

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

**EFFECTO DEL USO DE DOS LEVADURAS (*S. CEREVISAE* Y *S. BOULARDII*)
SOBRE ALGUNAS CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS E
INMUNOLÓGICAS DEL APARATO DIGESTIVO DE LECHONES RECIÉN
DESTETADOS**

Tesis

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

PRESENTA:

MVZ Miriam Itzel Martínez Olivo

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.

Enero de 2020

México

DEDICATORIAS

A mis padres, que sin ellos no hubiera logrado una meta más en mi vida profesional.

A mis hermanos Rodolfo y David.

A la Dra. Tércia, Dra. Araceli y al Dr. José.

A mis amigos, en especial a Giovanni, Dairon, Cristian y Edgardo.

A mis amigas, Sara, Luisa y Viridiana.

A mis tíos Adrián y Marlyn.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que contribuyeron de una u otra manera para la realización de este trabajo.

Gracias a mis padres por siempre estar a mi lado, los consejos, el amor, por el apoyo moral y todas las frases de aliento durante este tiempo.

Muchas gracias a todo el equipo de trabajo del laboratorio de Nutrición Animal por todo el apoyo brindado. Al Dr. José por todos los conocimientos que me brindo para este trabajo. A la Dra. Araceli porque durante su gestión como coordinadora de la maestría y como profesora siempre estuvimos bien orientados A Samantha y al Dr. Konisgmar por todo su apoyo, guía y consejos durante todo el proyecto.

Sobre todo, gracias a la Dra. Tércia a quien siempre me guio, me apoyó y me tuvo mucha paciencia en todo momento, y a quien le tengo un grande aprecio y una gran admiración como ser humano y como profesional.

Gracias a todos los profesores de la Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable que nos brindaron su tiempo, consejos y conocimientos, para poder seguir creciendo profesionalmente.

Al laboratorio de Genética, Sistemática y Ecología Molecular, en especial a la Dra. Karina Acevedo por permitir usar sus instalaciones y equipo en la realización de algunos análisis.

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.

Finalmente agradezco al CONACyT por su apoyo por la beca asignada y por su apoyo al proyecto CB-2012-0100000000179898 y al FOFI-UAQ 2018 por la complementación del financiamiento para la realización de esta tesis.

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
INDICE	III
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	IX
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 EL LECHÓN Y EL DESTETE	2
2.2 CRECIMIENTO Y DESARROLLO DEL LECHÓN	5
2.3 SALUD DEL TRACTO DIGESTIVO Y MICROBIOTA INTESTINAL	7
2.4 DISMINUCIÓN DEL USO DE LOS ANTIBIÓTICOS GENERADORES DE RESISTENCIA	9
2.5 ALIMENTOS FUNCIONALES	10
2.6 PROBIÓTICOS	11
2.7 MECANISMOS DE ACCIÓN DE <i>SACCHAROMYCES</i>	13
2.8 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	13
2.9 <i>SACCHAROMYCES BOULARDII</i>	14
2.10 SISTEMA INMUNOLÓGICO	19
2.11 CITOCINAS	21
2.12 MUCINAS Y GEN MUC2	25
2.13 SUSTENTABILIDAD Y PRODUCCIÓN	26
III. HIPÓTESIS.....	29
IV. OBJETIVOS.....	30
4.1 GENERAL	30
4.2 ESPECÍFICOS.....	30
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
5.1 LUGAR DE ESTUDIO.....	31
5.2 ANIMALES Y DIETAS.....	31
5.3 TOMA DE MUESTRAS	34

5.4 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE CDNA.....	34
5.5 PCR EN TIEMPO REAL	36
5.6 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	37
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 PESO RELATIVO DE ÓRGANOS	39
6.2 PH DE LOS CONTENIDOS GASTROINTESTINALES	44
6.2.1 Efecto de la dieta consumida sobre el pH de los contenidos digestivos	45
6.2.2 Efecto de la edad posdestete sobre el pH de los contenidos digestivos.....	46
6.2.3 Efecto de la interacción dieta y edad posdestete sobre el pH de los contenidos digestivos	47
6.3 EXPRESIÓN GÉNICA.....	50
6.3.1 Expresión génica en el íleon: efecto de la dieta consumida	50
6.3.2 Expresión génica en el colon	53
VII. CONCLUSIÓN	61
VIII. RECOMENDACIONES	63
IX. LITERATURA CITADA	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ingredientes y composición química de la dieta basal, porcentaje en base al alimento ofrecido.-----	33
Cuadro 2. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la qPCR a tiempo real y fuente de los mismos.-----	39
Cuadro 3. Peso relativo de los órganos digestivos de lechones alimentados con las dietas experimentales.-----	41
Cuadro 4. pH de los contenidos del estómago, yeyuno e íleon de lechones alimentados con las diferentes dietas experimentales.-----	46
Cuadro 5. Expresión de RNAm de MUC2, IL6 y TNF α en la mucosa del íleon de lechones al 14 posdestete.-----	53
Cuadro 6. Efecto de la dieta y del día posdestete sobre la expresión de RNAm de los genes MUC2, IL6 y TNF α en la mucosa del colon de lechones.-----	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de la edad posdestete sobre el peso relativo de los órganos digestivos.-----	43
Figura 2. Efecto de la edad posdestete sobre el pH de las secreciones del tracto digestivo anterior.-----	49
Figura 3. Efecto de la interacción entre la dieta consumida y la edad posdestete -----	50
Figura 4. Dispersión de datos para la expresión génica de IL-6 y TNF- α en íleon al día 14 posdestete.-----	54
Figura 5. Efecto de la interacción entre la dieta y la edad de los lechones sobre la expresión del gen MUC2 en el colón. -----	57
Figura 6. Efecto de la interacción entre la dieta y la edad de los lechones sobre la expresión del gen IL-6 en el colón. -----	59

RESUMEN

El estrés nutricional ocasionado por el cambio en su alimentación al destete se asocia a una respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal, lo que era solucionado con la inclusión de antibióticos en las dietas de los lechones; debido a la prohibición en su uso en la alimentación animal, se han propuesto como alternativa el uso de levaduras vivas en las dietas iniciadoras para su sustitución. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la inclusión de dos levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) y *Saccharomyces. boulardii* (Sb) a la dieta de lechones, sobre algunas características morfofisiológicas e inmunológicas del aparato digestivo. Se utilizaron 40 lechones Fertilis 20xG Performance (Genetiporc®, PIC México, Querétaro, México) de 19.76 ± 1.56 días de edad, con 6.2 ± 1.79 kg de peso, distribuidos entre cuatro grupos de 10 individuos por tratamiento experimental: dieta basal sin antibiótico (C-); dieta basal con Sc (Sc); dieta basal con Sb (Sb); 4) dieta basal con antibiótico (C+). A los días 7 y 14 posdestete se sacrificaron 5 lechones por tratamiento para obtener y pesar los órganos digestivos y determinar el pH de sus contenidos, además de medir la expresión génica de MUC2, IL-6 y TNF- α en la mucosa del íleon y colon. El peso de los órganos digestivos no varió ($P > 0.05$) entre los animales. El pH del estómago fue más ácido a los 14 días posdestete ($P < 0.05$). En el pH del contenido del ciego y del colon, se observó una interacción entre la dieta y la edad posdestete ($P < 0.001$), donde solamente los animales que consumieron las levaduras disminuyeron su pH entre el día 7 y 14. En la expresión génica de MUC2, IL6 y TNF- α en el íleon no se observó un efecto ($P > 0.05$) de la dieta. La expresión génica de MUC2 en el colon con Sc fue menor ($P < 0.01$), mientras que la de TNF- α no varió ($P > 0.05$). Se observó una interacción entre la dieta y la edad ($P < 0.05$) en la expresión génica de la IL-6 en el colon, con incrementos para C+, Sb y C- entre las dos edades posdestete y una disminución para Sc. Los resultados indican que el uso de levaduras en dietas sin antibióticos no afecta negativamente el desarrollo de los órganos digestivos, pero si en el pH del colon y ciego. Además de influenciar en la expresión génica en colon de IL-6, generando

niveles de expresión similares a la dieta con antibióticos y la expresión génica de MUC2, mostrando los efectos positivos que *Saccaromyces boulardii* tiene sobre la mucosa ileocolónica.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ABSTRACT

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. INTRODUCCIÓN

La transición del consumo de leche a ingerir alimentos sólidos es asociada a un período crítico de subalimentación durante el cual el lechón se está adaptando a la nueva dieta (Le Dividich y Herpin, 1994). El lechón destetado es altamente demandante de nutrimentos para el desarrollo corporal y maduración del sistema inmunológico (Lallès *et al.*, 2007). Puede tomar de 4 a 7 días (Le Dividich y Herpin, 1994; Pluske *et al.*, 1996; Bruininx, 2002) después del destete antes de que los lechones alcancen un promedio de nivel de la ingesta de alimento que cumpla con el requisito de energía para el mantenimiento. Por lo tanto, el estancamiento del crecimiento después del destete no es un evento sorprendente (Leibrandt *et al.*, 1975). El aparato digestivo debe adaptarse rápidamente a la digestión del nuevo alimento, principalmente de su fracción proteica. El lechón lactante es apto para digerir los carbohidratos de la leche y el cambio a la dieta posdestete, rica en carbohidratos complejos, hace que al intestino grueso ingrese una gran cantidad de sustratos altamente fermentables, esto conlleva probablemente a un cambio de las poblaciones microbianas, lo que genera desordenes gastrointestinales, inflamación y diarreas (Reis de Souza *et al.*, 1997; Le Dividich y Sève, 2000; Lallès *et al.*, 2007). Por ello, con frecuencia se agregan dosis subterapéuticas de antibióticos al alimento como medida preventiva contra las diarreas y como promotores de crecimiento. Sin embargo, debido a la prohibición actual del uso de antibióticos por la resistencia bacteriana, este proyecto busca evaluar la inclusión de probióticos como una alternativa al uso de antibioticos, en particular respecto a la adición de levaduras vivas a la dieta de lechones, para así corroborar los efectos que estas puedan tener sobre la expresión de genes que participan en el proceso inflamatorio, así como en la síntesis de mucina a nivel de íleon y colon, compartimentos importantes para los procesos de digestión enzimática y fermentación. El entendimiento de estos temas, puede llegar a ayudar a encontrar una alternativa viable que pueda tener un efecto benéfico sobre el medio ambiente intestinal de los lechones.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El lechón y el destete

El lechón está preparado fisiológicamente durante sus primeras semanas de vida para poder emplear la leche materna como principal fuente de nutrimentos (Gómez, 2006).

Durante los primeros 10 días de vida, los lechones recién nacidos cuentan con un desarrollo muy rápido por el cual ocurren diversos cambios en el intestino delgado, tales como incrementos importantes en su peso, diámetro y longitud, los cuales se asocian al incremento del peso de la mucosa intestinal, de la altura y diámetro de sus vellosidades y de la población celular (Smith y Jarvis, 1978; Moughan *et al.*, 1992 Xu *et al.*, 1992).

Por lo que es muy importante que los procesos de digestión y absorción de los nutrimentos sean llevados a cabo de una manera correcta, para lo que se necesita el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal, la que a su vez requiere de un adecuado recambio y renovación de sus células (Fan, 2002). Debe completarse la diferenciación estructural de la mucosa, para así poder empezar con una función digestiva, lo cual ocurre habitualmente en el primer tercio de la vellosidad. Cuando el enterocito rebasa la mitad de la vellosidad e incrementa hasta ser descamado en su punta, podemos decir que ha comenzado la absorción de carbohidratos y aminoácidos (Smith, 1984; Smith *et al.*, 1989).

Se ha observado una reducción estructural y funcional a nivel intestinal desde la tercera semana de vida del lechón de la enzima lactasa (Gómez *et al.*, 2007), por lo que se intuye que la dieta del lechón a base de leche puede detenerse a partir de la tercera o cuarta semana (Gómez *et al.*, 2008).

Antes de la tercera semana de edad la actividad enzimática en el tracto gastrointestinal del lechón es aún inmadura, por lo que es difícil que se puedan degradar nutrimentos de dietas elaboradas (Daposa, 2002; Kidder y Manners,

1978). La reducida cantidad de enzimas como la amilasa, lipasa y proteasas hasta la cuarta semana de edad (Daposa, 2002; Easter, 1995), restringe la hidrólisis de almidones y carbohidratos distintos a la lactosa (Kidder y Manners, 1978). Aunado a todo esto, durante los primeros días y hasta las primeras semanas posdestete se tiene una limitada secreción de ácido clorhídrico, lo que ocasiona que la acidez (observada con valores de pH 4) en estómago no alcance niveles considerables durante este periodo (Aguilera *et al.*, 2003); por lo que es aún menos eficiente la digestión de la proteína de la dieta suministrada (Kidder y Manners, 1978; Daposa, 2002).

El destete se puede definir como la exclusión de la leche materna como base dietaria del lechón, básicamente es el cambio de la leche materna a una dieta sólida. En la naturaleza el destete es un proceso natural, donde el lechón consume leche hasta que la producción de leche por parte de la madre va disminuyendo, y durante este proceso el lechón tiene una adaptación paulatina a otro tipo de alimentos, pudiéndose considerar este evento como un proceso fisiológico (Gómez, 2006), que es realizado entre las 15 y 22 semanas de edad (Jensen y Stangel, 1992). Sin embargo, en la porcicultura comercial el destete se realiza entre la segunda y la sexta semana de edad, de acuerdo a sus dos sistemas comerciales: destete tradicional (35 a 45 días) y destete temprano (7, 14, 21 y 28 días, en base al nivel de tecnificación de la granja), siendo este último el más común (Gómez, 2006).

En el destete tradicional se busca principalmente lograr minimizar el cambio brusco de manera suave y rápida de una dieta líquida a una sólida basada principalmente en almidón y proteínas animales y vegetales (Medel *et al.*, 1999). Esto genera cambios a nivel morfológico y funcional en el tracto gastrointestinal que alteran el consumo de alimento y proceso digestivo, induciendo que los requerimientos de proteína y energía no sean cubiertos en su totalidad, complicando así el crecimiento del lechón principalmente durante la primera semana posdestete (Le Dividich y Sève, 2000). El desarrollo ulterior del aparato

digestivo está ampliamente ligado al consumo de alimento sólido, por lo que animales con mayor consumo de alimento tendrán una cantidad mayor de energía que será destinada a un mayor crecimiento de órganos como el estómago, páncreas, intestino delgado e hígado (Pluske *et al.*, 2003).

Las fuentes de grasa vegetal y animal tienen un impacto también importante (Gómez, 2006), ya que su utilización influye en el proceso digestivo, en el caso de las grasas complejas forman gotas grandes con un área de superficie muy pequeña para el ataque enzimático; mientras que la grasa de la leche materna, forma pequeñas gotas emulsificadas que pueden mezclarse rápidamente con las sales biliares.

Gómez (2006), mencionan que aun más importante es la relación entre altura de vellosidades y profundidad de las criptas. Se han encontrado variaciones a lo largo de las vellosidades y profundidad de las criptas en diferentes condiciones ambientales, provocando que exista una reducción en la absorción de nutrientes derivados de fuentes que no son la leche materna, lo que es reflejado en las primeras semanas posdestete con una baja digestión (Van der Klis y Jansman, 2002).

Por lo que, al destete, todos estos cambios funcionales y estructurales provocan en el lechón una reducción del consumo voluntario de alimento, pobre crecimiento inicial o pérdida de peso, además de diarrea y en algunos casos morbilidad que termina en casos graves en muerte (Allee y Touchette, 1997).

En los últimos años los investigadores se han dado a la tarea de buscar técnicas que ayuden a mejorar los parámetros productivos para adaptar a los lechones a una dieta posdestete a base de carbohidratos y de proteínas de origen vegetal, reduciendo así el riesgo de las diarreas posdestete (Reis y Mariscal, 1997).

2.2 Crecimiento y desarrollo del lechón

El crecimiento y el desarrollo constituyen dos procesos importantes en la producción animal.

El crecimiento es un proceso en el que se producen nuevas unidades bioquímicas mediante síntesis metabólica y biológica, incluyendo procesos tales como multiplicación y agrandamiento celular (Brody, 1945). El crecimiento también fue definido por Hammond (1966) como: "El aumento de peso vivo (PV) experimentado por un individuo desde su concepción hasta su estabilización en la edad adulta", indicando que el crecimiento se puede explicar en dos procesos, el primero, como el crecimiento en sí, donde el animal aumenta de peso hasta alcanzar el tamaño adulto o madurez y el segundo, definido como el desarrollo, donde el animal modifica su conformación corporal alcanzando la plenitud de sus funciones y facultades. Lo que infiere que el crecimiento hace referencia solo a lo cuantitativo, y el desarrollo a un proceso tanto cuantitativo como cualitativo que se lleva a cabo siguiendo cierto orden fisiológico. Sin embargo, ambos procesos son complementarios y están ampliamente influenciados por factores internos (de tipo genético), y de tiempo ambiental y de manejo (alimentación, alojamientos).

Los animales en crecimiento tienen una evolución de su conformación y proporciones que indican un crecimiento alométrico, lo que quiere decir, que no todas las regiones y tejidos corporales crecen de la misma manera o intensidad y al mismo tiempo; y que en gran medida esta evolución del proceso es dependiente de la prioridad nutritiva de los tejidos. El cerdo al nacer es proporcionalmente voluminoso en su cabeza, con extremidades largas, cuerpo corto y poco profundo; conforme el animal se desarrolla, el cuerpo se alarga y aumenta en profundidad, las extremidades son proporcionalmente más cortas y el miembro posterior va adquiriendo mayor masa muscular (Hammond, 1966).

Una de las medidas de tiempo más utilizadas es la curva de crecimiento total, descrita por Whittemore (1996), donde se expresa el crecimiento como un aumento de peso que se va acumulando durante un periodo de tiempo prefijado.

La velocidad del crecimiento para la especie porcina difiere de la de otras especies, describiéndose como inicialmente baja, posteriormente se hace máxima, y a medida que el animal se acerca a la madurez, disminuye (Hammond, 1966). En las explotaciones comerciales se pueden diferenciar los dos puntos de inflexión en este crecimiento, donde a los 14 a 17 días cuando el lechón es un poco más maduro aumenta su velocidad de crecimiento, mientras que en el momento del destete disminuye debido al estrés.

Crecimiento de Órganos digestivos

Reis de Souza *et al.* (2012) en una revisión bibliográfica muestra el desarrollo que tiene el tracto gastrointestinal (TGI) desde la vida intrauterina hasta la fase posdestete. En este artículo los autores mencionan que el lechón aumenta alrededor de 7.5 veces su peso y que cada uno de los órganos pasa por transformaciones importantes, como el páncreas que aumenta 12 veces su peso absoluto. Antes del nacimiento, la mucosa gástrica es capaz de secretar HCl y enzimas; el final de la vida fetal se caracteriza por un descenso del pH estomacal de 7 a 2-3. Justo después del nacimiento de los lechones el estómago crece intensamente y su capacidad de secretar ácido aumenta cerca de cinco veces en la primera semana posparto, con un posterior incremento muy lento hasta el destete. El intestino delgado de los cerdos presenta un desarrollo acelerado durante los primeros 10 días después del nacimiento, después se observa un proceso de maduración, que se caracteriza por aumentos marcados del volumen, longitud y peso. La primera semana posdestete suele ser en la que más consecuencias negativas tiene en el TGI. En los dos o tres primeros días posdestete se observa una disminución del peso de los órganos digestivos, aunque en algunos casos, el peso permanece constante en este periodo.

Respecto a todo esto Reis de Souza *et al.* (2012) mencionan que, la nutrición enteral constituye un punto muy importante en el desarrollo del TGI. Comenzando por el estómago, ya que su crecimiento se asocia con el desarrollo de la mucosa gástrica y donde se observa un crecimiento alométrico durante las primeras cuatro semanas posdestete, estabilizándose en las semanas subsecuentes. Mientras que en el intestino delgado gracias a la disminución del consumo de alimento se observa una disminución en la proliferación, diferenciación y migración de células del epitelio intestinal. Además, mencionan una disminución de hasta el 75% de la altura de las vellosidades intestinales, debido a la pérdida de enterocitos maduros, sumando a esto una disminución de la actividad de las diversas enzimas intestinales, teniendo como consecuencia una disminución del peso intestinal.

2.3 Salud del tracto digestivo y microbiota intestinal

La salud intestinal puede ser definida como la capacidad del tracto gastrointestinal (TGI) de mantenerse en equilibrio, ya que es un ecosistema en constante cambio (Melin *et al.*, 1997). Existen tres principales componentes de la salud intestinal: la dieta, la mucosa y la microbiota comensal. Ciertos componentes de la dieta para lechones destetados, como la pasta de soya, pueden causar daños de la mucosa intestinal, acumulación de líquido intestinal y predisponer a diarreas posdestete (Pluske *et al.*, 2002). El desarrollo del sistema inmune de la mucosa intestinal depende de la colonización por bacterias comensales y patógenas (Lallès *et al.*, 2007). La mucosa está compuesta por el epitelio digestivo, el tejido linfoide asociado con el intestino (TLAI) y el moco que recubre el epitelio. El TLAI, la microbiota comensal y el moco interactúan con las células del hospedero, generando un sensible y dinámico equilibrio en el TGI, asegurando el correcto funcionamiento del proceso digestivo (Montagne *et al.*, 2003).

En el área de nutrición animal, el reto planteado por la prohibición de los antimicrobianos promotores de crecimiento, ha hecho que se busquen instrumentos capaces de aportar un mayor conocimiento de los componentes de

la microbiota intestinal, es decir, del conjunto de microorganismos que conforman uno de los microcosmos simbióticos más interesantes del reino animal (Pérez de Rozas *et al.*, 2003). La microbiota del TGI es un ecosistema complejo que contiene varios miles de especies bacterianas, las cuales tienen un papel importante en la salud intestinal, previniendo la colonización de microorganismos potencialmente patógenos (Takahashi *et al.*, 2008).

Al nacer, los lechones quedan expuestos a los microorganismos del ambiente que les rodea, y el contacto con la flora microbiana materna y sus heces, introduce bacterias que colonizan su tracto digestivo (Pluske *et al.*, 2003). Estas bacterias buscan el nicho más adecuado donde compiten e interactúan entre sí, constituyendo finalmente una población relativamente estable y compleja, que representa la microbiota intestinal normal. En el lechón lactante las bacterias dominantes en el estómago e intestino delgado suelen ser lactobacilos y estreptococos, ambos grupos están bien adaptados a utilizar el sustrato lácteo disponible (Pluske *et al.*, 2003). La microbiota que se desarrolla en el intestino grueso poco después del nacimiento, está constituida por una extensa y variada selección de bacterias mayoritariamente anaerobias estrictas, incluyendo bacteroides, bifidobacterias, eubacterias, estreptococos y lactobacilos, mientras que en menor densidad pueden encontrarse otros microorganismos, como las enterobacterias; normalmente, el género bacteroides es el más numeroso y puede representar más de 30% del total (Castillo, 2006). La flora microbiana normal que se establece después del nacimiento, interactúa con los sistemas digestivo e inmunológico del cuerpo y sus actividades pueden ser benéficas o dañinas para el huésped (Lallès *et al.*, 2007). La colonización de los diferentes compartimentos del intestino por bacterias comensales específicas, particularmente por medio de la asociación con el moco o de la adhesión a las células epiteliales, sirve como la primera barrera de defensa contra organismos invasores o sustancias tóxicas presentes en la dieta. Al momento del destete, en un corto periodo ocurren cambios en la composición de la microbiota intestinal del lechón en términos de

cantidad y calidad, la cual evoluciona a una compleja y estable comunidad (Konstantinov *et al.*, 2004). El desarrollo de la microbiota intestinal es un proceso gradual y secuencial que depende de factores nutricionales y no nutricionales (Konstantinov *et al.*, 2004; Pluske *et al.*, 2003).

2.4 Disminución del uso de los antibióticos generadores de resistencia

Desde 1969, era observado por el investigador Swann el posible riesgo de bacterias resistentes que pudieran generar algún tipo de reacción cruzada de animales a humanos. En la actualidad la preocupación reside en el uso de antibióticos por animales que producen alimento y su aportación a beneficiar el desarrollo de organismo patógenos en el tracto gastrointestinal (Christina y Surawicz, 2003; Gunther, 2003; Levin, 2007). El National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), alude que esta resistencia antibiótica en los microorganismos es transmitida a la progenie directamente a través de los genes, o a través de los plásmidos, a otras especies (Gutiérrez *et al.*, 2013).

La situación legislativa en la Unión Europea (UE), y en varias otras partes del mundo, limitando la utilización de los antibióticos promotores de crecimiento, ha dado un fuerte empuje a la investigación en aplicación de estrategias nutricionales y aditivos como ácidos, probióticos, oligosacáridos, enzimas, aromas y fitoquímicos entre otros (Araya *et al.*, 2002).

Es claro que los problemas más frecuentes que hoy en día suceden en las prácticas de manejo intensivo de los animales de granja se atribuyen mayormente a los desequilibrios generados por presencia de bacterias entéricas, las cuales provocan la disminución en la digestión y absorción de nutrientes y, por lo tanto, el retardo en la producción (Armstrong *et al.*, 1988) (Parker y Armstrong, 1987), sin mencionar factores externos que pueden ocasionar un daño al desequilibrio intestinal, tales como las diarreas que ocasionan un decremento considerable a la barrera inmune, permitiendo que los organismo patógenos puedan implantarse, adherirse y proliferar en las células epiteliales del intestino. Esto desencadenó la

suplementación de dietas que normalmente incluyen dosis subterapéuticas de antibióticos (Figuroa *et al.*, 2006) como una medida preventiva contra las diarreas y como promotores de crecimiento (Verstegen y Williams, 2002), las cuales parecían ser muy efectivas. No obstante, la utilización desmesurada de estos compuestos ha ocasionado la resistencia de algunas cepas microbianas a los antibióticos, lo que ha creado una creciente problemática a nivel mundial (Linton, *et al.*, 1988; Torres *et al.*, 2002). Debido a todo esto la prohibición del uso de antibióticos en la alimentación animal en diferentes partes del mundo ha sido implementada, por lo que han incrementado las diarreas posdestete (DPD) en lechones. Para contrarrestar este problema se ha promovido el uso de estrategias nutricionales como medidas de control de las DPD (Verstegen *et al.*, 2002; Pluske *et al.*, 2002; Figuroa *et al.*, 2006; Lallès *et al.*, 2007) incluyendo la manipulación de los ingredientes de la dieta para modificar las poblaciones bacterianas patógenas y comensales (Wellock *et al.*, 2008).

Una alternativa al uso de antibióticos, es la utilización de microorganismos vivos con características probióticas que depende en parte de la cepa utilizada, pues, no todas tienen la misma capacidad de modulación de la microflora intestinal o la misma capacidad para unirse a las células intestinales (Castro y Rodríguez, 2005).

2.5 Alimentos Funcionales

Una alternativa que actualmente es utilizada a la adición de antibióticos en la dieta en algunas especies ha sido el uso de ingredientes funcionales.

Se consideran alimentos funcionales: probióticos, prebióticos, simbióticos, antioxidantes, productos secundarios del metabolismo vegetal, lípidos estructurales, ácidos grasos poliinsaturados, subproductos del metabolismo de las grasas, péptidos bioactivos, fibras, vitaminas y minerales (Grossenbacher-Mansuy, 2000). Estos son definidos de esta forma al ser componentes que influyen sobre ciertas funciones del organismo de manera positiva y que de la

misma manera propician bienestar en el animal (Velasco *et al.*, 2006). Un alimento puede ser considerado funcional si se ha demostrado que afecta de forma sustancialmente beneficiosa (más allá de proporcionar una nutrición adecuada desde el punto de vista tradicional) a una o varias funciones relevantes del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar y/o reduce el riesgo de padecer enfermedad (Roberfoid, 1996). Estos alimentos pueden ser naturales o modificados, de manera que se puede alterar, añadir o eliminar uno o varios de sus componentes; o también puede ser una combinación de ambos. Sin embargo, hacen falta más estudios a largo plazo para ver con más detalle los resultados que se obtienen tras la administración de alimentos funcionales (Olagnero *et al.*, 2007).

Son totalmente seguros para los animales, los consumidores y el medio ambiente, y su eficacia está respaldada por numerosos estudios. Los probióticos particularmente son bastante sonados actualmente como alimentos funcionales, estudiados ampliamente en la salud humana (Salazar y Montoya, 2003; Guarner y Schaafsma, 1998). Por lo que representan una excelente alternativa como un medio para reparar deficiencias en la flora intestinal inducidas por efectos dietarios y ambientales, haciendo al hospedero más resistente a la enfermedad y reduciendo la frecuencia del uso de antibióticos (Castro y Rodríguez, 2005).

2.6 Probióticos

Se consideran alimentos funcionales al ser compuestos que tienen efectos positivos sobre una o varias funciones del organismo y propician bienestar en el animal (Velasco *et al.*, 2006). Los probióticos se definen como productos que contienen un microorganismo específico, viable y en cantidad suficiente, que por implantación o colonización altera la microflora de un compartimiento del tracto gastrointestinal de un hospedero, causando efecto benéfico (Schrezenmeir y De Vrese, 2001).

Los probióticos deben cumplir funciones en el hospedero, una vez se han incorporado en la alimentación, entre las que se incluyen: la disminución del pH intestinal, liberación de metabolitos protectores como los ácidos grasos, el peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, entre otras, que previenen el crecimiento de patógenos, como *Candida albicans*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella schottmuelleri*, *Shigella dysenteriae*, *S. paradysenteriae*, *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Vibrio cholerae* o *parahaemoliticus* (Vimala y Dileep, 2006). Los probióticos, además, ayudan a la regulación de la movilidad intestinal y la producción de moco (Gupta y Garg, 2009). También, usan mecanismos enzimáticos que modifican los receptores de toxinas y los bloquean, previniendo la colonización de patógenos por competencia (Vandenbergh, 1993).

Germán *et al.* (2001), mencionan que entre las estrategias más importantes de los probióticos se encuentran: la adhesión a la pared del tracto digestivo que evita la colonización de patógenos, compete con ellos por los nutrientes y los sitios de adhesión, y la producción de sustancias antimicrobianas, como el ácido láctico, que afectan las membranas celulares de microorganismos patógenos alterando su permeabilidad, y los niveles de pH y de oxígeno que los hacen desfavorables a los patógenos (Fuller y Cole, 1989).

La inclusión de cultivos bacterianos (probióticos) a los alimentos fue una de las primeras alternativas usadas para reemplazar los antibióticos en la alimentación animal (Verstegen y Williams, 2002). Su efecto en el control de las diarreas posdestete depende del microorganismo utilizado (Lallès *et al.*, 2007). Dentro de los microorganismos que han sido autorizados para su empleo en la alimentación animal hay diferentes grupos de bacterias probióticas (*Bacillus* spp, *Lactobacillus* spp, *Enterococcus* spp, *Pediococcus* spp) y entre las levaduras probióticas el género más común es *Saccharomyces*, siendo las especies más comunes *S. cerevisiae* y *S. boulardii* (Chaucheyras-Durand y Durand, 2008).

Varias investigaciones han demostrado los efectos positivos sobre el comportamiento zootécnico utilizando diferentes cepas de probióticos existiendo diferentes resultados, ya que en algunos casos pueden verse reducciones en la ganancia diaria de peso y en el consumo de alimento (Cutting *et al.*, 2011; Lessard *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2008; Skjolaas *et al.*, 2007; Jack *et al.*, 1995; Pollmann *et al.*, 1980).

2.7 Mecanismos de acción de *Saccharomyces*

Numerosos autores (Zanello *et al.*, 2011; Bazay, 2010; Chaucheyras-Durand y Durand, 2010; Van Der Aa Kühle *et al.*, 2005; Dick *et al.*, 1992) sugieren que los mecanismos de acción de las levaduras del género *Saccharomyces* son la producción de ácidos orgánicos que ayudan a disminuir el pH intestinal generando condiciones ecológicas favorables, reduciendo el riesgo de colonización por parte de bacterias patógenas; la secreción de factores moduladores de la respuesta inflamatoria; la producción de enzimas que degradan toxinas bacterianas; la producción de sustancias antibacterianas que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas; producen nutrientes y factores de crecimiento para bacterias benéficas de la microbiota intestinal; la interacción del probiótico con el huésped, influenciando el sistema inmune; tiene efecto anti adhesivo contra patógenos; estimula las disacaridasas del borde de cepillo; permanece viva a lo largo del TGI, no puede colonizarlo. Sin embargo, todos estos efectos benéficos han sido observados en pacientes humanos inoculados con *Saccharomyces boulardii*, lo que hace necesario diferenciar el efecto de ambos tipos de levadura desde el punto de vista fisiológico, inmunitario e inflamatorio.

2.8 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) es una levadura omnipresente ampliamente utilizada en la industria, principalmente en la fabricación de pan y bebidas alcohólicas como vino, cerveza o champán (Chitasombat *et al.*, 2012).

También es posible encontrar a esta levadura en la microbiota habitual: en el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio y las membranas mucosas (Souza *et al.*, 2013).

La EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) clasifica a *S. cerevisiae* con un estado de Presunción Cualificada de Seguridad, convirtiéndola en una levadura bastante común empleada en los alimentos de fermentación, donde ha mostrado diversas propiedades tecnológicas (Hudson *et al.*, 2016).

En la actualidad esta levadura y algunos componentes de la pared celular de la misma se utilizan como un suplemento en la alimentación animal, debido a sus múltiples efectos benéficos en la salud y bienestar de los animales (Beauchemin *et al.*, 2008).

Esta levadura puede modular y alterar la producción de citocinas y activación del sistema inmunológico (Eicher *et al.*, 2006). Zanello *et al.* (2011) confirmaron esta modulación de *S. cerevisiae* mediante la transcripción y expresión de proteínas en la inflamación, el reclutamiento y activación de células inmunes en células epiteliales intestinales de cerdos.

Los polisacáridos como el α -D-glucano y el β -D-glucano son algunos de los componentes de la pared celular de la levadura (Kogan y Kocher, 2007), los cuales son capaces de unirse a bacterias patógenas previniendo la unión y colonización en el tracto gastrointestinal (Kogan *et al.*, 1989). *S. cerevisiae* inhibe la expresión que induce *E. coli* enterotoxigenica de transcritos proinflamatorios como la IL-6, IL-8, CCL20, CXCL2 y CXCL10 (Zanello *et al.*, 2011). El β -glucano es clasificado como un modulador de respuesta biológica, aumentando la funcionalidad de macrófagos y neutrófilos (Williams *et al.*, 1996; Bohn y BeMiller, 1995).

2.9 *Saccharomyces boulardii*

Saccharomyces boulardii es una levadura que ha sido constantemente relacionada con *S. cerevisiae*. Esta cepa fue descubierta en la indochina en 1920

por el microbiólogo francés Henri Boulard mientras buscaba nuevas cepas de levadura que pudiesen ser utilizadas en procesos de fermentación. Durante su visita fue testigo de un brote de cólera, donde se pudo dar cuenta que algunas personas que no desarrollaban la enfermedad bebían un té especial. El té estaba hecho por la cáscara de dos frutas tropicales (lichi y mangostanes). Gracias a esto, logró aislar el agente responsable; se trataba de una cepa especial de levadura. La patente para esta levadura fue comprada en 1947 por laboratorios Biocodex quienes iniciaron su investigación y protocolos de fabricación. El interés por esta cepa ha aumentado, y esto se ve reflejado en el creciente número de publicaciones científicas, que abarca tantos documentos preclínicos en los mecanismos de acción, eficacia en modelos animales, farmacocinética, así como los primeros estudios en seguridad y dosis (McFarland, 2010).

A diferencia de otros probióticos, *Saccharomyces boulardii* fue la única levadura con efectos clínicos y con eficacia probiótica probada en estudios por partida doble en el ciego (Sazawal *et al.*, 2006).

Las levaduras usadas como probióticos tales como *S. boulardii* tienen diferencias específicas en comparación con los probióticos bacterianos, cuentan con distintas estructuras fisiológicas, diferente tamaño, no adquieren genes resistentes a antibióticos y no se ven afectados por los mismos (McFarland, 2010).

Esta levadura tiene diversas propiedades que la identifican como una alternativa idónea al ser escogida como probiótico contra una bacteria, ya que sobrevive al tránsito a través del tracto gastrointestinal resistiendo tensiones locales como la presencia de enzimas, sales biliares y variaciones de pH, ya que tiene un pH de sobrevivencia entre 4.5 y 6.5 y su temperatura óptima es de 37° C tanto *in vivo* como *in vitro* (Czerucka *et al.*, 2007).

Han surgido diversos debates acerca de su nomenclatura válida (McFarland, 1996). Los avances en los métodos de caracterización molecular abrieron un debate sobre si esta cepa debería ser reclasificada como una cepa de

S. cerevisiae o permanecer como una especie separada. Varios trabajos preliminares utilizando PCR y métodos de secuenciación informaron que *S. boulardii* era indistinta de otras cepas de *S. cerevisiae* (Mitterdorfer *et al.*, 2002). Sin embargo, los avances en las nuevas herramientas metabolómicas permitieron observar que *S. boulardii* tiene una agrupación única que difiere de otras cepas de *S. cerevisiae*, que incluyen factores y características metabólicas y genéticas (MacKenzie *et al.*, 2008; Malgoire *et al.*, 2005; Posteraro *et al.*, 2005). *S. boulardii* puede ser diferenciado de otras cepas de *S. cerevisiae* por métodos avanzados de tipado, por diferencias en el metabolismo y la fisiología y por la capacidad de tener efectos anti-patógenos (McFarland, 2010).

El rendimiento de crecimiento y resistencia a la temperatura y pH ácido constituyen las principales diferencias entre *S. boulardii* y *S. cerevisiae*. Ya que la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* por ejemplo, crecen y metabolizan a 30°C, *S. boulardii* es termo tolerante creciendo a una temperatura de 37°C (Fietto *et al.*, 2004).

Por otro lado, ha sido observado que la pared celular de *S. boulardii* es más gruesa comparada con la de *S. cerevisiae*. Esto se dio a luz gracias a la secuenciación genómica de *S. boulardii*, que comparada con *S. cerevisiae* revela diferencias en los genes que codifican las proteínas que están involucradas en la formación de la pared celular (Hudson *et al.*, 2016).

Las capas de la pared celular de la levadura que se han identificado están compuestas de distintos componentes: una capa interna delgada de quitina y de β glucanos y una externa de mananoproteína (fosfopeptidomanano o PPM) o bien de lípido (fosfolipomanano PLM) (Lesage y Bussey, 2006).

Diversos estudios mencionan que componentes particulares de la pared celular, como los β glucanos, proporcionan una mejor resistencia de las bacterias probióticas a retos como el pH o condiciones gastrointestinales simuladas (Stack *et al.*, 2010), lo que refleja la importancia de este componente en la levadura.

Letscher-Bru y Herbrecht (2003) examinaron el papel de la resistencia de la pared celular de *S. boulardii* ante tensiones externas, tratándola con caspofungina (agente antifungico que inhibe el crecimiento de la levadura al unirse a la β -(1,3)-D- glucano sintetasa) y exponiéndola a niveles de pH similares a los del tracto digestivo; pudieron concluir que la integridad de la pared celular de la levadura es importante para la resistencia de *S. boulardii* a las distintas variaciones en el pH que se encuentran en el tracto gastrointestinal.

Observaciones sobre las afecciones inflamatorias gastrointestinales apoyan la idea de que los efectos benéficos que aporta *S. boulardii* están modulados principalmente por respuestas proinflamatorias del huésped, además de factores que pueden tener un rol de interferencia con moléculas de señalización como son las vías NF-kB o la MAP quinasa las cuales dirigen la inflamación en distintos niveles (Pothoulakis, 2009).

Múltiples estudios con *S. boulardii* mencionan efectos favorecedores en contra de patógenos entéricos, implicando diferentes mecanismos (Moslehi-Jenabian *et al.*, 2010).

Czerucka y Rampal (2002) comentan dos mecanismos principales de *S. boulardii*: la producción de factores que neutralizan las toxinas bacterianas y la modulación de la vía de señalización de la célula huésped implicada en la respuesta proinflamatoria durante la infección bacteriana.

Entre estos mecanismos se puede mencionar primeramente la prevención de la adherencia bacteriana y translocación en las células epiteliales intestinales, otorgando esta ventaja a su pared celular, que ha demostrado tener una elevada capacidad de unión a *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* (Gedek, 1999). Por otro lado, *S. boulardii* inhibe la adherencia de *Clostridium difficile* a células vero (derivadas de células epiteliales de riñón), aparentemente las células de la levadura o partículas de su pared celular permiten la modificación de receptores que están implicados en la

adhesión de *C. difficile* a través de una actividad proteolítica (Tasteyre *et al.*, 2002). Este efecto protector contra *C. difficile* ha sido encontrado en varios modelos animales (Czeruka *et al.*, 1991). Las cepas patógenas de esta bacteria, producen dos toxinas (A y B) caracterizadas por causar daño en la mucosa e inflamación del colon (Pothoulakis y Lamont, 2001). Se ha demostrado que *S. boulardii* sintetiza una proteasa de 54 kDa que degrada las toxinas A y B y sus respectivos receptores en mucosa colonica (Castagliuolo *et al.*, 1999; Castagliuolo *et al.*, 1996).

En el caso específico de *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *S. boulardii* tiene un efecto de inhibición inducida por estas bacterias en la actividad de unión al ADN de NF- κ B y la activación de las MAP quinasas, los cuales controlan la síntesis de TNF- α (Dahan *et al.*, 2003; Czerucka *et al.*, 2000). Además, Dalmasso *et al.* (2006) observaron que *S. boulardii* retrasa la apoptosis provocada por EHEC, lo que provoca una reducción de la síntesis de TNF- α ; además de que modificó *in vitro* las vías de señalización implicadas en la síntesis de citocinas proinflamatorias.

Pothoulakis (2009), menciona que existe una inhibición de citocinas pro inflamatorias gracias a la secreción de proteínas secretadas por *S. boulardii* que pueden interferir con el mediador global del factor nuclear de inflamación κ B (NF- κ B). El NF- κ B regula la expresión de muchos genes proinflamatorios en varios tipos de células, incluidas las células epiteliales intestinales, además de respuestas inmunes innatas a bacterias patógenas (Naumann, 2000).

Para que *S. boulardii* pueda hacer entrega de sus proteínas terapéuticas al sistema inmunitario de la mucosa en el intestino debe de superar todas las barreras del mismo y poder llegar a las células presentadoras de antígeno en la capa epitelial. Otra reducida proporción de pequeñas partículas es absorbida por células caliciformes y dendríticas en la luz intestinal; aunque las células M en las placas de Peyer tienen una proporción aún más importante de captación de

moléculas grandes, como lo es la levadura intacta. De esta manera las células M transportaran de manera transcelular el antígeno desde la luz intestinal hasta las placas de Peyer, donde se producirá una inmunidad local gracias a numerosas células presentadoras de antígeno (Hudson *et al.*, 2016).

Bléhaut *et al.* (1989) mencionan que después de una administración oral repetida, las concentraciones de *S. boulardii* se vuelven estables en colon en 3 días, y son eliminadas en heces 2 a 5 días después de la interrupción.

2.10 Sistema inmunológico

El sistema inmunológico funge como el protector del hospedero contra microorganismos patógenos (Hernández y Alvarado, 2001), constituye un complejo de elementos que participan en cuantiosas funciones que interactúan de forma integrada con otros sistemas del organismo. En principio está constituido por una primera línea de defensa formada por barreras físicas y químicas que se refieren a piel y mucosas (intestinal, nasal, etc.), sus secreciones (pH ácido del estómago, lisozima y otras secreciones) y la flora autóctona protectora. Cuando los patógenos pasan esta primera línea de defensa, entran en juego dos subsistemas (Nova *et al.*, 2004), uno conocido como sistema inmunitario innato y otro como adaptativo; o también conocidos como inmunidad humoral comparada con la mediada por células (Polo *et al.*, 2014), las diferencias que destacan entre estas respuestas son los mecanismos y tipos de receptores que utilizan para reconocer al antígeno. Dentro del sistema inmunitario innato participan barreras físicas y químicas, dentro las que podemos mencionar el epitelio y sustancias antimicrobianas que son obtenidas en las superficies epiteliales como las criptidinas en el intestino delgado (Hernández y Alvarado, 2001).

El epitelio intestinal, se expone a diario a antígenos bacterianos y alimentos (Ghadimi *et al.*, 2010). Por lo que el intestino y el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) fungen como un componente de suma importancia para la defensa inmune, desarrollando una función protectora contra antígenos extraños

y patógenos al mismo tiempo que pueden tolerar bacterias comensales y antígenos de la dieta (Artis, 2008). La tolerancia por parte del GALT en el intestino es dada debido a mecanismos complejos y bien regulados que previenen una respuesta inflamatoria en el tracto intestinal (Plaza-Diaz *et al.*, 2014).

El epitelio de la mucosa está constituido por barreras que tratan de evitar que algún microorganismo patógeno cause infección. Por lo que diversos mecanismos de protección son empleados como barreras para poder así conservar la integridad de la monocapa de células epiteliales e impedir el daño que puede ocasionar la inflamación (Patel y McCormick, 2014). Una de las principales líneas de defensa para el tracto gastrointestinal es el moco que actúa contra patógenos, toxinas y partículas extrañas, además de lubricar y reducir la fricción (Georgiades *et al.*, 2014); este moco rige sus características en gran parte gracias a las mucinas siendo la principal secreción de las células caliciformes (Corfield y Warren, 1996).

La inmunidad innata no distingue entre un patógeno y otro, además su capacidad de respuesta no mejora tras un primer encuentro por lo que no guarda memoria inmunitaria. Tras la activación de los macrófagos por una exposición o activación del sistema inmunitario, son secretadas (principalmente por fagocitos) las citocinas proinflamatorias dentro de las que podemos mencionar a la IL-6, TNF- α , IL-1, etc.; que serán quienes atraerán a neutrófilos y monocitos con capacidad fagocítica, lo que provocará la inflamación en el lugar de la infección. Adicionalmente las células infectadas por un virus producirán otro tipo de citocinas como el interferón gamma quienes serán las encargadas de atraer células T citotóxicas y linfocitos natural killer (NK) quienes reconocerán y matarán a las células que puedan estar infectadas. El inicio de la respuesta adaptativa comenzará cuando la infección persista, para así extenderse al sistema linfático donde células dendríticas y macrófagos actuarán como presentadores de antígenos a los linfocitos. Este tipo de respuesta inmunitaria se diferencia de la

innata al crear memoria inmunológica que permitirá una mejor y más rápida respuesta en encuentros posteriores con el mismo patógeno (Polo *et al.*, 2014).

Es bastante complicado mencionar una delimitación entre la inmunidad innata y la adquirida, ya que posterior a la identificación de un microorganismo, la inmunidad innata manda señales que controlan aspectos de la específica. Así, la inmunidad adaptativa también interviene en la inmunidad innata, por ejemplo, en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, dirigiéndola en contra de microorganismos patógenos (Hernández y Alvarado, 2001).

Para que el sistema inmunológico funcione, se necesita de un adecuado nivel y disponibilidad de nutrientes en el organismo, que garantizarán que todo se lleve a cabo con normalidad. Esto se podría resumir en dos importantes mecanismos que requieren de estos nutrientes para llevar a cabo sus funciones: primeramente la síntesis de moléculas a lo largo del desarrollo de las respuestas inmunes, especialmente aminoácidos que se necesitan para la síntesis de las proteínas de fase aguda; y por otro lado su utilización en los fenómenos de división y diferenciación celular que permite la creación de nuevas células durante la expansión clonal que atacan y eliminan al patógeno invasor. Aunado a todo esto, es importante recordar que no solo estos dos mecanismos se ven afectados, sino que otras funciones en las que está involucrado el sistema inmunitario se ven alteradas por una inadecuada nutrición (Nova *et al.*, 2004).

2.11 Citocinas

Se definen como proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de varias actividades como el crecimiento celular, inflamación, diferenciación y reparación, entre muchas otras. Pueden ser producidas por distintos tipos celulares no pertenecientes al sistema inmune durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Constituyen el principal medio para la comunicación entre células durante una infección microbiana. Además, que inician la respuesta

inflamatoria y definen la naturaleza y magnitud de la respuesta inmune específica (Oberholzer *et al.*, 2000).

La interacción entre las citocinas y las células en la respuesta inmune comienzan en la comprensión de que para que los microorganismos patógenos puedan ocasionar enfermedad necesitan atravesar la barrera epitelial y así multiplicarse en los tejidos. Las primeras líneas de defensa consisten en defensinas y otros péptidos que evitan esto mediante su mecanismo de toxicidad, que permite una rápida permeabilización de la membrana celular del invasor (Risso, 2000). Otro mecanismo importante es el de los factores del complemento, que es activado por su vía alterna por las bacterias gram negativas con peptidoglicanos en su pared celular. Mientras la activación del complemento está en marcha, se generan también ciertos mediadores de la inflamación como el C5a y C3a, que a su vez se encargan de reclutar diversas células inmunitarias que ocasionaran en el lugar de la infección una respuesta inflamatoria local (Zhang *et al.*, 1999; Nonaka, 2001).

La secreción de citocinas se da después de la interacción con un patógeno. Esto estimula a los macrófagos los cuales funcionan como una célula profesional presentadora de antígenos para que sinteticen dichas citocinas, gracias a la unión con los receptores presentes en ellos. De esta manera los receptores de macrófagos desempeñan un papel importante en la transmisión de señales que inducen que se expresen moléculas estimuladoras, como las citocinas que determinarán la forma de la respuesta inmune. Las vías de transducción de señales que inducen la expresión de una amplia variedad de genes de la respuesta inmune, hablando también de los genes para citocinas inflamatorias, son activadas por ciertos receptores para reconocimiento de patrón. Entre estos receptores podemos mencionar a los de la familia toll (TLR), los cuales incluyen la transducción de señales que llevan a la activación de factores de transcripción de la familia del factor nuclear kappa B (NF- κ B). También la secreción de citocinas puede estar inducida por pequeños péptidos que se liberan en la cascada del

complemento (Ulevitch y Tobias, 1995; Kopp y Medzhitov, 1999; Linehan *et al.*, 2000; Stein- Streilein *et al.*, 2000).

El NF- κ B es una proteína dimérica, constituida por miembros de la familia de proteínas Rel (p65, C-rel, p50, p52, etc.) (Baeuerle y Baltimore, 1996), generalmente reside en el citoplasma unido a su inhibidor κ B (I κ B) (Baldwin, 1996); al ser estimulado por células con citocinas proinflamatorias, bacterias o productos de las mismas, el inhibidor es fosforilado en dos serinas, para su posterior degradación por el proteosoma cuando aún permanece unido a NF- κ B, que al perder esta unión podrá translocarse al núcleo y activar la transcripción de genes (Bonizzi y Karin, 2004) como la IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (Jobin y Sartor, 2000).

Los fagocitos mononucleares y plaquetas son los responsables de liberar citocinas como la IL-1 y TNF α durante la etapa temprana de la infección, en los sitios de reconocimiento antigénico. A su vez estas citocinas producen la secreción de otras citocinas por las células estromales (IL-8 y MCP), además de moléculas de adhesión en células endoteliales. Esta señalización inicia la acumulación de células natural killer (NK), neutrófilos y macrófagos, que inducirán la producción de citocinas IFN- α , IL-12, IL-10, IL-15 e IL18, que movilizarán linfocitos T y B (respuesta inmune específica) y finalmente eliminar el antígeno del tejido atacado. Por otra parte, está la respuesta hepática que será activada por IL-1, IL-6 y TNF α que inicia un incremento sérico de proteínas de fase aguda. El cortisol producido por el sistema nervioso central por el estímulo de estas interleucinas, desempeña un papel importante al modular la respuesta de los hepatocitos, lo que a su vez regulara la reacción febril (Hernández y Alvarado, 2001).

La interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) favorecen la expresión de ciertas moléculas de superficie como las ICAM y selectinas sobre células endoteliales, ocasionando la acumulación de leucocitos

en sitios locales de inflamación. El TNF- α incrementa la permeabilidad del endotelio vascular, aumentando la entrada de IgG, complemento y células a los tejidos, además del flujo de drenaje hacia nódulos linfoides (Beutler, 1999; Murphy *et al.*, 2000).

En la respuesta de fase aguda la IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α y el IFN- γ son importantes activadores. Por ejemplo, el TNF- α aumenta la producción de proteína amiloide A en los hepatocitos, mientras que la IL-6 ante estímulos inflamatorios promueve la síntesis de fibrinógeno. No obstante, cuando hay una alta producción de estas citocinas en la sangre, tienen un efecto pirógeno, provocando así fiebre. El TNF- α tiene un importante rol ya que es quien inicia el debilitamiento metabólico o caquexia. De igual manera, mientras la enfermedad está activa, mastocitos y basófilos empiezan sus actividades secretando varios mediadores inflamatorios entre los que se encuentran histamina, proteasas neurales, prostaglandinas y leucotrienos, además de citocinas y quimiocinas implicadas en la movilización de leucocitos (DiPiro, 1997; Gadiant y Otten, 1997).

Por lo que las citocinas pueden alterar el sistema inmune de los lechones y así mermar la eficiencia del alimento, y por lo tanto, su tasa de crecimiento. Lo que se ve reflejado en el desvío de los nutrientes, ya que en lugar de utilizarse para el crecimiento somático como debe ser normalmente, se utilizan para ayudar al sistema inmunológico. Lo que quiere decir que las citocinas proinflamatorias como la IL-6 o TNF- α provocan cambios de los requerimientos de nutrientes del animal, decrementando el crecimiento de músculo esquelético debido a la movilización de nutrientes hacia las respuestas metabólicas que necesitan apoyo en el sistema inmune (Pie *et al.*, 2004). Aunado a esto estas citocinas provocan una estimulación en la secreción de hormonas del estrés, como el cortisol, que provocará una disminución en la secreción de otras hormonas, como la del crecimiento. Adicionalmente, un animal enfermo tendrá necesidades de nutrientes para mantenimiento por encima de lo normal, sin embargo, en esta condición se producirá una reducción en la ingesta de los mismos; lo que provocará que los

animales enfermos, en especial durante la activación inmune aguda, utilicen nutrientes propios (Polo *et al.*, 2014). Los mediadores proinflamatorios como la IL-6 y TNF- α juegan un papel esencial para una eficiente respuesta inmunitaria durante infecciones virales y bacterianas y su producción en cantidades mayores podrían concluir en efectos perjudiciales para la salud y crecimiento de los animales (Spurlock, 1997).

2.12 Mucinas y gen MUC2

Las mucinas son glicoproteínas que defienden las mucosas y participan en mecanismos de señalización celular y en interacciones célula- célula. Cada mucina presenta una estructura específica de su sitio de acción y se diferencian en base a su composición química. Su secreción forma parte normal de la mucosa o del moco actuando como un mecanismo de defensa de la superficie mucosa (Corfield y Warren, 1996). Junto con otros mecanismos el moco regula la homeostasis intestinal. Este está constituido por la unión de mucinas, agua, electrolitos, inmunoglobulinas, células epiteliales desprendidas, entre otros compuestos (Shan *et al.*, 2014). El moco funciona como una barrera para microorganismos y compuestos tóxicos, permitiendo la difusión de nutrientes al epitelio, además de proteger a la mucosa de enzimas digestivas como proteasas, glucosidasas y lipasas, y de permitir una mejor lubricación para el paso del alimento a través del intestino. La capa de moco en el intestino está compuesta por dos tipos de mucina, la unida a la membrana o la que existe de base y la secretada. La primera forma el glicocálix, mientras que las segundas generan un gel viscoelástico que divide el glicocálix del contenido luminal (Bajka *et al.*, 2015), este tipo de mucina se produce ante la presencia de algún estimulante como hormonas y mediadores inflamatorios tales como las citocinas, lípidos, cáncer o la composición de algún alimento (Deplancke y Gaskins, 2001).

Las mucinas son hidrófilas y están constituidas por monómeros con hasta 20% de proteína y 80% de carbohidratos en peso seco. Sus polipéptidos son generalmente serina, treonina y prolina (Corfield y Warren, 1996; Bertolo *et al.*,

1998), además de regiones ricas en cisteína. A lo largo de los años se han identificado diversos genes de mucina (MUC) que codifican para la síntesis de las mismas (Corfield y Warren, 1996), sin embargo, la principal mucina en el intestino es la MUC2, caracterizada por tener un alto peso molecular y proporción de carbohidratos (Bajka *et al.*, 2015). MUC2 forma trímeros resistentes a enzimas proteasas en sus regiones N-terminales y dímeros en regiones C-terminales, provocando así la formación de láminas hexagonales, que seguida por la secreción de células caliciformes conduce a la formación de estructuras laminares.

Existe una variación del grosor y composición del moco de acuerdo a la ubicación en el tracto gastrointestinal (Atuma *et al.*, 2001). Por ejemplo, en el estómago e intestino grueso encontramos un grosor mayor, en el primero debido a la necesidad de protección por el ácido clorhídrico y en el segundo como un limitante entre la interacción de flora comensal con microorganismos patógenos; por otro lado, hay un menor grosor de moco en el intestino delgado para que exista un correcto transporte de nutrientes. En el colon ha sido observada una capa de moco estriada fuertemente adherida adyacente al epitelio, con otra capa menos estructurada y poco adherida en la luz del mismo (Matsuo *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 2011).

2.13 Sustentabilidad y producción

Gerber *et al* (2013), menciona que el total de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) provenientes de las cadenas de suministro ganadero se estima en 7,1 gigatoneladas de CO₂ – equivalente por año (eq/año). Este total representa el 14,5% de todas las emisiones inducidas por el ser humano, según las estimaciones más recientes del IPCC relativas al total de las emisiones antropogénicas. A nivel mundial, se estima que la producción de cerdos produce alrededor de 668 millones de toneladas de CO₂ -eq, que representan el 9% de las emisiones del sector pecuario, esta cantidad de CO₂ es distribuida entre la producción de alimentos, el uso de tierra, la fabricación de fertilizantes, entre otros.

Diversas publicaciones mencionan que las posibles intervenciones para reducir las emisiones se basan, en gran medida, en tecnologías y prácticas que mejoren la eficacia de producción a nivel de los animales. Como son las prácticas de alimentación mejorada para reducir las emisiones entéricas y de estiércol, manejo mejorado de la producción y sanidad animal para reducir la parte improductiva de la producción (Gerber *et al.*, 2013).

La administración de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* en dietas de lechones recién destetados podría crear una alternativa viable al uso de antibióticos, por ser un producto natural y sin riesgo para la salud del consumidor. Su uso contribuye con un menor uso de los antibióticos y por ende una reducción de residuos farmacológicos, lo que genera un menor impacto ambiental.

Otro efecto sería la mejora de la salud intestinal que contribuirá con los otros dos pilares de la sustentabilidad: social y económicamente rentable al reducir los costes del uso de antibiótico y al mejorar el bienestar animal en las producciones, ya que es de vital importancia una reducción del estrés y enfermedades en los cerdos, lo que mejorará las condiciones de la producción. Por otro lado, al contar con un mayor aprovechamiento del alimento suministrado gracias a los efectos de las levaduras se mejorará la digestión del mismo, además de contribuir a la seguridad alimentaria, gracias a la sustitución del antibiótico en la alimentación animal para evitar la resistencia a los antibióticos en los humanos (Molina, 2019), generando una mejor calidad de vida en la población.

Las tendencias actuales en los sistemas productivos de animales postula los probióticos como una buena alternativa de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento. El uso de los mismos en la alimentación animal es una de las formas de generar producción limpia y desarrollo competitivo a gran escala, sin efectos colaterales en el animal ni en sus productos, y con la ventaja de ser absolutamente naturales.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

III. HIPÓTESIS

La inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* o de *Saccharomyces boulardii* en dietas libres de antibióticos tiene un efecto benéfico sobre las características morfofisiológicas e inmunológicas del aparato digestivo de lechones recién destetados.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el efecto de la inclusión de los probióticos *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* en dietas libres de antibióticos sobre algunas características morfofisiológicas del aparato digestivo y algunos indicadores de la actividad inmunológica de la mucosa intestinal de lechones recién destetados.

4.2 Específicos

Observar el efecto de la adición de los probióticos *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* en dietas libres de antibióticos para lechones recién destetados, sobre:

- ☞ El pH del contenido de estómago, yeyuno, íleon y colon.
- ☞ El peso de estómago, duodeno, yeyuno, íleon, páncreas, hígado, ciego y colon.
- ☞ La expresión de gen MUC2 responsable de la síntesis de mucinas en el íleon y colon.
- ☞ La expresión de genes responsables de la síntesis de TNF α e IL6, que participan en el proceso inflamatorio en el íleon y colon.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Lugar de Estudio

La investigación se realizó 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. Los análisis de las muestras se realizaron en el laboratorio de Nutrición Animal, el laboratorio de Biología Molecular y el laboratorio de Genética, Sistemática y Ecología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro: oficio 78FCN2017. El experimento se desarrolló respetando 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 y dietas

Se utilizaron 40 lechones Fertilis 20 × G Performance (Genetiporc®) recién destetados de 20 ± 1.6 días de edad, con 6.2 ± 1.79 kg de peso.

Se formuló una dieta basal (Cuadro 1) para cubrir los requerimientos nutricionales de los lechones para la etapa de destete (NRC, 2012) a la cual se le incluyó *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* o un antibiótico promotor de crecimiento a expensas del maíz, constituyendo las cuatro dietas experimentales, las cuales fueron isoproteicas e isoenergéticas:

- 1) Dieta basal (DB) sin antibiótico ni probiótico (control negativo, C-) (Cuadro 1).

- 2) Dieta basal + 0.05 % de un antibiótico (LincoSpectin: 2.2 g lincomicina, 2.2 g espectinomicina, Zoetis, EUA) (control positivo, C+).
- 3) Dieta basal + 0.8 % de *Saccharomyces cerevisiae* (Yea-Sacc strain 1026, Alltech, EUA) (Sc).
- 4) Dieta basal + 0.1 % de *Saccharomyces boulardii* (Levucell SB, CNCM I-1079, Lallemand Animal Nutrition, Canadá) (Sb).

Después del destete los animales se transfirieron a la sala de destete y se distribuyeron entre los cuatro tratamientos en base a su peso y camada de origen, siendo 10 animales alojados en dos corrales por tratamiento (5 lechones/tratamiento/corral). La sala de destete contó con las siguientes características:

- Ambiente controlado (30, 28, 26 \pm 2°C durante la primera, segunda y tercera semana postdestete respectivamente).
- Corrales de destete elevados a 38 cm de altura, 115 cm de ancho, 150 cm de largo, con piso de rejilla y para una superficie efectiva de 1.7 m².
- Bebederos de chupón y comederos tipo tolva con 6 bocas.

Los lechones tuvieron libre acceso al agua durante todo el periodo experimental.

El alimento se ofreció en tres horarios: 8:00 hrs., 12:00 hrs. y 16:00 hrs.

Cuadro 1. Ingredientes y composición química de la dieta basal, porcentaje en base al alimento ofrecido.

Ingredientes	%
Maíz	47.1
Pasta de soya	15
Harina de Pescado Menhaden	9.2
Suero de leche	24.7
Aceite de maíz	1.5
Lisina	0.2
Aminogut*	0.8
Treonina	0.1
Triptófano	0.05
Fosfato Dicálcico	0.9
Vitaminas †	0.08
Minerales †	0.12
Biocolina	0.04
Gustor §	0.21
Composición química	
Materia seca (%)	89.5
Proteína cruda (%)	21.8
FDN (%)	12.3
EM (kcal·kg ⁻¹)	3,300

* Aminogut: L-glutamina y ácido L-glutámico (1:1), (Ajinomoto, Japón). † Vitaminas por kilogramo 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. † Minerales por kilogramo 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)

5.3 Toma de muestras

En los 7 y 14 días de experimentación se sacrificaron cinco cerdos por tratamiento siguiendo los lineamientos de la NOM-033-SAG/ZOO-2014.

Los lechones fueron tranquilizados con azaperona (Sural®) a una dosis de 20 mg/kg de peso vivo y se anestesiaron con isoflurano, una vez alcanzado el plano anestésico se procedió a la apertura de la cavidad abdominal e inmediatamente se tomaron muestras de íleon y colon de aproximadamente 2 mm para evaluar la expresión del gen de MUC2 que expresa la síntesis de mucina y la expresión de los genes de TNF α e IL6 que participan en el proceso inflamatorio. Las muestras de íleon y colon se conservaron en Trizol a -80°C hasta el momento de la extracción del RNA. Para determinar la abundancia relativa de la transcripción, se utilizó el valor de Δ Ct siguiendo la metodología propuesta por (Duran-Montgé *et al.*, 2009).

Posteriormente, se procedió a extraer de la cavidad abdominal, separar y pesar los siguientes órganos: estómago, yeyuno, íleon, páncreas, hígado, ciego y colon. El peso de los órganos se reportó en relación al peso vivo (g/kg de PV).

Por último, se colectó la digesta de cada compartimento gastrointestinal (estómago, yeyuno, íleon, ciego y colon) para medir el pH por potenciometría.

5.4 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La extracción del RNA de las muestras conservadas en Trizol se realizó en cuatro pasos (Sambrook y Russell, 2001)

1. Homogeneización: Se colocó la muestra de tejido con Trizol en un vial con perlas de cerámica de 2.8 mm y se añadió 1 ml de Trizol. Se homogeneizó en el equipo PowerLyzer a 3'500 rpm por 45 segundos (s), con un descanso de 30 s y nuevamente durante 45 s a 3500 rpm. Luego se centrifugó en refrigeración la muestra a 11300 rpm. Dentro del tubo se obtuvieron 3 capas, de arriba hacia abajo: una capa grasa, una capa de sobrenadante con RNA y una última que

contenía el pellet, polisacáridos y DNA de alto peso molecular (PM); se removió, desechó la capa de grasa y se transfirió el sobrenadante con RNA a un nuevo vial.

2. Separación: Se incubó la muestra 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 0.2 ml de cloroformo y se incubó 2-3 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 13000 rpm por 15 min. Se obtuvieron 3 fases (la primera una fase acuosa incolora, una interfase y una fase cloroformo-fenol roja). Se removió la fase acuosa y se colocó en un nuevo vial.

3. Aislamiento del RNA: Primero se precipitó el RNA añadiendo 0.5 ml de isopropanol (2-propanol) 100% a la fase acuosa. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. Se hizo un lavado donde se removió el sobrenadante del vial y se dejó solo el pellet de RNA añadiendo 1 ml de etanol al 75%. Se homogeneizó la muestra brevemente y se centrifugó a 8900 rpm durante 5 min a 4°C. Se tiró el sobrenadante y se colocó el vial boca abajo sobre una sanita estéril.

4. Resuspensión del RNA en vial: Se añadieron de 20 a 50 µL de agua libre de RNAsas y se resuspendió con la pipeta varias veces. Se incubó en baño de agua o termoblock a 55-60°C por 10 a 15 min. Finalmente se almacenó la muestra a -70°C (Sambrook y Russell, 2001).

Después de la extracción del RNA se preparó un gel de agarosa al 1.5% para evaluar la integridad del RNA extraído y se corrió en una cámara de electroforesis a 75 volts por 1 hora para después observar el mismo mediante el fotodocumentador (ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad) con luz UV.

Posteriormente, se sintetizó el cDNA con la ayuda de una transcriptasa reversa y oligo-dT (Invitrogen, Cat. No. 18418012) tratando 1 µg del RNA total de cada muestra con 1 U de desoxirribonucleasa I grado amplificación. La transcripción reversa se inició con 1 µg de RNA tratado con DNasa, el cual estaba contenido en 10 µl de agua destilada libre de RNAsas, se añadió 1 µl de oligo (dT)

primer y 1 μ l de solución de dNTPs (10 μ M cada uno). La solución se calentó a 65°C durante 5 min, y se enfrió rápidamente sobre hielo. Posteriormente se agregaron a la mezcla 4 μ l de amortiguador 5X first strand, 2 μ l de 0.1 M dithiothreitol (DTT) (Cat. No. 18064-022) y 1 μ l de inhibidor de ribonucleasa recombinante (Cat. no. 10777-019), y esta solución se incubó a 42°C durante 2 min. Se añadieron inmediatamente 200 U de transcriptasa reversa. La reacción de transcripción reversa se incubó a 42°C durante 50 min, seguido de 15 min a 70°C, y finalmente se enfrió en hielo para detener la reacción. Los viales se conservaron a -20° C.

Con el cDNA resultante se hicieron 4 diluciones seriadas que se conservaron a -20C hasta su utilización.

5.5 PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador CFX 96 de BIO-RAD con capacidad para placas de 96 pozos. En cada uno de ellos se cargaron 10 μ l de la siguiente mezcla de reacción: 0.5 μ l de cDNA (40 ng/ μ l), 5 μ l de iQ SYBR Green Supermix (mezcla optimizada de iTaq™ DNA polimerasa, SYBR Green, dNTPs, buffer y estabilizadores) 100nmol de cebador específico directo, 100nmol de cebador específico reverso y agua libre de nucleasas. El programa de PCR utilizado, consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 95°, seguida de 45 ciclos 30 seg a 95°C, 30 seg a 56.9°C y finalmente una desnaturalización de 30 seg a 95°C. Se incluyó un control negativo (NTC) por cada mezcla de reacción para descartar posibles contaminaciones cruzadas entre muestras.

En el Cuadro 2 se muestran todos los cebadores (PRIMERS) utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real y el tamaño del producto que amplifican.

Después de cada qPCR se analizaron las curvas de fusión con el software BioRad CFX Manager para identificar los productos específicos de la PCR, teniendo en cuenta que estos se disocian a una temperatura más alta que los

artefactos como dímeros de primer (Ririe *et al.*, 1997). La eficiencia de las reacciones se calculó a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real.

Cuadro 2. Secuencias nucleotídicas de los cebadores (PRIMERS) utilizados en la qPCR a tiempo real y fuente de los mismos.

Gen	PRIMERS	Secuencia (5' – 3')	Fuente
MUC2	Forward	GGCTGCTCATTGAGAGGAGT	Saqui-Salces <i>et al.</i> (2017)
	Reverse	ATGTTCCCGAACTCCAAGG	
IL-6	Forward	CCTGTCCACTGGGCACATAAC	Hu <i>et al.</i> (2013)
	Reverse	CAAGAAACACCTGGCTCTGAAAC	
TNF-α	Forward	CATCGCCGTCTCCTACCA	Hu <i>et al.</i> (2013)
	Reverse	CCCAGATTCAGCAAAGTCCA	
HMBS	Forward	AGGATGGGCAACTCTACCTG	Wang <i>et al.</i> (2018)
	Reverse	GATGGTGGCCTGCATAGTCT	
B2M	Forward	CGGAAAGCCAAATTACCTGAAC	Vigors <i>et al.</i> (2016)
	Reverse	TCTCCCCTTTTTTCAGCAAAT	

IL6: Interleucina 6; TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa; MUC2: Mucina 2; HMBS: hidroximetilbilano sintasa; B2M: microglobulina β 2.

5.6 Cuantificación de la expresión génica

Las cuantificaciones se llevaron a cabo en base al valor del ciclo umbral (Ct) registrado en el software CFX de BIO-RAD en base al siguiente modelo:

Cuantificación 2- Δ Ct: Es una derivación de la Cuantificación relativa normalizada que se basa en el modelo Delta Delta Ct desarrollado por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forster City, CA), mediante la cual eliminamos de la ecuación la expresión de los genes calibradores, teniendo solo a los genes blanco y los endógenos, así podemos ver su expresión en verdadera magnitud en lugar de normalizada a un valor constante de 1. Además, aplicando este modelo

obtenemos valores de expresión directamente proporcionales a la cantidad absoluta transcrita, por lo que se puede conocer si un gen diana A se expresa más o menos que otro gen diana B.

5.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico para el peso de órganos, pH intestinal y la expresión génica en colón se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple para un diseño totalmente aleatorizado, con un arreglo factorial (4 x 2), donde la dieta (4) y la edad posdestete (2) fueron los principales factores.

Para la expresión génica del íleon al día 7 los resultados también se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple para un diseño totalmente aleatorizado, evaluando los efectos de las dietas de forma individualizada.

Para todos los casos se compararon las medias empleando la prueba de SNK ($P < 0.05$) mediante el paquete estadístico SAS (2008).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Peso relativo de órganos

El consumo de las diferentes dietas experimentales no tuvo un efecto ($P>0.05$) sobre el peso relativo de los órganos digestivos; sin embargo, la edad posdestete afectó el peso de la mayoría de los órganos estudiados (Cuadro 3). Los resultados referentes al efecto de la dieta y a la edad posdestete sobre el peso de los órganos digestivos se presentan y se discuten de forma independiente, debido a que no se observó ($P>0.05$) una interacción entre estos factores (Cuadro 3).

Cuadro 3. Peso relativo de los órganos digestivos de lechones alimentados con las dietas experimentales.

Órganos	Dietas				P			EEM
	C-	C+	Sc	Sb	D	E	DxE	
Estómago	8.1	8.0	8.4	8.2	0.901	0.0012	0.442	0.18
I.D.	50	54	53	52	0.563	0.0001	0.301	1.04
I.G.	19	19	19	18	0.326	0.933	0.109	0.38
Páncreas	1.9	1.8	1.8	1.6	0.280	0.0380	0.857	0.05
Hígado	25	26	27	28	0.325	0.0001	0.369	0.45

C-: dieta sin antibiótico ni probiótico. C+: dieta con antibiótico. Sc: dieta con *Saccharomyces cerevisiae*. Sb: dieta con *Saccharomyces boulardii*. I.D.: Intestino delgado. I.G.: Intestino grueso. P: probabilidad estadística. D: dieta. E: edad posdestete. Dx E: interacción edad y dieta. EEM: error estándar de la media.

La ausencia de un efecto de la dieta sobre el peso de los órganos digestivos fue un resultado relativamente esperado, una vez que los componentes mayores de las dietas experimentales fueron los mismos. Otros autores tampoco observaron un efecto de las dietas experimentales, en las cuales cambiaron la fuente de proteína dietética de pasta de ajonjolí a pasta de soya (Aguilera *et al.*, 2014), o la variedad de sorgo incluido en la dieta (Gómez *et al.*, 2018), o incluyeron probióticos a la dieta (Morales *et al.*, 2015), todos con edades similares a las de este experimento. Esto sugiere que el peso de los órganos digestivos, no sea solamente una consecuencia del tipo de dieta ingerida, pero un reflejo del aumento

del sustrato disponible para el crecimiento celular a la medida que la ingesta de alimento incrementa después del destete, haciendo que se desarrollen los órganos necesarios para procesar este alimento (Pluske *et al.*, 2003b).

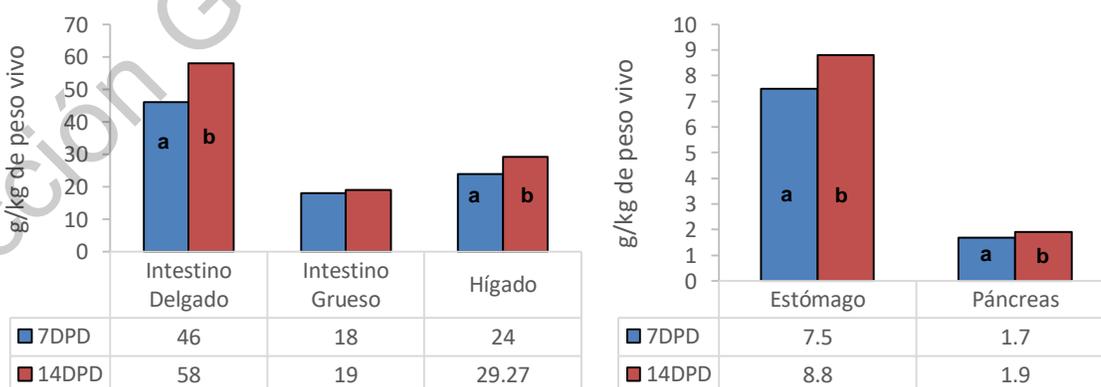
Los resultados del presente trabajo indican que el uso de estas levaduras (*S. cerevisiae* y *S. boulardii*) en dietas sin antibióticos no tuvo influencia positiva en el desarrollo de los órganos digestivos, pero su inclusión en el alimento tampoco afectó negativamente el peso de los mismos. Reis de Souza *et al.* (2012) mencionan que existe muy poca información sobre el efecto de la adición de alimentos funcionales, tales como son los probióticos a las dietas iniciadoras sobre el desarrollo del TGI. Como se mencionó anteriormente, Morales *et al.* (2015) tampoco observaron un efecto positivo del uso de probióticos sobre el peso relativo de los órganos. La mejoría observada en la salud intestinal de los lechones alimentados con probióticos parece estar relacionada con la modificación del ambiente gastrointestinal, a través de cambios en la microbiota. Incluso, Reis de Souza *et al.* (2012) reportan que diversos autores coinciden en que la utilización de aditivos probióticos o antimicrobianos no afecta la morfología intestinal. Esto podría explicar, desde cierto punto, porque en el presente trabajo la adición de las levaduras vivas y del antibiótico a la dieta no provocó un cambio en el peso de los órganos durante el periodo experimental.

Se puede considerar que el desarrollo de los órganos digestivos se comportó de una manera esperada para esta fase de crianza de los lechones, pues los pesos relativos observados en el presente estudio fueron comparables a los descritos por diferentes autores (Pluske *et al.*, 2003b; Reis de Souza *et al.*, 2007; Aguilera *et al.*, 2014, Morales *et al.*, 2015). Por otro lado, las dietas utilizadas en el presente trabajo fueron formuladas con un alto porcentaje de suero de leche, el cual es un ingrediente que, por ser fuente de lactosa y por sus componentes bioactivos, promueve el desarrollo de los órganos digestivos (Reis de Souza *et al.*, 2002 y Reis de Souza *et al.*, 2007); lo que también indica que los valores observados para el peso de órganos son adecuados y no hubo un efecto

detrimental de la no inclusión de antibiótico y de la adición de las levaduras vivas en la dieta basal.

La edad posdestete fue un factor que afectó positivamente el peso relativo del estómago ($P<0.001$), intestino delgado ($P<0.001$), páncreas ($P<0.05$) e hígado ($P<0.001$), pues estos órganos incrementaron su peso del día 7 al 14 posdestete (Figura 1). Sin embargo, en el caso del intestino grueso no se observó diferencia ($P>0.05$) en su peso relativo. Probablemente esto puede ser explicado por las observaciones de Widdowson (1985), quien menciona que, aunque todos los órganos y tejidos del cuerpo crecen y se desarrollan de manera ordenada en relación con el cuerpo en su conjunto, muchos de ellos son capaces de un crecimiento particularmente más rápido en respuesta a una demanda adicional. El incremento del consumo de alimento después de la primera semana posdestete (Pluske *et al.*, 2003a), probablemente fue el estímulo para el crecimiento del estómago, intestino delgado, páncreas e hígado, que son los órganos relacionados con la digestión enzimática necesaria para la absorción de los nutrimentos utilizados para el crecimiento adecuado del lechón (Cunningham y Klein, 2014).

Figura 1. Efecto de la edad posdestete sobre el peso relativo de los órganos digestivos.



^{ab}: barras con diferentes literales en el mismo órgano, indican diferencias estadísticas significativas. DPD: día posdestete.

Por otro lado, probablemente el desarrollo del ciego y del colon sea menos acelerado que los demás órganos digestivos, pues depende particularmente del desarrollo de una microbiota más diversa y numéricamente mayor, y al aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta. Williams *et al.* (2005), mencionan que los sustratos que llegan hasta la luz del intestino grueso influyen sobre su desarrollo. Uno de los nutrimentos que pueden llegar en exceso hasta el intestino grueso son las proteínas, debido a la limitada capacidad de los lechones para digerir a los componentes proteínicos, sobre todo los de origen vegetal en el intestino delgado (Guay *et al.*, 2006). Estas proteínas no digeridas sufren una fermentación por parte de bacterias oportunistas en el intestino grueso, generando metabolitos que podrían ser tóxicos para la mucosa intestinal (Christensen *et al.*, 1992; Bikker *et al.*, 2007), ocasionando así una pérdida de células, lo cual influirá en el peso de este compartimiento.

Otro nutrimento capaz de llegar hasta el intestino grueso es la fibra, donde la fibra detergente neutra (FDN) será susceptible a la fermentación bacteriana (Montagne *et al.*, 2003), formando ácidos grasos de cadena corta (láctico, acético, propiónico y butírico) deseables para un correcto funcionamiento del tracto gastrointestinal (Donohoe *et al.*, 2011) y crecimiento del tracto digestivo, debido al aumento de la proliferación celular del epitelio (Hermes *et al.*, 2009). Cabe destacar que las dietas para lechones recién destetados son relativamente pobres en FDN, Mateos *et al.* (2006) sugirieron que los cerdos jóvenes (6 a 12 kg) pueden tener un requerimiento mínimo de 6% de FDN; incrementando a 7 - 13%, para cerdos de 10 a 30 kg de peso corporal. Hermes *et al.* (2009) observaron que el peso relativo del intestino grueso de lechones a los 35 días posdestete aumentó con el consumo de una dieta con un mayor nivel de fibra de la dieta (5.3% vs 7.15% de FDN). Todo lo anterior sugiere que el peso relativo del intestino grueso incrementará en la etapa posdestete a la medida que se incremente el consumo de FDN por los lechones.

El aumento de peso del día 7 al día 14 posdestete en los órganos digestivos, podría explicarse desde el hecho que en los primeros días posdestete la adaptación a una dieta sólida genera cambios morfológicos y funcionales del tracto digestivo, lo que se puede traducir en un menor consumo de alimento, lo que provoca que no se cubran los requerimientos de proteína y energía básicos del animal, finalmente todo esto complicará su crecimiento inicial (Le Dividich y Sève, 2000). Este evento puede observarse principalmente durante la primera semana posdestete, con la mayor repercusión negativa durante los dos o tres primeros días, donde se observa una disminución del peso de los órganos digestivos o en algunos otros casos un peso constante; ya que después de estos días el crecimiento del tracto gastrointestinal dependerá de la ingesta de alimento sólido (Aguilera *et al.*, 2003; Escobar *et al.*, 2008). Makkink *et al.* (1994) mencionan que debido al ayuno o bajo consumo de alimento se produce una baja en el peso absoluto y relativo del páncreas. Sin embargo, después de que se incrementa el consumo de alimento se observa un aumento significativo en el tejido pancreático (Lindeman *et al.*, 1986); como fue observado en el presente trabajo entre los días 7 y 14 posdestete.

El crecimiento del estómago está asociado con el desarrollo de la mucosa gástrica, por lo que el peso relativo (g/kg de PV) de la misma incrementa cuando comienza la ingestión del alimento sólido (Lindeman *et al.*, 1986). Los cambios en el intestino delgado tienen como repercusión una pérdida de peso del 20-30% durante las primeras 24 a 36 horas posdestete (Lallés *et al.*, 2004). Su crecimiento macroscópico posterior (Cera *et al.*, 1988; Van Beers-Schreus *et al.*, 1998; Hedemann *et al.*, 2003) puede estar ligado a los cambios que hay en la mucosa intestinal (Moughan *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1992; Yen, 2002), observando una recuperación en sus valores entre los días 9 y 14 posdestete (Nabuurs *et al.*, 1993; Hedemann *et al.*, 2003; Vente-Spreuwenberg *et al.*, 2004). Mientras mayor es el consumo de alimento, mayor es el aporte de energía, y por ende habrá un crecimiento superior de estómago, páncreas, intestino delgado e hígado, los

cuales ocupan 50% de la energía total (Quiniou y Noblet, 1995; Nyachoti *et al.*, 1997).

6.2 pH de los contenidos gastrointestinales

Los resultados del pH de los contenidos digestivos se muestran en el Cuadro 4. El efecto de la dieta consumida por los lechones sobre el pH de los contenidos de los órganos digestivos de la parte anterior del tracto gastrointestinal (estómago, yeyuno e íleon) no fue significativo ($P>0.05$). La edad solamente afectó el pH del contenido del estómago ($P<0.05$). En ciego y colon la dieta consumida tuvo un efecto interactivo con la edad ($P<0.001$) sobre el pH de sus contenidos.

Cuadro 4. pH de los contenidos del estómago, yeyuno, íleon, ciego y colon de lechones alimentados con las diferentes dietas experimentales.

	Dietas				P			EEM
	C-	C+	Sc	Sb	D	E	DxE	
Estomago	3.0	3.4	3.3	3.5	0.335	0.039	0.177	0.11
Yeyuno	6.7	6.8	6.9	6.7	0.428	0.523	0.066	0.05
Íleon	6.8	6.6	6.4	6.9	0.229	0.737	0.106	0.08
Ciego	5.7	6.0	5.7	6.1	0.050	0.002	0.001	0.05
Colon	6.1	6.3	6.0	6.4	0.012	0.002	0.001	0.04

C-: dieta sin antibiótico ni probiótico. C+: dieta con antibiótico. Sc: dieta con *Saccharomyces cerevisiae*. Sb: dieta con *Saccharomyces boulardii*. P: probabilidad estadística. D: efecto de la dieta. E: efecto de la edad. DxE: efecto de la interacción edad y dieta. EEM: error estándar de la media.

Los valores de pH encontrados en el presente trabajo estuvieron en un rango entre 3 y 6.9 (Cuadro 4), lo que concuerda parcialmente con Chesson (1987) que menciona que en cerdos en crecimiento el pH del tracto gastrointestinal varía entre 1.0 y 8.0: siendo en contenido de estómago entre 1.0 y 4.5, en el intestino delgado entre 4.0 y 7.4 y en el intestino grueso entre 5.7 y 6.8. En lechones destetados, Aguilera *et al.* (2014) observaron valores en los contenidos digestivos un poco más ácidos en estómago (entre 2.5 y 3.8) y yeyuno (entre 5.9 y 6.1), muy similares a los presentes valores en íleon (entre 6.4 y 6.7). En el presente trabajo no se

observó un pH igual a 1 en el estómago, como lo menciona Chesson (1987), pues se utilizaron lechones recién destetados cuya producción de ácido clorhídrico es muy limitada (Partanen y Mroz, 1999); sin embargo, los pH de los contenidos de yeyuno, íleon, ciego y colon estuvieron dentro de los rangos que estos autores reportan.

Las diferencias entre los valores observados en la literatura están relacionadas con la edad de los animales, el tiempo en que se mide el pH después de la ingesta de alimento (Chesson, 1987; Aguilera *et al.*, 2014) y la composición de los alimentos consumidos (Levic *et al.*, 2005). Estos factores afectan los valores de pH de los contenidos digestivos y la capacidad de amortiguación, tanto del animal como de la dieta.

6.2.1 Efecto de la dieta consumida sobre el pH de los contenidos digestivos

La ausencia de un efecto de la dieta consumida sobre el pH de los órganos del tracto digestivo anterior, indica que la presencia del antibiótico o de las levaduras en la dieta no influyó en cualquiera de los factores acidificantes del medio ambiente gástrico y del intestino delgado; o que la capacidad amortiguadora de las dietas o de los animales está colaborando para que a nivel del estómago el pH sea menos ácido y que a nivel intestino delgado el pH se mantenga a niveles adecuados para la hidrólisis enzimática.

Todos los lechones se alimentaron con dietas con una alta proporción de cereales y cuya fuente de proteína vegetal (pasta de soya) se encuentra presente en un 15%, lo que pudo haber sido un factor amortiguador del pH (Levic *et al.*, 2005), impidiendo que se observara valores de pH más bajos en el contenido del estómago. Los cereales presentes en las dietas tienen una capacidad amortiguadora más baja, ya que los alimentos proteicos, como la pasta de soya, tienen una capacidad intermedia o alta (Jasaitis *et al.*, 1987; Levic *et al.*, 2005). Por lo tanto, la capacidad amortiguadora de los componentes de las dietas,

principalmente de la pasta de soya, podría explicar por qué en el presente trabajo, los valores de pH en los 14 días posdestete no fueron muy ácidos.

Por otro lado, el animal también tiene sus mecanismos de control del pH, gracias al alto grado de homeostasis digestiva que posee el organismo animal para mantener el equilibrio del ecosistema gastrointestinal y por ende su salud (Melin *et al.*, 1997). Lo que es importante, ya que alteraciones en el pH extracelular cambian el pH intracelular de los enterocitos, los cuales modifican su función secretora y absortiva utilizando diversos mecanismos para mantener su equilibrio intracelular; como la secreción de fluidos ricos en H^+ y HCO_3^- , regulando de esta manera el pH intracelular (Shimada y Hoshi, 1987; Hoinard y Gore, 1988; Wenzl *et al.*, 1989). El pH alcalino del yeyuno e íleon observados en el presente trabajo, indica que el quimo ácido proveniente del estómago fue adecuadamente neutralizado por las secreciones pancreática y hepática estimuladas por las hormonas secretina y CCK, para proteger la mucosa intestinal y posibilitar la digestión de los nutrimentos por las enzimas pancreáticas (Cunningham y Klein, 2014).

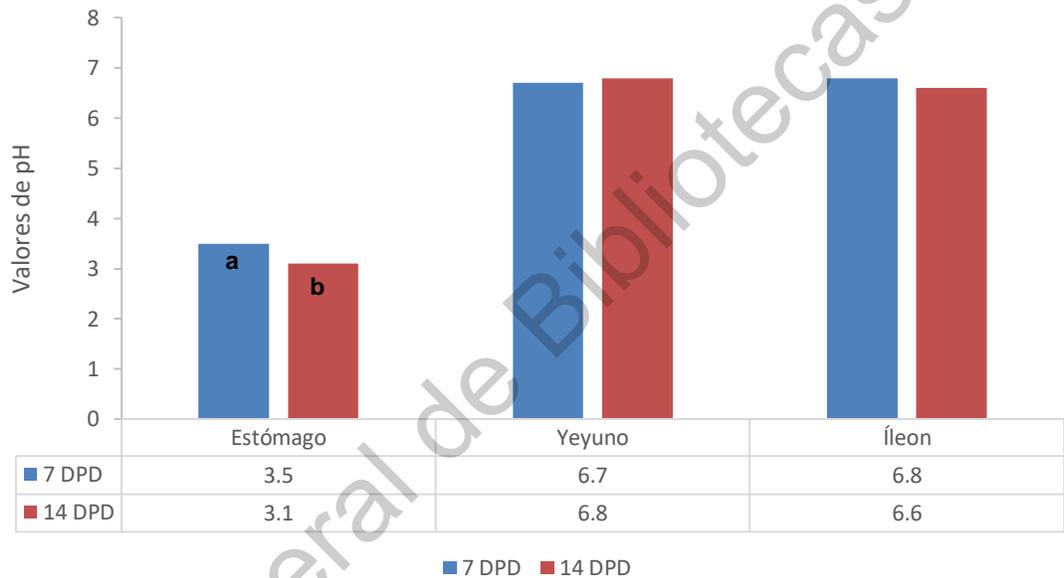
Por otro lado, las dietas tuvieron un efecto en el pH de los contenidos del intestino grueso mostrando valores menos alcalinos en ciego y colon de animales que consumieron las levaduras viva. Figueiredo *et al.* (2010) también observaron una disminución en el pH cecal de lechones de la misma edad alimentados con dietas adicionadas con probióticos. Sin embargo, en el presente trabajo, el efecto dieta interactuó con la edad posdestete, por lo que será presentado y discutido en el apartado 6.2.3.

6.2.2 Efecto de la edad posdestete sobre el pH del estómago.

Solamente se observó un efecto ($P < 0.05$) de la edad de los lechones en el pH del estómago (Figura 2), el cual fue más ácido ($P < 0.05$) en el día 14 que en el día 7 posdestete; lo que podría ser explicado por la secreción de ácido clorhídrico muy limitada en el inicio de la vida del lechón (Partanen y Mroz, 1999), el cual acidifica conforme la edad del animal avanza, teniendo niveles más ácidos hasta la tercera

o cuarta semana posdestete (Reis de Souza *et al.*, 2012). Además del estímulo que proporciona una mayor masa alimenticia ingerida y el efecto trófico de la hormona gastrina (Lindeman *et al.*, 1986), incrementando la capacidad secretoria de la mucosa gástrica.

Figura 2. Efecto de la edad posdestete sobre el pH de las secreciones del tracto digestivo anterior.



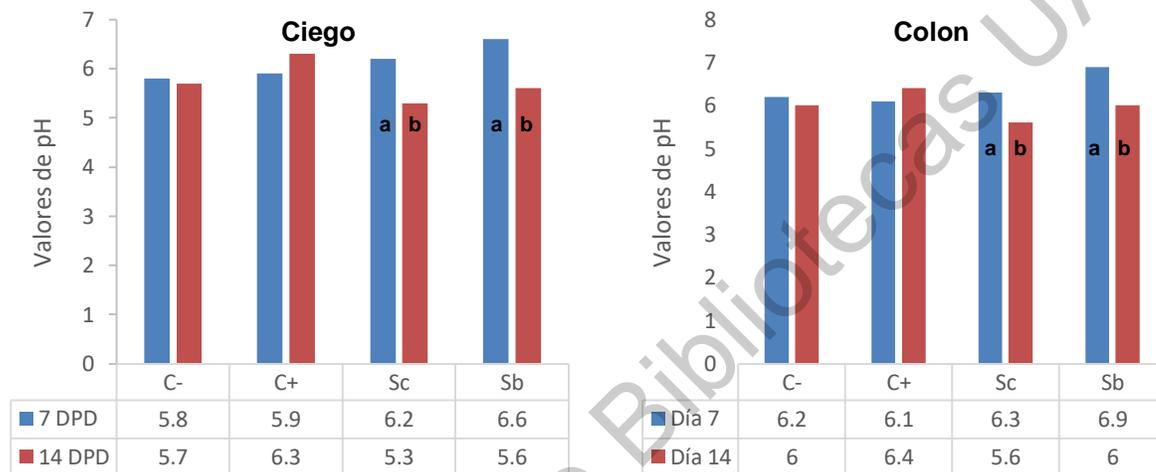
^{ab}: barras con diferentes literales en el mismo órgano, indican diferencias estadísticas significativas entre edades ($P < 0.05$). DPD: día posdestete. DPD: día posdestete.

6.2.3 Efecto de la interacción dieta y edad posdestete sobre el pH de los contenidos digestivos

En la parte anterior del tracto gastrointestinal no se observó una interacción entre la dieta consumida y la edad de los lechones ($P > 0.05$); sin embargo, en la parte posterior del tracto gastrointestinal (ciego y colon) la interacción entre ambos factores fue altamente significativa ($P < 0.001$). En la Figura 3 se puede observar que en los animales alimentados con la dieta control negativo y con la control positivo el pH del ciego y del colon no varió entre las edades; mientras que en los

animales de las dietas con levaduras (Sc y Sb) el pH del día 14 fue más ácido a comparación con el día 7 posdestete.

Figura 3. Efecto de la interacción entre la dieta consumida y la edad posdestete sobre el pH del contenido de ciego y de colon.



C-: dieta sin antibiótico ni probiótico. C+: dieta con antibiótico. Sc: dieta con *Saccharomyces cerevisiae*. Sb: dieta con *Saccharomyces boulardii*. ^{ab}: barras con diferentes literales en la misma dieta, indican diferencias estadísticas entre edades (P<0.001). DPD: día posdestete.

La disminución de los valores de pH en el día 14 posdestete en el intestino grueso de los animales que consumieron las dos levaduras vivas podría deberse a la adaptación de la microbiota a la dieta consumida por parte de los animales. Según algunos autores (Ross *et al.*, 2010; Giang *et al.*, 2012) hay una modificación en la microbiota gastrointestinal en base al probiótico suministrado, mostrando un aumento en las bacterias ácido lácticas, mientras que hay un descenso en las bacterias patógenas, ya sea por la destrucción de sus enzimas o pérdida de la función de las mismas, no permitiendo su proliferación, manteniéndolas en un estado basal (Williams *et al.*, 2001; Smirichy-Tjardes *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2005). Alltech (2001) observaron que el uso de levaduras puede potencialmente alterar la microbiota intestinal, disminuyendo significativamente los niveles de *Salmonella* y *Escherichia*, lo que sugiere que la levadura promueve la producción de ácido láctico, aumentando tanto la acidez en la luz del intestino como la

producción de enzimas digestivas, disminuyendo así el pH y limitando el desarrollo de bacterias patógenas. Gracias también a la competencia que existe entre la levadura y las bacterias patógenas para unirse a células intestinales (Auclair, 2001), los patógenos se unen a la pared celular de la levadura lo que provoca que el complejo *Saccharomyces*/patógeno se elimine rápidamente del tracto digestivo (Gedek, 1999).

Aunado a esto, la fermentación de carbohidratos por bacterias benéficas en el intestino y la transformación de sus productos por otras poblaciones de la microbiota, provocan la generación de ácidos grasos volátiles no ramificados (Donohoe et al., 2011), el incremento de concentraciones de ácido láctico y la disminución de las concentraciones de amonio (Radecki y Yokohama, 1991; Pie et al., 2007). Los ácidos grasos no ramificados se incrementan en animales alimentados con dietas con *S. cerevisiae* y *boulardii* (Más, 2019), lo que podría explicar la disminución del pH en ciego y colon.

La célula bacteriana posee un pH alrededor de 7.0, los ácidos grasos de cadena corta pueden llevar a cabo su efecto al momento de la disociación del mismo, acidificando el citoplasma del microorganismo. Además, pueden inhibir reacciones enzimáticas y sistemas de transporte de los nutrientes de las células bacterianas. Los efectos tóxicos de dichos ácidos son causados por la acumulación de aniones polares en el citoplasma y esta acumulación dependerá del gradiente del pH que exista a través de la membrana celular reportados (Russel, 1992). Breves et al. (2000) también observaron en un modelo *in vitro* que la aplicación de *S. boulardii* resultó en un aumento de la producción de ácidos grasos de cadena corta, además de un aumento en el D-lactato y amoniaco.

También en el intestino grueso existen los mecanismos de amortiguamiento mencionados anteriormente, que probablemente fueron efectivos desde la primera semana posdestete. Esto podría explicar la ausencia de efecto de la edad posdestete en los animales que consumieron las dietas control positivo. Por otro lado, Escobar et al. (2014) y Más (2019, datos no publicados) observaron que la

presencia de antibiótico en la dieta, disminuye los procesos fermentativos en el intestino grueso. En los animales que consumen dietas sin antibiótico o probiótico, los productos de la fermentación en colon incrementan de manera importante con la edad posdestete (Más, 2019) propiciando una mayor acidificación del medio y probablemente estimulando rápidamente los mecanismos de amortiguación del pH intestinal.

6.3 Expresión génica de IL-6, TNF- α y MUC2

En el caso de íleon solo se reportan valores de la expresión génica de IL-6, TNF- α y MUC2 del día 14 posdestete (Cuadro 5) debido a la pérdida de muestras del día 7 posdestete. Para el colon se presentan los análisis de los datos del día 7 y 14 posdestete.

Los valores de expresión génica de IL-6, TNF- α y MUC2 representados en los Cuadros 5 y 6 se calcularon en base a la transformación $2^{-\Delta Ct}$, donde se incluyeron un control endógeno y se obtuvo un valor directamente proporcional a la cantidad total de transcrito de cada gen, para así poder comparar cantidades de expresión de un gen respecto a otro, entre las diferentes dietas, pudiendo observar la expresión de cada gen en su real magnitud.

6.3.1 Expresión génica en el íleon: efecto de la dieta consumida

En íleon se observa una mayor ($P < 0.05$) expresión del gen MUC2 en los lechones que consumieron las dietas con *S. boulardii* en comparación con los animales que consumieron la dieta control positivo y *S. cerevisiae*, mientras que los del control negativo tuvieron un comportamiento intermedio (Cuadro 5).

Cuadro 5. Expresión de RNAm de MUC2, IL6 y TNF α en la mucosa del íleon de lechones al 14 posdestete.

	Dieta				P D	EEM
	C-	C+	Sc	Sb		
MUC2	0.446ab	0.135b	0.103b	0.646a	0.041	0.070

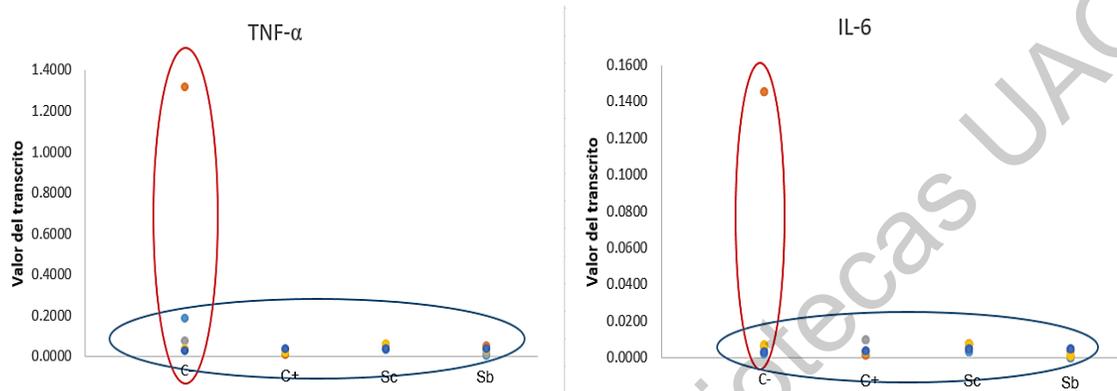
IL6	0.032	0.004	0.006	0.002	0.449	0.007
TNF-α	0.325	0.016	0.044	0.029	0.310	0.060

C-: dieta sin antibiótico ni probiótico. C+: dieta con antibiótico. Sc: dieta con *Saccharomyces cerevisiae*. Sb: dieta con *Saccharomyces boulardii*. D: efecto de la dieta. P: probabilidad estadística. D: efecto de la dieta. EEM: error estándar de la media.

La mayor expresión del gen MUC2 en el íleon por parte de los lechones que consumieron la dieta con *S. boulardii* concuerda con lo observado por Ciro *et al.* (2015) quienes encontraron que la adición de probióticos favorece la producción de mucinas en vellosidades de íleon. También coincide por lo reportado por Wang *et al.* (2014), quienes observaron una inhibición de la adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena a las células epiteliales intestinales a través de la producción de mucinas, demostrando que la expresión de genes MUC2 en las células epiteliales es inducida por el probiótico, lo que favorece la producción de mucina.

Por otro lado, en íleon las dietas consumidas no afectaron ($P>0.05$) la expresión de los genes IL-6 y TNF- α (Cuadro 5), a pesar de observarse diferencias numéricas importantes entre los animales que consumieron la dieta control negativo y los que recibieron antibiótico o levaduras vivas. Estos resultados podrían deberse principalmente a la variación que existe entre los datos individuales de los distintos. En la Figura 4 se puede observar la dispersión de los datos de IL-6 y TNF- α del día 14 posdestete en el íleon, donde cada punto de diferente color constituye un animal. En el eje de las X, se encuentran las 4 dietas, mientras que en el eje de las Y se encuentran los valores de transcrito para cada animal. Entre los animales de la dieta control negativo (ovaló color rojo) existe una mayor variación, lo que imposibilita una diferenciación estadística entre los tratamientos, a pesar de las diferencias observadas entre la expresión los animales en cada tratamiento.

Figura 4. Dispersión de datos para la expresión génica de IL-6 y TNF- α en íleon al día 14 posdestete.



Eje X: C-: dieta sin antibiótico ni probiótico; C+: dieta con antibiótico; Sc: dieta adicionada con *Saccharomyces cerevisiae*; Sb: dieta adicionada con *Saccharomyces boulardii*. Eje Y: valores de expresión del transcrito.

Sin embargo, si se elimina el(los) animal(es) del tratamiento control negativo, que se separa(n) en relación a los demás, todos los lechones presentarían valores de transcrito muy similares, indicando que probablemente tampoco habría diferencias significativas entre ellos. Esta dispersión entre individuos sugiere que a los 14 días posdestete la capacidad inmune no es uniforme entre los animales y en la mayoría de ellos el sistema inmune no está “maduro” y todavía debe ser “despertado”. También indica que la ausencia de antibiótico o probiótico en la dieta puede ser un estímulo para el desarrollo de la capacidad inmunológica del lechón. Sin embargo, esto deberá ser demostrado en un estudio con un mayor número de animales.

A pesar de no presentar diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos, si se puede observar una diferencia numérica que sugiere resultados similares a los presentados por Bautista *et al.* (2019), donde se midió mediante inmunohistoquímica la concentración de los marcadores inflamatorios TNF α e IL6 en la mucosa ileal, obteniendo una menor concentración de los mismos en los

animales alimentados con las dietas con *S. boulardii* y *S. cerevisiae* a comparación del control negativo, sin antibiótico o probiótico, donde estos marcadores se vieron incrementados. Esto podría ser explicado por el hecho de que, durante el destete, existe un periodo de bajo consumo de alimento, lo cual causa una respuesta inflamatoria en el TGI, iniciando cambios en la función y respuesta inmune (Pié *et al.*, 2004).

La reacción inflamatoria de la mucosa intestinal es importante, ya que el control de la liberación de las citocinas proinflamatorias en el intestino puede tener beneficios potenciales para aliviar los trastornos intestinales inducidos por el estrés al destete (Liu *et al.*, 2008). Investigadores como Pié *et al.* (2004) han demostrado que la expresión de los genes de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α aumenta en los dos días posteriores al destete, momento en que la altura vellosidades, la profundidad de las criptas y las actividades específicas de las enzimas intestinales están más afectadas. El destete, al menos en la primera semana, está asociado a una sobre-regulación de ciertos genes de expresión de las citocinas, que influyen en el consumo de alimento (Pié *et al.*, 2004). Mientras que *S. boulardii* cuenta con propiedades tales como la secreción de un factor denominado “factor antiinflamatorio de *S. boulardii* (SAIF, por sus iniciales en inglés)” que ejerce efectos antiinflamatorios al bloquear la activación de NF- κ B (Sougioultzis *et al.*, 2006). Sin embargo, nuestros resultados no fueron concluyentes y para observar resultados más concretos quizás sea necesario utilizar un mayor número de animales; ya que la expresión génica de IL6 y TNF- α en el presente trabajo fue muy similar entre los animales que consumieron las dos levaduras vivas.

6.3.2 Expresión génica de IL-6, TNF- α y MUC2 en el colon

También en el colon (Cuadro 6), los animales que consumieron la dieta con *S. cerevisiae* tuvieron una menor ($P<0.01$) expresión de MUC2 que los demás lechones. La expresión del gen MUC2 incrementó ($P<0.05$) entre el día 7 y 14

posdestete para todos los animales; sin embargo, se observa una tendencia ($P=0.066$) a la interacción entre dieta y edad.

Cuadro 6. Efecto de la dieta y del día posdestete sobre la expresión de RNAm de los genes MUC2, IL6 y TNF α en la mucosa del colon de lechones.

	Dietas				P			EEM
	C-	C+	Sc	Sb	D	E	DxE	
MUC2	0.204a	0.224a	0.033b	0.197a	0.013	0.002	0.066	0.024
IL6	0.638a	0.001b	0.002b	0.002b	0.025	0.053	0.0243	0.077
TNF-α	0.034	0.014	0.022	0.011	0.229	0.529	0.4364	0.038

C+: dieta con antibiótico; C-: dieta sin antibiótico ni probiótico; Sb: dieta con *Saccharomyces cerevisiae*; Sc: dieta con *Saccharomyces boulardii*. E: efecto de la edad; Dx E: efecto de la interacción edad y dieta. EEM: error estándar de la media;

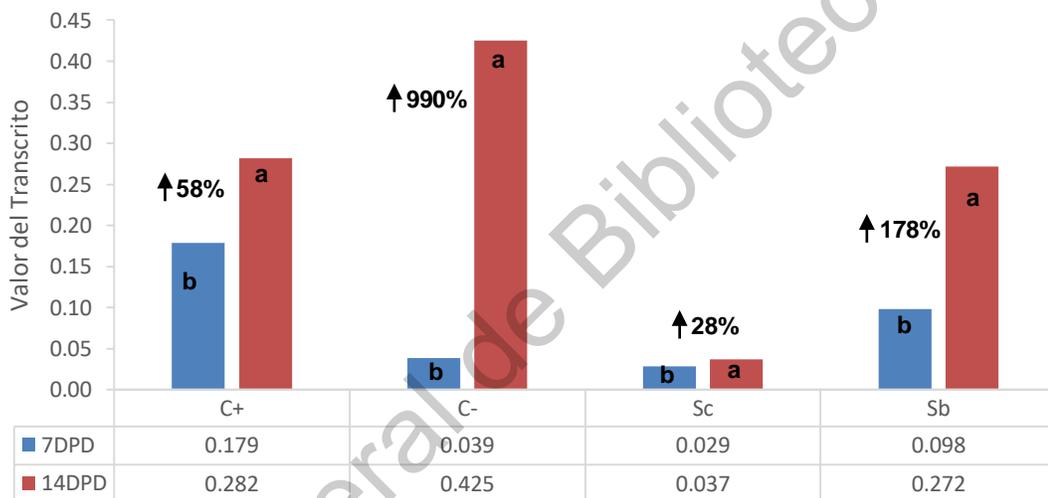
6.3.2.1 Expresión génica de MUC2 en el colon

El efecto de la interacción entre dieta y edad posdestete sobre la expresión del gen MUC2 se evidencia por las diferencias en las magnitudes de incremento entre el día 7 y 14 posdestete. Los lechones que consumieron la dieta con *S. cerevisiae* incrementaron muy poco la expresión del gen MUC2 al día 14 posdestete (28%) en comparación con los demás (Figura 5); mientras que los animales del grupo control negativo el incremento fue muy grande (990%). En los animales alimentados con *S. boulardii* se incrementó en un 178% y en los de control positivo (C+) el incremento fue de un 58%.

Como se puede ver en la Figura 5, la tendencia general observada es que los animales incrementen su capacidad de sintetizar mucinas en la segunda semana posdestete. Pero, en el caso de los lechones que se alimentaron con las levaduras vivas, la respuesta diferenció entre ellas, siendo que los animales de *S. cerevisiae* los que mostraron una menor capacidad para la expresión del gen MUC2 en la primera semana posdestete e incrementaron muy ligeramente su expresión en la segunda semana posdestete.

Los presentes resultados indican que la ausencia de antibiótico o probiótico en la dieta (control negativo) causó una mayor reacción por parte de los lechones en la segunda semana posdestete, expresando en mayor magnitud el gen MUC2. También se observó una similitud de respuesta entre los animales que consumieron la dieta con antibiótico y con *S. boulardii*, sobre todo en la segunda semana posdestete.

Figura 5. Efecto de la interacción entre la dieta y la edad de los lechones sobre la expresión del gen MUC2 en el colón.



C+: dieta con antibiótico. C-: dieta sin antibiótico ni probiótico. Sb: dieta con *Saccharomyces cerevisiae*. Sc: dieta con *Saccharomyces boulardii*. ^{ab} Barras con diferentes literales en el mismo órgano indican diferencias estadísticas debidas a la interacción entre edad y dieta (P=0.066).

A igual que en el íleon, la mayor expresión de MUC2 en los animales que consumieron la dieta con *S. boulardii* y la similitud a los animales que consumieron antibiótico para el caso del colon, podría explicarse por la capacidad que posee este probiótico de aumentar la expresión de las mucinas ileocolónicas tanto del MUC2 como del MUC3, lo que contribuye al recubrimiento del intestino de una capa de moco, mecanismo inespecífico, pero muy eficaz en la lucha antibacteriana (Tormo, 2006). Este efecto de los probióticos radica en la influencia que tienen en las interacciones de las células de la mucosa y la estabilidad celular mediante la mejora de las funciones de la barrera intestinal, todo esto por medio

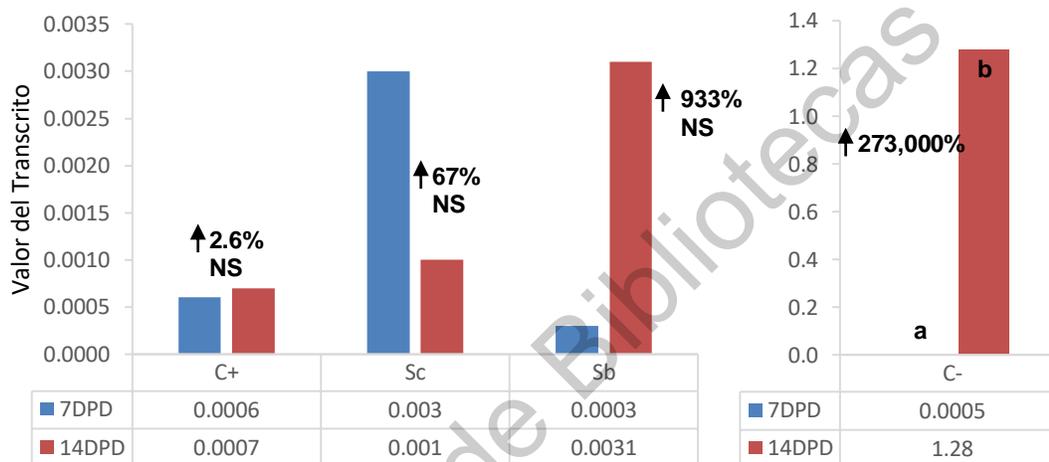
de la modulación de la fosforilación de proteínas del citoesqueleto. Debido a que las mucinas constituyen uno de los principales componentes estructurales de la capa mucosa, cambios en su secreción y cantidad podrían provocar un desequilibrio que disminuiría la protección del epitelio intestinal. Una vez que la mucina se sintetiza en las células caliciformes y se secreta a la superficie intestinal, forma una capa adherente que sufre una continua degradación y renovación (Chandran *et al.*, 2013). Por lo que al encontrar una mejora en el grosor de la capa mucosa proporcionaría una protección extra al intestino al daño atribuido a las infecciones y trastornos inflamatorios. Algunos estudios preliminares que utilizaron varios modelos *in vitro* e *in vivo* en ratones, sugieren que la administración de probióticos tienen el potencial de inducir la expresión del gen MUC2 en el epitelio del colon y, por lo tanto, puede ofrecer una estrategia prospectiva para prevenir enfermedades inflamatorias (Hoebler *et al.*, 2006, Caballero-Franco *et al.*, 2007). Adicionalmente, en el presente trabajo, el incremento de la expresión génica de MUC2 en los animales de la dieta del control negativo pudo deberse a una alteración de la microbiota intestinal, la cual puede influir en la síntesis y secreción de mucina como un lugar de adherencia de bacterias para una mayor regulación de la expresión de MUC2. Otra posible explicación del incremento de la expresión de MUC2 entre el día 7 y 14 posdestete, podría ser al papel protector de las mucinas en la formación de una barrera en el intestino, lo cual pudo haber sido estimulado por la mucosa gracias a la fibra dietética ingerida (Hermes *et al.*, 2009). Todo esto refleja la importancia de la expresión del gen MUC2 y por ende la producción de mucina en la etapa inicial de crecimiento de los lechones para así poder reducir la presencia de enfermedades entéricas.

6.3.2.2 Expresión génica de IL6 y TNF- α en el colon

Para la IL6, se observó el efecto ($P < 0.05$) de la interacción entre la dieta y la edad de los lechones (Figura 6). El comportamiento de la expresión génica entre los animales que consumieron las diferentes dietas en las dos semanas

posdestete fue muy variable. Para los animales de C+ el incremento entre los días fue muy pequeño (2.6%), mientras que para los de Sb y C- se observaron incrementos importantes (933% y 273,000%) y los de Sc disminuyeron su expresión en un 67%.

Figura 6. Efecto de la interacción entre la dieta y la edad de los lechones sobre la expresión del gen IL-6 en el colón.



C+: dieta con antibiótico. C-: dieta sin antibiótico ni probiótico. Sb: dieta con *Saccharomyces cerevisiae*. Sc: dieta con *Saccharomyces boulardii*. ^{ab}: Barras con diferentes literales en el mismo órgano indican diferencias estadísticas debidas a la interacción entre edad y dieta ($P < 0.05$). NS: diferencia no significativa.

Los bajos valores del transcrito casi cercanos a 0 de IL-6 y TNF- α en el colon en el día 7 posdestete, podrían deberse a que el lechón es capaz de producir su propia actividad inmunológica en cantidades adecuadas solamente al alcanzar al menos los 28 o 30 días de edad (Wijtten *et al.*, 2011) comenzando apenas a incrementarse entre la tercera y cuarta semana de edad (English y Bilkei, 2004), lo cual se ve reflejado en la segunda semana posdestete (día 14 posdestete) donde se aprecian valores numéricamente mayores del transcrito para estos dos indicadores (IL6 y TNF- α) en la mayoría de los animales estudiados.

A pesar del gran aumento proporcional (933%) de la expresión de IL6 entre el día 7 y 14 posdestete en los animales que consumieron la dieta *S. boullardii*, el valor sigue estando en cantidades relativamente bajas comparadas con las de un

animal en un proceso inflamatorio transitorio. Pié *et al.* (2004) encontraron que los niveles de expresión génica de IL-6 al día 8 posdestete en el colon proximal con una dieta similar al control negativo fueron de 0.03, mientras que los niveles observados en el presente trabajo al día 7 posdestete fueron de 0.0031 y al día 14 posdestete 0.0003, lo que podría sugerir que este aumento en la expresión génica no es debido a un proceso inflamatorio, si no quizás a una adaptación del sistema inmunológico a la microbiota intestinal.

Pié *et al.* (2004) también mencionan que cuando ocurren cambios grandes en factores dietéticos y ambientales habrá considerables adaptaciones morfológicas y funcionales en el intestino. Por lo que sustancias probióticas y prebióticas pueden alterar la producción local de citocinas. Todo esto desde el punto de vista de que para producir una regulación inmunofisiológica en el intestino se necesita de un establecimiento de la microbiota nativa (Isolauri *et al.*, 2001), desde su papel en la participación de la inducción de tolerancia a los antígenos del alimento, hasta su papel como estímulo antigénico para la maduración del tejido linfoide asociado al intestino (Shroff *et al.*, 1995; Helgeland *et al.*, 1996). La manera en la que los probióticos influyen sobre la regulación inmune son ampliamente mencionados, y parten del equilibrio que proporcionan sobre la síntesis de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Isolauri *et al.*, 2001).

En base a todo esto, una posible explicación al aumento de IL-6 por los animales que consumieron la dieta Sb entre el día 7 y 14 posdestete podría deberse a lo expuesto por Miettinen *et al.* (1996) quienes observaron que ciertas poblaciones de bacterias ácido lácticas pueden inducir la liberación de IL-6 y TNF- α en modelos *in vitro*, ya que muchos componentes de la pared celular bacteriana gram positiva están implicados en la inducción de citocinas. Lo cual sería en parte corroborado por los datos de pH anteriormente presentados, que sugieren que las condiciones de pH en el colon permitieron un ambiente favorable para bacterias no patógenas tales como los lactobacilos. Todo este periodo de establecimiento de una microbiota por parte del lechón también concordaría con los resultados de

la expresión génica de MUC2 de los animales alimentados con la dieta con *S. boulardii*, donde se aumentó un 178% su expresión entre el día 7 y 14 posdestete.

La reducción de la expresión génica por parte de los animales que consumieron la dieta Sc entre el día 7 y 14 posdestete corresponden a lo observado por Zanello *et al.* (2011) quienes mencionan una inhibición en los niveles de RNAm de la IL-6, gracias a sus factores antiinflamatorios, esto también coincide con lo reportado por Li *et al.* (2007) quienes presentan los efectos amortiguadores que podría tener la pared de la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la respuesta antiinflamatoria en lechones destetados, ya que observaron, tanto *in vivo* como *in vitro*, una disminución de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α en el plasma de lechones destetados a diferentes edades.

La literatura menciona que la IL-1, IL-6 y el TNF- α se inducen rápidamente durante un proceso de inflamación o lesión (Murtaugh *et al.*, 1996); sin embargo diversos autores (Aderka *et al.*, 1989; Schindler *et al.*, 1990; Ulich *et al.*, 1991) mencionan que la liberación de IL-6 puede inhibir la liberación de citocinas proinflamatorias como el TNF- α . Respecto a esto Murtaugh *et al.* (1996) observaron un aumento en la expresión de IL6 e IL-1, pero no de TNF- α en líquido de pulmón a 24 horas de infección. Ellos sugirieron que estos niveles elevados de IL-6 pudieron deberse a una respuesta protectora de fase aguda. Estos resultados podrían coincidir con los encontrados en el presente trabajo, donde si bien se encontraron un aumento marcado de la expresión de IL6 entre el día 7 y 14 posdestete en el colon, no hubieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la expresión de TNF- α ; sin embargo, si menores valores numéricos entre estas dos citocinas. La elevación en los niveles de expresión de IL-6 entre las dos semanas posdestete (273,000%) podría deberse a un establecimiento de bacterias gram negativas en la microbiota, mediante la estimulación por parte de las células secretoras que son inducidas por los lipopolisacaridos (LPS) de este tipo de bacteria sobre este gen (Tracey y Cerami, 1993). Esto también coincidiría con los

niveles de expresión génica de MUC2 entre la proporción del día 7 y 14 posdestete (933%) ya que la mayor expresión de este gen sugiere una mayor síntesis de moco por parte de las células caliciformes que cubrirá la superficie epitelial del tracto gastrointestinal, funcionando como una importante barrera física contra la fijación de antígenos lumbales (Isolauri *et al.*, 2001).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VII. CONCLUSIÓN

Los resultados indican que el uso de levaduras en dietas sin antibióticos no afecta negativamente el desarrollo de los órganos digestivos, permitiendo un crecimiento mayor a lo largo de las dos semanas posdestete en estómago, páncreas, hígado e intestino delgado; y el mantenimiento de peso en el intestino grueso.

Existe un efecto positivo de la edad posdestete sobre la acidificación del pH del contenido del estómago, lo que probablemente favoreció a la digestión de las proteínas.

El consumo de *S. cerevisiae* y *S. boulardii* promovió la acidificación del pH de colon y ciego, lo que muestra uno de los efectos favorables de estos probióticos sobre el tracto gastrointestinal.

La adición de las levaduras en las dietas de lechones recién destetados no afectó la expresión génica de TNF- α tanto en íleon como en colon.

La ausencia de antibiótico y probiótico en la dieta generó una gran variación en la expresión génica entre animales de la dieta control negativo en los tres genes estudiados.

La adición de *Saccharomyces boulardii* provocó un aumento de la expresión génica de MUC2 en colon, de modo similar a la dieta adicionada con antibiótico; además de mostrar una tendencia a incrementar su expresión en el íleon, mostrando uno de los efectos positivos que esta levadura tiene sobre la mucosa ileocolónica.

La adición de *Saccharomyces cerevisiae* disminuyó la expresión de MUC2 en el colon y muestra una tendencia similar en el íleon.

Los presentes resultados indican que la ausencia de antibiótico o probiótico en la dieta (control negativo) causó una mayor reacción por parte de los lechones en

la segunda semana posdestete, expresando en mayor magnitud el gen MUC2. También se observó una similitud de respuesta entre los animales que consumieron la dieta con antibiótico y con *S. boulardii*, sobre todo en la segunda semana posdestete.

Los resultados del transcrito de IL-6 y TNF- α cercanos a ceros a los 21 días de edad, muestran la capacidad inmunológica aún limitada en los lechones, incrementando en la segunda semana posdestete.

La ausencia de antibiótico y probiótico provocó una mayor expresión génica de IL-6 en los animales que consumieron esta dieta, lo que podría relacionarse con una mayor actividad inmunológica ante un cuadro de inflamación por una flora intestinal diferente a la de los animales que consumieron antibiótico o probiótico.

Mientras que adicionar antibiótico o probiótico provoca niveles bajos de expresión de IL-6 en el colon, los cuales sugieren solo una regulación inmunofisiológica gracias al establecimiento de la flora bacteriana, y no un cuadro inflamatorio, demostrado en dieta adicionada con *Saccharomyces boulardii* que provocó un aumento en la expresión de IL-6 entre el día 7 y 14 que a pesar de tener una proporción alta, mostró niveles de transcrito bajos.

Saccharomyces cerevisiae disminuyó la expresión de IL-6 en el colon entre el día 7 y 14 posdestete mostrando así, sus efectos de inmunomodulación en colon.

Los resultados sugieren que las levaduras ejercen sus efectos de manera diferente a lo largo del tracto gastrointestinal, teniendo una mayor influencia en el intestino grueso. Aludiendo sus efectos a una modificación de la flora bacteriana, quizás mediante la modificación del ambiente intestinal.

VIII. RECOMENDACIONES

Durante la recolección y extracción de RNA:

- Al momento de la recolección de muestras, tratar de tomar un mayor número de las mismas, ya que con dos viales de la muestra no es suficiente, tomar por lo menos 4 para poder tener la oportunidad de repetir la extracción de ser necesario (ya sea por una baja concentración de la muestra y por problemas como contaminación o degradación).
- Hacer la extracción de ARN de las muestras en el menor tiempo posible, ya que el ARN se degrada muy rápido. El momento más seguro para poder congelar las muestras en un tiempo más prolongado es hasta la síntesis del cDNA.
- Al momento del uso del NANODROP antes del tratamiento del RNA con la DNasa I, tener sumo cuidado de una contaminación de la muestra.
- El protocolo utilizado es para la síntesis de 20 microlitros de cDNA (anexo 1), sin embargo, se recomienda la síntesis de 60 microlitros para las muestras que se utilizarán en la curva de la validación de PRIMERS, para las demás se recomienda la síntesis de 40 microlitros de cDNA (tanto para el PCR punto final como para el PCR tiempo real).
- Cuando se preparan los PRIMERS para poner a la concentración adecuada 10 mM (micromolar) poner PRIMERS madre en varios viales y por lo menos en 2 refrigeradores, previniendo problemas con los REVCO y la luz.

Durante el PCR en tiempo real:

- Antes de comenzar cualquier procedimiento asegurarse de que las placas utilizadas son las adecuadas para el equipo que se utilizará.
- Determinar al comienzo del experimento las condiciones del termociclado y revisar que sean las adecuadas de acuerdo a los PRIMERS.

- Es muy importante utilizar las mismas pipetas y puntas durante todo el proceso, ya que una variación en las mismas afecta la eficiencia de la reacción.
- Durante la validación de los PRIMERS es importante verificar la cantidad de muestra, evitando así bajas cantidades, por lo que en lugar de solo tomar una muestra, se recomienda armar un pool con varias o todas las muestras para así tener una validación más eficaz.

Durante el análisis de las muestras:

- Evaluar a conciencia el método a utilizarse de acuerdo a los valores de CT arrojados por el equipo.

IX. LITERATURA CITADA

Allee, G., Touchette, K. 1997. Effects of the nutrition about the intestinal health and the growth of pigs. XV Course of Specialization Advances in Nutrition and Animal Feeding. Department of Animal Sciences, University of Missouri Columbia. USA , MO 65211. pp 15.

Alltech, J. 2001. The effect of dietary supplementation with spent cider yeast on the swine distal gut microbiom. Pp 231 – 235.

Aderka D., Junming L., Vilcek J. 1989. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. J. Immunol. 143. 3517–3523.

Aguilera, B. A., Reis de Souza, T. C., Mariscal-Landín G., Juárez, G. 2003. Desarrollo de los órganos digestivos hasta la cuarta semana posdestete en lechones alimentados con subproductos lácteos. Memorias del XI Congreso de la AMENA y I del CLANA; 2003 agosto 18-23; Cancún (Quintana Roo) México. México (DF): AMENA, 2003: 335-336.

Aguilera, B. A., Reis de Souza, T. C., Mariscal Landín G., Guerrero C., Escobar G. K., Bernal S. M. G, García G. 2014. Morphophysiological adaptations of the gastrointestinal tract in piglets fed a sesame meal or soybean meal diet. American Journal of Animal and Veterinary Sciences 9(1): 28-35.

Armstrong, J. D., Kraeling R. R., Britt J. H. 1988. Effects of naloxone or transient weaning on secretion of LH and prolactin in lactating sows. J Reprod Infertil, 83, 301-30.

Araya, M., Morelli, Lorenzo., Reid, G., Sanders, Mary., Stanton, C., Pineiro, M., Embarek, P. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 1-11.

Artis, D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*; 8: 411-420.

Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L. 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280 G922–929.

Auclair, E. 2000. Yeast as an example of the mode of action of probiotic in monogastric and ruminant species. *Improving Safety: from Feed to Food. Feed manufacturing in the Mediterranean region.* Brufau J editors. Zaragoza. Spain., pp: 45-53.

Baeuerle, P. A., Baltimore, D. 1996. NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 87: 13– 20.

Bautista, M. S., Reis de Souza, T. C., Mariscal-Landín, G., Díaz, M. M., Molina A. C., Aguilera, B. A. 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.

Bajka, B. H., Rigby, N. M., Cross, K. L., Macierzanka, A., Mackie A.R. 2015. The influence of small intestinal mucus structure on particle transport ex vivo *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 135, pp. 73-80.

Baldwin, A. S. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 14: 649–83.

Bazay, G. 2010. Uso de los probióticos en la alimentación animal con énfasis en *Saccharomyces cerevesiae*. Sistema de revisiones en investigación veterinaria de San Marcos.

Beauchemin, K., Kreuzer, M., O'mara, F., McAllister, T. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Anim. Prod. Sci.* 48, 21– 27.

Bertolo, R. F. P., Chen, C. Z. L., Law, G., Pencharz, P. B., Ball R.O. 1998. J. Nutr. 128: 1752-1759.

Beutler, B. A. 1999. The role of tumor necrosis factor in health and disease. J Rheumatol; 26 (Suppl 57):16- 21.

Bikker, P., Dirkzwager, A., Fledderus, J., Trevisi, P., Le Huërou-Luron, I., Lallès, J.P., Awati, A. 2007. Dietary protein and fermentable carbohydrates contents influence growth performance and intestinal characteristics in newly weaned pigs. Livest Sci. 108: 194-197.

Blehaut, H., Massot, J., Elmer, G. W., Levy, R. H. 1989. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. Biopharm Drug Dispos 10: 353–364

Bohn, J. A., BeMiller, J. N. 1995. (1→3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. Carbohydr. Polym., 28 (1): 3-14.

Bonizzi, G., Karin M. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. Trends Immunol. 25: 280–8.

Breves, G., Faul, K., Schroder, 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: 193–200.

Brody, S. 1945. Bioenergetics and Growth. Reinhold Publishing Corp., J. Phys. Chem. 50, 2, 168-169

Bruininx, E. M. 2002. Características individuales de la ingesta de pienso en cerdos destetados alojados en grupo. Diss., Univ. Utrecht, Utrecht, Países Bajos.

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.

Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., Chadee, K. 2007. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G315–322.

Castagliuolo, I., Lamont, J. T., Nikulasson, S. T., Pothoulakis, C. 1996. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum, *Infect. Immun.* 64. 5225–5232.

Castagliuolo, I., Riegler, M. F., Valenick, L., Lamont, J. T., Pothoulakis, C. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxin A and B in human colonic mucosa, *Infect. Immun.* 67. 302–307.

Castell, D. O., Moore, E. W. 1971. Ammonia absorption from the human colon. The role of nonionic diffusion. *Gastroenterology* 60: 33-42.

Castillo, G. M. S. 2006. Development of gut microbiota in the pig: modulation of bacterial communities by different feeding strategies. Doctoral thesis. Barcelona, España. Universidad Autónoma de Barcelona.

Castro, M., Rodríguez, F. 2005. Yeast: probiotics and prebiotics to improve animal production system. *Revista Corpoica.*; 6(1): 26-38.

Cera, K. R., Mahan, D. C., Cross, R. F., Reinhart G. A., Whitmoyer R. E. 1988. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *J Anim Sci*; 66:574–584.

Chandran, A., Duary, R. K., Grover, S. Batish, V. K. 2013. Relative expression of bacterial and host specific genes associated with probiotic survival and viability in the mice gut fed with *Lactobacillus plantarum* Lp91. *Microbiological Research*, 168(9), 555–562.

Chaucheyras-Durand, F., Durand, H. 2008. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef. Microb.* 1:3-9.

Chesson, A. 1987. Supplementary enzymes to improve the utilization of pig and poultry diets, *Rec. Adv. Anim. Nutr.* 1987 71-89.

Chitasombat, M. N., Kofteridis D. P, Jiang Y., Tarrand J., Lewis R. E., Kontoyiannis D. P. 2012. Rare opportunistic (non-Candida, non-Cryptococcus) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *J Infect*; 64:68–75.

Choudhari, A., Shinde S., Ramteke, B. N. 2008. Prebiotics and probiotics as health promoter. *Vet. World* 1: 59-61.

Christensen, L. H., Nirdrn J., Villadsen, J. 1992. Monitoring of substrates and productd during fed-batch penicillin fermentations on complex media. *Anal. Chem. Acta.* 249: 123-136.

Christina, M., Surawicz, M. D. 2003. Probiotics-antibiotic associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhea in humans. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 17, 775.

CIOMS, I. 2012. International guiding principles for biomedical research involving animals.

Ciro, G. J. A., López, H. A., Parra, S. J. 2015. Adding probiotic strains modulates intestinal mucin secretion in growing pigs ileum. ISSN: 1900-9607. Volumen 10 Número 2 julio - diciembre

Corfield, A. P., Warren B. F. 1996. The modern investigation of mucus glycoproteins and their role in gastrointestinal disease. *J Pathol* 180, 8-17

Cunningham, J., Klein, B. G. 2014. Fisiología veterinaria. In Editorial, Elsevir España.

Cutting, S. M. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.*, 28(2): 214-220.

Czerucka D, Piche T, Rampal P. 2007. Review article: yeast as probiotics -- *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther.* 26:767–778.

Czerucka, D., Nano, J. L., Bernasconi, P., Rampal, P. Response of the IRD intestinal epithelial cell line to *Clostridium difficile* toxins A and B in rats. Effect of *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, v. 15, 1991, p. 22-27.

Dahan, S., Dalmaso, G., Imbert V. 2003. *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli* induced signalling pathways in T84 cells. *Inf Immun.* 71: 766–73.

Czerucka, D., Rampal, P. 2002 Experimental Effects of *Saccharomyces boulardii* on Diarrheal Pathogens. *Microbes and Infection*, 4, 733-739.

Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B. 2000. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli* infected T84 cells. *Inf Immun.* 68: 5998–6004.

Dalmaso, G., Loubat, A., Dahan, S., Calle, G., Czeruka, D. 2006. *Saccharomyces boulardii* prevents TNF α -induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. *Res Microbiol* 2006; 157: 456–66.

Daposa, C. 2002. Alimentación nitrogenada del lechón. *Producción animal.* 181, 39-50.

Deplancke, B., Gaskins, H. R. 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*, 73:1131S–1141S.

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.

Dick, K. J., Molan, P. C., Eschenbruch, R. 1992. The isolation from *Saccharomyces cerevisiae* of two antibacterial cationic proteins that inhibit malolactic bacteria. *Vitis* 31: 105-116.

DiPiro, J. T. 1997. Cytokine networks with infection: mycobacterial infections, leishmaniasis, human immunodeficiency virus infection, and sepsis. *Pharmacotherapy*; 17:205-23.

Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bungler, M. K., Bultman, S. J. 2011. The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metab.* 13: 517-526.

Duran-Montgé, P., Theil, P. K., Lauridsen, C., Esteve-Garcia, E. 2009. Dietary fat source affects metabolism of fatty acids in pigs as evaluated by altered expression of lipogenic genes in liver and adipose tissues. *Animal* 3: 535-542.

Easter, R. A. 1995. Growth, Body Composition and Nutrition. En: *Memorias Curso de Lance*. 17 p.

Eicher, S., McKee, C., Carroll, J., Pajor, E. 2006. Supplemental vitamin C and yeast cell wall β -glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. *J. Anim. Sci.*, 84, 2352–2360.

English, J. G. H., Bilkei, G. 2004. The effect of litter size and littermate weight on pre-weaning performance of low-birth-weight piglets that have been cross-fostered. *Anim Sci*;79:439-443.

Escobar, G. K., Reis de Souza, T. C., Guerrero, M. J. C., Mariscal- Landín, G., Aguilera B. A., Bernal M. G. S.. 2008. Morfología del intestino delgado de lechones destetados alimentados con diferentes fuentes de proteína. *Memorias del III Congreso CLANA*; Noviembre 18–21; Cancún, Quintana Roo, México. CELIS A, GARCÍA M, editores, 2008:513–516.

Escobar G. K., Reis de Souza, T. C., Mariscal-Landín, G., Aguilera, B. A., Bernal, M. G., Gómez, S. J. 2014. Microbial fermentation patterns, diarrhea incidence, and performance in weaned piglets fed a low protein diet supplemented with probiotics. *Food Nutr. Sci.* 5: 1776-1786.

Fan, M. Z., Adeola, O., Asem, E. K., King, D. 2002. Postnatal ontogeny of kinetics of porcine jejunal brush border membrane-bound alkaline phosphatase, aminopeptidase N and sucrase activities. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132, 599–607.

Fangman, T. J., Tubbs, R. C. 1997. Segregated early weaning. *J Swine Health Prod*;5:195-198.

Fietto, J. L. R., Araujo, R. S., Valadao, F. N. 2004. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* *Can J Microbiol.* 50: 615–21.

Figuroa, V. J., Chi, M. E., Cervantes, R. M., Dominguez V.I. 2006. Functional foods for weanling pigs. *Vet Méx.* 37:117–136.

Figueiredo, S. M. L., De Freitas, L. J. A., De Souza, C. V., De Oliveira, A. N., Zangeronimo, M. G., Tadeu, F. E. 2010. Probiotics and antibiotics as additives for sows and piglets during nursery phase. *R. Bras. Zootec.* 39, 2453-2459

Fuller, R., Cole C. B. 1989. The Scientific Basis of the Probiotics Concept. In: B: Stark and J. Wilkinson (Eds.) *Probiotics. Theory and Applications.* Chalcome Publications, 1-14.

Gadient, R. A., Otten, U. H. 1997. Interleukin-6 (IL-6)-a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol*; 52:379-90.

Gedek, B. R. 1999. Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella* Typhimurium mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses*, 42, 261-264.

Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., Tempio, G. 2013. Hacer frente al cambio climático a través de la ganadería – Evaluación global de las emisiones y las oportunidades de mitigación. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. (FAO), Roma.

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*; 143:132-141.

Georgiades, P., Pudney, P. D., Rogers, S., Thornton, D. J., Waigh, T. A. 2014. Tea derived galloylated polyphenols cross-link purified gastrointestinal mucins. *PLoS One*. 9(8):e105302.

German, A., Hall, E., Day, M. J. 2001. Immune Cell Populations within the Duodenal Mucosa of Dogs with Enteropathies. *J Vet Intern Med*, 15, 14-25.

Ghadimi, D., Vrese, M. D., Heller, K. J., Schrezenmeir, J. 2010. Effect of natural commensal-origin DNA on toll-like receptor 9 (TLR9) signaling cascade, chemokine IL-8 expression, and barrier integrity of polarized intestinal epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis*; 16: 410-427

Gómez, S. J. G., Reis de Souza, T. C., Mariscal- Landín, G., Aguilera, B. A., Bernal S. M. G., Escobar G. K. 2018. Gastrointestinal morphophysiology and presence of kafirins in ileal digesta in growing pigs fed sorghum-based diets, *Journal of Applied Animal Research*, 46:1, 618-625, DOI: 10.1080/09712119.2017.1371607

Gómez, I., Vergara D., Argote F. 2008. Efecto de la dieta y edad del destete sobre la fisiología digestiva del lechón. *Rev Bio Agro*. 6, 1, 32-41.

Gómez, A., Benavides C., Díaz C. 2007. Evaluación de torta de palmaste (*Elaeis guineensis*) en alimentación de cerdos de ceba. *Rev Bio Agro*. (Vol 5) 1; 54-63

Gómez, A. El destete y la fisiología del lechón. Memorias I seminario internacional sobre sistemas sostenibles de producción en especies menores. Universidad del Cauca. Popayán (Colombia), 2006. P34.

Grossenbacher-Monsuy, W. 2000. Funtional food. Center for Technology Assesment at the Swiss Science and Technology Council.

Guarner, F., Schaafsma G. J. 1998. Probiotics. International J Food Microbiol; 39:237–238.

Guay F., Donovan S. M., Trottier N. L. 2006. Biochemical and morphological developments are partially impaired in intestinal mucosa from growing pigs fed reduced-protein diets supplemented with crystalline amino acids. J Anim Sci. 84: 1749-1760

Gunther, K. 2003. Taxonomy, ecology and resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. International J. Food Microbiology, 88, 123.

Gupta, V., Garg R. 2009. Probiotics. Ind J Med Microbiol., 27, 202-209.

Gutiérrez, L., Montoya, O. & Vélez, J. 2013. Probiotics: an alternative for cleaner production and a possible replacement of the antibiotics as growth promoters in animal feeding. Producción + limpia 8:135

Hammond, J. 1966. Principios de la explotación animal: reproducción, crecimiento y herencia. Ed: Acribia. Zaragoza, España. 363 p. pp. 172-198.

Hedemann, M. S., Hojsgaard S., Jensen B. B. 2003. Smallintestine morphology and activity of intestinal peptidasesin piglets around weaning. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 87:32.

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

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, 3569–3577.

Hernández, U. M. A., Alvarado, N. A. 2001. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed*; 12:272-280.

Hoebler, C., Gaudier, E., De Coppet, P., Rival, M., Cherbut C. 2006. MUC Genes Are Differently Expressed During Onset and Maintenance of Inflammation in Dextran Sodium Sulfate-Treated Mice. *Digestive Diseases and Sciences* 51: 381–389.

Hoinard, C., Gore J. 1988. Cytoplasmic pH in isolated rat enterocytes. Role of Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochim Biophys Acta* 941: 111-118.

Hoshi, S., Sakata, T., Mikuni, K., Hashimoto, H., Kimura, S. 1994. Galactosylsucrose and xylosylfructoside alter digestive tract size and concentrations of cecal organic acids in rats fed diets containing cholesterol and cholic acid. *J. Nu tr.*, 124: 52-60.

Hu, C. H., Xiao, K., Luan, Z. S. 2013. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. *J Anim Sci*; 91: 1094–1101.

Hudson, L. E., McDermott, C. D., Stewart, T. P., Hudson, W. H., Rios, D., Fasken, M. B., Corbett, A. H., Lamb, T. J., 2016. Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. *PLoS One* 11, 1–21

Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpaa, P., Arvilommi H., Salminen, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:444S-450S.

Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol Rev.* 59: 171-200.

Jasaitis, D. K., Wohlt, J. E., Evans J. L. 1987. Influence of feed ion content on buffering capacity of ruminant feedstuffs in vitro. *Journal of Dairy Science* 70, 1391± 1403.

Jensen, P., Stangel, G. 1992. Behavior of piglets during weaning in a seminatural enclosure. *Applied Animal Behavioral Science.* 33: 227-238 p.

Jobin, C., Sartor, R. B. 2000. The I kappa B/NFkappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 278: C451– 62.

Johansson, M. E. V., Larsson, J. M. H., Hansson, G. C. 2011. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 4659–4665.

Kelly, D., Smyth, J. A., Mccracken, K. J. 1991. Digestive development of the early-weaned pig. *British Journal of Nutrition*, 65(02), 181. doi:10.1079/bjn19910079

Kidder, D. E., Manners, M. J. 1978. *Digestion in the Pig.* Ed: Sciencetechnica. Bristol, UK. 201 p. pp 173-175.

Kogan, G., Masler, L., Šandula, J., Navarová, J., Trnovec, T. 1989. Recent results on the structure and immunomodulating activities of yeast glucan. In *Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides.* Ed: Gordon and Breach Science Publishers. New York, USA, pp. 251–258

Kogan, G.; Kocher, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livest. Sci.* 2007, 109, 161–165.

Konstantinov, S. R., Favier, C. F., Zhu, W. Y., Williams, B. A., Klüb, J., Souffrant, W. B. 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition *Anim Res*; 53:317–324.

Kopp, E. B., Medzhitov, R. 1999. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol*; 11:13-8.

Lallès, J. P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C. R. 2007. Weaning, a challenge to gut physiologists. *Livest. Sci.*;108:82-93.

Lallès, J. P., Boundry, G., Favier, C., Le Floch, N., Luron, I., Montagne, L. 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim Res*; 53:301-316.

Leibrandt, V. D., Ewan, R. C., Speer, V. C., Zimmerman, D. R. 1975. Effect of weaning and age at weaning on baby pig performance. *J. Anim. Sci.* 40: 1077-1080.

Lesage, G., Bussey, H. 2006. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70: 317–343.

Lessard, M., Dupuis, M., Gagnon, N., Nadeau, E., 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. *J Anim Sci*;87:922–934.

Letscher-Bru, V., Herbrecht, R. 2003. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J Antimicrob Chemother.*; 51: 513–521.

Lević, J., Prodanović, O., Sredanović S. 2005. Understanding the buffering capacity in feedstuffs. *Biotechnol Anim Husband* 21: 309-313.

Levin, B. R. *Microbiology*. Noninherited resistance to antibiotics. *Science* 305, 1578–1579 (2004).

Le Dividich, J., Herpin, P. 1994. Effects of climatic conditions on the performance, metabolism and health status of weaned piglets: a review. *Livest. Prod. Sci.* 38, 79-90.

Le Dividich, J., Sève, B. 2000. Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments. *Domestic Anim. Endocrinol.* 19:63-74.

Li, J., Li, D. F., Xing, J. J., Cheng, Z. B., Lai, C. H. 2006. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Anim Sci.* 84, 2374–2381.

Lindeman, M., Cornelius, S., El Kandelgy, S., Moser, R. 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *J Anim Sci.* 62:1298-1307.

Linden, S. K., Sutton, P., Karlsson, N. G., Korolik, V., McGuckin, M. A. 2008. Mucins in the mucosal barrier to infection, *Mucosal Immunol.* 1 183–197.

Linehan, S. A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S. 2000. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect;* 2:279-88.

Linton, A. H., Hedges A. J., Bennet B. M. 1988. Monitoring of resistance during the use of olaquinox as a feed additive on commercial pig farms. *J. Appl. Bact.* 64:311– 27.

Malgoire, J. Y., Bertout, S., Renaud, F., Bastide, J. M., Mallié, M. 2005. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism. *J Clin Microbiol;* 43: 1133-1137

MacKenzie, D. A., Defernez, M., Dunn, W. B., Brown, M., Fuller, L. J., De Herrera, S. R., Günther, A., James, S. A., Eagles, J., Philo, M., Goodacre, R., Roberts, I. N. 2008. Relatedness of medically important strains of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by phylogenetics and metabolomics. *Yeast;* 25: 501-512

Makkink, C.A., Negulescu, G.P., Guixin, Q., Verstegen, M.W.A. 1994. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned pigs. *Br. J. Nutr.* 72, 353-368.

Más, T. D., Reis de Souza, T. C., Mariscal-Landín, G., Escobar, G. K., Gómez S. J. G., Aguilera B. A. 2019. La inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* en la dieta de lechones modifica la fisiología digestiva. Tesis de Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Mateos, G. G., Martín, F., Latorre, M. A., Vicente, B., Lázaro R. 2006. Inclusion of oat hulls in diets for young pigs based on cooked maize or cooked rice. *Anim. Sci.* 82:57–63.

Matsuo, K., Ota, H., Akamatsu, T., Sugiyama, A., Katsuyama, T. 1997. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon, *Gut* 40 782–789.

McFarland, L. V. 2010. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.* 16, 2202–2222.

McFarland, L. V. 1996. *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. *Clin Infect Dis*; 22: 200-201.

Medel, P., Latorre, M. A., Mateos G. G. 1999. Nutrición y alimentación de lechones destetados precozmente. XV Curso de especialización avances en nutrición y alimentación animal. Madrid, España: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, 1999:145–196.

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. *Vet Microb*; 54:287–300.

Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J., Varkila, K. 1996. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun.* 64:5403–5.

Mitterdorfer, G., Mayer, H. K., Kneifel, W., Viernstein, H. 2002. Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. *J Appl Microbiol*; 93: 521-530

Montagne, L., Pluske, J. R., Hampson, D. J. 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim Feed Sci Technol*; 108:95–117.

Morales, A., Reis de Souza, T. C., Guerrero, C. M. J., Mariscal-Landín G., Aguilera B. A., Gómez S. J. G., Escobar G. K. 2015. Efecto del nivel de proteína dietética y de un probiótico sobre las características morfológicas del aparato digestivo de lechones. *Nthe.* 2 (11): 83-86. ISSN 2007-9079.

Moslehi-Jenabian, S.; Lindegaard, L.; Jespersen, L. Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients* 2010, 2, 449-473.

Moughan, P. J., Birtles M. J., Cranwell P. D., Smith W. C., Pedraza M. 1992. The piglet as a model animal for studying aspects of digestion and absorption in milk-fed human infants. *World Review of Nutrition and Dietetics*; 67:40-113.

Murphy J.E., Robert C., Kupper T.S. 2000. Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. *J Invest Dermatol*; 114:602-8.

Murtaugh, M. P., Baarsch, M. J., Zhou, Y., Scamurra, R. W., Lin G. 1996. Inflammatory cytokines in animal health and disease, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54 45–55.

Nabhuurs, M. J. A., Hoogendoorn, A., Van Der Molen, E.J., Van Osta, A.M. 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Res. Vet. Sci.* 55:78.

Naumann, M. 2000. Nuclear factor-kappa B activation and innate immune response in microbial pathogen infection. *Biochem Pharmacol.* 60: 1109–14.

Nonaka, M. 2001. Evolution of the complement system. *Curr Opin Immunol*; 13:69-73. 32.

Nova, E., Montero, S., Gómez, S., Marcos, A. 2004. La estrecha relación entre la nutrición y el sistema inmunitario. En: *Soporte Nutricional en el Paciente Oncológico*. Gómez Candela C, Sastre Gallego A (eds). Barcelona: Glosa, pp. 9-21.

NRC. 2012. *Nutrient requirements of swine (Eleventh revised ed.)*. Washington D.C., USA.: National Academies Press.

Nyachoti, C. M., De Lange, C. F. M., Schulze, H. 1997. Estimating endogenous amino acid flows at the terminal ileum and true ileal amino acid digestibilities. In: *feedstuffs for growing pigs using the homoarginine method*. *J Anim Sci*; 75: 3206–3213.

Oberholzer, A., Oberholzer, C., Moldawer, L. L. 2000. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med*; 28 (Suppl):N3- 12.

Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Gronzella, L., Montonati, M. 2007. Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *DIAETA*. 25, 20–33.

Osuna, P. I. A., Leal, E. G., Garza, C. A., Rodríguez, C. F. E. 2019. Carga ácida de la dieta; mecanismos y evidencia de sus repercusiones en la salud. *Nefrología*; 39 (4): 343-354.

Parker, D. S., Armstrong, D. G. 1987. Antibiotic feed additives and livestock production. *Proc. Nutr. Soc.* 46, 415.

Partanen, K. H., Mroz, Z. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews*, 12, 117–145.

Patel, S., McCormick, B. A. 2014. Mucosal Inflammatory Response to *Salmonella typhimurium* Infection. *Front Immunol*; 5:311.

Pérez De Rozas, A. M., Roca, M., Carabaño, R., De Blas, C., Francesch, J. B., Martín-Orue, S. 2003. El estudio de la Diversidad Intestinal por RFLP. *Memorias del XIX Curso de Especialización FEDNA*,:31–45.

Pie, S., Awati, A., Vida, S., Falluel, I., Williams, B. A., Oswald, I. P. 2007. Effects of added fermentable carbohydrates in the diet on intestinal proinflammatory cytokinespecific mRNA content in weaning piglets. *Journal of Animal Science*. 85, 637–683.

Pie, S., Lallès, J. P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., Oswald, I. P. 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J. Nutr.* 134, 641–647.

Plaza-Diaz, J., Gomez-Llorente, C., Fontana, L., Gil, A. 2014. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World J Gastroenterol*. 20:15632–15649.

Pluske, J. R. 2005. Alimentación y morfología intestinal en porcino. Universidad de Murdoch. Australia.

Pluske, J. R., Hopwood, D. E., Hampson, D. J. 2003a. Relación entre la microbiótica intestinal, el pienso y la incidencia de diarreas, y su influencia sobre la salud del lechón tras el destete. *Memorias del XIX Curso de Especialización FEDNA. Fundación para el desarrollo de la nutrición animal*: 93–108.

Pluske, J. R., Kerton, D. J., Cranwell, P. D., Campbell, P. D., Mullan, B. P., King, R. H., Pierzynowski, S. G., Westrom, B., Rippe, C., Peulen, O., Dunshea, F. R. 2003b. Age, sex, and weight at weaning influence organ weight and gastrointestinal development of weanling pigs. *Australian Journal of Agricultural Research*, Aust. J. Agric. Res. 54:515–527.

Pluske, J. R., Pethick, D. W., Hopwood, D. E., Hampson, D. J. 2002. Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs. *Nutr Res Rev*; 15:333–371.

Pluske, J. R., Hampson, D. J., Williams, I. H. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, 51(1-3), 215–236. doi:10.1016/s0301-6226(97)00057-2

Pluske, J. R., Williams, I. H., Aherne, F. X. 1996. Mantenimiento de la altura de la velloalidad y la profundidad de la cripta en lechones proporcionando la nutrición continúa después del destete. *Anim. Sci.* 62: 131-144.

Pollmann, D. S., Danielson, D. M., Crenshaw, M. A., Peo, E. R. 1980. Long-Term effects of dietary additions of alfalfa and tallow on sow reproductive performance. *J. Anim. Sci.*, 51 (2): 294-299

Polo, J., Campbell, J., Rodriguez, C., Rangel, L., Crenshaw, J. 2014. Relación entre nutrición, salud e inmunología en porcino. VI Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal – CBNA

Pothoulakis, C. 2009. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther.* 30:826–833.

Pothoulakis, C., Lamont, J. T. 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins, *Am. J. Physiol.* 280 G178–G183

Posteraro, B., Sanguinetti, M., Romano, L., Torelli, R., Novarese, L., Fadda, G. 2005. Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*; 103: 295-304

Quiniou, N., Noblet J. 1995. Prediction of tissular body composition from protein and lipid deposition in growing pigs. *J Anim Sci*; 73: 1567-1575.

Qualified Presumption of Safety of Micro-organisms in Food and Feed of Microorganisms in Food and Feed. 2005. In: The EFSA's 2nd Scientific Colloquium Report; European Food Safety Authority.

Quintero, M. A., Huerta, L. N. 1996. Uso de probióticos en la nutrición de cerdos, una revisión. *Rev. Cient. FCV-LUZ* 4: 75-82.

Radecki S.V., Yokoyama, M. T. 1991. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition. In: Miller ER, Ullrey DE, Lewis AJ, editors. *Swine Nutrition*. Boston: Butterworth Heinemann. p. 439-447.

Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245:154-160.

Risso, A. 2000. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol*; 68:785-92.

Roberfoid, M. B. 1996. Funtional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructoligosaccharides. *Nutr. Rev.* 54, 538–542.

Ross, G.R., Gusils, C., Oliszewski, R., Colombo-de-Holgado, S., González, S. N. 2010. Effects of probiotic administration in swine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 109:545-549.

Reis de Souza, T. C., Mariscal- Landín, G., Escobar, G. K., Aguilera, B. A., Magné, B. A.. 2012. Cambios nutrimentales en el lechón y desarrollo morfofisiológico de su aparato digestive. *Vet Mex*; 43 (2): 155-173.

Reis de Souza, T. C., Landin, G. M., Garcia, K. E. 2010. Some physiological and nutritional factors affecting the incidence of post-weaning diarrhea in piglets. *Vet Méx*; 41:275-88.

Reis de Souza, T.C., Aguilera, M. A. B., Aguilera, A. B., Mariscal- Landín G., Carrillo, M. J. G. 2007. Digestive tract morphology of piglets fed diets with isolated or concentrate soy protein. *Arch Latinoam Prod Anim*; 15:134–140.

Reis de Souza, T. C., Mariscal-Landín, G. 1997. El destete, la función digestiva y de la digestibilidad de los alimentos en cerdos jóvenes. *Técnica Pecuaria en México*. 35 (3): 145-159.

Russell, J. B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermenting acids at low pH: anion accumulation vs uncoupling. *J. Appl. Biotechnol.* 73:363– 370

Salazar, A., Montoya, C. 2003. Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. En: *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*. Vol. 10, No. 2; p. 20-26.

Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Volume 3. 3rd ed. New York, USA: CSHL Press. Appendix 9, Detection systems; p. A9.28.

Saqui-Salces, M., Huang, Z., Vila, M. F., Li, J., Mielke, J. A. A., Urriola, P. E. E. 2017. Modulation of intestinal cell differentiation in growing pigs is dependent on the fiber source in the diet. *J Anim Sci. American Society of Animal Science*. 95: 1179–1190.

Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., Black, R. E. 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(6), 374–382.

Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C., Dinarello, C. A. 1990. Correlations and interactions in the production of Interleukin-6 (IL-6), IL-1 and Tumor Necrosis Factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*; 75 40–47.

Schrezenmeir, J., De Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics—approaching a definition. *Am J Clin Nutr*; 73:361S–364S.

Shan, Y. S., et al. 2014. Suppression of mucin 2 promotes interleukin-6 secretion and tumor growth in an orthotopic immune-competent colon cancer animal model. *Oncology Reports*, 32, 2335–2342. doi: 10.3892/or.2014.3544.

Shimada, T., Hoshi, T. 1987. Role of Na⁺/H⁺ antiport in intracellular pH regulation by rabbit enterocytes. *Biochim Biophys Acta* 901: 265-272.

Shroff, K. E, Meslin, K., Cebra, J. J. 1995. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun*; 63:3904-13.

Skjolaas, K. A., Burkey, T. E., Dritz, S. S., Minton, J. E. 2007. Effects of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, or serovar Choleraesuis, *Lactobacillus reuteri* and *Bacillus licheniformis* on chemokine and cytokine expression in the swine jejunal epithelial cell line, IPEC-J2. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115, 299–308

Smiricky-Tjardes, M. R., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Fahey, G. C. 2003. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. *J Anim Sci.* 81: 2535-2545.

Smith, M. W., Meyer, G., James, P. S., Cremaschi, P. 1989. Cellular aspects of intestinal adaptation. In: Smith, M. W., Sepúlveda, F. V. editors. *Adaptation and development of gastrointestinal function*: 64-75.

- Smith, M. W. 1984. Effect of postnatal development and weaning upon the capacity of pig intestinal villi to transport alanine. *J Agric Sci Camb*; 102:625-633.6.
- Smith, M. W., Jarvis, L. G. 1978. Growth and cell replacement in the newborn pig intestine. *Proceedings of the Royal Society of London*; 203B:69-89.
- Sougioultzis, S., Simeonidis, S., Bhaskar, K. R., Chen, X., Anton, P. M., Keates, S., Pothoulakis, C., Kelly, C. N. 2006. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 343(1):69-76
- Souza, C. G., De Mattos, O., Severoc, C. 2013. Infección por *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Iberoam Micol*. 2013;30(3):205-208
- Spurlock, M. E. 1997 Regulation of metabolism and growth during immune challenge: An overview of cytokine function. *J Anim Sci*. 75:1773-1783
- Stack, H. M., Kearney, N., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. 2010. Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*. 500-507.
- Stein-Streilein, J., Sonoda, K. H., Faunce, D., Zhang-Hoover, J. 2000. Regulation of adaptive immune responses by innate cells expressing NK markers and antigen transporting macrophages. *J Leukoc Biol*; 67:488- 94.
- Szmulowicz, U., Hull, T. 2011. Colonic physiology. *The ASCRS textbook of colon and rectal surgery*. 2nd ed. Editors Springer. New York. 946 p. 23-29 pp
- Takahashi, S., Yoshida, Y., Nakanishi, N., Tsukahara, T., Ushida, K. 2008. Quantitative real-time PCR monitoring of *Escherichia Coli* and *Clostridium perfringens* with oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain Lq 80 to weaning piglets. *J Anim Sci*; 79:737-744.

Tasteyre, A., Barc, M. C., Karjalainen, T., Bourlioux, P., Collignon, A. 2002. Inhibition of in vitro cell adherence of *Clostridium difficile* by *Saccharomyces boulardii*. *Microb. Pathog*, 32, 219-225.

Tormo, C. T. 2006. Probióticos concepto y mecanismo de acción. *An Pediatr. An Pediatr Monogr*; 4:30-41

Torres, Y. R., Berlink, R. G. S., Nascimento, G. G. F., Fortier, S. C., Pessoa, C., Moraes, M. O. 2002. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicon* 40: 885-891.

Torres, C., Reguera J. A., San Martín M. J., Pérez-Díaz J. C., Baquero F. 1994. Van A-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in sewage. *J Antimicrob Chemother*, 33, 553-561.

Tracey, K. J., Cerami, A. 1993 Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol.* 9:317–343.

Ulevitch, R. J., Tobias, P. S. 1995. Receptor-dependent mechanism of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*; 13:437-57.

Ulich, T. R., Yin, S., Guo, Yi, K. E. S., Remick, D., Del Castillo, J. 1991. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. *Am. J. Pathol.* 138: 1097–1101

Vandenbergh, P. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.*12, 221-238

Van Beers-Schreus, H. M. G., Nabuurs, M. J. A., Vellenga, L., Kalsbeek-van der Valk, H. J., Wensing T., Breukink, H. J.1998. Weaning and the weanling diet influence the villousheight and cript depth in the small intestine of pigs andalter the

concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *J. Nutr.* 128: 947.

Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., Jespersen, L. 2005. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Inter. J. Food Microbiol.* 101: 29-39.

Van der Klis, J. D., Jansman, A. J. M. 2002. Optimising nutrient digestion, absorption and gut barrier function in monogastrics: reality or illusion. *Nutrition and health of the gastrointestinal tract.* Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands. 195 p. pp. 15–36

Velasco, J. L. F., Moreno E. E. C., Ramírez M. C., Vara I. A. D. 2006. Alimentos funcionales para cerdos al destete. *Vet Méx;* 37:117–136.

Vente-Spreeuwenberg, M. A. M., Verdonk, J. M. A. J., Verstegen, M. W. A., Beynen, A. C. 2003. Villus height and gut development in weaned piglets receiving diets containing either glucose, lactose or starch. *Br. J. Nutr.* 90:907.

Verstegen, M. W. A., Williams, B. A. 2002. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. *Anim Biotechnol;* 13:113–127.

Vigors S., O'Doherty J. V., Kelly, A. K., O'Shea, C. J., Sweeney, T. 2016. The effect of divergence in feed efficiency on the intestinal microbiota and the intestinal immune response in both unchallenged and lipopolysaccharide challenged ileal and colonic explants. *PLoS One* 11:e0148145.

Vimala, Y., Dileep, P. 2006. Some aspects of probiotics. *Ind. J of Microbiol.*, 46, 1-7.

Walker, W. A. 2008. Mechanism of action of probiotics. *Clin. Infect. Diseases* 46:S86-91.

Wang, S., Wang, B., He, H., Sun, A., Guo, C. 2018. A new set of reference housekeeping genes for the normalization RT-qPCR data from the intestine of piglets during weaning. PLoS One 13:e0204583.

Wang, L., Cao, H., Liu, L., Wang, B., Walker, W. A., Acra, S. A., Yan, F. 2014. Activation of epidermal growth factor receptor mediates mucin production stimulated by p40, a Lactobacillus rhamnosus GG-derived protein. J Biol Chem. 289(29):20234-44.

Wellock, I. J., Houdijk, J. G. M., Miller, A. C., Gill, B. P., Kyriazakis, I. 2009. The effect of weaner diet protein content and diet quality on the long-term performance of pigs to slaughter. J Anim Sci; 87:1261–1269.

Wellock, I. J.; Fortomaris, P. D.; Houdijk, J. G. M.; Kyriazakis, I., 2008a: Effects of dietary protein supply, weaning age and experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection on newly weaned pigs: health. Animal 2, 834–842.

Wenzl, E., Sjaastad, M. D., Weintraub, W. H., Machen, T. E. 1989. Intracellular pH regulation in IEC-6 cells, a cryptlike intestinal cell line. Am J Physiol 257: G732-G740.

Whittmore, C. T. 1996. Cambios en el crecimiento y en la composición corporal de los cerdos. En: Ciencia y práctica de la producción porcina. Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 49-81.

Widdowson, E. M. 1985. Development of the digestive system: comparative animal studies. Am J Clin Nutr. 41, 384–390.

Wijtten, P. J. A., Van Der Meulen, J., Verstegen, M. W. A. 2011. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. Br J Nutr; 105:967-981.

Williams, B. A., Bosch, M. W., Awati, A., Konstantinov, S. R., Smidt, H., Akkermans, A. D. L., Verstegen, M. W. A., Tamminga, S. 2005. In vitro assessment

of gastrointestinal tract (GIT) fermentation in pigs: Fermentable substrates and microbial activity. *Anim Res.* 54: 191-201.

Williams, B. A., Verstegen, M. W. A., Tamminga, S. 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutr Res Rev.* 14: 207-227.

Williams, D. L., Mueller, A., Browder, W. 1996. Glucan-based macrophage stimulators. *Clin. Immunother.* 5, 392–399.

Windey K., De Preter V. Y., y Verbeke Z. 2012. Protein fermentation to gut health. *Mol Nutr Food Res* 56: 184-196.

Xu, R. J., Mellor, D. J., Tungthanathanich, P., Birtles, M. J., Reynolds, G. W., Simpson, H. V. 1992. Growth and morphological changes in the small and the large intestine in piglets during the first three days after birth. *J Dev Physiol.* 18:161-172.

Yen, J. T. 2002. Anatomy of the Digestive System and Nutritional Physiology. In: Lewis A.J. and L.L. Southern(Ed.). *Swine Nutrition.* 2nd ed. Washington, DC. USA.. p 31.

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. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 141: 133-138.

Zhang, Y., Suankratay, C., Zhang, X. H., Lint, T. F., Gewurz, H. 1999. Lysis via the lectin pathway of complement activation: minireview and lectin pathway enhancement of endotoxininitiated hemolysis. *Immunopharmacology;* 42:81 - 90.