayo Clinic. (2018). Enfermedad de Hashimoto - Diagnóstico y tratamiento - Mayo Clinic. Retrieved August 20, 2019, from Mayo Foundation for Medical Education and Research website: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/hashimotos-disease/diagnosis-treatment/drc-20351860>
- Collado, V., Porrás, R., Cutuli de Simón, M., & Gómez Lucía, E. (2008). El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(1), 1–16.
- Collins, S., & Reid, G. (2016). Distant site effects of ingested prebiotics. *Nutrients*, 8(9), 523.
- Crossland, W. L., Tedeschi, L. O., Callaway, T. R., Miller, M. D., Smith, W. B., & Cravey, M. (2017). Effects of rotating antibiotic and ionophore feed additives on volatile fatty acid production, potential for methane production, and microbial populations of steers consuming a moderate-forage diet. *Journal of Animal Science*, 95(10), 4554–4567.
- Cunningham, J., & Klein, B. G. (2014). Fisiología veterinaria. In *Editorial, Elsevir España*.
- Curbelo, M. G. (2012). Prebiotics in the feeding of monogastric animals. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 46(3), 231–236.
- Das, L., Bhaumik, E., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2012). Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 173–183.
- Daudelin, J.-F., Lessard, M., Beaudoin, F., Nadeau, É., Bissonnette, N., Boutin, Y., & Fairbrother, J. (2011). Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs. *Veterinary Research*, 42(1), 69.
- de la Cruz, M., Barragán, J., Zerpa, S., & Castillo, M. (2016). Aislamiento y evaluación de hongos filamentosos ambientales con buena producción de amilasa. *Pueblo Continente*, 23(1), 157–166.

Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana-NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio § (2001).

Diario Oficial de la Federación. *Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.*, (2015).

Diario Oficial de la Federación. (2018). Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. Retrieved from http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018

Dodd, S. A. S., Cave, N. J., Adolphe, J. L., Shoveller, A. K., & Verbrugge, A. (2019). Plant-based (vegan) diets for pets: A survey of pet owner attitudes and feeding practices. *PLoS ONE*, *14*(1), e0210806.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, *11*(1), 1–42.

Edwards-Ingram, L., Gitsham, P., Burton, N., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, D., & Stateva, L. (2007). Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(8), 2458–2467.

Escobar García, K., Reis de Souza, T. C., Mariscal Landín, G., AguileraBarreyro, A., Bernal Santos, M. G., & Soto, J. G. G. (2014). Microbial fermentation patterns, diarrhea incidence, and performance in weaned piglets fed a low protein diet supplemented with probiotics. *Food and Nutrition Sciences*, *05*(18), 1776–1786.

Everaert, N., Van Cruchten, S., Weström, B., Bailey, M., Van Ginneken, C., Thymann, T., & Pieper, R. (2017). A review on early gut maturation and colonization in pigs, including biological and dietary factors affecting gut homeostasis. *Animal Feed Science and Technology*, *233*, 89–103.

FAO. (2019a). Estimación de la población en América Latina para la próxima década.

FAO. (2019b). Perspectivas Agrícolas 2018-2027.

- Fietto, J. L. R., Araújo, R. S., Valadão, F. N., Fietto, L. G., Brandão, R. L., Neves, M. J., & Castro, I. M. (2004). Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 615–621.
- Figueroa, J., Chi, E., Ramirez, M., & Dominguez, I. (2006). Alimentos funcionales para cerdos al destete. *Veterinaria México*, 37(1), 117–136.
- Flickinger, E. A., Loo, J. Van, & Fahey, G. C. (2003). Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 19–60.
- Fraser, D., Duncan, I. J. H., Edwards, S. A., Grandin, T., Gregory, N. G., Guyonnet, V., & Why, H. R. (2013). General Principles for the welfare of animals in production systems: The underlying science and its application. *Veterinary Journal*, 198(1), 19–27.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378.
- Gagnon, N., Talbot, G., Ward, P., Roy, D., Dupuis, M., Farnworth, E., & Lessard, M. (2007). Evaluation of bacterial diversity in the gut of piglets supplemented with probiotics using ribosomal intergenic spacer analysis. *Canadian Journal of Animal Science*, 87(2), 207–219.
- Gaucín, D. (2019). Carne de cerdo, un sector con perspectivas de expansión. *EL ECONOMISTA*, p. 2.
- Giang, H. H., Viet, T. Q., Ogle, B., & Lindberg, J. E. (2012). Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with a complex of lactic acid bacteria alone or in combination with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces boulardii*. *Livestock Science*, 143(2–3), 132–141.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (2008). Handbook of prebiotics. In *Handbook of Prebiotics*. Crc Press, Boca Ratón, Florida, Estados Unidos.

- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Van de Wiele, T., Forano, E., & Blanquet-Diot, S. (2017). Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. *Trends in Microbiology*, 25(10), 851–873.
- Grossman, J. D., & Sisson, S. (2000). *Anatomía de los animales domésticos* (5ta ed.). Salvat, Barcelona, España.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2006). *Tratado de fisiología* (Co.; Ed.). Elsevier Brasil.
- Hahn, T. W., Lohakare, J. D., Lee, S. L., Moon, W. K., & Chae, B. J. (2006). Effects of supplementation of β -glucans on growth performance, nutrient digestibility, and immunity in weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 84(6), 1422–1428.
- Han, J., Wang, Y., Song, D., Lu, Z., Dong, Z., Miao, H., & Li, A. (2018). Effects of *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immune function and volatile fatty acid level of caecal digesta in broilers. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 797–807.
- Hannant, D. (2002). Mucosal immunology: Overview and potential in the veterinary species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 87(3–4), 265–267.
- He, L., Wu, L., Xu, Z., Li, T., Yao, K., Cui, Z., & Wu, G. (2016). Low-protein diets affect ileal amino acid digestibility and gene expression of digestive enzymes in growing and finishing pigs. *Amino Acids*, 48(1), 21–30.
- Hermes, R. G., Molist, F., Ywazaki, M., Nofrarias, M., Gomez de Segura, A., Gasa, J., & Pérez, J. F. (2009). Effect of dietary level of protein and fiber on the productive performance and health status of piglets. *Journal of Animal Science*, 87(11), 3569–3577.
- Hernández, A. S. (2009). Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica Suplementos*, 5(SUPPL. 1), 1–5.

- Hernández, Y., & Curbelo, Y. (2015). Uso de aditivos en la alimentación animal: 50 años de experiencia en el Instituto de Ciencia Animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 49(2), 173–177.
- Herrero de Lucas, E., Cachafeiro Fuciños, L., Asensio Martín, M. J., & Cáceres Giménez, N. (2018). Interacciones entre el huésped y la microbiota. *Medicine (Spain)*, 12(52), 3059–3065.
- Hine, C., Zhu, Y., Hollenberg, A. N., & Mitchell, J. R. (2018). Dietary and endocrine regulation of endogenous hydrogen sulfide production: implications for longevity. *Antioxidants and Redox Signaling*, 28(16), 1483–1502.
- Hong, Y. H., Nishimura, Y., Hishikawa, D., Tsuzuki, H., Miyahara, H., Gotoh, C., & Sasaki, S. (2005). Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology*, 146(12), 5092–5099.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., & Terrill, T. H. (2015). Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, 212(1–2), 5–17.
- Huang, W., Huang, W., Yuan, T., Zhao, Z., Cai, W., Zhang, Z., & Feng, C. (2016). Volatile fatty acids (VFAs) production from swine manure through short-term dry anaerobic digestion and its separation from nitrogen and phosphorus resources in the digestate. *Water Research*, 90(March), 344–353.
- Hudson, L. E., McDermott, C. D., Stewart, T. P., Hudson, W. H., Rios, D., Fasken, M. B., & Lamb, T. J. (2016). Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. *PLOS ONE*, 11(4), e0153351.
- Imlay, J. A. (2019). Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environmental Microbiology*, 21(2), 521–530.
- Józefiak, D., Kaczmarek, S., & Rutkowski, A. (2008). A note on the effects of selected prebiotics on the performance and ileal microbiota of broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17(3), 392–397.

- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*, 2013, 2–7.
- Kenny, M., Smidt, H., Mengheri, E., & Miller, B. (2011). Probiotics-do they have a role in the pig industry? *Animal*, 5(3), 462–470.
- Kim, H. B., Borewicz, K., White, B. A., Singer, R. S., Sreevatsan, S., Tu, Z. J., & Isaacson, R. E. (2011). Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Veterinary Microbiology*, 153(1–2), 124–133.
- Kirchhelle, C. (2018). Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). *Palgrave Communications*, 4(1), 1–13.
- Ko, T. G., Kim, J. D., Bae, S. H., Han, Y. K., & Han, I. K. (2000). Study for the development of antibiotics-free diet for weanling pigs. *Korean Journal of Animal Science*, 42(1), 37–44.
- Kogut, M. H., & Arsenault, R. J. (2016). Gut health: The new paradigm in food animal production. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(August), 1–4.
- Kombrink, A., Tayyrov, A., Essig, A., Stöckli, M., Micheller, S., Hintze, J., & Künzler, M. (2019). Induction of antibacterial proteins and peptides in the coprophilous mushroom *Coprinopsis cinerea* in response to bacteria. *ISME Journal*, 13(3), 588–602.
- Lallès, J. P., Bosi, P., Smidt, H., & Stokes, C. R. (2007). Weaning - A challenge to gut physiologists. *Livestock Science*, 108(1–3), 82–93.
- Lan, A., Blachier, F., Benamouzig, R., Beaumont, M., Barrat, C., Coelho, D., & Tomé, D. (2015). Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: Is there a place for nutritional supplementation? *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(1), 198–207.
- Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M., & Altier, C. (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular Microbiology*, 46(5), 1451–1464.

- Lee, S. J., Kim, J. Y., Park, N. H., Awji, E. G., Suh, J. W., & Park, S. C. (2016). Effect of dietary fiber source on the growth performance and intestinal microflora in piglets. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 14(2), 135–142.
- Lee, W. J., & Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology*, 10(6), 416–424.
- Lessard, M., Dupuis, M., Gagnon, N., Nadeau, É., Matte, J. J., Goulet, J., & Fairbrother, J. M. (2009). Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *Journal of Animal Science*, 87(3), 922–934.
- Li, J., Li, D., Gong, L., Ma, Y., He, Y., & Zhai, H. (2006). Effects of live yeast on the performance, nutrient digestibility, gastrointestinal microbiota and concentration of volatile fatty acids in weanling pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 60(4), 277–288.
- Li, Y. S., Trenhaile, M. D., van Sambeek, D. M., Moore, K. C., Barnett, S. M., Fernando, S. C., & Miller, P. S. (2017). Effects of mannan oligosaccharides and *Lactobacillus mucosae* on the growth performance and immune response of weanling pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharides. *Journal of Animal Science*, 95(suppl_2), 140–140.
- Liao, S. F., & Nyachoti, M. (2017). Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition*, 3(4), 331–343.
- Licata, M. (2019). Carne de cerdo: ventajas y desventajas de sus consumo. Retrieved from Comidas website: <https://www.zonadiet.com/comida/carne-cerdo.htm>
- Lilley, D., & Stiwell, R. (1965). Probiotics: Growth promotion factor produced by. *Science*, (167), 747.
- Limón Sánchez, A., Escobar García, K., Reis de Souza, T. C., & Mariscal Landín, G. (2015). Impacto del nivel de proteína dietética y el uso de antibiótico y probiótico sobre el perfil microbiano intestinal de lechones recién destetados. *Memorias Del VIII Foro de Investigación y Posgrado. Facultad de Ciencias Naturales*, 139–144.

- Lindemann, M. D., Cornelius, S. G., el Kandelgy, S. M., Moser, R. L., & Pettigrew, J. E. (1986). Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *Journal of Animal Science*, 62(5), 1298–1307.
- Liu, P., Piao, X. S., Kim, S. W., Wang, L., Shen, Y. B., Lee, H. S., & Li, S. Y. (2008). Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. *Journal of Animal Science*, 86(10), 2609–2618.
- Losada-Espinosa, N., Trujillo-Ortega, M. E., & Galindo, F. (2017). The welfare of pigs in rustic and technified production systems using the welfare quality protocols of pigs in Mexico: Validity of indicators of animal welfare as part of the sustainability criteria of pig production systems. *Veterinaria Mexico*, 4(4), 1–15.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lukaszewicz, M. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*—Probiotic Yeast. In *Probiotics*. IntechOpen, London, United Kingdom.
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 67–72.
- Makkink, C. A., Berntsen, P. J., op den Kamp, B. M., Kemp, B., & Verstegen, M. W. (1994). Gastric protein breakdown and pancreatic enzyme activities in response to two different dietary protein sources in newly weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 72(11), 2843–2850.
- Malcolm, K. J., & Kiesling, H. E. (1990). Effects of whole cottonseed and live yeast culture on ruminal fermentation and fluid passage rate in steers. *Journal of Animal Science*, 68(7), 1965–1970.
- Malgoire, J. Y., Bertout, S., Renaud, F., Bastide, J. M., & Mallié, M. (2005). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1133–1137.

- Manners, D. J., Masson, A. J., & Patterson, J. C. (1973). The structure of a β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochemical Journal*, 135(1), 19–30.
- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D. A., Hirschfield, G. M., Hold, G., & Hart, A. (2016). The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut*, 65(2), 330–339.
- Martínez, M., Reis de Souza, T. C., Mariscal Landín, G., Escobar García, K., Gómez Soto, J. G., & Aguilera Barreyro, A. (2019). *Efecto del uso de dos levaduras (S. cerevisiae y S. boulardii) sobre algunas características morfofisiológicas e inmunológicas del aparato digestivo de lechones recién destetados*. Tesis de Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.
- Martínez, R. M., Cerrilla, M. E. O., Haro, J. G. H., Garza, J. R. K., Ramos, J. Z., & Soriano, R. R. (2015). Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Interciencia*, 40(11), 744–750.
- Martins, F. S., Vieira, A. T., Elian, S. D. A., Arantes, R. M. E., Tiago, F. C. P., Sousa, L. P., & Teixeira, M. M. (2013). Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes and Infection*, 15(4), 270–279.
- Más, D., Martínez, Y., Rodríguez, R., Salazar, I., Aroche, R., López, B., & Marcella, D. (2016). Efecto de la suplementación dietética con polvos de hojas de guayaba (*Psidium guajava*) y marañón (*Anacardium occidentale*) en el comportamiento productivo y la incidencia de diarrea en cerdos antes y después del destete. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 23(2), 106–113.
- Más Toro, D., Martínez Aguilar, Y., Rodríguez Bertot, R., Pupo Torres, G., Rosabal Nava, O., & Olmo González, C. (2017). Preliminary analysis of secondary metabolites in mixed powders of leaves of medicinal plants. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 1–9.

- Mathew, A. G., Chattin, S. E., Robbins, C. M., & Golden, D. A. (1998). Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 76(8), 2138–2145.
- McOrist, S., Wager, A. M., Kratzer, D., & Sjösten, C. G. (2000). Therapeutic efficacy of water-soluble lincomycin-spectinomycin powder against porcine proliferative enteropathy in a European field study. *Veterinary Record*, 146(3), 61–65.
- Melin, L., Jensen-Waern, M., Johannisson, A., Ederoth, M., Katouli, M., & Wallgren, P. (1997). Development of selected faecal microfloras and of phagocytic and killing capacity of neutrophils in young pigs. *Veterinary Microbiology*, 54(3–4), 287–300.
- Métais, P. (1968). Détermination de l' α -amylase par une microtechnique. *Annales de Biologie Clinique*, 26, 133–142.
- Metchnikoff, E., & Mitchell, P. C. (2018). *The prolongation of life*. Mauro Liistro Editore.
- Milligan, G. W., & Cooper, M. C. (1986). A study of the comparability of external criteria for hierarchical cluster analysis. *Multivariate Behavioral Research*, 21(4), 441–458.
- Mitmesser, S., & Combs, M. (2016). Prebiotics: Inulin and Other Oligosaccharides. In *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis* (pp. 201–208). Academic Press, Massachusetts, Estados Unidos.
- More, M. I., & Swidsinski, A. (2015). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis—a review. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 8(August), 237–255.
- More, M. I., & Vandenplas, Y. (2018). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 improves intestinal enzyme function: A trophic effects review. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, 11(2018), 1–14.
- Murínová, S., & Dercová, K. (2014). Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. *International Journal of Microbiology*, 2014, 1–16.

- Nava-Morales, G. M. (2009). *Toward an understanding of interindividual variation in hydrogenotrophic microbes in the human colon*. University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Nawab, A., Liu, W., Li, G., Ibtisham, F., Fox, D. P., Zhao, Y., & An, L. (2019). The potential role of probiotics (nutraceuticals) in gut health of domestic animals; an alternative to antibiotic growth promoters. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 69(4), 1169–1188.
- NCBI:txid252598. (2019). Taxonomy browser (*Saccharomyces* sp. 'boulardii'). Retrieved September 1, 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=252598&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- NRC. (2012). Nutrient Requirements of Swine. In *Nutrient Requirements of Swine*. National Academies Press, Washington D.C, United States.
- O'Doherty, J. V., Bouwhuis, M. A., & Sweeney, T. (2017). Novel marine polysaccharides and maternal nutrition to stimulate gut health and performance in post-weaned pigs. *Animal Production Science*, 57(12), 2376–2385.
- Oeztuerk, H., Schroeder, B., Beyerbach, M., & Breves, G. (2005). Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2594–2600.
- ONU. (2019). Población mundial. Retrieved from Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las naciones Unidas website: <https://countrymeters.info/es/World>
- Owsley, W. F., Orr, D. E., & Tribble, L. F. (1986). Effects of age and diet on the development of the pancreas and the synthesis and secretion of pancreatic enzymes in the young pig. *Journal of Animal Science*, 63(2), 497–504.
- Pandey, A. K., Kumar, P., & Saxena, M. J. (2019). Feed additives in animal health. In R. Gupta, A. Srivastava, & R. Lall (Eds.), *Nutraceuticals in Veterinary Medicine* (pp. 345–362). Cham: Springer Cham, United States.

- Paramio, T., Manteca, X., & Milan, M. J. (2010). *Manejo y producción de porcino*. UAB.
- Parker R B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29, 4–8.
- Plata, F. P., Mendoza, G. D., Bárcena-Gama, J. R., & González, S. (1994). Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 49(3–4), 203–210.
- Playne, M. J., Bennett, L. E., & Smithers, G. W. (2003). Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(3), 242–264.
- Pluske, J. R., & Zentek, J. (2019). 4: Gut nutrition and health in pigs and poultry. In *Poultry and pig nutrition* (pp. 77–103). The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, Gelderland, Netherlands.
- Povolo, V. R., & Ackermann, M. (2019). Disseminating antibiotic resistance during treatment. *Science*, 364(6442), 737–738.
- Qin, C., Gong, L., Zhang, X., Wang, Y., Wang, Y., Wang, B., & Li, W. (2018). Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on gut microbiota modulation in broilers. *Animal Nutrition*, 4(4), 358–366.
- Qin, L., Ji, W., Wang, J., Li, B., Hu, J., & Wu, X. (2019). Effects of dietary supplementation with yeast glycoprotein on growth performance, intestinal mucosal morphology, immune response and colonic microbiota in weaned piglets. *Food and Function*, 10(5), 2359–2371.
- Rajkowska, K., & Kunicka-Styczyńska, A. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of probiotic yeasts. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(sup1), 662–665.
- Ramakrishna, B. S. (2013). Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 28(S4), 9–17.

- Rastall, R. A., & Gibson, G. R. (2015). Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*, 32(April), 42–46.
- Reboud, J. P., Abdeljlil, A. Ben, & Desnuelle, P. (1962). Variations de la teneur en enzymes du pancreas de rat en fonction de la composition des regimes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 58(2), 326–337.
- Reece, W. O., Erickson, H. H., Goff, J. P., & Uemura, E. E. (2015). *Dukes' Physiology of Domestic Animals* (13th Ed). John Wiley & Sons, EUA.
- Reis de Souza, T. C., Mariscal Landín, G., & Escobar García, K. (2010). Algunos factores fisiológicos y nutricionales que afectan la incidencia de diarreas posdestete en lechones. *Veterinaria México*, 41(4), 275–288.
- Reis de Souza, T. C., Mariscal Landín, G., Escobar García, K., Aguilera Barreyro, A., & Magné Barrón, A. (2012). Nutritional changes in piglets and morphophysiological development of their digestive tract. *Veterinaria México OA*, 43(2), 155–173.
- Reis de Souza, T., & Mariscal Landín, G. (1997). El destete, la función digestiva y la digestibilidad de los alimentos en cerdos jóvenes. *Técnica Pecuaria En México*, 35(3), 145–159.
- Relling, A., & Mattioli, G. (2008). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 4(2), 34–40.
- Ríos-Fuenmayor, G., Huerta-Leidenz, N., Rincón, E., Wilhelm, E., & Aguirre-Suárez, J. (1992). Uso de antimicrobiales como promotores del crecimiento en cerdos. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 9(4), 256–270.
- Roberts, S. A., Xin, H., Kerr, B. J., Russell, J. R., & Bregendahl, K. (2007). Effects of dietary fiber and reduced crude protein on ammonia emission from Laying-hen Manure¹. *Poultry Science*, 86(4): 1625–1632.

- Rostagno, H. S., Gomes, P. C., & Euclides, R. F. (2011). *Composición de alimentos y requerimientos nutricionales para aves y cerdos* (Tercera Ed). Departamento de Zootecnia, Universidad Federal de Viçosa, Brasil.
- Sabogal, A., Casas, L. A., Arango, L. G., Feriz, K., Guzmán, G., Gutiérrez, Ó., & Caicedo, L. (2017). Presente y futuro del trasplante de islotes pancreáticos, un tratamiento innovador para la diabetes tipo 1. *Revista Colombiana de Endocrinología, Diabetes & Metabolismo*, 2(1), 20–32.
- Sakurazawa, T., & Ohkusa, T. (2005). Cytotoxicity of organic acids produced by anaerobic intestinal bacteria on cultured epithelial cells. *Journal of Gastroenterology*, 40(6), 600–609.
- Sánchez-Bernal, C., San Román-García, J. I., López-Rodríguez, M. A., & Calvo-Andrés, J. J. (2002). Fisiología y bioquímica del páncreas. In S. Navarro, M. Pérez-Mateo, & L. Guarner (Eds.), *Tratado de páncreas exocrino* (pp. 11–34). J & C. Ediciones Médicas SL, Barcelona, España.
- Sanchez Rivero, G. (2007). Historia de la diabetes. *Gaceta Médica Boliviana*, 30(2), 74–78.
- Sanders, M. E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D. J., & Klaenhammer, T. R. (2018). Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 207–216.
- Santovito, E., Greco, D., Logrieco, A. F., & Avantaggiato, G. (2018). Eubiotics for food security at farm level: Yeast cell wall products and their antimicrobial potential against pathogenic bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(9), 531–537.
- Sastre, J., Sabater, L., & Aparisi, L. (2005). Fisiología de la secreción pancreática. *Gastroenterología y Hepatología*, 28(Supl 2), 3–9.
- Savage, D. C. (1984). Present view of the normal flora. In M. E. Coates & B. E. Gustafson (Eds.), *The Germfree Animals in Biomedical Research* (p. 140). Laboratory animals Ltd: London.

- Schmidt, B., Mulder, I. E., Musk, C. C., Aminov, R. I., Lewis, M., Stokes, C. R., & Kelly, D. (2011). Establishment of Normal Gut Microbiota Is Compromised under Excessive Hygiene Conditions. *PLoS ONE*, 6(12), e28284.
- Schneider, S. M., Girard-Pipau, F., Filippi, J., Hébuterne, X., Moyses, D., Hinojosa, G. C., & Rampal, P. (2005). Effects of *Saccharomyces boulardii* on fecal short-chain fatty acids and microflora in patients on long-term total enteral nutrition. *World Journal of Gastroenterology*, 11(39), 6165–6169.
- SIAP. (2019). *No Title* (p. 2). p. 2. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Singh, D., Alam, T., Pratap Singh, P., Bhardwaj, A., Masud, S., & Tanweer Alam, C. (2018). Efficacy of feeding of soy fortified Shrikhand as functional food on thyroid hormone (T3, T4) and thyroid stimulating hormone (TSH) of rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 671–674.
- Singh, R., & Chahal, K. K. (2018). *Cichorium intybus* L : A review on phytochemistry and pharmacology. *International Journal of Chemical Studies*, 6(3), 1272–1280.
- Solos, I., Liang, Y., & Yue, G. (2014). The teacher-disciple tradition and secret teaching in Chinese medicine. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 20(1), 56–62.
- Speirs, D. C., Smith, H. L., & Waltman, P. (2006). The theory of the Chemostat: Dynamics of microbial competition. *The Journal of Applied Ecology*, 33(3), 651.
- Starkey, J. D. (2014). Triennial Growth Symposium— A role for vitamin D in skeletal muscle development and growth¹. *Journal of Animal Science*, 92(3), 887–892.
- Stewart, L. L., Kim, B. G., Gramm, B. R., Nimmo, R. D., & Stein, H. H. (2010). Effect of virginiamycin on the apparent ileal digestibility of amino acids by growing pigs. *Journal of Animal Science*, 88(5), 1718–1724.
- Stokes, C., & Vega Lopez, M. (1994). Desarrollo del sistema inmune intestinal porcino. *Técnica Pecuaria En México*, 32(1), 30–38.
- Suarez, R. M. (1951). Originales: cortisona y A.C.T.H. en reumatismo. *Anales de Medicina y Cirugía*, 29(72), 495–507.

- Suiryanrayna, M. V. A. N., & Ramana, J. V. (2015). A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 45.
- Sweeney, T., Collins, C. B., Reilly, P., Pierce, K. M., Ryan, M., & O'Doherty, J. V. (2012). Effect of purified β -glucans derived from *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* and *Saccharomyces cerevisiae* on piglet performance, selected bacterial populations, volatile fatty acids and pro-inflammatory cytokines in the gastrointestinal tract of pig. *British Journal of Nutrition*, 108(7), 1226–1234.
- Taciak, M., Pastuszewska, B., Túnio, A., & Świech, E. (2010). Effects of two protein and fibre sources on SCFA concentration in pig large intestine. *Livestock Science*, 133(1–3), 138–140.
- Tizard, I. (2013). *Veterinary Immunology-E-Book (Ninth)*. Elsevier Health Sciences, St. Louis, Missouri, EUA.
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., Vázquez-Juárez, R., & Lésel, R. (2002). Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 204(1–2), 113–123.
- USDA. (2019). Foreign Agricultural Service. Livestock and Poultry: world markets and trade.
- Vazquez, O. (2019). La producción de pollos de engorda en sistema libre de antibióticos promotores de crecimiento en México. Retrieved August 30, 2019, from <https://bmeditores.mx/avicultura/articulos/manejo-en-avicultura/manejo-del-broiler/la-produccion-de-pollos-de-engorda-en-sistema-libre-de-antibioticos-promotores-de-crecimiento-en-mexico-2210>
- Velásquez, J. R. (2005). Comportamiento fractal del repertorio T específico contra el alérgeno Poa P9. *Revista de La Facultad de Medicina*, 53(2), 72–78.
- Verbeke, K. A., Boobis, A. R., Chiodini, A., Edwards, C. A., Franck, A., Kleerebezem, M., & Tuohy, K. M. (2015). Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 28(1), 42–66.

- Villee, C. A. (1988). *Biología*. McGraw-Hill, Interamericana, México.
- Wan, M. L. Y., Forsythe, S. J., & El-Nezami, H. (2018). Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*, 1–14.
- Wang, S., Guo, C., Zhou, L., Zhang, Z., Huang, Y., Yang, J., & Yang, K. (2015). Comparison of the biological activities of *Saccharomyces cerevisiae*-expressed intracellular EGF, extracellular EGF, and tagged EGF in early-weaned pigs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(17), 7125–7135.
- Wang, Y. B., Du, W., Fu, A. K., Zhang, X. P., Huang, Y., Lee, K. H., & Li, Y. L. (2016). Intestinal microbiota and oral administration of *Enterococcus faecium* associated with the growth performance of new-born piglets. *Beneficial Microbes*, *7*(4), 529–538.
- White, L. A., Newman, M. C., Cromwell, G. L., & Lindemann, M. D. (2002). Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *Journal of Animal Science*, *80*(10), 2619–2628.
- Whitney, P. A., & Morris, D. R. (1978). Polyamine auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, *134*(1), 214–220.
- Williams, B. A., Bosch, M. W., Awati, A., Konstantinov, S. R., Smidt, H., Akkermans, A. D. L., & Tamminga, S. (2005). *In vitro* assessment of gastrointestinal tract (GIT) fermentation in pigs: Fermentable substrates and microbial activity. *Animal Research*, *54*(3), 191–201.
- Williams, P. E., Tait, C. A., Innes, G. M., & Newbold, C. J. (1991). Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *Journal of Animal Science*, *69*(7), 3016–3026.
- Xu, F., Newby, J. M., Schiller, J. L., Schroeder, H. A., Wessler, T., Chen, A., & Lai, S. K. (2019). Modeling barrier properties of intestinal mucus reinforced with IgG and secretory IgA against motile bacteria. *ACS Infectious Diseases*, *5*(6), A-K.

- Yan, L., Lim, S. U., & Kim, I. H. (2012). Effect of fermented chlorella supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbial and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(12), 1742–1747.
- Zabielski, R., Le Huërou-Luron, I., & Guilloteau, P. (1999). Development of gastrointestinal and pancreatic functions in mammals (mainly bovine and porcine species): influence of age and ingested food. *Reproduction Nutrition Development*, 39(1), 5–26.
- Zanello, G., Meurens, F., Berri, M., Chevaleyre, C., Melo, S., Auclair, E., & Salmon, H. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* decreases inflammatory responses induced by F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* in porcine intestinal epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 141(1–2), 133–138.
- Zhang, L., Wu, W., Lee, Y. K., Xie, J., & Zhang, H. (2018). Spatial heterogeneity and co-occurrence of mucosal and luminal microbiome across swine intestinal tract. *Frontiers in Microbiology*, 9(January), 48.
- Zhao, W., Yuan, M., Li, P., Yan, H., Zhang, H., & Liu, J. (2019). Short-chain fructooligosaccharides enhances intestinal barrier function by attenuating mucosa inflammation and altering colonic microbiota composition of weaning piglets. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), 976–986.
- Zoetis, S. (2013). *Resumen de las características del producto 1. Denominación comercial y especie de destino*. Retrieved from https://www.zoetis.es/_locale-assets/spc/linco-spectin-100.pdf