



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Doctorado en Ciencias Biológicas

**CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA INICIADORA Y SUS  
EFECTOS SOBRE LA ECOFISIOLOGÍA INTESTINAL DE LECHONES  
RECIÉN DESTETADOS**

Opción de titulación  
**Tesis o Publicación de artículos**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

**Presenta:**  
M en C Konisgmar Escobar García

Dirigido por:  
Tércia Cesária Reis de Souza

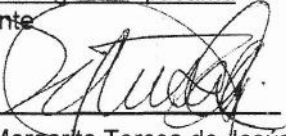
Tércia Cesária Reis de Souza  
Presidente

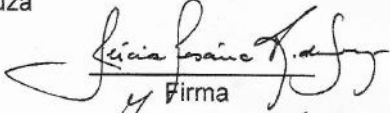
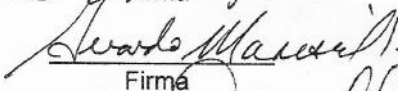
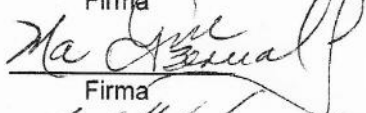


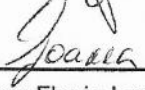
Gerardo Mariscal Landín  
Secretario

María Guadalupe Bernal Santos  
Vocal

Araceli Aguilera Barreyro  
Suplente

Gabriela Aguilar Tipacamú  
Suplente

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Margarita Teresa de Jesús  
García Gasca  
Director de la Facultad

  
\_\_\_\_\_  
Firma  
  
\_\_\_\_\_  
Firma  
  
\_\_\_\_\_  
Firma  
  
\_\_\_\_\_  
Firma  
  
\_\_\_\_\_  
Firma  
  
\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca  
Piña  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Agosto 2015

## RESUMEN

Los lechones recién destetados son susceptibles a los problemas generados por el cambio de alimento, debido a la prohibición del uso de antibióticos en sus dietas, por lo que es necesario la búsqueda de alternativas. Este trabajo evaluó el efecto del nivel de proteína dietética y la presencia de antibióticos y/o probióticos sobre la ecofisiología y la salud gastrointestinal y el comportamiento productivo de los lechones recién destetados. Se realizaron dos experimentos, el primero utilizando tres dietas: 1) alta en proteína (20%) con antibióticos (APa), 2) alta en proteína (20%) sin antibióticos (AP) y 3) baja en proteína (16%) sin antibióticos (BP). En el segundo se utilizaron tres dietas experimentales: 1) alta en proteína con antibiótico (APa), 2) alta en proteína sin antibióticos (AP), 3) baja en proteína con probióticos (BPpb). En ambos experimentos se evaluó el comportamiento productivo, la fermentación gastrointestinal, el peso de órganos digestivos, el pH de los diferentes compartimientos intestinales, la secreción de mucinas, la morfología de las vellosidades intestinales y la incidencia y la severidad de las diarreas posdestete. La dieta APa limitó el desarrollo de la microbiota intestinal, favoreciendo la producción de ácidos grasos de cadena corta, controlando la severidad de las diarreas posdestete. La dieta AP incrementó la incidencia y severidad de las diarreas. La dieta BP promovió la producción de ácidos grasos de cadena corta y disminuyó los ácidos grasos de cadena ramificada y amonio ( $P < 0.05$ ), mejorando el medio ambiente intestinal con una mayor recuperación de su epitelio, disminuyendo la severidad de las diarreas posdestete ( $P < 0.05$ ). En el primer experimento, el cambio de los componentes dietéticos no tuvo un efecto significativo ni sobre el crecimiento de los animales, ni sobre su consumo de alimento ( $P > 0.05$ ). En el segundo experimento hubo una mayor producción de ácidos grasos de cadena corta, observándose una menor incidencia y severidad de las diarreas posdestete ( $P < 0.05$ ), además el comportamiento productivo de los animales que consumieron la dieta BPpb equipararon a los de la dieta APa. La disminución de la proteína dietética y la inclusión de probióticos influyen el medio ambiente intestinal favoreciendo la producción de ácidos grasos de cadena corta, disminuyendo la incidencia y la severidad de las diarreas posdestete, mejorando la salud intestinal y su productividad.

**(Palabras clave:** Lechones, fermentación, nivel proteico, diarrea, comportamiento productivo).

## **ABSTRACT**

The newly weaned piglets are more susceptible to problems caused by changes in dietary components, because the ban of antibiotics in its diets. This study evaluate the effect of protein level and the presence of antibiotics and/or probiotics on gastrointestinal health and eco-physiology and growth performance of weaned piglets. Two experiments were conducted. The first using three diets: 1) high crude protein diet (20%) with antibiotics (APa), 2) high crude protein diet (20%) without antibiotics (AP), and 3) low crude protein diet (16%) without antibiotics (BP). In the second experiment three experimental diets were used: 1) high crude protein diet (20%) with antibiotics (APa), 2) high crude protein diet (20%) without antibiotics (AP), and 3) low crude protein diet (16%) without antibiotics and with probiotics (BPpb). In both experiments performance, gastrointestinal fermentation, digestive organ weight, pH of intestinal compartments, mucin secretion, morphology of the intestinal villi and incidence and severity of post-weaning diarrhea was evaluated. In the first experiment APa diet decreased bacterial fermentation favoring production of short chain fatty acids, decreasing the severity of post-weaning diarrhea. The HP diet causing a higher incidence and severity of diarrhea. BP diet promoted the production of short chain fatty acids and decreased production of branched chain fatty acids and ammonia which was reflected in the improvement in intestinal environment with a greater recovery of gastrointestinal epithelium, which decreased the severity of post-weaning diarrhea. Performance, in the first experiment, was not affected by dietary components. In the second experiment, when probiotics were included in low protein diet, there was an increase on short chain fatty acids production and an important reduction on branched chain fatty acids, which was reflected in a lower incidence and severity of post-weaning diarrhea, besides the productive performance of animals this diet consumed equated to those of animals fed the high protein diet with antibiotic. With these observations it can be concluded that decreased dietary protein and including probiotics into the diet, influences the intestinal environment favoring an increase in short chain fatty acids production, improving intestinal health of animals, reducing the incidence and severity of post-weaning diarrhea, improving productivity.

**(Keywords:** Piglets, fermentation, protein level, diarrhea, performance)

## **DEDICATORIA**

Este trabajo va dedicado a mis hijos por darme una de las felicidades más grandes de mi vida, a mis padres por inculcar en mi el deseo de lucha y la responsabilidad y a Samantha por ofrecerme la luz para rehacer mi vida y por convertirse en mi todo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al equipo de trabajo del laboratorio de nutrición animal, y del cuerpo académico de morfofisiología y nutrición animal, por la ayuda brindada en mis experimentos y trabajo de laboratorio, a mis alumnos de licenciatura que cada vez me permiten aprender más. Especialmente quisiera agradecer a la Dra Tércia que a través de estos años has sido casi una madre para mí, porque siempre ha estado en los momentos más difíciles prestándome su apoyo incondicional, es algo que nunca voy a olvidar.

Agradezco a CONACyT por el apoyo brindado tanto desde el proyecto de ciencia básica con el cual se financió parte del trabajo, como por la beca que me fue asignada.

## ÍNDICE GENERAL

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	lii
Agradecimientos	iv
Índice general	v
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
2.1. Microbiota intestinal	3
2.1.1. Establecimiento de la microbiota en lechones	7
2.2. La microbiota y la fisiología gastrointestinal	10
2.3. Microbiota y el sistema inmune	13
2.4. Dieta, microbiota y productos microbianos	16
2.4.1. Proteína dietética	16
2.4.2. Carbohidratos	23
2.4.2.1. Carbohidratos de reserva	23
2.4.2.2. Carbohidratos estructurales o polisacáridos no amiláceos	23
2.4.3. Lípidos	29
2.5. Problemática del uso de antibióticos en alimentos para animales y alternativas propuesta para evitar su utilización	30
2.5.1. Nivel de proteína dietética	31
2.5.2. Uso de carbohidratos fermentables	33
2.5.3. Uso de aditivos	36
2.5.3.1. Prebióticos	36
2.5.3.2. Probióticos	38
2.5.3.3. Simbióticos	39
2.5.3.4. Acidificantes	40
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>47</b>
3.1. Objetivos particulares	47

<b>4. LITERATURA CITADA</b>	<b>47</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>65</b>
<b>6. Capítulo 1: MICROBIAL FERMENTATION PATTERNS, DIARRHEA INCIDENCE, AND PERFORMANCE IN WEANED PIGLETS FED A LOW PROTEIN DIET</b>	<b>66</b>
<b>7. Capítulo 2: DIETARY PROTEIN LEVELS ALTER MICROBIAL FERMENTATION PATTERNS IN INTESTINES OF WEANED PIGLETS</b>	<b>67</b>
<b>8. Capítulo 3: MORPHO-PHYSIOLOGY OF INTESTINAL TRACT OF NEWLY WEANED PIGLETS CAN BE ALTERED AS RESPONSE TO STARTER DIET COMPONENTS</b>	<b>68</b>
<b>9. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>81</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
Cuadro 1. Metabolitos formados a partir de la fermentación bacteriana de los aminoácidos a nivel intestinal.	19
Cuadro 2. Efecto del nivel de proteína dietética sobre el comportamiento productivo de lechones entre la 3 y la 5 semana posdestete (Adaptado Hermes <i>et al.</i> , 2009).	33
Cuadro 3. Efecto del nivel de proteína sobre el comportamiento productivo y la severidad de las diarreas en lechones recién destetados desafiados con E. coli enterotoxigénica K88 (adaptado de Opapeju <i>et al.</i> , 2009).	35
Cuadro 4. Efecto del tipo de cereal y en nivel de fibra de la dieta de lechones sobre el comportamiento productivo, la fermentación intestinal y la cantidad de enterococos y coliformes (Adaptado de Hermes <i>et al.</i> , 2010)	36
Cuadro 5. Efecto de los diferentes acidificantes y sus niveles de inclusión sobre el pH del contenido gástrico (adaptado de Kil <i>et al.</i> , 2011).	42
Cuadro 6. Efecto de la adición de ácido fórmico sobre los conteos <sup>1</sup> bacterianos en las diferentes porciones intestinales de lechones recién destetados (adaptado de Roth y Kirchgessner, 1998).	43



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Factores que influncian la dinámica y el establecimiento de la microbiota intestinal (adaptado de Serikov <i>et al.</i> , 2010).	5
Figura 2. Variaciones en la composición y número de la población bacteriana a lo largo del tracto gastrointestinal (adaptado de Serikov <i>et al.</i> , 2010).	6
Figura 3. Diferencias entre la microbiota presente en la luz intestinal y la asociada a la capa mucosa (adaptado de Serikov <i>et al.</i> , 2010).	7
Figura 4. Evolución de la microflora aeróbica y anaeróbica fecal de lechones desde el nacimiento hasta los 5 días de vida (adaptado de Swords <i>et al.</i> , 1993).	8
Figura 5. Síntesis de ácidos grasos ramificados por parte de las bacterias (adaptado Vlaeminck <i>et al.</i> , 2006).	19
Figura 6. Ruta de la fermentación de tirosina, fenilalanina y triptófano (adaptado de Windey <i>et al.</i> , 2012).	20
Figura 7. Vía de síntesis del sulfuro de hidrógeno (H <sub>2</sub> S) (adaptado de Caliendo <i>et al.</i> , 2010).	20
Figura 8. Vía para la biosíntesis de putrescina, agmatina, espermidina y espermina (adaptado Tabor y Tabor, 1985).	22
Figura 9. Rutas de degradación de carbohidratos complejos a glucosa y productos finales de su a partir de piruvato (Adaptado van Soest, 1994; Pommerville, 2011).	28
Figura 10. Factores involucrados en la secreción de GLP2 por parte de las células L intestinales (Burrin <i>et al.</i> , 2001).	29
Figura 11. Efecto del día posdestete sobre las concentraciones de <i>Lactobacillus</i> y <i>Coliformes</i> en contenidos ileales de lechones recién destetados (adaptado de Mathew <i>et al.</i> , 1996).	44

## 1. INTRODUCCIÓN

En la última década ha crecido la preocupación por el desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte de una gran cantidad de patógenos, tanto ha sido el impacto de dicha situación que en enero de 2006 se declaró la prohibición total del uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la Unión Económica Europea y en los Estados Unidos de América (Opapeju *et al.*, 2009). Desde dicha prohibición se observó un incremento en el desarrollo de las diarreas posdestete, debido a que el destete es una fase crítica en el desarrollo de un cerdo, caracterizada por un estrés nutricional debido al cambio de las condiciones de vida de los animales, cuyo principal impacto lo tiene el cambio de dieta (Bikker *et al* 2007). A partir de la prohibición del uso de antibióticos en las dietas para animales se han realizado muchos esfuerzos encaminados a la búsqueda de alternativas o estrategias de reemplazo para evitar el desarrollo de enfermedades entéricas de origen bacteriano y de esta forma mantener el crecimiento de los cerdos en un rango ideal (Guay *et al.*, 2006; Wellock *et al.*, 2006). Aplicando el mismo principio que se tuvo en cuenta en el momento de incluir el antibiótico en las dietas como promotores de crecimiento, uno de los principales objetivos en la búsqueda de alternativas es la modulación de la microbiota autóctona intestinal, de la cual se sabe que una vez establecida genera microambientes ideales con lo cual se establecería un ecosistema gastrointestinal que favorecería la presencia de bacterias “benéficas” que eviten la proliferación de bacterias potencialmente patógenas, lo que beneficiaría la salud intestinal (Gong *et al.*, 2003) .

El medio ambiente intestinal es un ecosistema complejo y dinámico que cambia en función de las influencias provenientes del exterior, en ese sentido los componentes dietéticos son fundamentales en el establecimiento del ecosistema intestinal y en la modulación del medio ambiente intestinal (Franklin *et al.*, 2002; Serikov *et al.*, 2010). Uno de los componentes dietéticos más estudiados es la proteína. Varias investigaciones han demostrado que su disminución en la dieta ayuda a establecer una flora intestinal benéfica y a desarrollar un medio ambiente intestinal saludable (Williams *et al.*, 2005; Stein y Kil, 2006). Esta premisa es muy importante cuando se

trata de lechones recién destetados, debido a que estos al momento del destete presentan un tracto gastrointestinal poco desarrollado (inmaduro), con una actividad enzimática incipiente haciendo que la proteína dietética sea deficientemente digerida. Lo anterior permite la presencia de remanentes ricos en proteína parcialmente digeridos en la luz intestinal, los cuales son aprovechados por los microbios gastrointestinales como sustrato (Lallès *et al.*, 2007). Los principales productos de la fermentación microbiana de dichos remanentes son ácidos grasos volátiles de cadena ramificada, amonio y ácido sulfhídrico (Windey *et al.*, 2012). Estos metabolitos son potencialmente tóxicos para la mucosa intestinal causando incrementos del pH intracelular, irritación de la mucosa, muerte celular, entre otras consecuencias, las cuales se ven reflejadas en el desarrollo de diarreas posdestete (Stein y Kil *et al.*, 2006). La reducción de la cantidad de proteína en la dieta hace que disminuya su fermentación y consecuentemente la producción de los metabolitos tóxicos, con lo que se controlaría el daño sobre la mucosa intestinal y con ello las diarreas posdestete (Hermes *et al.*, 2009). La mayoría de los estudios realizados al respecto se han enfocado a las mediciones zootécnicas (ganancia diaria de peso, consumo diario de alimento y eficiencia alimenticia), pero no al efecto de una baja cantidad de proteína en la dieta sobre el medio ambiente intestinal (Wellock *et al.*, 2006).

Otra de las alternativas estudiadas para establecer un mejor ambiente intestinal, es la adición de probióticos a la dieta. Los probióticos se definen como cultivos de microorganismos vivos que se ofrecen en la dieta y que son capaces de sobrevivir al medio ambiente gastrointestinal y establecer colonias (Walker, 2008). Los efectos de los probióticos sobre el tracto gastrointestinal incluyen la generación de un medio ambiente favorable para las bacterias “benéficas” y desfavorable para las potencialmente patógenas, a través de la disminución del pH del contenido gastrointestinal, desarrollo y mantenimiento de un sistema inmune gastrointestinal que permanezca alerta para que reaccione de manera adecuada a las incursiones de bacterias patógenas y la producción de sustancias antimicrobianas denominadas

bacteriocinas que funcionan de manera similar a los antibióticos (Alexopoulos *et al.*, 2004).

Teniendo como base lo anterior, el presente estudio pretende evaluar el efecto de los componentes dietéticos utilizando dietas con diferentes niveles de proteína (alto y bajo) y adicionando antibiótico o probióticos a las mismas sobre los principales componentes del medio ambiente intestinal: la población bacteriana, la producción de metabolitos bacterianos (ácidos grasos volátiles, ácidos grasos de cadena ramificada, ácido láctico y amonio) y la producción de moco (mucinas). Además, evaluar el efecto de dichos componentes sobre la morfofisiología gastrointestinal, la generación de diarreas y el comportamiento productivo de los lechones recién destetados.

## **2. ANTECEDENTES**

El medio ambiente intestinal está determinado por el ecosistema que se genera por la interacción de una gran cantidad de factores:

- Microbiota intestinal y sus metabolitos.
- Mucosa gastrointestinal:
  - Secreciones digestivas (moco, enzimas, componentes alcalinos y ácidos que generan su pH).
  - Sistema inmune.
- Composición de la dieta consumida.

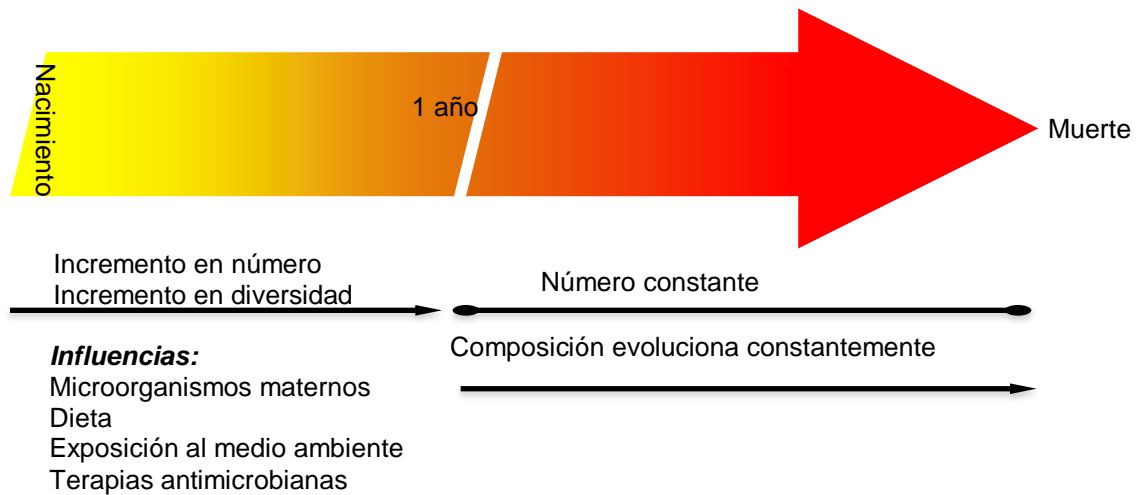
Estos factores se encuentran en un equilibrio muy delicado y cualquier influencia externa que lo altere, afecta la fisiología gastrointestinal, reflejándose en alteraciones que terminan con la presencia de diarrea.

### ***2.1 Microbiota intestinal***

El establecimiento de la microflora intestinal del cerdo, al igual que en otros mamíferos, es un proceso complejo que involucra diferentes fases.

a) Una primera fase es la de colonización inicial ocurre durante el nacimiento, cuando el intestino de los animales recién nacidos es rápidamente invadido por bacterias provenientes de la madre en el momento mismo de su paso por el canal vaginal. Varios estudios indican que la microbiota del tracto genital de las madres está compuesto principalmente por bacterias pertenecientes al grupo *Lactobacillus/Leuconostoc/Pediococcus* (Redondo-López *et al.*, 1990). Mändar y Mikelsaar (1996) realizaron un estudio en donde se comparó la microbiota de recién nacidos con la microbiota vaginal de sus madres y demostraron que ambas poblaciones eran similares.

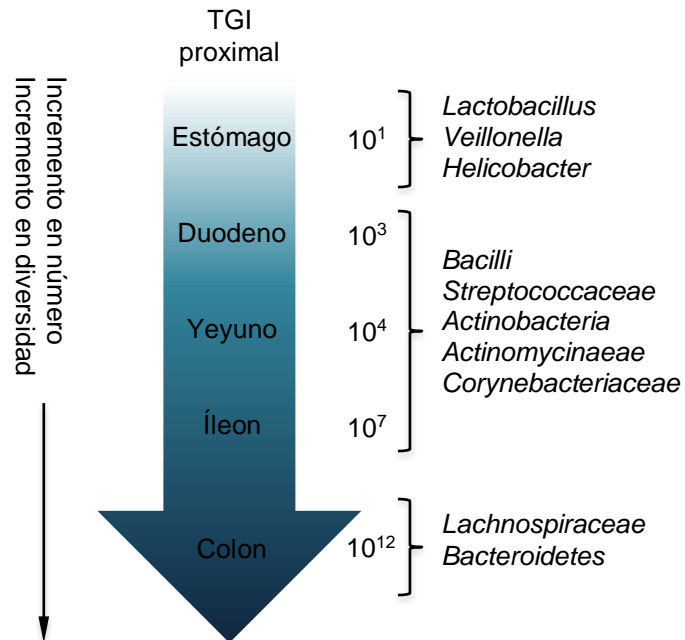
b) Una vez que se da la colonización o el establecimiento inicial, sigue una fase de dominación, en la cual diversos grupos se vuelven predominantes (Mackie *et al.*, 1999). Durante la dominación la composición microbiana intestinal de los mamíferos en general es relativamente simple y varía entre los individuos y a lo largo del tiempo, incrementándose en número y diversidad. Las poblaciones microbianas intestinales se ven influenciadas por otros factores que determinan el tipo de microbiota que se encuentra en el tracto gastrointestinal (TGI) como la dieta, la exposición al medio ambiente y las terapias antimicrobianas. Una vez establecida, la composición de la microbiota intestinal evoluciona constantemente, pero el número de bacterias de acuerdo a la porción intestinal no cambia (Figura 1) (Serikov *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Factores que influyen la dinámica y el establecimiento de la microbiota intestinal (adaptado de Serikov *et al.*, 2010).

El número de bacterias oscila entre  $10^1$  a  $10^3$  bacterias·g<sup>-1</sup> de contenido en estómago y duodeno, entre  $10^4$  y  $10^7$  bacterias·g<sup>-1</sup> en el yeyuno e íleon, y entre  $10^{11}$  y  $10^{12}$  bacterias·g<sup>-1</sup> en el colon (Figura 2) (O'Hara y Shanahan, 2007; Serikov *et al.*, 2010). Entre las diferentes porciones intestinales la cantidad de bacterias incrementa conforme haya menor cantidad de oxígeno (Figura 2) (Pryde *et al.*, 1999; Leser *et al.*, 2002; Furet *et al.*, 2009; Serikov *et al.*, 2010).

Existen grandes diferencias en la composición de la microbiota presente en la luz intestinal (contenido intestinal) y la que se encuentra asociada al epitelio (Pryde *et al.*, 1999). El epitelio intestinal se encuentra separado de la luz intestinal por una barrera compuesta por una capa mucosa (mucina), lo cual crea condiciones específicas que permiten el establecimiento o la discriminación de la microbiota presente (Figura 3) (Pryde *et al.*, 1999; Zoetendal *et al.*, 2004; Serikov *et al.*, 2010).



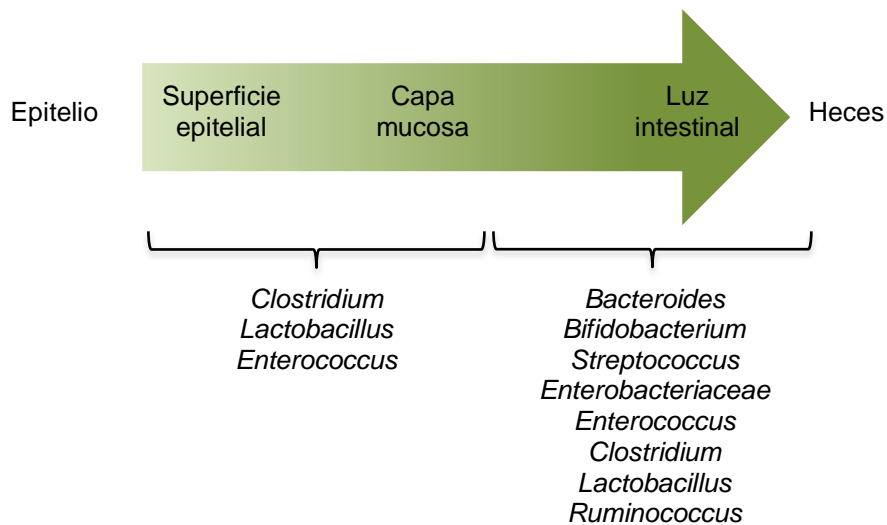
**Figura 2.** Variaciones en la composición y número de la población bacteriana a lo largo del tracto gastrointestinal (adaptado de Serikov *et al.*, 2010).

c) Las poblaciones bacterianas por lo general deben ser estables en tamaño y presencia a lo largo del tiempo (fase de estabilización) con el objetivo de estabilizar el ecosistema intestinal y poder generar un perfil que vaya en concordancia con el hospedero, pues es una relación que requiere una constante interacción para poder ser benéfica en ambos sentidos (Serikov *et al.*, 2010). La estabilización de la población bacteriana a en la luz intestinal, implica una alta tasa de división celular, la necesaria para exceder la tasa de salida de estas del tracto gastrointestinal, debido al tránsito normal como consecuencia de la motilidad del órgano (Mackie *et al.*, 1999). En el caso de las bacterias asociadas a la pared gastrointestinal, la capacidad de adhesión de los microorganismos es fundamental para estabilizar este tipo de poblaciones bacterianas (Pryde *et al.*, 1999).

En el proceso de colonización tanto de la luz intestinal, como de las paredes intestinales intervienen muchos factores inherentes al huésped y a las bacterias, dentro de estos factores se encuentran:

- Estado inmunitario del hospedero.

- Presencia de receptores específicos para permitir la adhesión bacteriana.
- Composición y características de la dieta.
- Disponibilidad de nutrientes.
- Tasa de paso de la digesta
- pH del contenido intestinal.
- Presencia o no de oxígeno.
- Potencial de óxido reducción.



**Figura 3.** Diferencias entre la microbiota presente en la luz intestinal y la asociada a la capa mucosa (adaptado de Serikov *et al.*, 2010).

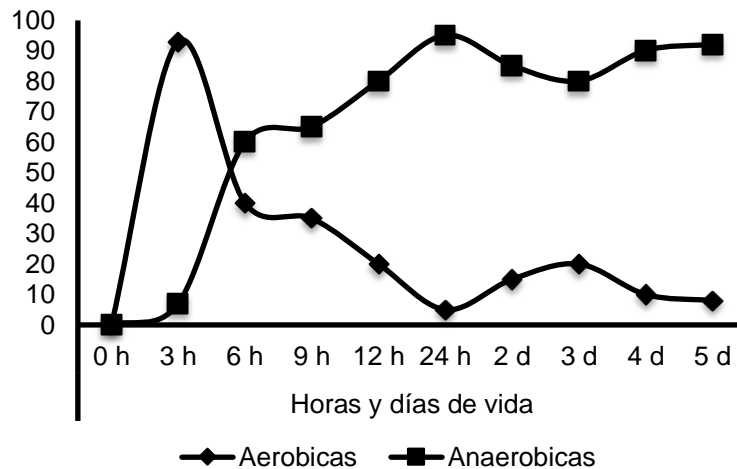
Cada uno de estos factores determina el perfil bacteriano que se establecerá en un nicho específico, bien sea a lo largo (porción intestinal), o a lo ancho (luz intestinal o pared intestinal del TGI (Pryde *et al.*, 1999; Zoetendal *et al.*, 2004; Louis y Flint, 2009; Serikov *et al.*, 2010).

### 2.1.1 Establecimiento de la microbiota en lechones

Particularmente el lechón tiene ciertas características que lo hacen un organismo con una diversidad bacteriana muy cambiante. Según diferentes autores, el establecimiento de la flora intestinal en los lechones, al igual que los demás mamíferos, es un proceso largo y complejo que cuenta con las tres fases principales:



Fase 1 de colonización: corresponde a la primera semana de vida. Durante esta fase el tracto gastrointestinal del lechón es colonizado por bacterias de la madre y del medio ambiente que son aerobias y anaerobias facultativas. Estas bacterias llegan a comprender el 80% de la flora total en las 3 primeras horas de vida. Estos primeros colonizadores modifican el medio ambiente intestinal, consumiendo el oxígeno presente y disminuyendo el potencial de reducción, lo cual favorece el establecimiento de la flora anaeróbica (Figura 4) (Swords *et al.*, 1993; Bjerre *et al.*, 2000; Furet *et al.*, 2009; Louis y Flint, 2009).



**Figura 4.** Evolución de la microflora aeróbica y anaeróbica fecal de lechones desde el nacimiento hasta los 5 días de vida (adaptado de Swords *et al.*, 1993).

Fase 2, estabilización: corresponde al periodo entre la segunda semana de vida y el destete. Durante este periodo la microbiota intestinal se mantiene relativamente estable, mientras las condiciones de vida de los lechones no cambien y sigan recibiendo leche materna. A pesar de lo anterior la diversidad de las bacterias anaeróbicas incrementa durante este periodo y la suplantación de las bacterias aeróbicas por parte de las anaeróbicas está casi completa. Como es lógico, las bacterias predominantes son aquellas que pueden utilizar como sustrato los componentes de la leche materna (principalmente la lactosa), por lo que las bacterias pertenecientes al grupo de los *Lactobacillus* y *Streptococcus* son los predominantes (Jensen, 1998; Mathew *et al.*, 1998; Furet *et al.*, 2009).

Fase 3, adaptación: corresponde al periodo entre el destete y la adaptación a la dieta sólida. Este periodo dura aproximadamente 2 a 3 semanas. El destete implica ciertos cambios en la vida del lechón de los cuales el más importante y radical es la alimentación (Hetty *et al.*, 1998; Manzanilla *et al.*, 2004; Kil *et al.*, 2011). Como resultado de esto los lechones entran en un periodo corto de anorexia, durante el cual sufren un estrés nutricional que causa profundos cambios en la morfofisiología intestinal. Esto genera problemas gastrointestinales que comprometen la vida y la productividad del lechón (Le Dividich y Herpin, 1994; Pluske *et al.*, 1997; Lallès *et al.*, 2004). Como consecuencia, durante la primera semana posdestete, al disminuir el consumo de alimento por parte del lechón, la microbiota intestinal no cuenta con un suministro constante de sustrato, haciéndola inestable con una notable disminución de la diversidad bacteriana. Dicho período de inestabilidad dura entre 2 y 3 semanas (Jensen, 1998; Inohue *et al.*, 2005).

En ese mismo sentido, varios autores indican que en esta fase (tercera) la colonización bacteriana se caracteriza por una suplantación de las bacterias gram positivas anaeróbicas por miembros de bacterias gram negativas, más específicamente del género *Bacteroides* (Swords *et al.*, 1993; Jensen, 1998; Furet *et al.*, 2009). Otros autores han reportado un descenso significativo en la poblaciones de *Lactobacilos* (una disminución de 100 veces con respecto a los valores observados antes del destete) a la vez que se observa un incremento en la *Enterobacterias* (incrementos de hasta 50 veces con respecto a lo observado antes del destete) (Mathew *et al.*, 1993; Franklin *et al.*, 2002).

Después del establecimiento de la flora bacteriana se da la estabilización de la misma. Esta estabilización en cerdos se establece alrededor de los tres meses de vida, debido a los cambios dietéticos constantes que se observan en las diferentes fases de producción porcina (Franklin *et al.*, 2002).

## **2.2 La microbiota y la fisiología gastrointestinal**

El TGI de los cerdos posee una comunidad compleja, diversa y dinámica de microorganismos no patógenos. Diversos autores, sugieren que entre 500 y 1000 especies de microorganismos colonizan el intestino de un animal adulto, con aproximadamente  $10^{14}$  bacterias, diez veces más la cantidad de células presentes en un organismo mamífero (Franklin *et al.*, 2002; Noverr y Huffnagle, 2004; Pickard *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2003; Furet *et al.*, 2009). Esta conjunción de especies y su interacción forman un ecosistema activo que provee productos esenciales para el hospedero, le permite formar barreras (mucosa e inmunitaria) contra los microorganismos patógenos y juega un papel fundamental en la ecofisiología y morfología del tracto gastrointestinal, llegando a intervenir directamente sobre la modulación de la expresión génica del hospedero (Buddington y Sanguild, 2011).

La microbiota tiene un efecto directo sobre la estructura, la función y la maduración gastrointestinal. Estos efectos han sido ampliamente estudiados en experimentos realizados con animales libres de gérmenes, criados y mantenidos en ambientes completamente estériles, comparándolo con animales similares criados y mantenidos en ambientes convencionales (principalmente, rata, ratones y cerdos), en estos experimentos se han comprobado las diferencias anatómicas, fisiológicas y bioquímicas relacionadas con la microbiota (Inohue *et al.*, 2005; Burkey *et al.*, 2009; Buddington y Sanguild, 2011). Los cambios morfológicos inducidos por la ausencia de microbios en el tracto gastrointestinal van desde una reducción en la masa intestinal, con una disminución del grosor y del largo, hasta un alargamiento del ciego con la presencia de una mucosa muy delgada, debido a una disminución en la celularidad de la lámina propia, la cual contiene muy pocos linfocitos y células mononucleares, lo cual está asociado al bajo estímulo por parte de la microbiota sobre la respuesta inmune (Van Kessel *et al.*, 2004).

En los animales libres de gérmenes, las vellosidades intestinales son más pequeñas y más delgadas y las criptas son menos profundas, como reflejo a una baja mitosis

como consecuencia de una mínima tasa de recambio celular (Buddington y Sangulid, 2011).

La presencia de las diferentes especies microbianas en el TGI también afecta la motilidad. Los animales libres de gérmenes tienen una tasa de paso más lenta (Inohue *et al.*, 2005). Esto ha sido relacionado con los productos de la fermentación microbiana, ya que varios estudios (Stevens y Hume 1998; Williams *et al.*, 2005 Metzler-Zebelli *et al.*, 2010) han demostrado que los productos de la fermentación bacteriana tienen un efecto directo sobre la fisiología humoral y neural, los cuales producen respuestas reflejas y miogénicas. Franklin *et al.* (2002) demostraron que la presencia de *Lactobacillus* afectaba la motilidad gastrointestinal, además Tannock (1999) demostraron que la presencia de ácido láctico incrementaba la motilidad.

Otro de los factores que deben tenerse en cuenta en el establecimiento de un ecosistema gastrointestinal es la interacción entre microorganismos (Leser y Melbak, 2009). El ecosistema gastrointestinal es un ente dinámico que está en constante evolución (Hooper, 2004; Sears, 2005; Roca *et al.*, 2014). En ese sentido la microbiota autóctona cobra un papel preponderante en lo que a la dinámica microbiana gastrointestinal se refiere. La microbiota autóctona impide la colonización por parte de bacterias foráneas (usualmente patógenas) por medio de un proceso que se denomina “resistencia a la colonización”, el cual es una primera línea de defensa de un ecosistema que se encuentra en equilibrio, evitando la proliferación y adhesión de organismos potencialmente patógenos (Wilks, 2007; Davis *et al.*, 2010). Este proceso involucra una serie de mecanismos complejos en los que intervienen tanto las bacterias como el hospedero (Lawley y Walker, 2012). El hospedero contribuye a la resistencia a la colonización con factores como: el peristaltismo, la secreción de diferentes tipos de enzimas digestivas y electrolitos, la secreción de moco, la descamación de células epiteliales, los tejidos linfoides asociados al tracto gastrointestinal y la inmunoglobulina A secretoria (Spees *et al.*, 2013). Las bacterias autóctonas, por su parte, evitan la colonización de especies

foráneas por medio de la competencia por los receptores epiteliales y por los nutrientes presentes a nivel intestinal, también produciendo compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas y metabolizando nutrientes con la finalidad de crear un ambiente desfavorable para el crecimiento de patógenos (Falk *et al.*, 1998; Garret *et al.*, 2010; Looft *et al.*, 2012). También es importante considerar que la capacidad microbiana para reconocer y adherirse a los receptores es uno de los factores que determinan la composición de la microbiota especialmente en el intestino delgado (Mackie *et al.*, 1999; Zoetendal *et al.*, 2004; Raubenheimer *et al.*, 2012). La microbiota tiene la capacidad de seleccionarse a sí misma por medio de actividades antagonistas entre sus componentes (comensales vs patógenos), por medio de la capacidad de modular el sistema inmune del hospedero y también por la capacidad de mejorar y de curar la mucosa gastrointestinal dañada (Richards *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2006; Lessard *et al.*, 2009; Walker, 2008).

Actualmente se utiliza el término microbioma, el cual se define como el conjunto del total de microorganismos y su material genético presente en un organismo que tiene una influencia sobre el genoma de hospedero (Inohue *et al.*, 2005; Buddington y Sanguild, 2011). Para los microbios intestinales estas relaciones son importantes porque en el trato gastrointestinal se generan nichos específicos en los cuales las bacterias pueden desarrollarse (Duncan *et al.*, 2002; Inohue *et al.*, 2005). Esto es lo que realmente se denomina como mutualismo, que se define como una interacción biológica entre individuos de diferentes especies en donde ambos se benefician y mejoran su aptitud biológica (Boucher *et al.*, 1984; Darveau *et al.*, 2003). La modulación genética de los receptores por parte de los microorganismos del hospedero es uno de los factores que están involucrados en el establecimiento del perfil de la microbiota autóctona. Estudios recientes sugieren que las células epiteliales del hospedero pueden expresar glucoproteínas específicas en respuesta a la presencia de determinadas bacterias, con la finalidad de que estos glucoconjugados sirvan como sitio de adhesión para que los microorganismos puedan establecerse (Pothoulakis y Lamont, 2001; Walker, 2008; Spees *et al.*, 2013). Esta interacción entre hospedero y microorganismo forma parte de lo que se

denomina “proceso de translocación” (Brown *et al.*, 2006; Richads *et al.*, 2006). Sharma y Shumacher (1995) demostraron que la presencia de determinada microflora influía sobre las proporciones de mucinas sialiladas y sulfatadas, todo por la inducción de la fucosiltransferasa en las células de Goblet (Duerkop *et al.*, 2009; Garret *et al.*, 2010). De esta manera la interacción microbiota-mucosa parece ser el punto clave para el establecimiento de la microbiota autóctona (Hooper, 2004; Leser y Melback, 2009; Spees *et al.*, 2013).

### **2.3. Microbiota y el sistema inmune gastrointestinal**

Una de las principales funciones del sistema inmune es identificar y eliminar patógenos, pero en el caso del sistema inmune gastrointestinal, este tiene la función de conseguir un balance entre la tolerancia (a la dieta y a las bacterias) y la respuesta inmune (Burkey *et al.*, 2009). La superficie mucosa del tracto gastrointestinal, junto con los componentes de la luz intestinal conforman un sistema mediante el cual el organismo del hospedero genera una respuesta, que de acuerdo al desafío será su intensidad (Garret *et al.*, 2010). La gran diversidad de antígenos de origen dietético, así como las diferentes poblaciones bacteriana presentes en la luz intestinal ha permitido el desarrollo de un sistema inmune asociado a la mucosa muy sofisticado (Davis *et al.*, 2010).

Unos de los componentes más importantes del sistema inmune de la mucosa son las células epiteliales intestinales, estas forman una capa que servirá como una barrera anatómica especialmente diseñada para mantener la homeostasis en el tracto gastrointestinal. Dentro de las funciones del sistema inmune de las mucosas está el discriminar efectivamente y responder apropiadamente a los estímulos generados por los microorganismos patógenos y los antígenos dañinos presentes en los alimentos (Goldsby *et al.*, 2003).

Es bien sabido que la microbiota residente en el tracto gastrointestinal afecta la inmunidad del hospedero, toda vez que es la mayor fuente antigénica para el animal, esto es especialmente importante en las etapas tempranas en la vida del animal, ya

que los mamíferos recién nacidos dependen completamente de la transferencia pasiva de anticuerpos maternos a través de la leche materna y normalmente es el caso de los cerdos que desarrollan una inmunidad activa entre las 4 y 7 semanas de edad (Mulder *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014).

El estímulo de los microorganismos comensales es especialmente importante durante las etapas tempranas de la vida, ya que mantiene al sistema inmune en alerta y listo para actuar. Estudios en los que se comparan animales libres de gérmenes con animales convencionales, demostraron que la presencia de microorganismos en el intestino tiene una fuerte influencia sobre la maduración y el desarrollo de la inmunidad sistémica y local (Mulder *et al.*, 2009). Particularmente las bacterias comensales tienen un papel fundamental en el tejido inmune asociado a las mucosas gastrointestinales. En ausencia de microorganismos, los tejidos inmunes asociados a la mucosa gastrointestinal se encuentran atrofiados, produciendo una deficiencia de la inmunidad mediada por células (Duerkop *et al.*, 2009). En los animales libres de gérmenes el número de linfocitos en la lámina propia es bajo, las placas de Peyer y los nódulos linfáticos asociados al tracto gastrointestinal se encuentran atrofiados, la quimiotaxis y la actividad fagocítica de los macrófagos está inhibida, la concentración de inmunoglobulina G está disminuida y no hay producción de inmunoglobulina A (Hooper *et al.*, 2004; Leser *et al.*, 2009).

A pesar de esos efectos tan visibles de los microorganismos sobre la respuesta inmune, los mecanismos exactos por medio de los cuales esto se lleva a cabo no están muy bien dilucidados. De igual manera el mecanismo por medio del cual el sistema inmune no reacciona ante la presencia de las bacterias autóctonas y se vuelve tolerante aún no está completamente comprendido (Duerkop *et al.*, 2009).

Existen muchos factores del hospedero en un sistema inmune saludable que controlan a la comunidad bacteriana presente a nivel intestinal. Dentro de ellos se encuentran la capa mucosa (mucinas), las placas de Peyer, los tejidos linfoides

asociados a la mucosa que contienen folículos con linfocitos B y células T, pero los mecanismos de acción por medio de los cuales este sistema inmune reacciona contra patógenos y tolera o ignora a los comensales no se tiene muy bien establecido. Cera *et al.* (1999) mencionan que la inmunoglobulina A secretoria tiene un papel relevante en el establecimiento de la tolerancia a los microorganismos autóctonos. La inmunoglobulina A promueve la formación de nichos bacterianos, pero también limita la proliferación y la translocación de patógenos (Suzuki *et al.*, 2004). Otro factor importante para entender el desarrollo de la tolerancia es el papel de los receptores, existen un gran repertorio de receptores, los cuales reconocen estructuras altamente conservadas de los microorganismos (patrones moleculares asociados a los patógenos, PAMPs, por su sigla en inglés) (Davis *et al.*, 2010). Existen diferentes tipos de receptores que identifican este tipo de estructuras, dentro de ellos se encuentran los dominios moleculares de unión a los nucleótidos (Nucleotide-binding domain molecules: NODs por su sigla en inglés) y los receptores similares a campanas (Toll-like receptors: TLR por su sigla en inglés). Los TLR2 responden a los peptidoglicanos de las bacterias gram positivas, los TLR4 reconocen a los lipopolisacáridos de las bacterias gram negativas, el ADN bacteriano es reconocido por TLR5 y TLR9. Una vez el receptor recibe una señal de este tipo se monta una respuesta que termina con la producción de péptidos antimicrobianos, citocinas y quimiocinas. Las células dendríticas se activan para eliminar la amenaza y presentar antígenos en los nódulos linfáticos asociados a la mucosa intestinal y de esta manera se activa toda una respuesta inmune, que incluye la expresión de una serie de genes inducibles por parte de las células del hospedero (Burkey *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2010). Por otro lado, varios autores han observado que, cuando una bacteria autóctona es reconocida por estos tipos de receptores (NODs o TLRs) se inhibe o se modula la respuesta inmune, suprimiendo la señalización dirigida a eliminarla (Falk *et al.*, 1998; Mulder *et al.*, 2009; Spees *et al.*, 2013).

Lo que aún no se define que hace que el organismo discrimine entre los diferentes microorganismos. Existen varias hipótesis, la más aceptada hasta el momento es



que los patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) son diferentes entre los microorganismos patógenos y los comensales o simplemente los patógenos no los poseen (Hooper, 2004; Leser y Melbak, 2009).

## **2.4. Dieta, microbiota y productos microbianos**

Los componentes dietéticos son los principales proveedores de nutrientes tanto para la microbiota gastrointestinal como para el animal mismo, es por ello que la manipulación del tipo y la cantidad de dichos componentes es la principal forma de modificar la poblaciones microbianas gastrointestinales (Looft *et al.*, 2012; Spees *et al.*, 2013). Esta modulación se logra a través de los sustratos que están presentes a nivel intestinal, los cuales pueden ser utilizados para la fermentación por parte de los microorganismos (Bindelle *et al.*, 2010). Esta fermentación va a dirigir el establecimiento de condiciones ambientales favorables para la colonización y la proliferación de microorganismos que puedan nutrirse de dichos componentes, formando nichos en los que se establecen jerarquías, que puede beneficiar o perjudicar al hospedero (Williams *et al.*, 2005; Metzler-Zebeli *et al.*, 2010; Windey *et al.*, 2013). Existen diferentes tipos de actividad fermentativa bacteriana de acuerdo al sustrato que esté presente en el TGI. Específicamente los carbohidratos simples son fácilmente fermentables en el TGI anterior, mientras que en el intestino grueso, donde se encuentra la mayor cantidad de biomasa, la fibra es el principal sustrato para la fermentación microbiana (Carneiro *et al.*, 2008; Bindelle *et al.*, 2010). Sin embargo, los demás nutrimentos también pueden ser fermentados.

### *2.4.1 Proteína dietética*

El requerimiento proteico de los lechones al momento del destete es muy alto, debido a que en esta etapa de su vida, los cerdos están en pleno crecimiento y maduración, y además, se encuentran en un momento de estrés. Esto lleva a que el recambio proteico en el organismo sea muy alto. Por lo anterior la dieta para estos animales en esta fase posee un elevado contenido proteico (NRC, 2012). Sin embargo, al momento del destete los lechones poseen un TGI inmaduro y adaptado a dietas líquidas (leche materna) con componentes de origen animal de alta

digestibilidad. Una vez que se cambia la dieta, ésta mayormente posee componentes proteínicos de origen vegetal con una digestibilidad limitada, lo cual es un desafío para la fisiología gastrointestinal, haciendo que el animal no pueda digerir ni absorber completamente este tipo de componentes y que restos de los mismos queden parcialmente digeridos a nivel intestinal (Guay *et al.*, 2006). Las proteínas no digeridas junto con la proteínas endógenas (secreción pancreática, células descamadas, mucinas) sufren una fermentación significativa en el intestino delgado, a pesar de que su tránsito sea rápido (Christensen, 1992). Después salen del intestino delgado y pasan al intestino grueso, donde sufren la mayor parte de la fermentación por bacterias oportunistas produciendo algunos metabolitos que son tóxicos para la mucosa intestinal (Christensen, 1992; Bikker *et al.*, 2007).

La degradación de las proteínas en el intestino por parte de las bacterias comienza con la hidrólisis de estas para convertirlas en pequeños péptidos y aminoácidos por parte de las proteasas y peptidasas bacterianas. Estas hidrolasas son más activas entre valores de pH de neutro a alcalino, por lo que la mayor actividad de estas enzimas se observa en colon, y a medida que el pH se incrementa estas enzimas se van haciendo más eficientes (Windey *et al.*, 2012). A partir de la fermentación de aminoácidos, por parte de las bacterias también pueden sintetizarse ácidos grasos volátiles. El acetato puede sintetizarse a partir de glicina, alanina, treonina, glutamato, lisina y aspartato; el butirato puede producirse a partir de glutamato y lisina, y el propionato puede sintetizarse a partir de alanina y treonina (Blachier *et al.*, 2007). En el Cuadro 1 se hace una relación de los productos metabólicos a partir de la fermentación de los principales aminoácidos por parte de las bacterias.

Los ácidos grasos de cadena ramificada (AGR) se originan exclusivamente a partir de la fermentación bacteriana de aminoácidos de cadena ramificada, así la valina, leucina e isoleucina, producen isobutirato, isovalerato y 2-metilbutirato, respectivamente (Smith y MacFarlane, 1997) (Figura 5).

El amonio es producido por la desaminación de los aminoácidos principalmente, y por la hidrólisis de la urea por la actividad de la ureasa en menor proporción. Este

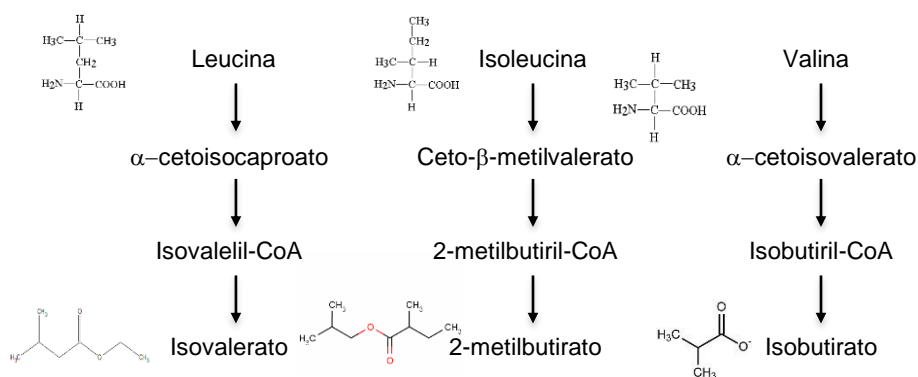
puede ser utilizado por las bacterias para su propio metabolismo y para la síntesis de proteína. El amonio puede ser absorbido por los colonocitos y transformado en urea en el hígado para ser excretada por la orina (Blachier *et al.*, 2007).

La degradación bacteriana de los aminoácidos aromáticos produce compuestos fenólicos e indólicos. Los productos de la degradación de la tirosina incluyen 4-hidroxifenilpiruvato, 4-hidroxifenilactato, 4-hidroxifenilpropionato y 4-hidroxifenilacetato así como p-cresol y 4-etilfenol. La fermentación bacteriana de la fenilalanina produce fenilpiruvato, fenilactato, fenilacetato y fenilpropionato. La degradación de triptófano genera indol, 3-metilindol (escatol), indol acetato e indol propionato. Este tipo de compuestos son absorbidos por parte de los colonocitos y degradados en la mucosa colónica y el hígado por la conjugación con glucurónidos y sulfatos, para finalmente ser excretados por la orina (Hughes *et al.*, 2000) (Figura 6).

**Cuadro 1.** Metabolitos formados a partir de la fermentación bacteriana de los aminoácidos a nivel intestinal.

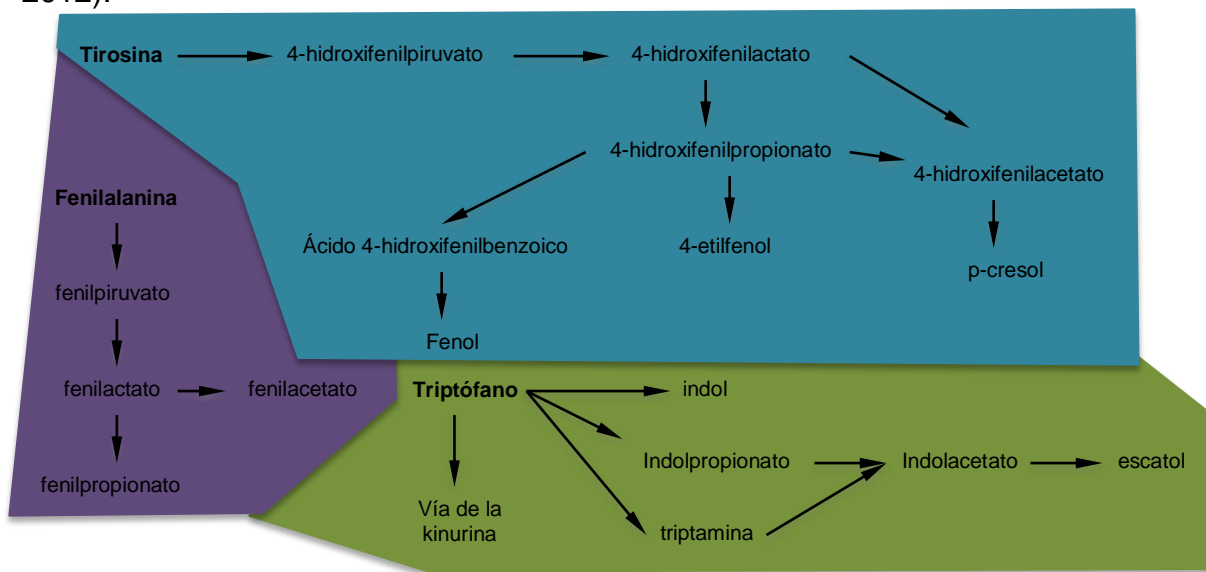
Aminoácido	Metabolito sintetizado
Alanina	Acetato, etilamina, propionato
Arginina	Agmatina, óxido nítrico y putrescina
Aspartato	Acetato y succinato
Cisteína	Sulfuros (H <sub>2</sub> S)
Glutamato	Acetato y butirato.
Glicina	Acetato y metilamina
Histidina	Histamina
Isoleucina	2-metilbutirato
Leucina	Isovalerato
Lisina	Acetato, butirato, cadaverina
Metionina	Sulfuros (H <sub>2</sub> S)
Fenilalanina	Fenilacetato, feniletilamina, fenilactato, fenilpropionato y fenilpiruvato
Treonina	Acetato y propionato
Triptófano	Indol, indolacetato, indolpropionato, 3-metilindol, triptamina
Tirosina	4-etilfenol, hidroxifenilacetato, hidroxifenilpropionato, hidroxifenilpiruvato, p-cresol, fenol, tiramina.
Valina	Isobutirato y 2-metilbutilamina
Desaminación de los aminoácidos	Amonio
Desaminación y fermentación de los aminoácidos	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , lactato, succinato, formato y oxaloacetato

(adaptado de Blachier *et al.*, 2007).

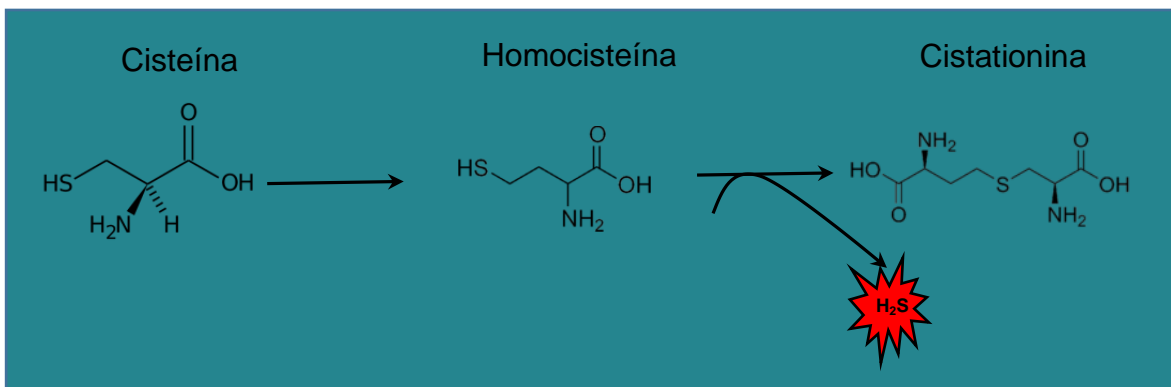


**Figura 5.** Síntesis de ácidos grasos ramificados por parte de las bacterias (adaptado Vlaeminck *et al.*, 2006).

La fermentación de las mucinas y aminoácidos azufrados como metionina, cisteína, cistina y taurina, por parte de las bacterias reductoras de sulfatos, produce sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), una sustancia extremadamente tóxica que se compara con el cianuro. A partir de cualquier aminoácido azufrado las bacterias pueden sintetizar homocisteína. Este último aminoácido es el sustrato fisiológico para la cistationina- $\beta$ -sintetasa una enzima bacteriana (presente principalmente en el Cluster IV de los clostridiales) que une la homocisteína con la serina dando como resultado la producción de cistationina y  $H_2S$  (Figura 7) (Caliendo *et al.*, 2010; Windey *et al.*, 2012).



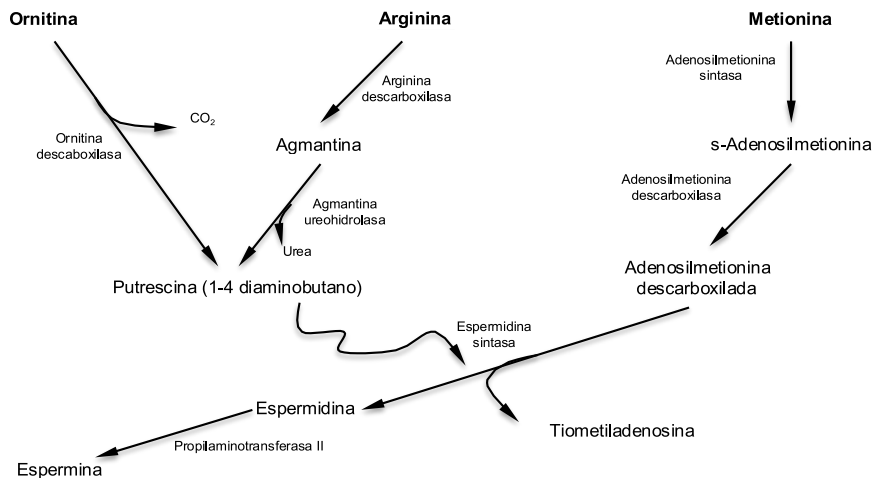
**Figura 6.** Ruta de la fermentación de tirosina, fenilalanina y triptófano (adaptado de



**Figura 7.** Vía de síntesis del sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) (adaptado de Caliendo *et al.*, 2010).

La descarboxilación de ciertos aminoácidos (ornitina, arginina y metionina) resulta en la síntesis de poliaminas a nivel intestinal. Estas sustancias, son compuestos policationicos que están presentes en muchos materiales biológicos y están implicados en una gran cantidad de reacciones biológicas, dentro de las que se encuentran la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Por lo anterior se hace claro que las poliaminas son esenciales para el normal crecimiento celular. Las principales poliaminas son putrescina, cadaverina, espermidina y espermina. Estas sustancias pueden ser producidas por células procariotas y pueden ser secretadas en leche, por lo tanto también pueden ser ingeridas en la dieta. Por otro, lado las bacterias tienen un importante papel en la síntesis de ciertas poliaminas, debido a que las requieren para su crecimiento y proliferación, tal es el caso de bacterias como *E. coli* y *S. pneumoniae* que requieren cadaverina para su desarrollo normal (Tabor y Tabor, 1985; Shah *et al.*, 2011; Windey *et al.*, 2012). La putrescina es sintetizada a partir de la ornitina gracias a la acción de ornitina descarboxilasa, o por la acción combinada de la arginina descarboxilasa y la agmatina ureohidrolasa, a partir de arginina. Posteriormente, la putrescina se une a un residuo de adenosilmetionina descarboxilado y por medio de la espermidina sintasa se genera la espermidina, mas tiometiladenosina. La adenosilmetionina descarboxilada, proviene de la s-adenosilmetionina gracias a la acción de la adenosilmetionin descarboxilasa. La s-adenosilmetionina es sintetizada por la adenosilmetionin sintetasa a partir de la metionina, utilizando una molécula de ATP. Finalmente, la espermidina da origen a la espermina por medio de la propilaminotransferasa II que cataliza la unión de un grupo amino a la espermidina (Figura 8) (Tabor y Tabor, 1985; Blachier *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2011; Windey *et al.*, 2012).

Debido a la fermentación de los aminoácidos por parte de las bacterias y por el reciclaje del nitrógeno endógeno, el epitelio del intestino grueso se ve expuesto al amonio y a los ácidos grasos de cadena ramificada, las dietas altas en proteína hacen que la concentración de estos metabolitos se incremente en los contenidos intestinales (Windey *et al.*, 2012).



**Figura 8.** Vía para la biosíntesis de putrescina, agmatina, espermidina y espermina (adaptado Tabor y Tabor, 1985).

El principal efecto de las altas concentraciones de estos metabolitos en el contenido intestinal es un aumento en el pH. Esto causa un desajuste en el sistema de estabilización del pH impidiendo la salida de  $\text{HCO}_3^-$ , con ello se disminuye la entrada de sodio y cloro, con lo que se va a ver afectada la absorción de agua (Szmulowicz y Hull, 2007). Por otro lado, los colonocitos también ven afectado su pH intracelular, lo que causa una vacuolización con la presencia de un gran número de lisosomas, los cuales al reventarse producen la muerte de la célula, dejando un espacio disponible para la adhesión bacteriana a nivel de la mucosa intestinal (Windey *et al.*, 2012).

El aumento en el pH de los contenidos intestinales favorecerá el funcionamiento de las enzimas proteolíticas bacterianas, con lo cual aumentará la degradación de proteínas y aminoácidos, lo que conlleva a un aumento en la presencia de este tipo de metabolitos a nivel intestinal agravando aún más el cuadro, el resultado final de este tipo de efectos es la presencia de diarreas, bien sea por la disminución en la absorción de agua o por efecto del daño directo que causan los metabolitos finales de la fermentación de las proteínas y los aminoácidos sobre las mucosa intestinal (Blachier *et al.*, 2007; Windey *et al.*, 2012).

### 2.4.2 Carbohidratos

Los carbohidratos en animales monogástricos tienen como función principal brindar energía. Esta “disponibilidad” de energía depende mucho del tipo de carbohidrato que esté presente en la dieta, generalmente dentro de las materias primas que se incluyen en dietas para cerdos encontramos carbohidratos de reserva (almidones) y estructurales (fibras).

#### 2.4.2.1 Carbohidratos de reserva

El principal carbohidrato de reserva en los vegetales es el almidón, y en las dietas para animales monogástricos es la principal fuente de energía, sin embargo una parte de los carbohidratos consumidos pueden ser fermentados por la microbiota gastrointestinal (Williams *et al.*, 2005). Una vez los carbohidratos son colonizados y fermentados por los microorganismos presentes en el intestino estos producen ácidos grasos de cadena corta (láctico, acético, propiónico y butírico) que son deseables para un buen funcionamiento de la fisiología de tracto gastrointestinal (Donohoe *et al.*, 2011).

#### 2.4.2.2 Carbohidratos estructurales o polisacáridos no amiláceos

Los carbohidratos estructurales de las plantas, también llamados “fibra”, hacen parte, cada vez más importante de la dieta de animales monogástricos. Desde los años 50 se ha venido discutiendo la definición de la fibra y sus diferentes compuestos. La última y más aceptada definición es la ofrecida por McDougall *et al.* (1996) quienes mencionan que la fibra dietética es una mezcla compleja de polímeros de carbohidratos asociada con componentes que no son carbohidratos, que se encuentra predominantemente en las paredes celulares de las células vegetales, conformada por polisacáridos no amiláceos (PNA) ligados a la lignina, proteínas, ácidos grasos, ceras, etc; los cuales no pueden ser degradados por las secreciones endógenas del tracto digestivo de los animales. Estos compuestos no digeridos alcanzan el intestino grueso donde son susceptibles a la fermentación bacteriana (Montagne *et al.*, 2003).



Existen diferentes factores que pueden influenciar la fermentación bacteriana de la fibra proporcionada en la dieta. El más importante de estos factores es la fuente de fibra dietética, teniendo en cuenta factores inherentes al tipo de fibra como su solubilidad, grado de lignificación y procesamiento. Otro factor importante es su nivel de inclusión en la dieta ya que éste podría determinar el nivel de fermentación (Bach Knudsen y Hansen, 2001; McFarlane y Cummings, 1991; Williams *et al* 2005).

A pesar de que se ha demostrado claramente que la fibra dietética tiene la capacidad de modular la microbiota gastrointestinal, se carece de mucho conocimiento sobre el efecto de los diferentes tipos y cantidad de fibra sobre grupos microbianos particulares, así como utilizar la fibra dietética de forma racional para promover la salud intestinal favoreciendo el establecimiento de poblaciones microbianas autóctonas.

Algunos autores han estudiado la influencia de diferentes tipos y dosis de fibra en la dieta de los cerdos, en los cuales se observan cambios en la composición y la actividad metabólica de la microbiota del TGI. Bikker *et al.* (2007) publicaron un estudio en el cual utilizaron cuatro tratamientos: 1, dieta baja en proteína (15.2%) y baja en carbohidratos fermentables (7.7%); 2, dieta baja en proteína (15.3%) y alta en carbohidratos fermentables (13.6%); 3, alta en proteína (21.3%) y baja en carbohidratos fermentables (7.3%) y 4, alta en proteína (21.7%) y alta en carbohidratos fermentables (13.2%). En este trabajo llegaron a la conclusión de que el incremento en los carbohidratos fermentables en la dieta estimuló la producción de ácido láctico y redujo los conteos de bacterias coliformes, disminuyendo la fermentación de proteína en el intestino delgado, y en el intestino grueso se incrementó la concentración de ácidos grasos volátiles, principalmente acético y butírico, sin embargo, los efectos de las dietas sobre la fermentación, no necesariamente se vieron reflejados en el comportamiento zootécnico en los lechones recién destetados.

Bindelle *et al.* (2010) realizaron un experimento *in vitro* simulando la digestión porcina utilizando una mezcla de pepsina-pancreatina, sometiendo granos de cebada y avena con y sin cascarilla, con diferente contenido de PNA (contenido de PNA: 145, 115, 214 y 138 g·kg<sup>-1</sup>, respectivamente). En este trabajo se estimaron conteos bacterianos y perfil de ácidos grasos volátiles, concluyendo que no solo el tipo de grano, sino también las diferencias en la composición de los carbohidratos entre los diferentes granos pueden ser utilizados para influenciar la ecofisiología gastrointestinal, alterando el perfil microbiológico favoreciendo la salud intestinal.

Bach Knudsen (2001) realizaron un estudio en el cual se utilizaron dietas con diferentes niveles de fibra provenientes del trigo y avena, encontrando cambios importantes en la actividad microbiana a lo largo del tracto gastrointestinal de los cerdos. Este último estudio concuerda con los resultados obtenidos por Jensen y Jorgensen (1994), en el que administraron dietas altas en fibra (provenientes de cebada, chícharo y pectina) a cerdos adultos, encontrando un incremento importante en el total de bacterias cultivables en el estómago y una alta actividad metabólica microbiana en todos los segmentos del intestino grueso.

Además de lo mencionado anteriormente también se ha demostrado que la microbiota intestinal tiene la capacidad de adaptarse cambiando las especies predominantes en respuesta a los componentes dietéticos. El intestino de los cerdos exhibe una población bacteriana celulolítica y hemicelulolítica altamente activa, lo cual indica que posee un alto potencial para la utilización de la fibra por parte de la microbiota presente en la luz intestinal (Franklin *et al.*, 2002; Furet *et al* 2009). Existen estudios que indican que por lo menos 50% de la celulosa y el 80% de los polisacáridos no celulósicos son fermentados por microorganismos en el intestino de los monogástricos (Bach Knudsen, 2001). Aparte de los componentes fibrosos anteriormente mencionados, desde la década de los 30 se han mencionado tres tipos principales de almidón, el A presente en los cereales y que es generalmente atacado por las amilasas salivales y pancreáticas, por lo que es muy escasa la fermentación de este; el B presente en las papas y los plátanos, es parcialmente

resistente a la digestión por parte de las amilasas, por lo cual puede llegar a ser fermentado por las bacterias presentes en el intestino; y el tipo C que es una combinación de los dos anteriores (A y B), está presente en las leguminosas principalmente y es muy resistente a la digestión amilolítica, por lo cual queda disponible para la digestión bacteriana a nivel intestinal (Katz, 1934; Fuwa *et al.*, 1980; Cummings y McFarlane, 1991). De manera similar el procesamiento industrial de la materias primas, también afecta la fermentabilidad de los carbohidratos, ya que por medio del procesamiento se rompe la estructura cristalina del almidón haciéndolo susceptible a la digestión amilolítica, lo cual disminuye el sustrato disponible para la fermentación bacteriana (Topping y Clifton, 2001).

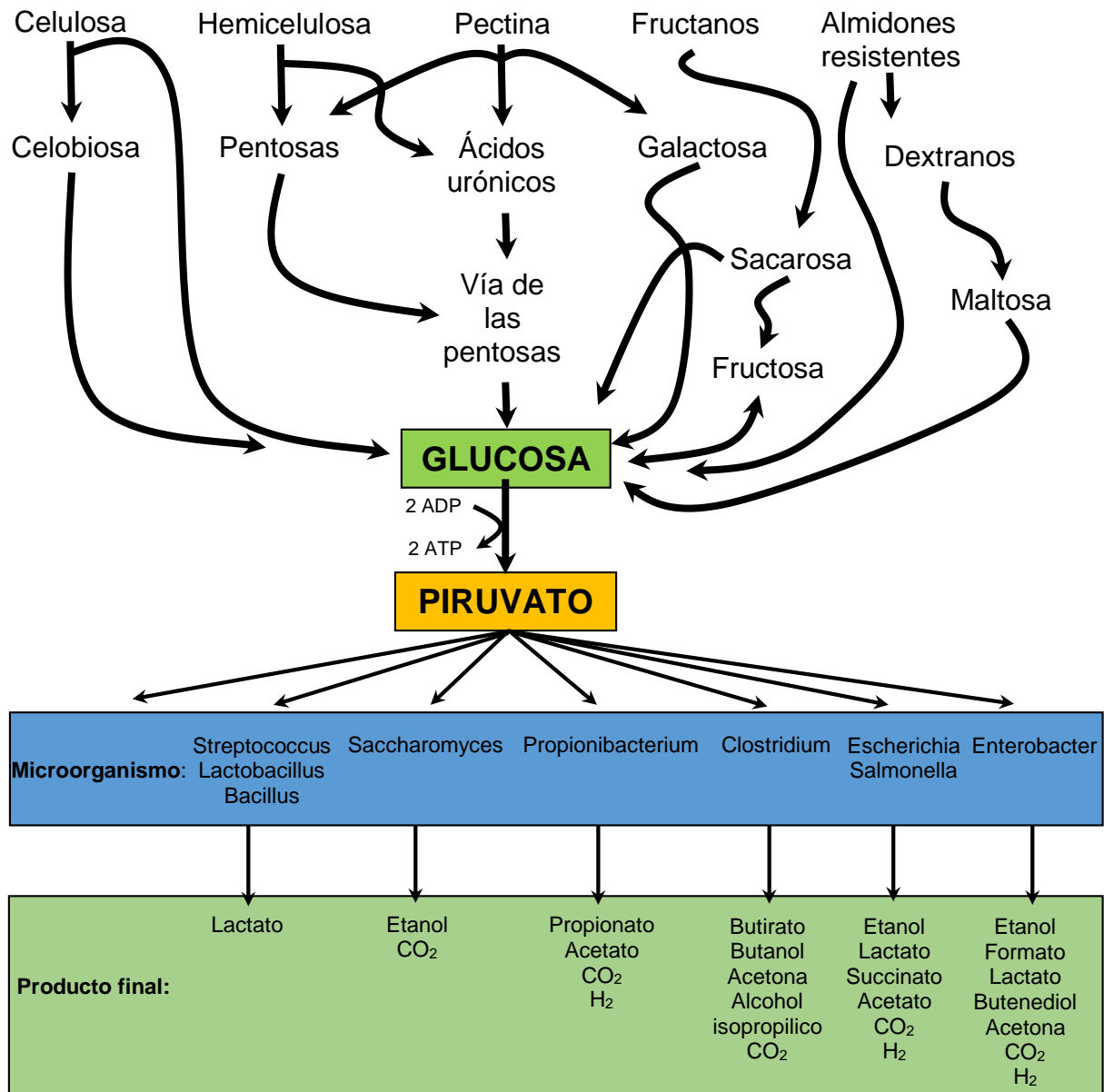
En los lechones recién destetados, los principales azúcares que escapan a la absorción son lactosa, rafinosa y estaquiosa (Bikker *et al.*, 2007; Pierce *et al.*, 2007). Muchos oligosacáridos probablemente también escapen a la digestión en el intestino delgado, los más comunes son los fructo-oligosacáridos, estos son rápidamente fermentados por la flora intestinal (Williams *et al.*, 2001).

De manera general todos los carbohidratos son degradados a su mínima expresión, la glucosa, esta sigue el proceso anaeróbico para formar piruvato, y posteriormente da lugar a los productos finales de la fermentación, dependiendo del microorganismo que tomo el sustrato (Figura 9).

Los principales productos de la fermentación de los carbohidratos se encargan de mantener ligeramente ácido el pH del contenido del colon con lo cual pueden disminuir la actividad de las enzimas de las bacterias que fermentan proteínas, esto hace que estas no puedan tener su metabolismo en pleno funcionamiento, y como consecuencia las bacterias no puedan proliferar, manteniendo un nivel basal (Williams *et al.*, 2001; Smirichy-Tjardes *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2005).

Además, un pH ligeramente ácido promueve la absorción de agua, ya que permite el normal funcionamiento del sistema de intercambio iónico a nivel celular. A pH ligeramente ácidos el colonocito permite la salida de  $\text{HCO}_3^-$ , lo cual hace que entre

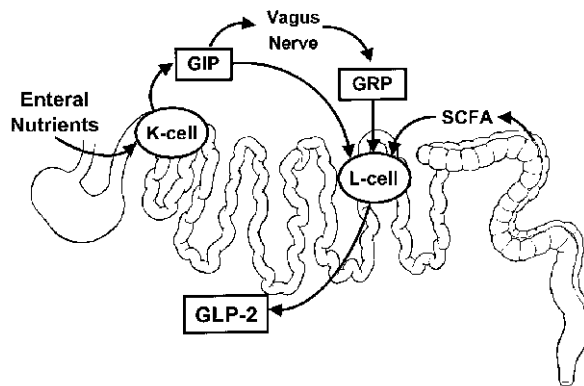
cloro y sodio a la célula y se active la bomba sodio potasio en la membrana basal lo cual abre canales a nivel paracelular permitiendo la absorción de agua (Szmulowicz y Hull, 2007). El ácido acético es el único que se absorbe y alcanza niveles detectables en la circulación, alcanzando el hígado donde sirve para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga y en músculo puede ser utilizado como sustrato energético (Williams *et al.*, 2001). Y a nivel local (intestino) se relaciona con la síntesis de óxido nítrico, el cual produce vasodilatación aumentando el flujo sanguíneo intestinal. El ácido láctico estimula las terminaciones nerviosas del plexo mientérico estimulando la motilidad intestinal (Szmulowicz y Hull, 2007). Los ácidos propiónico y butírico, aparte de contribuir con la disminución del pH del contenido intestinal y favorecer la absorción de agua, poseen actividad antimicrobiana sobre bacterias sensibles a cambios de pH intracelular, lo cual hace que las bacterias tengan que activar una bomba de sodio potasio para neutralizar el pH intracelular, consumiendo mucha energía, disminuyendo de esta manera la capacidad de la bacteria para crecer y multiplicarse (Williams *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2005).



**Figura 9.** Rutas de degradación de carbohidratos complejos a glucosa y productos finales de su a partir de piruvato (Adaptado van Soest, 1994; Pommerville, 2011).

El ácido butírico provee entre el 70 y el 90% de la energía al colonocito, lo cual disminuye aproximadamente un 30% el requerimiento energético del animal (Bindelle *et al.*, 2009). También se ha documentado el efecto trófico que tiene el butirato sobre las células del íleon y del colon. Burrin *et al.* (2001) indican que la presencia de ácidos grasos volátiles, especialmente el butírico, estimulan a las

células L presentes a nivel ileal y en el colon proximal, las cuales secretan el péptido similar al glucagón 2 (glucagón-like peptide 2 (GLP2)) el cual se caracteriza por promover la división, migración y maduración de los colonocitos y enterocitos (Figura 10).



**Figura 10.** Factores involucrados en la secreción de GLP2 por parte de las células L intestinales (Burrin *et al.*, 2001). GLP-2: Glucagon-like peptide 2; GIP: glucose-dependent insulintrophic peptide; GRP: gastrin-releasing peptide; SCFA: Short chain fatty acids.

El butirato posee un efecto antiproliferativo en células cancerígenas induciendo vías apoptóticas, y además regula la respuesta inflamatoria, al incrementar la expresión de un supresor de la expresión de citocinas (Donohoe *et al.*, 2011).

#### 2.4.3 Lípidos

Aún no se tiene muy clara la función de los lípidos en el funcionamiento gastrointestinal, y mucho menos sobre el establecimiento de la microbiota intestinal. Se ha establecido que los ésteres de ácidos grasos y glicerol son hidrolizados por la flora intestinal (Prins *et al.*, 1975). Dentro de los lípidos que pasan la digestión y la absorción en el intestino delgado, alcanzan el intestino grueso y pueden llegar a ser fermentados por la flora intestinal están glicéridos de galactosil, fosfolípidos y triglicéridos. Estos son fermentados principalmente por ciertos firmicutes

especializados (*Anaerovibrio lipolytica*) liberando glicerol y tres ácidos grasos, por medio de una lipasa extracelular unida a su membrana.

Ciertas especies de *Butyrivibrio* llegan a fermentar galactolípidos, fosfolípidos y sulfolípidos. Los principales productos de fermentación dependen del sustrato fermentado. El glicerol es fermentado principalmente a propionato, succinato y pequeñas cantidades de H<sub>2</sub> y lactato. También pueden fermentar ribosa y fructosa, produciendo acetato, propionato, CO<sub>2</sub> y pequeñas cantidades de succinato, H<sub>2</sub> y lactato. El lactato es fermentado principalmente a acetato, propionato, CO<sub>2</sub> y pequeñas cantidades de succinato y H<sub>2</sub>. Los ácidos grasos liberados de los triglicéridos, pueden ser hidrogenados e incluidos en las membranas celulares de las bacterias (Hungate, 1966; Henderson y Hodgkiss, 1973; Prins 1975).

### ***2.5 Problemática del uso de antibióticos en alimentos para animales y alternativas propuestas para evitar su utilización.***

Desde que se creó la industria de alimentos concentrados para animales, a finales de los años 40 se comenzaron a utilizar antibióticos como promotores de crecimiento, con el objetivo de mantener controladas las poblaciones bacterianas a nivel intestinal, evitando de esta manera la competencia por nutrientes y el desarrollo de desórdenes gastrointestinales, mejorando la tasa de crecimiento y la eficiencia alimenticia (Stein y Kil, 2006; Roca *et al.*, 2014). Actualmente se sabe que la especificidad de los antibióticos a las diferentes poblaciones microbianas difiere y que su mecanismo de acción no está asociado precisamente con la definición de un promotor de crecimiento, ya que usualmente se agrega el antibiótico en la dieta en dosis subterapéuticas, lo cual mantiene controlados a los microorganismos inhibiendo su proliferación, pero sin eliminarlos por completo. Esta forma de utilizar los antibióticos, aunada con el mal uso de estos por la población humana, ha ocasionado que las bacterias hayan adquirido resistencia a estos compuestos, lo cual generó un movimiento mundial en contra de su uso en dietas para animales, teniendo como resultado su prohibición por parte de la unión europea (Looft *et al.*, 2012).

Como consecuencia de lo anterior en las explotaciones porcinas se empezaron a observar efectos negativos en lo que se refiere a la sanidad y a la productividad, sobre todo en la etapa más crítica de la vida de un cerdo que es el destete. Los problemas asociados al no uso de antibióticos en las dietas reflejaron un aumento de la incidencia y en la severidad de las diarreas posdestete y el mal desarrollo de los lechones, afectando de esta manera el proceso productivo en su totalidad, ya que animales con un bajo peso al destete tienden a tardarse más para alcanzar un peso de sacrificio (Davis *et al.*, 2010; Roca *et al.*, 2014).

Como consecuencia de lo anterior la industria de alimentos concentrados para animales y los desarrolladores de alimentos se avocaron a buscar alternativas para reducir el efecto del retiro de los antibióticos sobre la ecofisiología gastrointestinal y con ello disminuir los efectos negativos sobre la productividad (Escobar *et al.*, 2014).

#### *2.5.1. Nivel de proteína dietética*

Como se mencionó en los párrafos anteriores, la cantidad de proteína dietética puede afectar el perfil microbiano del tracto gastrointestinal, favoreciendo el establecimiento de especies bacterianas dañinas para el medio ambiente intestinal. Bajo el hecho de que el lechón al momento del destete es un animal inmaduro, fisiológicamente hablando, se hipotetiza que una gran cantidad de proteína en la dieta no podrá ser digerida eficientemente por el animal, por lo que restos de alimento sin digerir permanecerán a nivel intestinal, los cuales serán fermentados por las bacterias produciendo metabolitos potencialmente tóxicos para la mucosa gastrointestinal, lo cual puede ser el desencadenador de las diarreas (Bikker *et al.*, 2007; Hermes *et al.*, 2009; Opapeju *et al.*, 2009; Bindelle *et al.*, 2010).

Esta situación se ve empeorada con el retiro de los antibióticos de la dieta. Una alternativa al uso de grandes cantidades de proteína es una disminución importante del componente proteico de la dieta incluyendo aminoácidos cristalinos, bajo la hipótesis que de esta manera el animal no tendría que digerir y tendría la posibilidad



de absorber eficientemente los aminoácidos que son los que al fin y al cabo requiere su organismo (Bhandari *et al.*, 2010). Si el animal absorbe correctamente los aminoácidos incluidos en la dieta, dejaría muy poco para que fuera fermentado por las bacterias y de esta manera se corregiría el problema anteriormente mencionado (Wellock *et al.*, 2007; Hermes *et al.*, 2009).

Estudios como el de Hermes *et al.* (2009), demuestran que el alimentar animales con niveles bajos de proteína (16%) favorece la salud intestinal y permiten un crecimiento adecuado de los animales, toda vez que no se presentaron diferencias estadísticas en el comportamiento zootécnico al compararlos con animales alimentados con dietas altas en proteína (20%) (Cuadro 2).

En otro estudio realizado por Opapeju *et al.*, (2009) se alimentó animales con diferentes niveles de proteína (17.6 vs 22.5%) y se les desafió con *E. coli* enterotoxigénica (K88) durante los primeros 14 días posdestete, y además de las variables productivas se midió la severidad de la diarrea. En este estudio se observa claramente el efecto que tiene el nivel de proteína sobre la salud intestinal, demostrando que los animales que tenían una mayor cantidad de proteína en su dieta presentaban una mayor severidad de las diarrea ( $P < 0.05$ ), aunque se observaron diferencias solamente en la ganancia diaria de peso y la eficiencia alimenticia durante la primera semana posdestete (Cuadro 3).

Lo anterior permite concluir que en efecto el nivel de proteína tiene una influencia importante sobre la ecofisiología gastrointestinal, permitiendo o impidiendo el desarrollo de disturbios intestinales, que se ven reflejados en diarrea y pobre desarrollo corporal.

**Cuadro 2.** Efecto del nivel de proteína dietética sobre el comportamiento productivo de lechones entre la 3 y la 5 semana posdestete (Adaptado Hermes *et al.*, 2009).

Variable productiva	Dieta baja en	Dieta alta en	EEM	P
	proteína (16%)	proteína (20%)		
<b>Peso corporal (kg)</b>				
Inicial	8.97	9.18	0.60	0.42
Final	16.89	16.70	1.04	0.66
<b>Consumo diario de alimento (g)</b>				
Semana 1	598	570	79	0.99
Semana 2	875	765	215	0.74
Semana 3	1032	890	252	0.95
<b>Ganancia diaria de peso (g/día)</b>				
Semana 1	350	338	56	0.93
Semana 2	382	374	86	0.88
Semana 3	453	444	81	0.70
<b>Eficiencia alimenticia (g/g)</b>				
Semana 1	0.60	0.49	0.10	0.62
Semana 2	0.46	0.49	0.11	0.80
Semana 3	0.45	0.53	0.12	0.61

EEM: error estándar de la media; P: valor de P.

### 2.5.2. Uso de carbohidratos fermentables

Con la finalidad de reducir la fermentación de la proteína dietética, varios autores han sugerido la inclusión de carbohidratos fermentables en la dieta de lechones, ya que estos promueven la producción de ácidos grasos de cadena corta (láctico, acético, propiónico y butírico), además de reducir el crecimiento de bacterias coliformes e incrementar la proliferación, maduración y migración de las células epiteliales, tanto en intestino delgado como grueso, favoreciendo su desarrollo con

lo cual mejorarían los indicadores productivos de los animales, favoreciendo su desarrollo corporal. Lamentablemente ninguno de los estudios han sido conclusivos en este aspecto y todos concuerdan con que el cambio en el perfil fermentativo utilizando una mayor cantidad de carbohidratos fermentables en la dieta no tiene implicaciones sobre el comportamiento productivo de los animales. Como ejemplo de lo anteriormente aseverado, Hermes *et al.* (2010) publicaron un estudio en el cual utilizaron cuatro dietas bajas en proteína: 1, dieta con arroz y baja en fibra (2.8% de FDN); 2, dieta con arroz y alta en fibra (3.6% de FDN); 3, dieta con cebada y baja en fibra (12.2% de FDN); 4, dieta con cebada y alta en fibra (13.4% de FDN). En este trabajo se observó que los lechones alimentados con arroz tuvieron un mayor consumo de alimento que los animales que consumieron cebada, sin embargo no se observaron diferencias significativas en la ganancia diaria de peso. Además no se observó una mayor fermentación de carbohidratos a pesar de las diferencias en la cantidad de fibra de las dietas debidas al tipo de cereal utilizado. Sin embargo, si se observó una menor fermentación de proteína, toda vez que los animales que consumieron la dieta con cebada produjeron una menor cantidad de ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR), los cuales provienen de la fermentación de aminoácidos ramificados. Por último no se observaron diferencias debidas a los tratamientos ni en la presencia de coliformes o de enterococos. Estos resultados indican que a pesar de que se limitó la fermentación de proteínas con la cantidad de fibra en la dieta, esto no tuvo ningún significado, ni desde el punto de vista productivo, ni en la producción de AGCC como indicador de fermentación de carbohidratos (Cuadro 4).

Bikker *et al.* (2007), realizaron un trabajo en el que utilizaron dietas altas y bajas en proteína con una inclusión alta y baja de polisacáridos no amiláceos (PNA), los resultados indican que el incremento en la cantidad de PNA en la dieta, estimuló la proliferación de bacterias ácido lácticas. Esto se vio reflejado en una mayor producción de ácido láctico causando una disminución en número de unidades formadoras de colonias de bacterias coliformes, reduciéndose de esta manera la fermentación de proteína en el intestino delgado. En el intestino grueso los PNA

incrementaron las concentraciones ácidos grasos volátiles, específicamente ácidos acético y butírico.

**Cuadro 3.** Efecto del nivel de proteína sobre el comportamiento productivo y la severidad de las diarreas en lechones recién destetados desafiados con *E. coli* enterotoxigénica K88 (adaptado de Opapeju *et al.*, 2009).

Variable	Dieta baja en	Dieta alta en	EEM	P
	proteína (17.6%)	proteína (22.5%)		
<b>Peso corporal (kg)</b>				
Inicial	5.30	5.34	0.24	NS
Final	8.07	8.51	0.30	NS
<b>Consumo diario de alimento (g)</b>				
Días 1 a 7 PD	179	200	8.67	NS
Días 9 a 10 PD	260	302	20.62	NS
Días 12 a 14 PD	302	317	16.90	NS
<b>Ganancia diaria de peso (g/día)</b>				
Días 1 a 7 PD	147 <sup>b</sup>	201 <sup>a</sup>	8.50	*
Días 9 a 10 PD	304	333	21.81	NS
Días 12 a 14 PD	343	322	29.39	NS
<b>Eficiencia alimenticia (g/g)</b>				
Días 1 a 7 PD	0.82 <sup>b</sup>	1.00 <sup>a</sup>	0.02	*
Días 9 a 10 PD	1.11	1.20	0.10	NS
Días 12 a 14 PD	1.06	1.08	0.07	NS
<b>Severidad de las diarreas</b>				
24 horas pos-desafío	0.32	0.68	0.19	NS
30 horas pos-desafío	0.62	1.00	0.30	NS
48 horas pos-desafío	0.50 <sup>b</sup>	1.40 <sup>a</sup>	0.29	*
72 horas pos-desafío	0.60 <sup>b</sup>	1.40 <sup>a</sup>	0.17	*
5 días pos-desafío	0.30 <sup>b</sup>	1.10 <sup>a</sup>	0.23	*

También en este estudio aseguran que la inclusión de PNA fue más eficiente que la reducción de la proteína dietética en el mejoramiento de la fermentación y de la composición microbiana intestinal en lechones. Sin embargo los efectos sobre la fermentación no necesariamente se ven reflejados en el crecimiento de los animales.

### 2.5.3 Uso de aditivos

#### 2.5.3.1 Prebióticos

Los prebióticos se definen como ingredientes dietéticos no digestibles que benefician al hospedero a través de la estimulación selectiva del crecimiento bacteriano y de su actividad metabólica, en términos de productos finales de la fermentación y de la estabilidad de la población bacteriana comensal en el tracto gastrointestinal (Pié *et al.*, 2007).

**Cuadro 4.** Efecto del tipo de cereal y en nivel de fibra de la dieta de lechones sobre el comportamiento productivo, la fermentación intestinal y la cantidad de enterococos y coliformes (Adaptado de Hermes *et al.*, 2010)

Cereal	Dietas				P	EEM
	Arroz		Cebada			
	Bajo	Alto	Bajo	Alto		
Consumo diario de alimento	791	779	671	682	0.03	125
Ganancia diaria de peso	487	510	443	461	0.35	97
AGCC	92	92	93	95	0.2	3.3
AGCR	2.3	1.7	1.0	1.0	0.007	1.0
Enterococos	4.5	5.8	4.1	4.8	0.1	1.1
Coliformes	6.7	6.4	6.1	5.8	0.1	0.9

AGCC: ácidos grasos de cadena corta; AGCR: ácidos grasos de cadena ramificada

Para entrar dentro de la definición de prebiótico un ingrediente debe cumplir con tres características fundamentales (Gibson y Roberfroid, 1995):

- a. No debe ser ni digerido (hidrolizado), ni absorbido en el intestino delgado.
- b. Debe servir como sustrato selectivo para un limitado número de bacterias comensales en el colon, debiendo estimular su crecimiento y su metabolismo.
- c. Debe causar alteraciones en la microflora del colon con el objetivo de establecer un ecosistema más saludable.

De manera similar a la fibra dietética los prebióticos funcionan estimulando la fermentación bacteriana en el intestino grueso, favoreciendo el crecimiento de determinadas poblaciones bacterianas que a la postre van a beneficiar al hospedero.

Diversos experimentos realizados con prebióticos en lechones han dado resultados prometedores. Estudios *in vitro* han demostrado que se puede incrementar el crecimiento de un tipo selecto de bacterias mediante el uso de oligosacáridos. Los fructo-oligosacáridos incrementan el crecimiento de *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp* (Konstantinov *et al.*, 2004). Amilopectinas y xilo-oligosacáridos también incrementan el crecimiento de *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp*, pero además inhiben el crecimiento de bacterias patógenas (Gibson y Roberfroid, 1995; Li *et al.*, 2011). Por otro lado, Houdijk *et al.* (1997) encontró una disminución en los aerobios totales en el íleon en respuesta al uso de fructo-oligosacáridos en el dieta, y otros autores han demostrado mejorías en el comportamiento zootécnico, después de la administración de diferentes prebióticos (Shim *et al.*, 2005; Aufreiter *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Tako *et al.*, 2014).

Otro efecto importante de los prebióticos es el cambio que produce en el medio ambiente intestinal, lo cual puede confirmarse a través de las diferentes mediciones hechas por varios autores, quienes observaron, no solo un cambio en el perfil de la

fermentación, sino también un incremento de esta, además de una reducción en el pH del contenido intestinal al utilizar oligosacáridos no digeribles, fructo-oligosacáridos, paredes celulares de levaduras, mananoligosacáridos, inulina y pectinas (Stevens y Hume, 1998; Mikkelsen *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2005; Bindelle *et al.*, 2010; Metzler-Zebeli *et al.*, 2010).

#### 2.5.3.2 Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos agregados al alimento, los cuales proveen ciertos niveles de estabilidad a la flora gastrointestinal y como consecuencia tienen un efecto positivo en la salud intestinal de huésped (Walker *et al.*, 2008).

Varias investigaciones han demostrado los efectos positivos sobre el comportamiento zootécnico utilizando diferentes cepas de probióticos (*Bifidobacterium pseudolongum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus spp.*, entre otros). Existen diferentes resultados, ya que en algunos casos pueden verse reducciones en la ganancia diaria de peso y en el consumo de alimento (Pollmann *et al.*, 1980; Jack *et al.*, 1995; Skjolaas *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2008; Lessard *et al.*, 2009; Cutting *et al.*, 2011).

En algunos casos se ha observado reducciones importantes en el conteo de bacterias coliformes y clostridios e incrementos en los conteos de Lactobacilli a nivel intestinal (Simpson *et al.*, 2000; Skjolaas *et al.*, 2007). En otros trabajos se observó un comportamiento similar en cuanto al conteo bacteriano, pero el uso de probióticos no representó ninguna diferencia en términos del comportamiento zootécnico (Bhandari *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011).

También se han utilizado los probióticos como una herramienta para la prevención de la diarrea posdestete, obteniendo también resultados controvertidos. Mientras que algunos autores han demostrado la disminución en la incidencia de las diarreas (Kyriakis *et al.*, 1999; Alexopoulos *et al.* 2004; Aperce *et al.*, 2010; Le Bon *et al.*,

2010). Otros trabajos no han encontrado efectos sobre la diarrea posdestete (Bontempo *et al.*, 2006; Salminen *et al.*, 2005; Giaggia *et al.*, 2010). Se ha postulado que estos resultados tan controversiales se deben en parte a lo complejo de la etiología de las diarreas posdestete.

De manera general, los efectos benéficos de los probióticos se han relacionado con un mejoramiento del balance microbiano a nivel intestinal y al reforzamiento de la actividad de la microbiota autóctona, además de sus efectos sobre la modulación de la respuesta inmune a nivel intestinal (Walker, 2008). Sin embargo en la actualidad aún no se tiene bien dilucidado cual es el mecanismo exacto por medio del cual ejercen su acción los probióticos a nivel intestinal. Para tratar de entender un poco su efecto sobre la ecofisiología gastrointestinal se han postulado diferentes hipótesis sobre cómo actúan los probióticos. Los probióticos modulan el ecosistema intestinal a través de la competencia con los patógenos por los receptores epiteliales (exclusión competitiva), a través de la competencia por los nutrientes, o a través de la producción de compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas o los ácidos orgánicos, los cuales tienen efectos inhibitorios sobre las bacterias no deseadas a nivel intestinal (Jack *et al.*, 1995; Walker, 2008; Wang *et al.*, 2009; Giaggia *et al.*, 2010).

#### 2.5.3.3 Simbióticos

Otra forma de modificar la microflora intestinal es a través del uso de simbióticos, el cual consiste en el uso de probióticos y prebióticos combinados (Gibson y Roberfroid, 1995). Las bacterias vivas deben utilizarse con sustratos específicos para promover su crecimiento (Giaggia *et al.*, 2010). De esta manera la colonización del tracto gastrointestinal por parte de un probiótico exógeno puede verse favorecida por medio del uso simultáneo de un prebiótico (Rolfe, 2000). Al igual que los prebióticos y los probióticos utilizados por separado, los simbióticos tienen resultados controversiales. Nemcova *et al.* (1999) administraron a lechones recién destetados una mezcla de *Lactobacillus paracasei* y fructo-oligosacáridos, lo cual produjo un incremento en el conteo total de anaerobios, aerobios y *Lactobacilli*, y



una disminución en la cantidad de Enterobacterias y clostridios. Estrada *et al.* (2001) alimentaron a lechones en un destete temprano, con fructo-oligosacáridos y *Bifidobacterium longum* encontrando una mejoría en la eficiencia alimenticia. Aun no se ha podido establecer un protocolo de uso adecuado de simbióticos en lechones recién destetados por la gran cantidad de variaciones y a lo desconocido de su efecto sobre el medio ambiente gastrointestinal.

#### 2.5.3.4 Acidificantes

La inclusión de acidificantes en dietas para lechones recién destetados se hace como una alternativa al uso de antibióticos. Todo esto basado en su potencial para la reducción del pH del tracto gastrointestinal, lo cual mejora la digestión de nutrientes y protege al TGI de la invasión y proliferación de patógenos (Kil *et al.*, 2011). Lo anterior se basa en el principio de que a disminuir el pH de los contenidos gastrointestinales se eficientiza la digestión, debido a que a pH bajos se activan las enzimas proteolíticas a nivel gástrico (por ejemplo la pepsina tiene dos pH de activación 2 y 3.5) (Kidder y Manners, 1978). Además un medio ambiente intestinal ligeramente acidificado tiene un papel fundamental en la prevención del paso de bacterias dañinas al tracto gastrointestinal posterior (intestino grueso) (Kim *et al.*, 2005). Uno de los problemas de los lechones recién destetados es que no tienen la capacidad de producción de HCl suficientemente desarrollada, con lo que lograrían mantener un pH gástrico lo suficientemente bajo como para mantener activas las enzimas proteolíticas (Bosi *et al.*, 2007). El HCl es determinante en la disminución del pH a nivel gástrico, y los lechones al no tener la capacidad suficiente de producirlo, no pueden mantener una actividad de pepsina óptima, lo cual hace que las proteínas no sean lo suficientemente digeridas y pasen parcialmente digeridas al intestino delgado. En esta situación, la presencia de proteínas sin digerir favorece el crecimiento de bacterias fermentadoras de proteína, usualmente patógenas u oportunistas, con lo cual se da la producción de metabolitos potencialmente tóxicos para la mucosa intestinal, generando las diarreas típicas de esta etapa productiva (Guay *et al.*, 2006; Bikker *et al.*, 2007; Opapeju *et al.*, 2009). Dentro de la literatura revisada (Kidder y Manners, 1978; Kim *et al.*, 2005; Stein y Kil, 2006; Bosi *et al.*,

2007; Li *et al* 2008; Kil *et al.*, 2011) se observaron diferentes resultados, en muchos casos contradictorios.

Una vez se agrega el acidificante en la dieta, se espera que ejerza su acción basándose en tres pilares fundamentales:

- a. Disminución del pH gástrico y del contenido intestinal.
- b. Modulación de las poblaciones bacterianas.
- c. Mejoramiento en la digestión de nutrientes.

En cuanto a la disminución del pH de los contenidos del TGI, esta se da en función del porcentaje de inclusión de acidificante en la dieta (Kim *et al.*, 2005; Kil *et al* 2011). El grado de acidificación depende de la composición de la dieta y de la fuerza de disociación del acidificante ( $pK_a$ ), por lo que las dietas con subproductos lácteos y con suplementos minerales (con una mayor capacidad de unión al ácido) disminuyen el efecto de los acidificantes (Kim *et al.*, 2005). Lo anterior explica, en cierta manera, las discrepancias entre las diferentes publicaciones, pero por lo general los acidificantes disminuyen efectivamente el pH del contenido gástrico de lechones recién destetados (Cuadro 5).

A nivel intestinal los datos son aún más variados y contradictorios, con datos que llegan a disminuir el pH del íleon en -0.57 (Burnell *et al.*, 1988) o a aumentarlo en 0.60 (Roth *et al.*, 1992); la causa esta aún por esclarecer, pero una posibilidad es la capacidad de regulación fisiológica por parte del intestino mismo, por medio de la secreción de  $HCO_3^-$  principalmente (Kim *et al.*, 2005), el cual es un regulador sistémico de pH, esta secreción esta dada principalmente a nivel pancreático, se da en respuesta a la presencia del contenido ácido proveniente del estómago a nivel duodenal y es fundamental para la función de las enzimas provenientes del páncreas (Hall, 2011).

Lo anterior, hace pensar que los efectos de los acidificantes se limitan al estómago, por lo que se requieren más estudios para conocer los efectos de estos sobre el pH intestinal (Kil *et al.*, 2011).

**Cuadro 5.** Efecto de los diferentes acidificantes y sus niveles de inclusión sobre el pH del contenido gástrico (adaptado de Kil *et al.*, 2011).

Referencia	Acidificante utilizado	pK <sub>a</sub>	Nivel de acidificante utilizado g/kg	Disminución de pH en contenidos gástricos (unidades)
Radcliffe <i>et al.</i> , 1998	Ácido cítrico	3.09	15	-0.33
			30	-0.50
			6	0.38
Roth <i>et al.</i> , 1992	Di-formato de sodio	7.0	12	0.53
			18	0.52
			24	0.05
Kluge <i>et al.</i> , 2006	Ácido benzoico	4.2	5	-0.19
			10	-0.19

Otro de los pilares fundamentales en los que se basa la acción de los acidificantes es la modulación de las poblaciones bacterianas en el TGI. En ese sentido Gauthier (2002), menciona que el uso de acidificantes en la dieta puede tener efectos antimicrobianos, especialmente sobre bacterias patógenas sensibles al pH como los coliformes y *Clostridium*, pero que además tendrían un efecto trófico sobre el crecimiento de bacterias benéficas como las ácido lácticas, principalmente *Lactobacillus* (Cuadro 6). Se sabe que el estrés asociado al destete ocasiona un desbalance de la microflora intestinal, afectando de manera adversa el funcionamiento del TGI. En un experimento clásico de Barrow *et al.* (1977), se observó que a los dos días posdestete, grandes cantidades de coliformes

proliferaban en el TGI de los lechones, mientras que los conteos de *Lactobacillus* estaban bajos. Otro estudio más reciente, demostró que la cantidad de *Lactobacillus* era mínima en los contenidos ileales de lechones a los dos días posdestete y que de manera contraria, los coliformes totales estaban significativamente aumentados, y que esto se correlacionaba con el pH del contenido presente en el íleon (Mathew *et al.*, 1996) (Figura 11).

Finalmente se sabe que las bacterias ácido-lácticas compiten por los sitios de adhesión en la mucosa intestinal con la bacterias patógenas y que producen ácido láctico, por lo cual, al proliferar las primeras, se disminuye el pH inhibiendo el crecimiento de patógenos, con lo cual se disminuyen las posibilidades de que estos se adhieran a la pared intestinal y causen su efecto dañino (Kim *et al.*, 2005).

Además también se ha reportado que los *Lactobacillus* producen peróxido de hidrógeno, el cual tiene un efecto antimicrobial sobre las bacterias patógenas (Fuller, 1977).

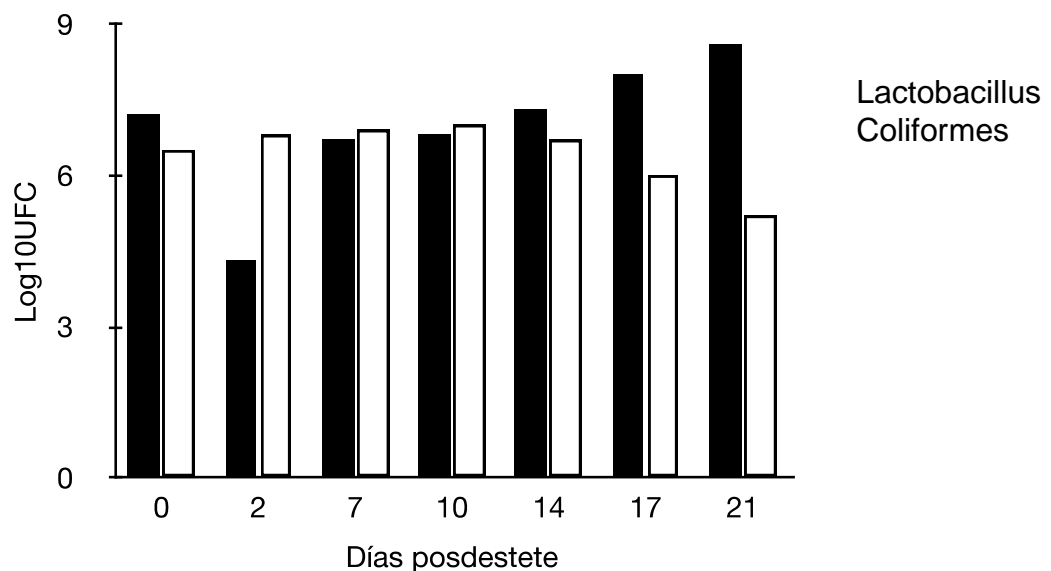
**Cuadro 6.** Efecto de la adición de ácido fórmico sobre los conteos<sup>1</sup> bacterianos en las diferentes porciones intestinales de lechones recién destetados (adaptado de Roth y Kirchgessner, 1998).

Especies	Bacterias ácido lácticas		E. coli	
	0	1.2	0	1.2
Duodeno	6.4±0.7	5.5±0.6	5.5±0.9 <sup>a</sup>	3.3±0.7 <sup>o</sup>
Yeyuno	6.7±0.7 <sup>a</sup>	5.8±0.7 <sup>o</sup>	6.8±0.5 <sup>a</sup>	5.3±0.9 <sup>o</sup>
Íleon	7.2±1.3	6.6±1.4	7.9±0.7	6.8±1.5
Ciego	8.1±0.7	7.5±0.6	6.8±0.6	6.9±0.6
Colon	8.6±0.8	8.0±0.7	6.3±0.7	6.0±1.3

<sup>1</sup>Unidades formadoras de colonias en log10·g de material fresco<sup>-1</sup>.

También se reporta que, los acidificantes *per se* poseen una fuerte actividad antimicrobial por un medio de acción diferente a la reducción del pH en el TGI. Los

ácidos orgánicos no disociados pueden penetrar la pared celular de ciertos tipos de bacterias y alterar su fisiología normal (Lambert y Straford, 1999). Luego de penetrar, los ácidos orgánicos no disociados, se ven expuestos al pH interno de la bacteria y se disocian, liberando  $H^+$  y aniones. El pH interno disminuye y en las bacterias sensibles al pH como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium* y *Listeria* se activa una  $ATPase_{H^+}$  para tratar de equilibrar el pH llevándolo a un nivel normal.



**Figura 11.** Efecto del día posdestete sobre las concentraciones de *Lactobacillus* y *Coliformes* en contenidos ileales de lechones recién destetados (adaptado de Mathew *et al.*, 1996).

Este proceso de estabilización del pH consume grandes cantidades de energía, lo cual tiene como resultado una disminución en la tasa de crecimiento de la bacteria y posteriormente desencadenará su muerte. Por otro lado una disminución en el pH interno de la bacteria inhibe la glucólisis, inhibe el transporte activo e interfiere con la traducción y la síntesis de proteínas. Además, la acumulación de aniones deriva en desbalances osmóticos, generando toxicidad para la bacteria haciendo que entren grandes cantidades de líquidos reventando a la bacteria. (Roe *et al.*, 1998; Gauthier, 2002).

Desde este punto de vista, se puede deducir a partir de la literatura revisada, que el efecto de la adición de acidificantes sobre la flora bacteriana presente en el TGI al momento del destete se observa principalmente en estómago y duodeno, ya que como se puede apreciar en el Cuadro 4 las diferencias significativas se dan en estas dos regiones (Partanen y Mroz, 1999; Kim *et al.*, 2005; Kil *et al.*, 2011).

El último principio sobre el que se basa la acción de los acidificantes es su efecto sobre la digestión de nutrientes. Muchos autores han aseverado que la adición de acidificantes a la dieta de lechones recién destetados mejora la digestibilidad de la proteína y los aminoácidos, debido a que se disminuye el pH del contenido gástrico, con lo que se logra una rápida activación de la pepsina. Además sugieren que los acidificantes en la dieta pueden retardar la tasa de pasaje de la digesta gástrica al duodeno, y que un contenido ácido a nivel duodenal estimula la secreción pancreática, en la que van incluidas las enzimas proteolíticas, necesarias para una buena digestión de las proteínas (Ravindran y Kornegay, 1993; Partanen y Mroz, 1999, Kim *et al.*, 2005; Kil *et al.*, 2011). En efecto al revisar la literatura, existen evidencias que indican que la digestibilidad mejora entre un 0.3 y un 4.4%, de acuerdo a lo referido por diversas publicaciones (Falkowski y Aherne, 1984; Radcliffe *et al.*, 1998; Eidelsburger *et al.*, 1992; Eckel *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2005; Partanen y Mroz, 1999; Kil *et al.*, 2011). Sin embargo, ellos mismos indican que los efectos de los acidificantes sobre la digestibilidad dependen de la dosis, del tipo de ácido ( $pK_a$ ) y por ende del tipo de dieta, ya que son estos factores son los mismos que determinan el efecto de los acidificantes sobre el pH del estómago, y es este último el que influye sobre la actividad de la pepsina y la secreción pancreática (donde se encuentran las otras enzimas pancreáticas), lo cual influencia directamente a la digestibilidad.

Como es de esperarse todos los efectos de los acidificantes van encaminados a mejorar la situación crítica que vive el lechón al momento del destete, y el mejoramiento de dichas condiciones se deben ver reflejadas en su desarrollo físico.

Desafortunadamente, así como los datos de pH, y modulación de poblaciones bacterianas, los resultados son muy disímiles, o simplemente no se han observado diferencias estadísticas con el control (alimento sin acidificante) (Krause *et al.*, 1995; Manzanilla *et al.*, 2004; Kil *et al.*, 2006; Kil *et al.* 2011).

A manera de conclusión se puede decir que la inclusión de los acidificantes en alimentos para lechones recién destetados, reducen el pH del contenido gástrico, dependiendo de la dosis y el pK<sub>a</sub> del ácido utilizado, pero este descenso en el pH no significa que tenga la capacidad de atenuar el efecto que tiene el destete sobre el tracto gastrointestinal, ya que hace falta mucha investigación para conocer sus efectos sobre las poblaciones bacterianas y la digestibilidad de los nutrientes, dichas investigaciones deberán establecer sobre que tipo de animales el acidificante es más eficiente y que tipo de alimento (composición) debe ofrecerse para aprovechar el potencial del ácido a utilizar.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los componentes dietéticos, en términos del nivel de proteína dietética y la presencia de antibiótico y/o probióticos sobre el medio ambiente y la salud intestinal y el comportamiento productivo de lechones recién destetados.

#### 3.1 *Objetivos particulares*

Evaluar los efectos del nivel de proteína dietética y la inclusión de antibióticos y/o probióticos en la dieta sobre:

1. La concentración de metabolitos de la fermentación bacteriana.
2. La morfo-fisiología gastrointestinal.
  - 2.1. Morfología de vellosidades y criptas intestinales.
  - 2.2. Secreción de mucinas en duodeno, yeyuno e íleon.
  - 2.3. pH de los contenidos gastrointestinales.
3. La incidencia y la severidad de las diarreas posdestete
4. El comportamiento productivo de los lechones recién destetados.

### 4. LITERATURA CITADA

- Alexopoulos C., Georgoulakis I.E., Tzivara A., Kyriakis C.S., Govaris A, Kyriakis S.C. 2004. Field Evaluation of the Effect of a Probiotic-containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* Spores on the Health Status, Performance, and Carcass Quality of Grower and Finisher Pigs. *J Vet Med.* 51: 306-312.
- Aperce C.C., Burkey T.E., KuKanich B., Crozier-Dodson B.A., Dritz S.S., Minton J.E. 2010. Interaction of *Bacillus* species and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in immune or inflammatory signaling from swine intestinal epithelial cells. *J Anim Sci.* 88: 1649-1656.
- Aufreiter S., Kim J.H., O'Connor D.L. 2011. Dietary oligosaccharides increase colonic weight and the amount but not concentration of bacterially synthesized folate in the colon of piglets. *J Nutr.* 141: 366–72.



- Bach Knudsen K. E. 2001. The nutritional significance of “dietary fiber” analysis. *Anim Feed Sci Technol.* 90: 3-20.
- Bach Knudsen K.E., Hansen I. 1991. Gastrointestinal implication in pigs of wheat and oat fractions. 2. Microbial activity in the gastrointestinal tract. *Br. J. Nutr.* 65: 233-248.
- Barrow P.A., Fuller R., Newport M.J. 1977. Changes in the microflora and physiology of the anteriorintestinal tract of pigs weaned at 2 days with special reference to the pathogenesis of diarrhea. *Infect Immunol.* 18: 586-595.
- Bhandari, S.K., Opapeju, F.O., Krause, D.O. and Nyachoti, C.M. 2010. Dietary Protein Level and Probiotic Supplementation Effects on Piglet Response to *Escherichia coli* K88 Challenge: Performance and Gut Microbial Population. *Livest. Sci.* 133: 185-188.
- 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.
- Bindelle J., Buldgen A., Delacollette M., Wavreille J., Agneessens R., Destain J.P., Leterme P. 2009. Influence of source and concentrations of dietary fiber on in vivo nitrogen excretion pathways in pigs as reflected by in vitro fermentation and nitrogen incorporation by fecal bacteria *J Anim Sci.* 87: 583-593.
- Bindelle J., Pieper R., Leterme P., Rossnagel B., Van Kessel A.G. 2010. Changes in intestinal microbial ecophysiology as related to the carbohydrate composition of barleys and oats cultivars in an in vitro model of the pig gastrointestinal tract. *Livest Sci* 133: 151-153.
- Bjerre, A., Brusletto, B., Rosenqvist, E., Namork, E., Kierulf, P., Ovstebo R., Joo G.B., Brandtzaeg P. 2000. Cellular activating properties and morphology of

membrane-bound and purified meningococcal lipopolysaccharide. J. Endotoxin Res. 6: 437–445.

- Blachier F., Mariotti F., Huneau J.F. y Tomé D. 2007. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. Amino Acids. 33: 547-562.
- Bontempo V., Di Giancamillo A., Savoini G., Dell'Orto V., Domeneghini, C. 2006. Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. Anim. Feed Sci. Technol. 129: 224-236.
- Bosi P., Sarli G., Casini L., De Filippi S., Trevisi P., Mazzoni M., Merialdi G. 2007. The influence of fat protection of calcium formate on growth and intestinal defence in *Escherichia coli* k88-challenged weanling pigs. Anim Feed Sci Technol. 139: 170-185.
- Boucher, D. G., James, S. & Kresler, K. 1984. The ecology of mutualism. Ann. Rev. Ecol. Syst. 13: 315-347.
- Brown D.C., Maxwell C.V., Erf G.F., Davis M.E., Singh S., Johnson Z.B. 2006. The influence of different management systems and age on intestinal morphology, immune cell numbers and mucin production from goblet cells in post-weaning pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 111: 187-198.
- Buddington R.K., Sangild P.T. 2011. Development of the mammalian gastrointestinal tract, the resident microbiota, and the role of diet in early life. J. Anim. Sci. 89: 1506-1519.
- Burkey T.E., Skjolaas K.A., Minton J.E. 2009. Porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract. J. Anim. Sci. 87: 1493-1501.
- Burnell T.W., Cromwell G.L., Stahly T.S. 1988. Effects of dried whey and copper sulfate on the growth responses to organic acid in diets for weanling pigs. J Anim Sci. 66: 1100-1108.

- Burrin D.G., Petersen Y., Stoll B., Sangild P. 2001. Glucagon-Like Peptide 2: A Nutrient-Responsive Gut Growth Factor. *J Nutr.* 131: 709-712.
- Caliendo G., Cirino G., Santagada V., Wallace J.L. 2010. Synthesis and Biological Effects of Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S): Development of H<sub>2</sub>S-Releasing Drugs as Pharmaceuticals. *J Med Chem.* 53: 6275-6286.
- Carneiro M.S.C., Lordelo M.M., Cunha L.F., Freire J.P.B. 2008. Effects of dietary fibre source and enzyme supplementation on faecal apparent digestibility, short chain fatty acid production and activity of bacterial enzymes in the gut of piglets. *Anim Feed Sci Technol* 146: 124-136.
- Choi J.Y., Shinde P.L., Ingale S.I., Kim J.S., Kim Y.W., Kim K.H., Kwon I.K., Chae B.J. 2011. Evaluation of multi-microbe probiotics prepared by submerged liquid or solid substrate fermentation and antibiotics in weaning pigs. *Livest. Sci.* 138: 144-151.
- Christensen L. H., Nirdrn J., y John Villadsen. 1992. Monitoring of substrates and productd during fed-batch penicillin fermentations on complex media. *Anal. Chem. Acta.* 249: 123-136.
- Courtney J.R., Bohannan B.J.M., Young V.B. 2010. From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 453-476.
- Cummings J. H., Macfarlane G.T. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacter.* 70: 443-459.
- Cutting S.M. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.* 28: 214-220.
- Darveau R.P., McFall-Ngai M., Ruby E., Miller S., Mangan D.F. 2003. Host tissues may actively respond to beneficial microbes. *ASM News* 69:186-191.
- Davis E., Rehberger J., King M., Brown D.C., Maxwell C.V., Rehberger T. 2010. Characterization of gastrointestinal microbial and immune populations post-

weaning in conventional-reared and segregated early weaned piglets. *Livest. Sci.* 133: 92-94.

- Donohoe D.R., Garge N., Zhang X., Sun W., O'Connell T.M., Bunker M.K., Bultman S.J. 2011. The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metab.* 13: 517-526.
- Duerkop B.A., Vaishnava S., Hooper L.V. 2009. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Cell.* 31: 368-376.
- Duncan S.H., Hold G.L., Harmsen H.J.M., Stewart C.S., Flint H.J. 2002. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002. 52: 2141-2146.
- Eckel B., Kirchgessner M., Roth F.X. 1992. Influence of formic acid on daily weight gain, feed intake, feed conversion rate and digestibility. 1. The nutritive value of organic acids in the rearing of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 62: 93-100.
- Eidelsburger U., Kirchgessner M., Roth F.X. 1992. Influence of formic acid, calcium formate and sodium bicarbonate on pH, concentration of carbonic acids and ammonia in different segments of the gastrointestinal tract. 8. Nutritive value of organic acids in piglet rearing. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 68: 20-32.
- Escobar G. K., Reis de Souza T.C., Mariscal L.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.
- Estrada, A., M. D. Drew, and A. van Kessel. 2001. Effect of the dietary supplementation of fructooligosaccharides and *Bifidobacterium longum* to early-weaned pigs on performance and fecal bacterial populations. *Can. J. Anim. Sci.* 82:607-609.

- Falk P.G., Hooper L.V., Midtvedt T., Gordon J.I. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1157-1170.
- Falkowski J.F, Aherne F.X. 1984. Fumaric and citric acid as feed additives in starter pig nutrition. *J Anim Sci.* 58: 935-938.
- Franklin M.A., Mathew A.G., Vickers J.R., R. Clift A. 2002. Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. *J Anim Sci.* 80: 2904-2910.
- Fuller R. 1977. The importance of lactobacilli in maintain normal microbial balance in the crop. *Br Pout Sci.* 18: 89-94.
- Furet J.P., Firmesse Olivier., Gourmelon M., Bridonneau C., Tap J., Mondot S., Doré J., Corthier G. 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *Microbiol Ecol.* 68: 351-362.
- Fuwa H., Takaya T., Sugimoto Y. 1980. Degradation of various starch granules by amylases. In *Mechanisms of Saccharide Polymerization and Depolymerization* ed. Marshall, J.J. pp. 73-100. New York: Academic Press.
- Garret W.S., Gordon J.I., Glimcher L.H. 2010. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell.* 140: 859-870.
- Gauthier R. Intestinal health, the key to productivity – the case of organic acids. Precongreso Científico Avícola IASA XXVII convención ANECA-WPDC. Puerto Vallarta, Jal. México. Abril 30, 2002.
- Giaggia F., Mattarelli P., Biavati B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Intl. j. Food Microbiol.* 141: 15-28.
- Gibson G.R., Roberfroid M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.

- Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., Kuby J. 2003. Immunology. 5 ed. New York: W. H. Freeman and Company.
- Gong J., Forster H., Yu J.R., Chambers P.M., Sabour R., Wheatcroft S. 2003. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. Microbiol. Lett. 208: 1-7.
- 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.
- Hall J.E. 2011. Tratado de fisiología médica. 12<sup>va</sup> ed. Elsevier-Saunders. Barcelona, España.
- Henderson C., Hodgkiss W., 1973. An electron microscopic study of Anaerovibrio lipolytica (strain 5 S) and its lipolytic enzyme. J Gen Microbiol. 76: 389- 393.
- Hermes G.P., Molist F., Ywazaki M., Gomez de Segura A., Gasa J., Torrallardona D., Pérez J.F. 2010. Effects of type of cereal and fibre level on growth and parameters of the gastrointestinal tract in young pigs. Livest. Sci. 133: 225-228.
- Hermes R.G., Molist F., Ywazaki M., Nofrarías 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. J. Anim. Sci. 87:3569-3577.
- Hetty M. G., van Beers S., Nabuurs M.J.A., Vellenga L., van der Valk H.J.K., Wensing T., Breukink H.J. 1998. Weaning and the Weanling Diet Influence the Villous Height and Crypt Depth in the Small Intestine of Pigs and Alter the Concentrations of Short-Chain Fatty Acids in the Large Intestine and Blood. J Nutr. 128: 947-953.
- Hooper L.V. 2004. Bacterial contribution to mammalian gut development. Trends Microbiol. 12: 21-28.

- Houdijk J.G.M., Hartemink R., Van Laere K.M.J., Williams B.A., Bosch M.W., Verstegen A., Tamminga S. 1997. Fructooligosaccharides and transgalactooligosaccharides in weaner pigs diets. En: Proceedings of the international symposium of non-digestible oligosaccharides "healthy food for the colon. Wageningen, Nederland
- Hughes, R., Magee, E.A.M., Bingham, S. 2000. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr Iss Intest Microbiol.* 1: 51-58.
- Hungate R.E., Phillips G.D., Hungate D.P., Mcgregor A. 1960. A comparison of the rumen fermentation in European and zebu cattle. *J Agr Sci.* 54:196-201.
- Iason G. 2005. The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivory: ecological perspectives. *Proc. Nutr. Soc.* 64: 13-131.
- Inohue R., Tsukahara T., Nakanishi N., Ushida K. 2005. Development of the intestinal microbiota in the piglet. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51: 257-265.
- Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol Rev.* 59: 171-200.
- Jensen B.B. 1998. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J Anim Feed Sci Technol.* 89: 175-188.
- Jensen B.B., Jorgensen H. 1994. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1897-1904.
- Katz, J. R. 1934. X-ray investigation of gelatinization and retrogradation of starch and its importance for bread research. *Bakers Weekly* 81, 34-37.
- Kidder D.E., Manners M.J. Digestibility. In digestion in the pig. Bath UK: Kingeton Press; 1978. p.190.

- Kil D.Y., Kwon W.B., Kim B.G. 2011. Dietary acidifiers in weanling pig diets: a review. *Rev. Col. Cien. Pecu.* 24: 231-247.
- Kil D.Y., Kwon W.B., Kim B.G. 2011. Dietary acidifiers in weanling pig diets: a review. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 24: 231-247.
- Kim Y.Y., Kil D.Y., Oh H.K., Han I.K. 2005. Acidifier as an Alternative Material to Antibiotics in Animal Feed. *Asian-Aust J Anim Sci.* 2005. 18: 1048-1060.
- Konstantinov S.R., Favier C.F., Zhu W.Y., Williams B.A., Klub J., Souggrant W.B., De Vos W.M., Akkermans A.D.L., Smidt H. 2004. Microbial diversity studies on the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Anim. Res.* 53: 317-324.
- Krause D.O., Easter R.A., White B.A., Mackie R.I. 1995. Effect of weaning diet on the ecology of adherent lactobacilli in the gastrointestinal tract of the pig. *J. Anim. Sci.* 73: 2347-2354.
- Kyriakis, S. C., V. K. Tsiloyiannis, J. Vlemmas, K. Sarris, A. C. Tsinas, C. Alesopoulos, and L. Jansegers. 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Res. Vet. Sci.* 67:223-228.
- Lallès J.P., Bosi P., Smidt H., Stokes C. 2007. Weaning a challenge to gut physiologists. *Livest. Sci.* 108:82-93.
- Lallès J.P., Boudry G., Favier C., Le Floc'h N., Luron I., Montagne L., Oswald I.P., Pié S., Piel C., Sève B., 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim Res.* 53: 301-316.
- Lambert R.J., Stratford M. 1999. Weak acid preservatives: modeling microbial inhibition and response. *J. Applied Microbiol.* 86: 157-164.
- Lawley T.D., Walker A.W. 2012. Intestinal colonization resistance. *Immunol.* 138: 1-11.



- Le Bon M., Davies H.E., Glynn C., Thompson C., Madden M., Wiseman J., Dodd C.E.R., Hurdidge L., Payne G., Le Treut Y., Craigon J., Töttemeyer S., Mellits K.H. 2010. Influence of probiotics on gut health in the weaned pig. *Livest Sci* 133: 179-181.
- Le Dividich J., and Herpin P. 1994. Effects of climatic conditions on the performance, metabolism and health status of weaned piglets: a review. *Livest. Prod. Sci.* 38: 79-90.
- Leser T.D., Amenuvor J.Z., Jensen T.K., Lindecrona R.H., Boye M., Møller K. 2002. Culture-Independent Analysis of Gut Bacteria: the Pig Gastrointestinal Tract Microbiota Revisited. *Appl Environ Microbiol.* 68: 673-690.
- Leser T.D., Melbak L. 2009. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ. Microbiol.* 11: 2194-2206.
- Lessard M., Dupuis M., Gagnon N., Nadean E., Matte J.J., Goulet J., Fairbrother J.M. 2009. Administration of *Pediococcus acidolactici* 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.
- Li J.V., Ashrafian H., Bueter M., Kinross J., Sands C., le Roux C.W., Bloom S.R., Darzi A., Athanasiou J.R., Marchesi J.R. 2011. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic cross-talk. *Gut.* 60: 1214-1223.
- Li Z., Yi G., Yin J., Sun P., Li D., Knight C. 2008. Effect of organic acids on growth performance, gastrointestinal pH, intestinal microbial populations and immune responses of weaned pigs. *Asian-Aust J Anim Sci.* 21: 252-261.
- Looft T., Johnson T.A., Allen H.K., Bayles D.O., Alt D.P., Stedtfeld R.D., Sul W.J., Stedtfeld T.M., Chai B., Cole J.R., Hashaham S.A., Tiedje J.M. 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *PNAS.* 109: 1691-1695.

- Louis P., Flint H.J. 2009. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Microbiol Lett.* 294: 1–8.
- MacFarlane G.T., Cummings J.H. 1991. The colonic flora, fermentation, and large bowel digestive function. En: Phillips S.F., Pemberton J.H., Shorter R.G., eds. *The large intestine: Physiology, Pathophysiology and disease.* Raven Press, New York.
- Mackie R.I., Sghir A., Gaskins H.R. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 69: 1035S–1045S.
- Mändar R., Mikelsaar M. 1996. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol Neonate.* 69: 30-35.
- Manzanilla E.G., Perez J.F., Martin M., Kamel C., Baucells F., Gasa J. 2004. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J Anim Sci.* 82: 3210-3218.
- Mathew A.G., Chattin S.E., Robbins C.M., Golden D. A. 1998. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. *J Anim Sci.* 76: 2138-2145.
- Mathew A.G., Sutton A.L., Scheidt A.B., Patterson J.A., Kelly D.T.,K. Meyerholtz A. 1993. Effect of galactan on selected microbial populations in the ileum of the weanling pig. *J. Anim. Sci.* 71: 1503-1509.
- Mathew, A.G., Franklin M.A., Upchurch W.G, Chattin S. E. 1996. Influence of weaning age on ileal microflora and fermentation acids in young pigs. *Nutr Res.* 16: 817-827.
- McDougall G.J., Morrison I.M., Stewart D., Hillman J.R. 1996. Plant cell walls as dietary fiber: range, structure, processing and function. *J. Sci. Food. Agric.* 70: 133-150.
- Meng Q.W., Yan L., Ao X., Zhou T. X., Wang J. P., Lee J. H., Kim I. H. 2010. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth

performance, nutrient digestibility, meat quality, and blood characteristics in growing-finishing pigs. *J Anim Sci.* 88: 3320-3326.

- Metzler-Zebeli B.U., Hooda S., Mosenthin R., Gänzle M.G., Zijlstra R.T. 2010. Bacterial fermentation affects net mineral flux in the large intestine of pigs fed diets with viscous and fermentable nonstarch polysaccharides. *J Anim Sci.* 88: 3351-3362.
- Mikkelsen, L. L., M. Jakobsen, and B. B. Jensen. 2003. Effects of dietary oligosaccharides on microbial diversity and fructo-oligosaccharide degrading bacteria in faeces of piglets post-weaning. *Anim. Feed Sci. Tech.* 109:133-150.
- Montagne L., Pluske J.R., Hampson D.J. 2003. A review of interactions between dietary fiber and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young and non-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Tech.* 108: 95-117.
- Mulder I.E., Schmidt B., Stokes C.R., Lewis M., Bailey M., Aminov R.I., Prosser J.I., Gill B.P., Pluske J.R., Mayer C.D., Musk C.C., Kelly D. 2009. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biol.* 7: 79-99.
- Nemcova, R. A., S. Boma, R. Gancarikova, R. Herich and P. Guba. 1999. Study of the effect of *Lactobacillus paracasei* and fructooligosaccharides on the faecal microflora in weanling pigs. *Ber. Mucnch. Tierdrztl. Wschr.* 112:225-228.
- Noverr M.C., Huffnagle G.B. 2005. The microflora hypothesis of allergic diseases. *Clin. Exp. Allergy.* 35: 1511-1520.
- NRC. 2012. *Nutrient Requirements of Swine.* Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- O'Hara A.M., Shanahan F. 2007. Mechanisms of Action of Probiotics in Intestinal Diseases. *Scient world J.* 7: 31-46.
- Opapeju F.O., Krause D.O., Payne R.L., Rademacher M., Nyachoti C.M. 2009. Effect of dietary protein level on growth performance, indicators of enteric health,

and gastrointestinal microbial ecology of weaned pigs induced with postweaning colibacillosis. *J Anim Sci.* 87: 2635-2643.

- Partanen K.H., Mroz Z. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr Res Rev.* 12: 117-145.
- Pickard K.M., Bremner A.R., Gordon J.N., MacDonald T.T. 2004. Immune Responses. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18: 271-285.
- Pié 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 cytokine-specific mRNA content in weaning piglets. *J. Anim. Sci.* 2007. 85:673-683.
- Pierce K.M., Callan J.J., McCarthy P., O'Doherty J.V. 2007. The interaction between lactose level and crude protein concentration on piglet post-weaning performance, nitrogen metabolism, selected faecal microbial populations and faecal volatile fatty acid concentrations. *Anim Feed Sci and Tech* 132: 267-282.
- 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. *Livest. Prod. Sci.* 51:215-236.
- Pollmann D.S., Danielson D.M. and Peo E.R. 1980. Effect of *Lactobacillus Acidophilus* on Starter Pigs Fed a Diet Supplemented with Lactose. *J Anim Sci.* 51: 638-644.
- Pommerville J. C. y Alcamo I. E. 2011. Fundamentals of microbiology: Body systems. Estados Unidos.
- Pothoulakis C., Lamont J.T. 2001. Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: 178-183.

- Prins R.A., Lankhorst A., van der Meer P., van Nevel C.J., 1975. Some characteristics of *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen lipolytic organism. *Ant Van Leeuwenhoek*. 41: 1-11.
- Pryde S.E., Richardson A.J., Stewart C.S., Flint H.J. 1999. Molecular Analysis of the Microbial Diversity Present in the Colonic Wall, Colonic Lumen, and Cecal Lumen of a Pig. *Appl Environ Microbiol*. 65: 5372-5377.
- Radcliffe J.S., Zhang Z., Kornegay E.T. 1998. The effects of microbial phytase, citric acid, and their interaction in a corn-soybean meal-based diet for weanling pigs. *J Anim Sci*. 76: 1880-1886.
- Raubenheimer D., Simpson S.J., Tait A.H. 2012. Match and mismatch: conservation physiology, nutritional ecology and the timescales of biological adaptation. *Phil. Trans. R. Soc*. 367: 1628-1646.
- Ravindran V., Kornegay E.T. 1993. Acidification of weaner pig diets: A review. *J. Sci. Food. Agric*. 62: 313-322.
- Redondo-Lopez V., Cook R.L., Sobel J.D. 1990. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis*. 12: 856-872.
- Richards J.D., Gong J., de Lange C.F.M. 2005. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Can. J. Anim. Sci*. 85: 421-435.
- Roca M., Nofrarías M., Majó N., Pérez de Rozas A.M., Segalés J., Castillo M., Martín-Orúe S.M., Espinal A., Pujols J., Badiola I. 2014. Changes in bacterial population on gastrointestinal tract of weaned pigs fed with different additives. *Biomed. Res. Intl*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/269402>.

- Roe A.J., McLaggan D., Davidson I., Oayrne C., I. Booth R. 1998. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *J. Bacteriol.* 180: 767-772.
- Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130:396S-402S.
- Roth F.X., Eckel B., Kirchgessner M., Eidelsburger U. 1992. Influence of formic acid on pH, dry matter content, and concentrations of volatile fatty acids and lactic acid in the gastrointestinal tract. 3. Nutritive value of organic acids in piglet rearing. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 67: 148-156.
- Roth, F.X., M. Kirchgessner. 1998. Organic acids as feed additives for young pigs: nutritional and gastrointestinal effects. *J. Anim. Feed Sci.* 7: 25-33.
- Salminen S.J., Gueimonde M., Isolauri E. 2005. Probiotics that modify disease risk. *J. Nutr.* 135: 1294-1298.
- Sears C. 2005. A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe.* 11: 247-251.
- Serikov I., Russell S.L., Antunes L.C.M., Finlay B.B. 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev.* 90: 859-904.
- Shah P., Nanduri B., Swiatlo E., Ma Y., Pendarvis K. 2011. Polyamine biosynthesis and transport mechanisms are crucial for fitness and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol.* 157: 504-515.
- Sharma R., Schumacher U. 1995. The influence of diets and gut microflora on lectin binding patterns of intestinal mucins in rats. *Lab. Invest.* 73: 558-564.
- Shim S. B., Verstegen M.W., Kim I.H., Kwon O.S., Verdonk J.M. 2005. Effects of feeding antibiotic-free creep feed supplemented with oligofructose, probiotics or symbiotics to suckling piglets increases the preweaning weight gain and composition of intestinal microbiota. *Arch. Anim. Nutr.* 59: 419-427.

- Simpson, J. M., V. J. McCracken, H. R. Gaskins, and R. I. Mackie. 2000. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S Ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4705-4714.
- Skjolaas, K.A., Burkey, T.E., Dritz, S.S. and Minton, J.E. 2007. Effects of *Salmonella enteric* Serovar *Typhimurium*, or Serovar *Choleraesuis*, *Lactobacillus reuteri* and *Bacillus licheniformis* on Chemokine and Cytokine Expression in the Swine Jejunal Epithelial Cell Line, IPEC-J2. *Veterinary Immunology and Immunopathol.* 115: 299-308.
- Smiricky-Tjardes M.R., Grieshop C.M., Flickinger E.A., Bauer L.L. and 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 E.A., MacFarlane G.T. 1997. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe* 3: 327-337.
- Spees A.M., Lopez C.A., Kingsbury D.D., Winter S.E., Bäumlér A.J. 2013. Colonization resistance: Battle of the bugs or ménage à trois with the host?. *PLOS Pathogens.* 9: 1-4.
- Stein H.H., Kil D.Y. 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: Dietary tools, Part 2. *Anim Biotechnol.* 17: 217-231.
- Stevens C.E., Hume I.D. 1998. Contributions of Microbes in Vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients. *Physiol Rev.* 78: 393-427.
- Suzuki K., Meek D., Dot Y. 2004. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 1981-1986.

- Swords W.E., Wu C.C., Champlin F.R., Buddington R. K. 1993. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Biol. Neonate* 63:191-200.
- Tabor C.W., Tabor H. 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 49: 81-99.
- Tako E., Glahn R.P., Knez M., Stangoulis J.C.R. 2014. The effect of wheat prebiotics on the gut bacterial population and iron status of iron deficient broiler chickens. *Nutr. J.* 13: 58-68.
- Tannock G.W. 1999. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. En: *Gastrointestinal microbiology*, Mackie R.I., White B.A., eds. Chapman and Hall microbiology. Series. New York.
- Topping D.L., Clifton P.M. 2001. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiol Rev.* 81: 1031-1064.
- Van Kessel A., Shirkey T.W., Siggers R.H., Drew M.D., Laaveld B. 2004. Commensal bacteria and intestinal development. Studies using gnotobiotic pigs. En: *Interfacing immunity, gut health and performance*. Tucker L.A., Taylor-Pickard J.A., eds. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Van Soest P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press. Ithaca., New York.
- Vlaeminck B., Fievez V., Tamminga S., Dewhurst R.J., Van Vuuren A.M., De Brabander D., Demeyer D., 2006. Milk odd- and branched-chain fatty acids in relation to the rumen fermentation pattern. *J Dairy Sci.* 89: 3954-3964.
- Walker W.A. 2008. Mechanism of action of probiotics. *Clin. Infect. Diseases* 46:S86-91.



- Wang Q., Dong J., Zhu Y. 2012. Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants: an updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trial. *J. Ped. Surg.* 47: 241–248.
- Wang W.W., Qiao S.Y., Li D.F. 2009. Amino acids and gut function. *Amino acids.* 37: 105-110.
- Wellock I.J., Houdijk J.G.M., Kyriazakis I. 2006. Effect of dietary non-starch polysaccharide solubility and inclusion level on gut health and the risk of post weaning enteric disorders in newly weaned piglets. *Livest Sci.* 108: 186-189.
- Wellock, I.J., Houdijk, J.G.M. and Kyriazakis, I. 2007. Effect of Dietary Non-Starch Polysaccharide Solubility and Inclusion Level on Gut Health and the Risk of Postweaning Enteric Disorders in Newly Weaned Piglets. *Lives. Sci.* 108: 186-189.
- Wilks M. 2007. Bacteria and early human development. *Early Human Develop.* 83: 165-170.
- 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.
- Windey K., De Preter V. Y., y Verbeke Z. 2012. Protein fermentation to gut health. *Mol Nutr Food Res* 56: 184-196.
- Xu C., Wang Y., Sun R., Qiao X., Shang X., Niu W. 2014. Modulatory effects of vasoactive intestinal peptide on intestinal mucosal immunity and microbial

community of weaned piglets challenged by enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88).

- Zoetendal E.G., Collier C.T., Koike S., Mackie R.I., Gaskins H.R. 2004. Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review. *J. Nutr.* 134: 465–472.

## 5. METODOLOGÍA

El trabajo de tesis se elaboró en tres etapas diferentes, las cuales generaron tres capítulos que tuvieron la finalidad de cubrir los objetivos particulares. Los capítulos fueron manuscritos independientes, por lo que en cada uno de ellos se describe la metodología seguida para la obtención de cada una de las variables de respuesta, así como los análisis estadísticos aplicados en cada una de dichas variables. Además de la metodología en cada capítulo se incluyen resultados, conclusiones, implicaciones y referencias. Los capítulos son los siguientes:

*Capítulo uno:* Microbial fermentation patterns, diarrhea incidence, and performance in weaned piglets fed a low protein diet. (Artículo publicado: *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 5: 1776-1786).

*Capítulo dos:* Dietary protein levels alter microbial fermentation patterns in intestines of weaned piglets. (Artículo enviado: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Manuscript ID: Apr-15-250).

*Capítulo tres:* Morpho-physiology of intestinal tract of newly weaned piglets can be altered as response to starter diet components. (Artículo en borrador).

Al finalizar todos los capítulos se realizó una conclusión general del trabajo de tesis.

#### **4. CAPÍTULO 1**

### **MICROBIAL FERMENTATION PATTERNS, DIARRHEA INCIDENCE, AND PERFORMANCE IN WEANED PIGLETS FED A LOW PROTEIN DIET**

Food and Nutrition Sciences. 2014. 5: 1776-1786

# Microbial Fermentation Patterns, Diarrhea Incidence, and Performance in Weaned Piglets Fed a Low Protein Diet Supplemented with Probiotics

Konigsmar Escobar García<sup>1</sup>, Tércia Cesária Reis de Souza<sup>1\*</sup>, Gerardo Mariscal Landín<sup>2</sup>, Araceli Aguilera Barreyro<sup>1</sup>, María Guadalupe Bernal Santos<sup>1</sup>, José Guadalupe Gómez Soto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

<sup>2</sup>CENID-Fisiología, Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuaria, Colón, México  
Email: \*[tercia@uaq.mx](mailto:tercia@uaq.mx)

Received 12 July 2014; revised 6 August 2014; accepted 15 August 2014

Copyright © 2014 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

---

## Abstract

To evaluate the effects of dietary protein levels and probiotic supplementation on microbial intestinal fermentation, diarrhea incidence, and performance in weaned piglets, 162 piglets were randomly assigned to three treatments: high-protein diet (20%), with antibiotics (HPa); high-protein diet (20%), without antibiotics (HP); and low-protein diet, without antibiotics but with probiotics (LPpb). Piglets and feed were weighed weekly to calculate the average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), and gain: feed ratio (G:F). Four piglets per treatment were killed on day 21 postweaning to collect ileal and colon digesta for measurement of short-chain fatty acids (SCFAs), branched-chain fatty acids (BCFAs), lactic acid (LA), and ammonia (AM). In the digesta collected from the ileum and colon, piglets fed the HPa diet had the lowest concentration of volatile fatty acids. Additionally, the HP diet produced the highest concentration of BCFAs, while the LPpb diet produced more acetic, propionic, and butyric acids than the HPa and HP diets. Piglets fed the HP diet had higher incidence and severity of diarrhea than piglets fed LPpb and HPa diets, and similar values were observed between these two groups. The second week postweaning was the most critical for diarrhea measurements; during the second week, animals had higher incidence and severity of diarrhea. Piglets fed the HPa and LPpb diets had similar ADGs, while those fed the HP diet had the poorest ADG. Similar results were observed with ADFI and G:F. A low-protein diet supplemented with probiotics changed the fermentation profile, reducing toxic metabolites, promoting gut health, decreasing the incidence and severity of postweaning diarrhea, and improving the performance of piglets.

---

\*Corresponding author.

## Keywords

Diarrhea, Intestinal Fermentation, Piglet, Probiotics, SCFAs

### 1. Introduction

The use of vegetable protein sources in diets offered at weaning, when newly weaned piglets have a limited digestive capacity, promotes fermentation of undigested protein by opportunistic microorganisms, producing branched-chain fatty acids (BCFAs) and ammonia (AM). BCFAs and ammonia are toxic metabolites for the intestinal mucosa and most likely trigger of postweaning diarrhea and poor performance in piglets [1] [2]. Thus, postweaning diarrhea is associated with the consumption of high-protein diets [3] [4].

To prevent postweaning diarrhea, piglets are often given antibiotics; however, antibiotics have been banned for use in livestock for human consumption, exacerbating postweaning diarrhea and related problems in piglets. Consequently, research has focused on looking for alternatives to replace antibiotics in piglet diets. One alternative is the use of low-protein diets: it has been hypothesized that consumption of a low crude protein diet reduces the availability of substrates for bacterial fermentation [5] [6] and improves fecal consistency [5] [7]-[9], which have direct effects on postweaning diarrhea [3] [9] [10]. Another alternative is the use of probiotics, which have shown to have beneficial effects on intestinal health and productive performance in newly weaned piglets [10] [11]. While previous studies have evaluated separately the use of low-protein diets and diets including probiotics with different responses, no studies have assessed the effects of combining both treatments.

The aim of this study was to evaluate the effects of a combination of a low protein diet with probiotics on the fermentation patterns of the ileum and colon, the incidence and severity of diarrhea, and piglet performance during the first three weeks postweaning. Additionally, this diet was compared to a high protein diet with or without antibiotics.

### 2. Materials and Methods

The experiment was conducted at the experimental farm of CENID-Physiology (INIFAP, Mexico). The protocol was reviewed and approved by the bioethical committee of the Faculty of Natural Sciences of Autonomous University of Queretaro. The experimental animals were treated according to the guidelines of the Mexican official norm (NOM-062-ZOO-1999) for production, care, and use of animals for experimentation [12] and the guidelines of the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals [13].

#### 2.1. Animals and Diets

One hundred sixty-two (Fertilis 20 × G Performance, *Genetiporc*) piglets were used. Animals were weaned at 20 ± 1.4 days with an average body weight of 6.6 ± 1.1 kg. Piglets were housed in groups of six per pen, with nine pens per treatment. Experimental treatments (diets) were as follows: high-protein diet (20%) with antibiotics (HPa); high-protein diet (20%) without antibiotics (HP); and low-protein diet (16%) without antibiotics and with probiotics (LPpb), as described in **Table 1**. High-protein diets provided amino acid requirements for this production phase [14]; lysine, methionine, threonine, tryptophan, and valine were included in the low-protein diet to cover nutritional requirements of the piglets [14]. The probiotic used in the LPpb group included *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (1:1).

#### 2.2. Animal Management, Performance Data, and Fecal Scores

Piglets were placed in a temperature-controlled room (30°C, 28°C, and 26°C ± 2°C during the first, second, and third weeks postweaning, respectively). Animals were housed in weaning pens, with a nipple drinker and a feeder with six spaces; piglets had free access to feed and water throughout the entire experimental period. Piglets were weighed at the beginning of the experimental period and then every week thereafter. At the end of each week, the feed intake of each pen was measured by determining the difference between the amount of feed offered and the amount of feed rejected. These values were used to estimate feed efficiency (gain: feed ratio, G:F). To calculate the average daily feed intake (ADFI) and the average daily gain (ADG), the weekly measurements

**Table 1.** Ingredients and chemical compositions of experimental diets.

Ingredients (%)	Treatments		
	HPa	HP	LPpb
Maize	43.57	43.62	55.67
Soybean meal	15.00	15.00	4.02
Fish Menhaden meal	1.00	1.00	1.00
Soybean protein concentrate	10.49	10.49	8.73
Whey dried	24.69	24.69	24.69
Maize oil	2.00	2.00	2.00
Lysine	0.22	0.22	0.50
Aminogut*	0.80	0.80	0.80
Threonine	0.02	0.02	0.15
Methionine	0.04	0.04	0.08
Tryptophan	0.01	0.01	0.08
Valine	--	--	0.17
Salt	0.01	0.01	0.01
Sodium carbonate	0.89	0.89	0.73
Limestone	0.71	0.71	0.82
Linco Spectin Premix**	0.05	--	--
Vitamins and minerals*****	0.30	0.30	0.30
Gustor***	0.20	0.20	0.20
Bioplus 2B****	--	--	0.05
<b>Chemical Composition</b>			
Dry matter (%)	89.7	91.7	90.3
Crude protein (%)	20.0	19.9	16.1
Ash (%)	5.9	5.8	5.6
Crude fat (%)	3.4	3.6	1.8
NDF (%)	5.8	5.0	5.6
ME (kcal·kg <sup>-1</sup> )	3300	3300	3300

HPa: high-protein diet with antibiotics; HP: high-protein diet without antibiotics; LPpb: low-protein diet without antibiotics and with probiotics; \*Aminogut, L-glutamine and L-glutamic acid (1:1), (Ajinomoto, Japan); \*\*Linco Spectin premix, 2.2 g lincomycin, 2.2 g spectinomycin (Zoetis, USA); \*\*\*Gustor sodium butyrate, (Norel, Spain); \*\*\*\*Bioplus 2B: *B. subtilis* and *B. licheniformis* (1:1); (Crh Hansen, Denmark); \*\*\*\*\*Vitamin and mineral premix: (vitamins per kg of diet: vitamin A 10,200 IU; vitamin D 1980 IU; vitamin E 60 IU; vitamin K 1.20 mg; choline 967 mg; niacin 36 mg; pantothenate 17 mg; riboflavin 7.2 mg; vitamin B<sub>12</sub> 38 µg; thiamine 0.30 mg; pyridoxine 0.31 mg; biotin 0.08 mg; folate 0.75 mg mineral/kg diet; copper 14.4 mg; iodine 800 mg; iron 105 mg; manganese 36 mg; selenium 0.3 mg; zinc 144 mg).

were divided by seven (days of a week). Incidence of diarrhea was measured daily in each pen by direct observation by two different evaluators. The severity of diarrhea was measured through visual evaluation of the fecal consistency, using a score from 0 to 3, where 0 indicated normal feces, 1 indicated mild diarrhea, 2 indicated moderate diarrhea, and 3 indicated severe diarrhea. The daily score of each pen was averaged every week to calculate the severity of diarrhea [3].

### 2.3. Sampling and Analysis

At day 21 after weaning, four animals from each group (one per experimental unit [pen]) were stunned using CO<sub>2</sub> and euthanized by exsanguination by severing the jugular vein. A midline incision was made in the abdomen to expose the digestive tract. The small and large intestines were removed from the abdominal cavity to collect the terminal ileum and proximal colon digesta, which were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Concentrations of acetic, propionic, butyric, and valeric acids (SCFAs); isobutyric, isovaleric, and isocaproic acids (BCFAs) [15] and lactic acid (LA) [16] were measured by gas chromatography; and ammonia (AM) by distillation [17]. Diets were analyzed by Association of Official Analytical Chemists methods [17]: moisture (934.01), ashes (900.02), crude protein (984.13), crude fat (954.16). Neutral Detergent Fiber (NDF) were measured by Van Soest method [18].

### 2.4. Statistical Analysis

Fermentation profiles were analyzed using a completely randomized design, considering the piglet as the experimental unit. ADG, ADFI, and G:F were analyzed using a completely randomized design, considering the pen as the experimental unit. In both cases,  $\alpha$ -value of 0.05 was used to assess significance, and means were compared by Tukey's test using the GLM procedure of SAS [19] [20]. The presence and severity of diarrhea were analyzed as repeated measures on a time design, considering the pen as the experimental unit using the Proc Mix procedure of SAS [20].

## 3. Results

### 3.1. Microbial Fermentation End Products

Fermentation profiles in the ileum and colon were affected by diet (**Table 2**). Piglets fed HPA had lower concentration of total VFAs (Volatile Fatty Acids) ( $P < 0.001$ ) than piglets fed diets without antibiotics (HP and LPpb). The effects of antibiotic on the VFAs profile in the ileum and colon were different. The absence of antibiotic in the HP diet increased SCFA production in the ileum, but decreased SCFA production in the colon ( $P < 0.001$ ). Animals fed the LPpb diet had higher concentration of SCFAs in the ileum and colon ( $P < 0.001$ ) than animals fed the HP or HPA diet. Acetate was the most abundant SCFAs in piglets fed the LPpb diet, followed by butyrate and propionate. Higher concentrations of BCFAs were observed in the digesta, in both ileum and colon, of animals fed the HP diet than in those fed the HPA and LPpb diets ( $P < 0.001$ ). LA concentrations in the ileum and colon were higher in piglets fed the LPpb diet ( $P < 0.001$ ) than in those fed the HP and HPA diets. AM concentrations were higher in animals fed the HP diet ( $P < 0.001$ ) than in those receiving the HPA and LPpb diets (**Table 2**).

### 3.2. Postweaning Diarrhea

All animals had mild diarrhea throughout the experimental period (**Figure 1**). However, animals fed the HP diet had the highest incidence and severity of diarrhea ( $P < 0.01$ ), while the other two groups (HPA and LPpb) exhibited similar incidence and severity. The highest incidence and severity of diarrhea were observed during the second week postweaning ( $P < 0.01$ ). Both, incidence and severity of diarrhea, decreased during the third week postweaning ( $P < 0.01$ ), returning to values similar to those observed during the first week postweaning.

### 3.3. Performance

Piglets fed the HPA and LPpb diets showed similar performance parameters ( $P > 0.05$ ) for all weeks and for the entire experimental period (**Figure 2**). In contrast, animals fed the HP diet had significantly poorer performance than the other two groups of animals ( $P < 0.05$ ), except for ADFI during the first week postweaning and G:F during the second week postweaning.

## 4. Discussion

### 4.1. Fermentation Pattern

The presence of antibiotics and level of dietary protein in the diet modify the fermentative activity of the intes-

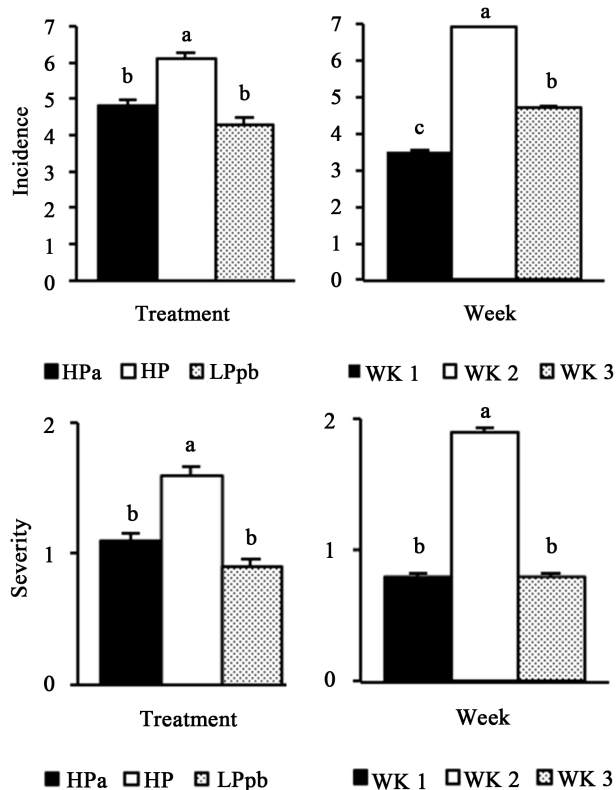
**Table 2.** Volatile fatty acids, lactic acid ( $\mu\text{mol/g}$ ), and ammonia ( $\text{mg/kg}$ ) production in the ileum and colon.

	Treatments			<i>P</i>	SEM
	<i>HPa</i>	<i>HP</i>	<i>LPpb</i>		
<b>Ileum</b>					
Acetate	11 <sup>c</sup>	15 <sup>b</sup>	82 <sup>a</sup>	***	0.07
Butyrate	6.3 <sup>c</sup>	7.3 <sup>b</sup>	36 <sup>a</sup>	***	0.06
Propionate	5.2 <sup>b</sup>	4.3 <sup>c</sup>	27 <sup>a</sup>	***	0.06
Valerate	7.2 <sup>b</sup>	19 <sup>a</sup>	2.1 <sup>c</sup>	***	0.04
Isobutyrate	2.5 <sup>b</sup>	32 <sup>a</sup>	2.2 <sup>c</sup>	***	0.06
Isovalerate	3.7 <sup>b</sup>	21 <sup>a</sup>	1.9 <sup>c</sup>	***	0.06
Isocaproate	2.2 <sup>b</sup>	15 <sup>a</sup>	0.7 <sup>c</sup>	***	0.03
VFAs	38 <sup>c</sup>	116 <sup>b</sup>	152 <sup>a</sup>	***	0.28
SCFAs	29 <sup>c</sup>	46 <sup>b</sup>	147 <sup>a</sup>	***	0.19
BCFAs	8.5 <sup>b</sup>	69 <sup>a</sup>	4.8 <sup>c</sup>	***	0.13
Lactate	16 <sup>c</sup>	30 <sup>b</sup>	41 <sup>a</sup>	***	0.20
Ammonia	362 <sup>b</sup>	514 <sup>a</sup>	190 <sup>c</sup>	***	1.9
<b>Colon</b>					
Acetate	31 <sup>b</sup>	19 <sup>c</sup>	121 <sup>a</sup>	***	0.06
Butyrate	12 <sup>b</sup>	11 <sup>c</sup>	46 <sup>a</sup>	***	0.09
Propionate	11 <sup>b</sup>	9.4 <sup>c</sup>	38 <sup>a</sup>	***	0.07
Valerate	15 <sup>a</sup>	9.3 <sup>b</sup>	1.8 <sup>c</sup>	***	0.01
Isobutyrate	7.5 <sup>b</sup>	58 <sup>a</sup>	2.9 <sup>c</sup>	***	0.02
Isovalerate	9.3 <sup>b</sup>	36 <sup>a</sup>	2.5 <sup>c</sup>	***	0.04
Isocaproate	10 <sup>b</sup>	17 <sup>a</sup>	1.3 <sup>c</sup>	***	0.01
VFAs	97 <sup>c</sup>	162 <sup>b</sup>	214 <sup>a</sup>	***	0.16
SCFAs	70 <sup>b</sup>	49 <sup>c</sup>	207 <sup>a</sup>	***	0.12
BCFAs	27 <sup>b</sup>	112 <sup>a</sup>	6.5 <sup>c</sup>	***	0.05
Lactate	1.2 <sup>c</sup>	1.9 <sup>b</sup>	2.3 <sup>a</sup>	***	0.008
Ammonia	400 <sup>b</sup>	1077	275 <sup>c</sup>	***	4.5

HPa: high-protein diet with antibiotics; HP: high-protein diet without antibiotics; LPpb: low-protein diet without antibiotics and with probiotics; VFAs: volatile fatty acids; SCFAs: short-chain fatty acids; BCFAs: branched-chain fatty acids; \*\*\* $P < 0.001$ ; SEM: standard error of the mean; <sup>abc</sup>different letters in the same row show statistical differences.

tinal flora, as demonstrated by the results of the HP and LPpb groups in the present study. Animals in these groups that did not consume antibiotics showed the highest concentrations of the most microbial fermentation products (VFAs). In both, the ileum and colon of these animals, the quantity of VFAs was influenced by the concentration of SCFAs. This was supported by the observation that piglets fed the LPpb diet had higher concentration of SCFAs than animals of the other two groups (HPa and HP) ( $P < 0.01$ ), while piglets fed the HP diet had higher concentration of BCFAs than the other two groups (HPa and LPpb) ( $P < 0.01$ ). Animals fed the LPpb diet exhibited similar profiles of SCFAs in the colon and in the ileum. However, animals fed the HP diet exhibited lower concentrations of SCFAs than those fed the HPa diet (with antibiotics).



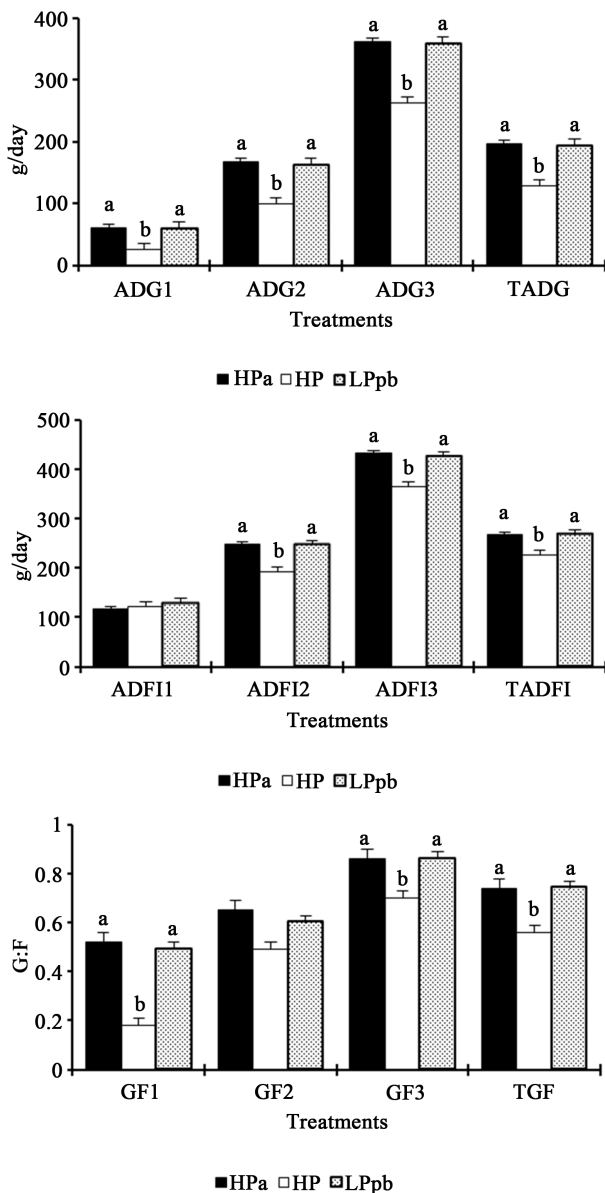


**Figure 1.** Effect of treatments and postweaning weeks on the incidence and severity of diarrhea. HPa: high-protein diet with antibiotics; HP: high-protein diet without antibiotics; LPpb: low-protein diet without antibiotics and with probiotics; WK1: first week postweaning; WK2: second week postweaning; WK3: third week postweaning; <sup>abc</sup>bars with different letters show statistical differences ( $P < 0.01$ ).

These data indicate that antibiotics reduced overall fermentation in the ileum, but both antibiotics and protein levels affected intestinal fermentation in the colon. Indeed, the absence of antibiotics and presence of a large quantity of undigested protein in the hindgut probably favored the growth of microorganisms capable of fermenting protein (BCFAs and AM producers), which could limit the growth of other types of microorganisms (generally SCFAs producers). These results were consistent with those of several other studies [1]-[3] [9] in which the use of antibiotics showed to affect intestinal fermentation.

Microbial fermentation of protein increases AM production and fermentation of branched amino acids, generating BCFAs [2]. Thus, the level of dietary protein is a key factor that modifies the intestinal microenvironment. This idea was supported by the high concentrations of BCFAs and AM in the gut of animals fed the HP diet in the present study. This may be because piglets do not digest dietary protein well, and undigested protein remaining in the intestinal lumen can serve as a substrate for bacterial fermentation. BCFAs and AM are harmful metabolites to intestinal mucosa because they are able to alter the acid-base balance, an essential factor for water absorption in the hindgut, and this is probably one of the triggers postweaning diarrhea [1] [21].

Conversely, when the protein level was reduced and probiotics were added (LPpb diet), SCFAs and LA production were increased. This probably resulted from differences in the quantity of major ingredients of the diet required to reduce the protein level; in the LPpb diet, protein sources were reduced, while corn was increased (Table 1), providing a greater amount of starch, which is an important substrate to amylolytic bacteria, resulting in an increased production of acetic and propionic acids. In turn, acetic acid can be transformed to butyric acid, which provides between 70% and 90% of the energy required by colonocytes metabolism [22], thus sparing about 30% of the energy requirement of piglets during the stressful period weaning represents [1] [22] [23]. Moreover, comparing results in the present study with other conducted by our research group, in which a low-



**Figure 2.** Effects of dietary protein levels and probiotics on the performance of newly weaned piglets. HPa: high-protein diet with antibiotics; HP: high-protein diet without antibiotics; LPpb: low-protein diet without antibiotics and with probiotics; ab: bars with different letters show statistical differences; ADG1: average daily gain in week 1; ADG2: average daily gain in week 2; ADG3: average daily gain in week 3; TADG: average daily gain during the total experimental period; ADFI1: average daily feed intake in week 1; ADFI2: average daily feed intake in week 2; ADFI3: average daily feed intake in week 3; TAFI: average daily feed intake during the total experimental period; G:F1: gain:feed ratio in week 1; G:F2: gain:feed ratio in week 2; G:F3: gain:feed ratio in week 3; TG:F: total gain:feed ratio.

protein diet without probiotics was used (unpublished data), we can conclude that probiotics supplementation of a low protein diet resulted in a higher proportion of SCFAs, mainly acetic acid, which could be beneficial to the intestinal environment and probably reduce postweaning diarrhea in piglets.

Furthermore, high concentration of SCFAs reduces gut pH, inhibiting the development of potentially pathogenic bacteria [24]. The higher concentration of LA in the ileum with respect to that in the colon, may be the result of rapid lactose fermentation in the small intestine, causing a reduction in lactose transit to the large bowel. LA also serves as a bacterial control and promotes growth of beneficial bacteria, mainly SCFAs producers [1] [2].

#### 4.2. Postweaning Diarrhea

The high incidence and severity of diarrhea in piglets fed the HP diet suggest that high level of dietary protein and the absence of antibiotics triggered postweaning diarrhea. This was also observed by others (5 - 9) and may be explained as the fermentation of undigested protein by opportunistic bacteria, which results in an increased production of BCFA and AM, promoting the incidence and severity of diarrhea [25] [26].

Addition of antibiotics to high-protein diets controls bacterial growth, reduces overall fermentation, and suppresses BCFA and AM production [21] [22]. Reduction of protein levels and addition of probiotics in the diet results in a beneficial fermentation pattern, increasing SCFAs and LA, and reducing BCFA and AM concentrations. These changes may reduce pH values and in turn decreasing growth of opportunistic bacteria [1] [21]. SCFAs, mainly butyrate, increase glucagon-like peptide 2 (GLP2) secretion by L cells in the ileum. GLP2 stimulates cellular proliferation and maturation, probably allowing a quick recovery of intestinal epithelium, reducing the incidence and severity of postweaning diarrhea [27].

The transient under consumption normally reported during the first three days after weaning, probably reduces the presence of undigested protein in the intestinal lumen, thereby suppressing bacterial fermentation [28]. Consequently, fermentation should not be a determining factor in the incidence of diarrhea during the first week after weaning [28]. However, once piglets increase feed intake (3 - 5 days after weaning) the presence of fermentable substrates (mainly protein) in the intestinal lumen may promote the growth of pathogenic bacteria, resulting in greater production of potentially toxic metabolites, which can damage the intestinal mucosa producing diarrhea [1]. The severity of diarrhea observed during the second week after weaning confirmed this mechanism. Once the animal's digestive capacity increases, the severity of diarrhea decreases [29]; this was observed during the third week after weaning.

The increase in SCFAs observed in piglets fed with the combination of a low-protein diet and probiotics (LPpb diet), compared to those produced by piglets fed a high protein diet, may be the result of intestinal environmental changes favoring the establishment of beneficial microbes and limiting the growth of pathogenic bacteria [22]. These changes may reduce the incidence and severity of postweaning diarrhea and improve piglet's growth. On the other hand, probiotics facilitate the characteristics of the intestinal environment by maintaining an acidic pH, which inhibits the growth of potentially pathogenic bacteria that generally require an alkaline pH to grow [30] [31]. Beneficial bacteria rapidly proliferate to become more abundant through competitive exclusion, occupying binding sites on the intestinal mucosa that could otherwise be occupied by pathogenic bacteria [32]. Establishment of beneficial bacteria controls pathogenic bacteria proliferation through bacteriocin production, which ruptures the bacterial cell wall through a mechanism similar to that of several antibiotics [30]-[33]. On the other hand, probiotics have demonstrated to modulate the immune system, regulating the expression of pro-inflammatory cytokines, which contribute to the control of postweaning diarrhea [32].

#### 4.3. Performance

Low-protein diet contents did not affect performance (ADG, ADFI, and G:F) of piglets (**Figure 2**). This result was consistent with those of Le Bellego and Noblet [34], who found that diets with low crude protein, supplemented with essential amino acids, were effective to maximize nutrient intake by piglets. Furthermore, a decrease in dietary protein (from 20.4% to 16.9%) did not affect the ADFI or ADG of piglets. In the present study, protein levels were slightly lower (16%), and no differences were observed. Bikker *et al.* [28] observed that animals fed low-protein diets (15%) had higher ADFI and ADG than animals fed high protein diets. In a study by Reynolds and O'Doherty [35] feeding a low protein diet to piglets between 0 and 28 days postweaning, resulted in reduced growth rates, probably due to amino acids deficiency, mainly lysine. However, when appropriate amino acids were provided together with a low-protein diet, animal growth was not altered. In the present study, the low protein diet was supplemented with essential amino acids, including lysine, methionine, tryptophan, threonine, and valine; we believe this is the reason why no changes in animal performance was observed. These

results are consistent with those of Reynoso *et al.* [36], who found that protein content in the diet could be reduced as long as synthetic amino acids are included to meet the nutritional requirements of piglets. Similarly, Hansen *et al.* [37] observed the same ADG in piglets fed low (17%) and high-protein (21%) diets supplemented with amino acids.

## 5. Conclusion

In the present study, the use of antibiotics reduced microbial fermentation by altering the proliferation of intestinal bacteria. When piglets were fed a high protein diet VFAs concentration was increased, mainly BCFAs. Conversely, the use of a low-protein diet with probiotics promoted SCFAs production. Both high-protein diets with antibiotics and low-protein diets with probiotics promoted healthy intestinal environment, reducing the incidence and severity of diarrhea. Therefore, it can be concluded that feeding a low protein diet combined with probiotics to newly-weaned piglets may have similar effects on incidence and severity of diarrhea and performance, to those fed a high-protein diet with antibiotics. A combination of a low-protein diet and probiotics may be an effective alternative to the use of antibiotics in starter diets.

## Acknowledgements

This study was partially supported by CONACyT grant CB-2012-0100000000179898 and by the Programa Integral de Fortalecimiento Institucional, of the Mexican Ministry of Public Education (SEP).

## References

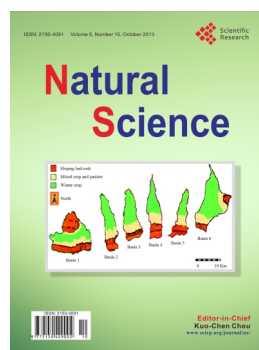
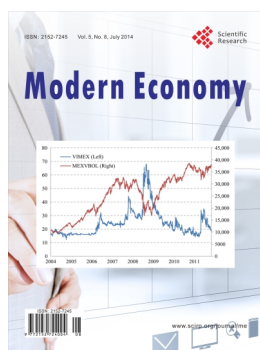
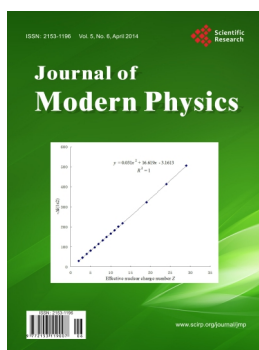
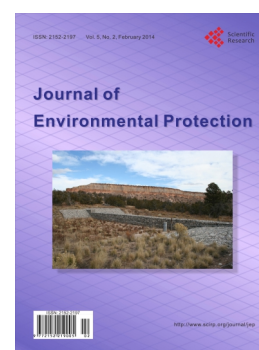
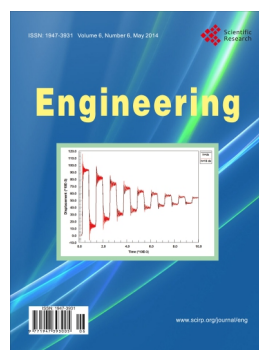
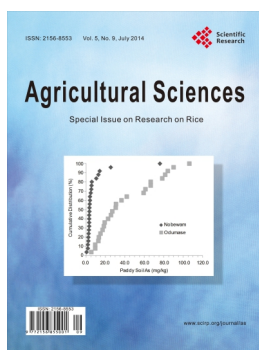
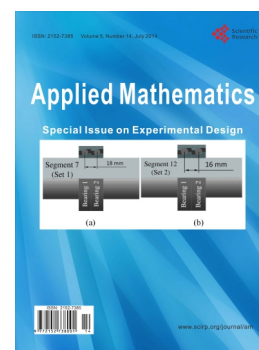
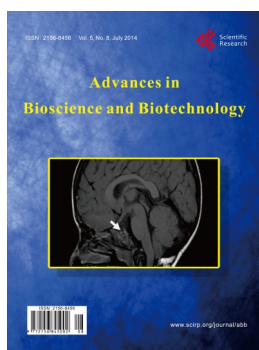
- [1] Williams, B.A., Bosch, M.W., Awati, A., Konstantinov, S.R., Smidt, H., Akkermans, A.D.L., Verstegen, M.W.A. and Tamminga, S. (2005) *In Vitro* Assessment of Gastrointestinal Tract (GIT) Fermentation in Pigs: Fermentable Substrates and Microbial Activity. *Animal Research*, **54**, 191-201. <http://dx.doi.org/10.1051/animres:2005011>
- [2] Hermes, R.G., Molist, F., Ywazaki, M., Nofrarias, M., Gomez de Segura, A., Gasa, J. and 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. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1241>
- [3] Opapeju, F.O., Krause, D.O., Payne, R.L., Rademacher, M. and Nyachoti, C.M. (2009) Effect of Dietary Protein Level on Growth Performance, Indicators of Enteric Health, and Gastrointestinal Microbial Ecology of Weaned Pigs Induced with Postweaning colibacillosis. *Journal of Animal Science*, **87**, 2635-2643. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1310>
- [4] Nyachoti, C.M., Omogbenigun, F.O., Rademacher, M. and Blank, G. (2006) Performance Responses and Indicators of Gastrointestinal Health in Early Weaned Piglets Fed Low-Protein Amino Acid Supplemented Diets. *Journal of Animal Science*, **84**, 125-134.
- [5] Htoo, J.K., Araiza, B.A., Sauer, W.C., Rademacher, M., Zhang, Y., Cervantes, M. and Zijlstra, R.T. (2007) Effect of Dietary Protein Content on Ileal Amino Acid Digestibility, Growth Performance, and Formation of Microbial Metabolites in Ileal an Cecal Digesta of Early-Weaned Pigs. *Journal of Animal Science*, **85**, 3303-3312. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2007-0105>
- [6] Wellock, I.J., Fortomaris, P.D., Houdijk, J.G.M. and Kyriazakis, I. (2006) The Effect of Dietary Protein Supply on the Performance and Risk of Post-Weaning Enteric Disorders in Newly Weaned Pigs. *Animal Science*, **82**, 327-335. <http://dx.doi.org/10.1079/ASC200643>
- [7] Yue, L.Y. and Qiao, S.Y. (2008) Effects of Low-Protein Diets Supplemented with Crystalline Amino Acids on Performance and Intestinal Development in Piglets over the First 2 Weeks after Weaning. *Livestock Science*, **115**, 144-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2007.06.018>
- [8] Heo, J.M., Kim, J.C., Hansen, C.F., Mullan, C.F., Hampson, B.P. and Pluske J.R. (2008) Effects of Feeding Low Protein Diets to Piglets on Plasma Urea Nitrogen, Faecal Ammonia Nitrogen, the Incidence of Diarrhea and Performance after Weaning. *Archives of Animal Nutrition*, **62**, 343-358. <http://dx.doi.org/10.1080/17450390802327811>
- [9] Wellock, I.J., Houdijk, J.G.M. and Kyriazakis, I. (2007) Effect of Dietary Non-Starch Polysaccharide Solubility and Inclusion Level on Gut Health and the Risk of Postweaning Enteric Disorders in Newly Weaned Piglets. *Livestock Science*, **108**, 186-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.050>
- [10] Bhandari, S.K., Opapeju, F.O., Krause, D.O. and Nyachoti, C.M. (2010) Dietary Protein Level and Probiotic Supplementation Effects on Piglet Response to *Escherichia coli* K88 Challenge: Performance and Gut Microbial Population. *Livestock Science*, **133**, 185-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06060>
- [11] Skjolaas, K.A., Burkey, T.E., Dritz, S.S. and Minton, J.E. (2007) Effects of *Salmonella enteric* Serovar *Typhimurium*, or Serovar *Choleraesuis*, *Lactobacillus reuteri* and *Bacillus licheniformis* on Chemokine and Cytokine Expression in

- the Swine Jejunal Epithelial Cell Line, IPEC-J2. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **115**, 299-308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.10.012>
- [12] Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999 (2001) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación, México, D.F.
- [13] CIOMS (1985) International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. The Development of Science-Based Guidelines for Laboratory Animal Care. NCBI Bookshelf. [http://cioms.ch/publications/guidelines/1985\\_texts\\_of\\_guidelines.htm](http://cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm)
- [14] National Research Council (NRC) (2012) Nutrients Requirements of Swine. 11th Edition, National Academy Press, Washington DC.
- [15] Roberts, S.A., Xin, H., Kerr, B.J., Russell, J.R. and Bregendahl, K. (2007) Effects of Dietary Fiber and Reduced Crude Protein on Ammonia Emission from Laying-Hen Manure. *Poultry Science*, **86**, 1625-1632. <http://dx.doi.org/10.1093/ps/86.8.1625>
- [16] David, F., Sandra, P. and Wylie, P.L. (2003) Improving the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters Using Retention Times Locked Methods and Retention Time Data Bases. Agilent Technologies, Santa Clara.
- [17] Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2002) Official Methods of Analysis. 17th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
- [18] Van Soest, P.J., Roberts, J. and Lewis, B.A. (1991) Methods for Dietary Fiber Neutral Detergent Fiber and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, **74**, 3583-3594. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- [19] Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. (1991) Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 3rd Edition, McGraw-Hill, New York.
- [20] SAS Institute (2008) SAS/ETS® 9.2 User's Guide. SAS Institute, Inc., Cary.
- [21] Windey, K., De Preter, V. and Verbeke, K. (2012) Relevance of Protein Fermentation to Gut Health. *Molecular Nutrition & Food Research*, **56**, 184-196. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201100542>
- [22] Williams, B.A., Verstegen, M.W.A. and Tamminga, S. (2001) Fermentation in the Large Intestine of Single-Stomached Animals and Its Relationship to Animal Health. *Nutrition Research Reviews*, **14**, 207-227. <http://dx.doi.org/10.1079/NRR200127>
- [23] Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunger, M.K. and Bultman, S.J. (2011) The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metabolism*, **13**, 517-526. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>
- [24] Taciak, M., Pastuszewska, B., Tuśnio, A. and Świąch, E. (2010) Effects of Two Protein and Fibre Sources on SCFA Concentration in Pig Large Intestine. *Livestock Science*, **133**, 138-140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.046>
- [25] Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J.F. and Tome, D. (2007) Effects of Amino Acid-Derived Luminal Metabolites on the Colonic Epithelium and Physiopathological Consequences. *Amino Acids*, **33**, 547-562. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-006-0477-9>
- [26] Caliendo, G., Cirino, G., Santagada, V. and Wallace, J.L. (2010) Synthesis and Biological Effects of Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S): Development of H<sub>2</sub>S-Releasing Drugs as Pharmaceuticals. *Journal of Medicinal Chemistry*, **53**, 6275-6286. <http://dx.doi.org/10.1021/jm901638j>
- [27] Burrin, D.G., Petersen, Y., Stoll, B. and Sanguild, P. (2001) Glucagon-Like Peptide 2: A Nutrient-Responsive Gut Growth Factor. *Journal of Nutrition*, **131**, 709-712.
- [28] Bikker, P., Dirkzwager, A., Fledderus, J., Trevisi, P., le Huërou-Luron, I., Lallès, J.P. and Awati, A. (2007) Dietary Protein and Fermentable Carbohydrates Contents Influence Growth Performance and Intestinal Characteristics in Newly Weaned Pigs. *Livestock Science*, **108**, 194-197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.057>
- [29] Lallès, J.P., Bosi, P., Smidt, H. and Stokes, C.R. (2007) Weaning—A Challenge to Gut Physiologists. *Livestock Science*, **108**, 82-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.091>
- [30] Le Bon, M., Davies, H.E., Glynn, C., Thompson, C., Madden, M., Wiseman, J., Dodd, C.E.R., Hurdidge, L., Payne, G., Le Treut, Y., Craigon, J., Töttemeyer, S. and Mellits, K.H. (2010) Influence of Probiotics on Gut Health in the Weaned Pig. *Livestock Science*, **133**, 179-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.058>
- [31] Anthony, T., Rajesh, T., Kayalvizhi, N. and Gunasekaran, P. (2009) Influence of Medium Components and Fermentation Conditions on the Production of Bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Bioresource Technology*, **100**, 872-877. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.027>
- [32] Walker, W.A. (2008) Mechanisms of Action of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, **46**, 87-91. <http://dx.doi.org/10.1086/523335>
- [33] Alexopoulos, C., Georgoulakis, E., Tzivara, A., Kyriakis, C.S., Govaris, A. and Kyriakis, S.C. (2004) Field Evaluation

- of the Effect of a Probiotic-Containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* Spores on the Health Status, Performance and Carcass Quality of Grower and Finisher Pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, **51**, 306-312. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00637.x>
- [34] Le Bellego, L. and Noblet, J. (2002) Performance and Utilization of Dietary Energy and Amino Acids in Piglets Fed Low Protein Diet. *Livestock Production Science*, **76**, 45-48. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00008-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00008-8)
- [35] Reynolds, A.M. and O'Doherty, J.V. (2006) The Effect of Amino Acid Restriction during the Grower Phase on Compensatory Growth, Carcass Composition and Nitrogen Utilization in Grower—Finisher Pigs. *Livestock Production Science*, **104**, 112-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2006.03.012>
- [36] Reynoso, E., Cervantes, M., Figueroa, J.L. and Cuca, J.M. (2004) Productive Response of Pigs to Low-Protein Diets Added Synthetic Amino Acids and Yeast Culture. *Cuban Journal of Agricultural Science*, **38**, 269-275.
- [37] Hansen, J.A., Knabe, D.A. and Burgoon, K.G. (1993) Amino Acids Supplementation of Low-Protein Sorghum-Soybean Meal Diet for 5 to 20 Kilograms Swine. *Journal of Animal Science*, **71**, 452-458.

Scientific Research Publishing (SCIRP) is one of the largest Open Access journal publishers. It is currently publishing more than 200 open access, online, peer-reviewed journals covering a wide range of academic disciplines. SCIRP serves the worldwide academic communities and contributes to the progress and application of science with its publication.

Other selected journals from SCIRP are listed as below. Submit your manuscript to us via either [submit@scirp.org](mailto:submit@scirp.org) or [Online Submission Portal](#).



## **4. CAPÍTULO 2**

### **DIETARY PROTEIN LEVELS ALTER MICROBIAL FERMENTATION PATTERNS IN INTESTINES OF WEANED PIGLETS**





## Dietary protein levels alter microbial fermentation patterns in intestines of weaned piglets

Journal:	<i>Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Escobar, Konisgmar; Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales Reis de Souza, Tércia; Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales Mariscal, Gerardo; Instituto Nacional de Investigación Agrícola Forestal y Pecuaria, Aguilera, Araceli; Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales Bernal, María; Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales
Subject Area:	Nutrition, Pigs

SCHOLARONE™  
Manuscripts

view

1 **Dietary protein levels alter microbial fermentation patterns in intestines of**  
2 **weaned piglets**

3 **K. Escobar-García<sup>1</sup>, T. C. Reis-de-Souza<sup>1Φ</sup>, G. Mariscal-Landín<sup>2</sup>, A. Aguilera-**  
4 **Barreyro<sup>1</sup>, M. G. Bernal-Santos<sup>1</sup>**

5 <sup>1</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales Universidad Autónoma de Querétaro,  
6 Querétaro, México

7 <sup>2</sup> CENID Fisiología, Instituto Nacional de Investigación Agrícola Forestal y Pecuaria, Querétaro, México

8

9 **Running head:** Gut fermentation in piglets

10

---

Φ Correspondence. T. C. Reis de Souza, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Av. de las Ciencias s/n. Juriquilla, C.P. 76230, Querétaro, México. Tel: +52(442)1921200, ext. 5343; fax: +52(442)2342951; e-mail: terci@uaq.mx

## 11 Summary

12 The aim of this study was to evaluate the effect of dietary protein levels on gut microbial  
13 fermentation and on the incidence and severity of diarrhoea in newly weaned piglets. One  
14 experiment was conducted using 72 piglets randomly distributed among three diets: high protein  
15 diet (20%) with antibiotics (HPa), high protein diet (20%) without antibiotics (HP), and low  
16 protein diet (16%) without antibiotics (LP). Piglets were euthanized at 0, 7, 14, and 21 days  
17 post-weaning to collect jejunal, ileal, caecal, and colonic digesta. The levels of short chain fatty  
18 acids (SCFA), branched chain fatty acids (BCFA), lactic acid (LA), and ammonia (AM) were  
19 assessed. In all intestinal portions, the HP diet stimulated the highest BCFA concentration ( $P <$   
20  $0.001$ ), whereas LP increased acetic, propionic, and butyric acid production. Piglets fed the HP  
21 diet had high incidence and severity of diarrhoea ( $P < 0.001$ ), whereas piglets fed the LP and  
22 HPa diets were similar in their diarrheic symptoms ( $P > 0.05$ ). The highest incidence and  
23 severity of diarrhoea occurred during the second week after weaning, making this time period  
24 the most critical. In conclusion, the use of low-protein diets changes the fermentation profile in  
25 the piglet gut, improving gut ecosystem and promoting gut health, reflected in the lower  
26 incidence and severity of post-weaning diarrhoea.

27

28 **Keywords:** volatile fatty acids, diarrhoea, antibiotics, dietary protein level.

29

## 30 Introduction

31 Newly weaned piglets (*Sus scrofa*) are typically fed diets consisting of plant protein, which is  
32 difficult to digest. Coupled with their limited digestive capacity, the result is a large amount of  
33 undigested protein that is fermented by opportunistic gut microbes. The fermentation then  
34 produces BCFA and ammonia, which are both toxic compounds that harm intestinal mucosa and  
35 likely trigger of post-weaning diarrhoea (Williams et al., 2005; Blachier et al., 2007; Caliendo et  
36 al., 2010; Hermes et al., 2010). Consequently, the use of high-protein diets is a major contributor

37 to post-weaning diarrhoea (Opapeju et al., 2009; Bhandari et al., 2010), a condition worsened by  
38 the ban of antibiotics in animal nutrition (Stein and Kil, 2006).

39 Thus, recent efforts to reduce post-weaning diarrhoea have focused on finding alternatives to  
40 antibiotics, including the use of low-protein diets. The lower amount of protein is hypothesised  
41 to reduce the substrate for bacterial fermentation (Wellock et al., 2007). Indeed, a previous study  
42 examining this practice found that piglets on a low-protein diet differed in their gut microbial  
43 fermentation patterns compared to those on a high-protein diet (Escobar et al., 2014). Therefore,  
44 the aim of this study was to evaluate the effect of differing dietary protein levels on microbial  
45 intestinal fermentation and on the incidence and severity of diarrhoea in newly weaned piglets.

## 46

## 47 **Materials and methods**

48 The experiment was conducted at the experimental farm of CENID-Physiology (INIFAP,  
49 Mexico), following a protocol approved by the Bioethical Committee of the Faculty of Natural  
50 Sciences at the Autonomous University of Queretaro. Subjects were managed in accordance  
51 with the guidelines of both the Mexican government (NOM-062-ZOO-1999; Diario Oficial de la  
52 Federación, 2001) and the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving  
53 Animals (CIOMS, 1985).

## 54 **Animals and diets**

55 Seventy-two piglets were weaned at  $20 \pm 1.4$  days, weighing  $6.6 \pm 1.1$  kg. The piglets were  
56 randomly distributed across three dietary treatments, with four pens per treatment (six piglets per  
57 pen). The experimental diets were as follows: high-protein diet (20%) with antibiotic (HPa);  
58 high-protein diet (20%) without antibiotic (HP), and low-protein diet (16%) without antibiotic  
59 (LP) (Table 1). All diets provided the nutritional requirements for that production stage (NRC,  
60 1998); in the LP diet, crystalline amino acids (lysine, methionine, threonine, and tryptophan)  
61 were added as supplements. Additionally, Aminogut<sup>®</sup> and Gustor<sup>®</sup> were added to all diets, the  
62 former as a mucous protector and the latter to stimulate feed intake.

### 63 **Animal management and faecal score**

64 The piglets were placed in a temperature-controlled room (30, 28, 26 ± 2 °C during the first,  
65 second, and third week post weaning, respectively) and housed in weaning pens. The pens were  
66 equipped with a nipple drinker and a six-compartment feeder, providing *ad libitum* feed and  
67 water throughout the entire experimental period.

68 Diarrhoea incidence was measured daily through the direct observation of each pen. Severity of  
69 diarrhoea was measured through visual evaluation of faecal consistency, using a 0 to 3 score,  
70 where 0 = normal faeces; 1 = mild diarrhoea; 2 = moderate diarrhoea, and 3 = severe diarrhoea  
71 (Opapeju et al., 2009). The daily score of each pen was averaged every week to calculate the  
72 overall severity of diarrhoea.

### 73 **Sampling and analysis of microbial fermentation**

74 A control group of four piglets that were never given solid feed was euthanized at weaning (0 d).  
75 Four animals per treatment were euthanized at 7, 14, and 21 days post-weaning. The animals  
76 were first stunned with CO<sub>2</sub> inhalation, and subsequently, the jugular vein was cut. The jejunum,  
77 terminal ileum, caecum, and proximal colon digesta were then collected, immediately frozen in  
78 liquid nitrogen, and preserved at -80 °C until analysis. Next, concentrations of the following  
79 compounds were measured in the digesta of each intestinal section. Short chain fatty acids  
80 (SCFA: acetic, propionic, butyric, and valeric acids) and branched chain fatty acids (BCFA:  
81 isobutyric, isovaleric, and isocaproic acids) were analysed following the methods of Roberts et  
82 al. (2007). Lactic acid (LA) was analysed following the methods of David et al. (2003), and  
83 ammonia (AM) was analysed following the methods of AOAC (2002). We also ascertained the  
84 amount of dry matter, ashes, crude protein, crude fat (AOAC, 2002), and NDF (van Soest et al.,  
85 1991) in the experimental diets (Table 1).

### 86 **Statistical analysis**

87 Concentrations of microbial fermentation end products were analysed using a randomised design  
88 with a factorial arrangement, where diet and post-weaning day (pwd) were the main factors.

89 Data were analysed on the level of individual piglets. Incidence and severity of diarrhoea were  
90 investigated with a group-level (per pen) analysis in a repeated-measures design (Steel and  
91 Torrie, 1997). In both cases, statistical significance was set at  $p < 0.05$ , and group means were  
92 compared with Tukey's test using the GLM procedure in SAS (SAS, 2008).

## 93 **Results**

### 94 **Microbial fermentation end products**

95 Fermentation profiles in the small and large intestine were significantly affected by diet ( $p <$   
96  $0.001$ ) and pwd ( $p < 0.001$ ). Additionally, we found a significant interaction ( $p < 0.001$ ) between  
97 pwd and diet (Tables 2 and 3).

98 In all intestinal sections, the HPa diet decreased total volatile fatty acid (TVFA) concentrations  
99 from 0 to 7 pwd, and then increased TVFA concentrations by 14 pwd, reaching levels similar to  
100 those observed in the 0-pwd control group ( $p < 0.001$ ). TVFA concentrations continued to  
101 increase until 21 pwd ( $p < 0.001$ ). Between 7 and 21 pwd, piglets fed the HP diet had the highest  
102 TVFA concentration ( $p < 0.001$ ), influenced mainly by BCFA production. SCFA concentrations  
103 were minimal in all intestinal sections under this diet. During the same time period, the LP diet  
104 resulted in the second highest concentration of TVFA ( $p < 0.001$ ), but in contrast, SCFA  
105 concentrations were high, whereas BCFA concentrations were low ( $p < 0.001$ ; Tables 2 and 3).

106 LA concentrations in intestinal digesta were directly proportional to piglet age, increasing as age  
107 increased. Furthermore, LA concentrations were higher in animals fed the LP diet than in those  
108 fed the HP and HPa diets ( $p < 0.001$ ). With the HPa diet, LA concentrations fell by 7 pwd  
109 compared to controls, but increased to control levels by 14 pwd ( $p < 0.001$ ), reaching the highest  
110 concentrations on 21 pwd (Tables 2 and 3).

111 AM concentrations were highest in animals fed the HP diet for all intestinal sections and across  
112 all ages. Between 0 (control) and 7 pwd, AM concentrations decreased in animals fed the HPa  
113 and LP diets in all intestinal portions. Starting from 14 pwd and continuing to 21 pwd, AM

114 concentrations increased in these two diet groups, but for the LP diet, AM concentrations in the  
115 ileum, caecum, and colon never reached levels observed in the controls. In the ileum and colon  
116 specifically, we did not find a significant interaction effect of pwd and diet on AM  
117 concentrations ( $p > 0.05$ ), although the individual variables did have independent significant  
118 effects ( $p < 0.001$ ). Finally, throughout the entire experimental period, the HPa diet resulted in  
119 intermediate AM concentrations and the LP diet resulted in the lowest AM concentrations ( $p <$   
120  $0.001$ ; Tables 2 and 3).

121 When examining fermentation profiles for specific intestinal sections, TVFA and AM  
122 concentrations were highest in the colon, whereas LA concentrations were highest in the ileum.  
123 In fact, only traces of LA were observed in the caecum and colon, although LA responded to diet  
124 similarly in both sections: higher levels with the LP and HP diets and lower levels with the HPa  
125 diet ( $p < 0.001$ ; Table 3).

#### 126 **Post-weaning diarrhoea**

127 The incidence and severity of diarrhoea were significantly affected by diet and the time after  
128 weaning ( $p < 0.01$ ). Compared to other diets, piglets fed the HP diet exhibited more frequent and  
129 severe diarrhoea ( $p < 0.01$ ), whereas piglets fed the HPa diet were the opposite. The effects of  
130 the LP diet on diarrhoea incidence were not significantly different from those of the other two  
131 diets ( $p > 0.05$ ), but the LP diet was similar to the HPa diet in causing less severe diarrhoea than  
132 the HP diet ( $p < 0.01$ ; Figure 1a).

133 In all pens in this study, we found piglets with diarrhoea throughout the experimental period, but  
134 the symptoms were mild (Figure 1b). In the second week post-weaning, both the incidence and  
135 severity of diarrhoea were at their highest levels, which was significantly different from week  
136 one ( $p < 0.01$ ). Diarrhoeic incidence slightly decreased in the third week post-weaning, but the  
137 decrease did not result in a significant difference compared to week one and week two levels.  
138 Diarrhoea severity significantly decreased ( $p < 0.01$ ) in the third week post-weaning and reached  
139 levels comparable to those observed during week one.

## 140 Discussion

141 Our results indicate that antibiotic-supplemented diets reduce overall microbial fermentation in  
142 the gut (Tables 2 and 3), an outcome supported by several other studies (Williams et al., 2005;  
143 Stein and Kil, 2006; Opapeju et al., 2009; Hermes et al., 2010; Escobar et al., 2014).

144 We also found high AM and BCFA concentrations in the gut of HP-fed animals. These results  
145 support previous reports that dietary protein level plays a major role in modifying the intestinal  
146 environment and increasing AM and BCFA concentrations via microbial fermentation (Hermes  
147 et al., 2010; Taciak et al., 2010; Escobar et al., 2014). As mentioned earlier, the inability of  
148 piglets to fully digest feed protein likely caused the observed patterns, as partially digested  
149 proteins remain in the intestinal lumen to serve as a substrate for bacterial fermentation  
150 (Williams et al., 2005; Windey et al., 2012; Escobar et al., 2014).

151 In contrast, when diets contained low protein levels, SCFA and LA production increased. Two  
152 may explain this outcome. First, the lower protein content allowed the piglets' digestive tract to  
153 fully break down all feed components, even with their limited digestive capacity, resulting in  
154 less substrate for bacterial fermentation and thus reducing BCFA and AM production. Second,  
155 the LP diet compensates for low protein content with increased starch (corn; Table 1). As starch  
156 is an important substrate for amylolytic bacteria, the LP diet indirectly increases levels of lactic,  
157 acetic and propionic acids.

158 An advantage of the increase in acetic acid is that acetic acid can be converted to butyric acid,  
159 which provides 70%–90% of the energy required by colonocyte metabolism (Donohoe et al.,  
160 2011). Thus, the higher butyric acid levels reduce piglet energy requirements by approximately  
161 30% during the stressful weaning period (Williams et al., 2005; Lallès et al., 2007; Donohoe et  
162 al., 2011). Butyrate also stimulates GLP 2 (glucagon-like peptide 2) secretion by L cells in the  
163 ileum. GLP 2 increases the proliferation and maturation of ileum enterocytes, rapidly restoring  
164 the small intestine epithelium and mitigating post-weaning diarrheic symptoms (Burrin et al.,



165 2001). Moreover, high concentrations of SCFA and LA reduce pH (Williams et al., 2005;  
166 Windey et al., 2012), potentially inhibiting the growth of pathogenic bacteria and favouring the  
167 establishment of beneficial microbiota producing SCFA, mainly butyrate (Bikker et al., 2007;  
168 Taciak et al., 2010). Therefore, in addition to being easier to digest, the LP diet is also an  
169 energy-efficient feed that promotes healthy gut flora in piglets. In this study, we observed higher  
170 concentrations of LA in the ileum than in the colon, probably because the lactose provided by  
171 dried whey, which is the main substrate for LA production, fermented quickly in small intestine,  
172 causing a reduction in lactose transit to the hindgut.

173 The HP diet resulted in the highest incidence and severity of diarrhoea, most likely because of  
174 the higher BCFA and AM production. BCFA and AM affect hindgut water absorption by  
175 altering the pH balance in the intestinal mucosa; therefore, they are probable triggers of post-  
176 weaning diarrhoea (Williams et al., 2005; Lallès et al., 2007). However, high protein content is  
177 not the only factor involved in diarrheic symptoms, as the severity of diarrhoea was also low in  
178 animals fed with the HPa diet. This result indicates that antibiotics successfully controlled  
179 bacterial growth and modulated fermentation.

180 In addition to diet, the time after weaning is a key influence on diarrhoea development.  
181 Immediately after weaning, piglets exhibit a transitory anorexia that probably decreased the  
182 presence of substrate in the intestinal lumen. As a result, gut bacteria produce little to no toxic or  
183 beneficial metabolites during this time (Bikker et al., 2007). However, when piglets begin to  
184 consume solid diets at 3–5 days post-weaning, the protein in the feed becomes sufficient as a  
185 substrate for bacterial fermentation. Bacterial growth and subsequent production of toxic  
186 metabolites are induced, causing damage to intestinal mucosa that result in diarrhoea (Williams  
187 et al., 2005). The extremely severe diarrhoea we observed during the second week post-weaning  
188 corroborates this explanation. In this study, piglets under all treatments showed an average of  
189 84% in feed intake between the first and second post-weaning week, which supports the

190 hypothesis described above. Once the gut sufficiently matures during the third week post-  
191 weaning, digestion improves and the severity of diarrhoea decreases (Lallès et al., 2007).

192 In conclusion, this study demonstrates that the use of a low-protein diet is a suitable alternative  
193 for high-protein diets with antibiotics, at least in the mitigation of post-weaning diarrhoea.

194 Although the use of antibiotics successfully limits bacteria and enables the maintenance of  
195 healthy gut microbiota, it also decreases the concentration of all fermentation end products,

196 including beneficial SCFAs. By comparison, the LP diet increases SCFA production, which  
197 promotes a healthy intestinal environment, decreasing the incidence and severity of diarrhoea.

198 The least beneficial diet by far was the HP diet, which resulted in a BCFA-rich fermentation  
199 pattern that caused severe and frequent post-weaning diarrhoea. With the ban of antibiotics in

200 starter feeds, we find a low-protein diet to be an appropriate substitute, although more research is  
201 necessary to fully ascertain the effects of a starch-heavy feed on other aspects of pig nutrition.

## 202 **Acknowledgment**

203 This study was partially supported by CONACyT grant CB-2012-01000000000179898 and by  
204 the ‘Programa Integral de Fortalecimiento Institucional’, of the Mexican Ministry of Public  
205 Education (SEP).

## 206 **References**

207 AOAC, 2002: *Official Methods of Analysis*, 17th edn. Association of Official Analytical  
208 Chemists, Arlington, VA, USA.

209 Williams, B.A.; Bosch, M.W.; Awati, A.; Konstantinov, S.R.; Smidt, H.; Akkermans, A.D.L.;  
210 Verstegen, M.W.A.; Tamminga, S., 2005: In vitro assessment of gastrointestinal tract (GIT)  
211 fermentation in pigs: Fermentable substrates and microbial activity. *Animal Research* 54, 191–  
212 201.

213 Bhandari, S.K.; Opapeju, F.O.; Krause, D.O.; Nyachoti, C.M., 2010: Dietary protein level and  
214 probiotic supplementation effects on piglet response to *Escherichia coli* K88 challenge:  
215 Performance and gut microbial population. *Livestock Science* 133, 185–188.

216 Bikker, P.; Dirkzwager, A.; Fledderus, J.; Trevisi, P.; le Huërou-Luron, I.; Lallès, J.P.; Awati,  
217 A., 2007: Dietary protein and fermentable carbohydrates contents influence growth  
218 performance and intestinal characteristics in newly weaned pigs. *Livestock Science* 108, 194–  
219 197

- 220 Blachier, F.; Mariotti, F.; Huneau, J.F.; Tomé, D., 2007: Effects of amino acid-derived luminal  
221 metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* 33,  
222 547–562.
- 223 Burrin, D.G.; Petersen, Y.; Stoll, B.; Sanguild, P., 2001: Glucagon-like peptide 2: A nutrient-  
224 responsive gut growth factor. *Journal of Nutrition* 131, 709–712.
- 225 Caliendo, G.; Cirino, G.; Santagada, V.; Wallace, J.L., 2010: Synthesis and biological effects of  
226 hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S): Development of H<sub>2</sub>S-releasing drugs as pharmaceuticals. *Journal of*  
227 *Medical Chemistry* 53, 6275–6286.
- 228 CIOMS, 1985: International guiding principles for biomedical research involving animals. The  
229 development of science-based guidelines for laboratory animal care—NCBI Bookshelf.  
230 [http://cioms.ch/publications/guidelines/1985\\_texts\\_of\\_guidelines.htm](http://cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm).
- 231 David, F.; Sandra, P.; Wylie, P.L., 2003: Improving the analysis of fatty acid methyl esters using  
232 retention times locked methods and retention time data bases. Agilent Technologies, Santa  
233 Clara.
- 234 Donohoe, D.R.; Garge, N.; Zhang, X.; Sun, W.; O’Connell, T.M.; Bunger, M.K.; Bultman, S.J.,  
235 2011: The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the  
236 mammalian colon. *Cell Metabolism* 13, 517–526.
- 237 Escobar, G.K.; Reis, S.T.C.; Mariscal, L.G.; Aguilera, B.A.; Bernal, S.M.G.; Gómez, S.J.G.,  
238 2014: Microbial fermentation patterns, diarrhea incidence, and performance in weaned piglets  
239 fed a low protein diet supplemented with probiotics. *Food and Nutrition Sciences* 5, 1776–  
240 1786.
- 241 Hermes, R.G.; Molist, F.; Ywazaki, M.; Nofrarias, M.; Gomez de Segura, A.; Gasa, J.; Pérez,  
242 J.F., 2009: Effect of dietary level of protein and fiber on the productive performance and health  
243 status of piglets. *Journal of Animal Science* 87, 3569–3577.
- 244 Lallès, J.P.; Bosi, P.; Smidt, H.; Stokes, C.R., 2007: Weaning—A challenge to gut physiologists.  
245 *Livestock Science* 108, 82–93.
- 246 National Research Council (NRC), 1998: *Nutrient Requirements of Swine*, 11th edn. National  
247 Academy Press, Washington DC, USA.
- 248 Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999., 2001: Especificaciones técnicas para la  
249 producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación,  
250 México, D.F.
- 251 Opapeju, F.O.; Krause, D.O.; Payne, R.L.; Rademacher, M.; Nyachoti, C.M., 2009: Effect of  
252 dietary protein level on growth performance, indicators of enteric health, and gastrointestinal  
253 microbial ecology of weaned pigs induced with postweaning colibacillosis. *Journal of Animal*  
254 *Science* 87, 2635–2643.
- 255 Roberts, S.A.; Xin, H.; Kerr, B.J.; Russell, J.R.; and Bregendahl, K., 2007: Effects of dietary  
256 fiber and reduced crude protein on ammonia emission from laying-hen manure. *Poultry*  
257 *Science* 86, 1625–1632.
- 258 SAS, 2008: *Statistical Analysis System, User’s Guide, SAS/ETS 9.2*. SAS Institute, Inc., Cary,  
259 NC, USA.

- 260 Steel, R.G.D.; Torrie, J.H., 1997: *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical*  
261 *Approach*, 3rd edn. McGraw-Hill, NY, USA.
- 262 Stein, H.H.; Kil, D.Y., 2006: Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to  
263 weanling pigs: dietary tools, part 2. *Animal Biotechnology* 17, 217–231.
- 264 Taciak, M.; Pastuszewska, B.; Tuśnio, A.; Świąch, E., 2010: Effects of two protein and fibre  
265 sources on SCFA concentration in pig large intestine. *Livestock Science* 133, 138–140.
- 266 Van Soest, P.J.; Roberts, J.; Lewis, B.A., 1991: Methods for dietary fiber, neutral detergent  
267 fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*  
268 74, 3583–3594.
- 269 Wellock, I.J.; Houdijk, J.G.M.; Kyriazakis, I., 2007: Effect of dietary non-starch polysaccharide  
270 solubility and inclusion level on gut health and the risk of post weaning enteric disorders in  
271 newly weaned piglets. *Livestock Science* 108, 186–189.
- 272 Windey, K.; De Preter, V.; Verbeke, K., 2012: Relevance of protein fermentation to gut health.  
273 *Molecular Nutrition & Food Research* 56, 184–196.

274

**Table 1.** Composition of experimental diets on a feed basis.

	Diets		
	HPa	HP	LP
<b>INGREDIENTS</b>			
Maize	46.76	46.82	57.20
Soybean meal	15.00	15.00	7.00
Fish menhaden meal	9.23	9.23	6.54
Whey (dried)	24.69	24.69	24.69
Corn oil	1.49	1.48	1.06
Lysine	0.25	0.25	0.65
Glutamine	0.80	0.80	0.80
Threonine	0.10	0.10	0.26
Methionine	--	--	0.05
Tryptophan	0.05	0.05	0.10
Sodium carbonate	--	--	0.03
Limestone	0.90	0.90	0.94
LincoSpectin <sup>®*</sup>	0.05	--	--
Vitamins and minerals <sup>†</sup>	0.48	0.48	0.48
Gustor <sup>®‡</sup>	0.20	0.20	0.20
<b>CHEMICAL COMPOSITION</b>			
Dry matter (%) <sup>§</sup>	91.6	92.6	92.5
Crude protein (%) <sup>§</sup>	19.7	19.8	15.8
Ash (%) <sup>§</sup>	5.6	5.9	5.8
Crude fat (%) <sup>§</sup>	3.1	2.7	1.6
NDF (%) <sup>§</sup>	5.7	5.3	7.7
ME (kcal·kg <sup>-1</sup> ) <sup>¶</sup>	3300	3300	3300

HPa: high crude protein diet with antibiotics; HP: high crude protein diet without antibiotics; LP: low crude protein diet without antibiotics.

\* LincoSpectin<sup>®</sup>: 2.2 g lincomycin, 2.2 g spectinomycin.

† Vitamins per kg of diet: vitamin A 10,200 IU, vitamin D 1,980 IU, vitamin E 60 IU, vitamin K 1.20 mg, choline 967 mg, niacin 36 mg, pantothenate 17 mg, riboflavin 7.2 mg, vitamin B<sub>12</sub> 38 µg, thiamine 0.30 mg, pyridoxine 0.31 mg, biotin 0.08 mg, and folate 0.75 mg. Minerals per kg of diet: Cu 14.4 mg, I 800 mg, Fe 105 mg, Mn 36 mg, Se 0.3 mg, and Zn 144 mg.

‡ Gustor<sup>®</sup>: sodium butyrate.

§ Values analysed; ¶ Values calculated.

275

276

277

278

279

280

281

**Table 2.** Effect of experimental diets on volatile fatty acids, lactic acid ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ), and ammonia ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) in small intestine.

	Diet									SEM	P value			
	HPa			HP			LP				pwd	diet	pwd*diet	
Post-weaning day (pwd)	0	7	14	21	7	14	21	7	14	21				
<b>Jejunum</b>														
Acetate	6	3	5	7	7	7	14	15	21	32	0.13	***	***	***
Propionate	3	2	2.5	3	3.5	4	5	7	11	13	0.10	***	***	***
Butyrate	1	1	1.6	2	2.5	3.5	6	7	9.3	18	0.02	***	***	***
Valerate	2.5	1.5	2.5	4.1	9.3	10.1	12.3	0.3	0.8	1	0.01	***	***	***
SCFA	10	6	9	12	13	15	25	29	42	63	0.17	***	***	***
Isobutyrate	1	0.5	1	1.1	12	20.5	25	0.05	0.1	0.18	0.02	***	***	***
Isovalerate	1.5	1	2.1	3	10.1	12.1	14.1	1.3	1.6	2.1	0.01	***	***	***
Isocaproate	1.9	1	1.5	1.8	9.2	10.3	8.1	0.7	1.8	1	0.01	***	***	***
BCFA	7	4	7	10	41	53	60	2	4	4	0.05	***	***	***
Total VFA	17	10	16	22	54	68	85	31	46	67	1.20	***	***	***
Lactic acid	5.4	2.7	6.5	14	5	7	19	7	13	30	0.10	***	***	***
Ammonia	147	97	137	212	254	361	412	100	145	167	3.89	***	***	**
<b>Ileum</b>														
Acetate	10	6.3	7.2	11.1	8.3	10.1	15.3	20.1	37.4	45.3	0.01	***	***	***
Propionate	5	3.1	4.2	5.2	3.5	3.7	4.3	10.2	12.3	15.1	0.02	***	***	***
Butyrate	3.2	2	2.1	6.2	2.4	4.4	7.2	12	19.7	27.5	0.02	***	***	***
Valerate	1.5	3.3	4.2	7.3	15.3	16.3	19.3	1.8	2.6	3	0.02	***	***	***
SCFA	18	11	13.5	22.5	14	18	27	42	69	88	0.03	***	***	***
Isobutyrate	2.1	1	1.5	2.5	13.3	30.1	32.4	0.3	0.5	1.2	0.02	***	***	***
Isovalerate	5	1.5	3.2	3.7	12	15.1	21.3	2	2.2	2.3	0.01	***	***	***
Isocaproate	1.5	3.3	4.2	7.3	15.3	16.3	19.3	1.8	2.6	3	0.01	***	***	***
BCFA	9	7	11	16	52	74	88	5	6	8	0.05	***	***	***
Total VFA	27	18	24.5	38.5	66	92	115	47	75	96	2.70	***	***	***
Lactic acid	8	5	7	16	6	8	30	9	12	36	0.05	***	***	***
Ammonia	335	150	201	361	398	466	515	120	180	197	13.12	***	***	NS

HPa: high crude protein diet with antibiotics; HP: high crude protein diet without antibiotics; LP: low crude protein diet without antibiotics; VFA: volatile fatty acids; SCFA: short chain fatty acids; BCFA: branched chain fatty acids.

P: statistical significance; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS:  $p > 0.05$ ; pwd: post-weaning day; SEM: standard error of the mean.

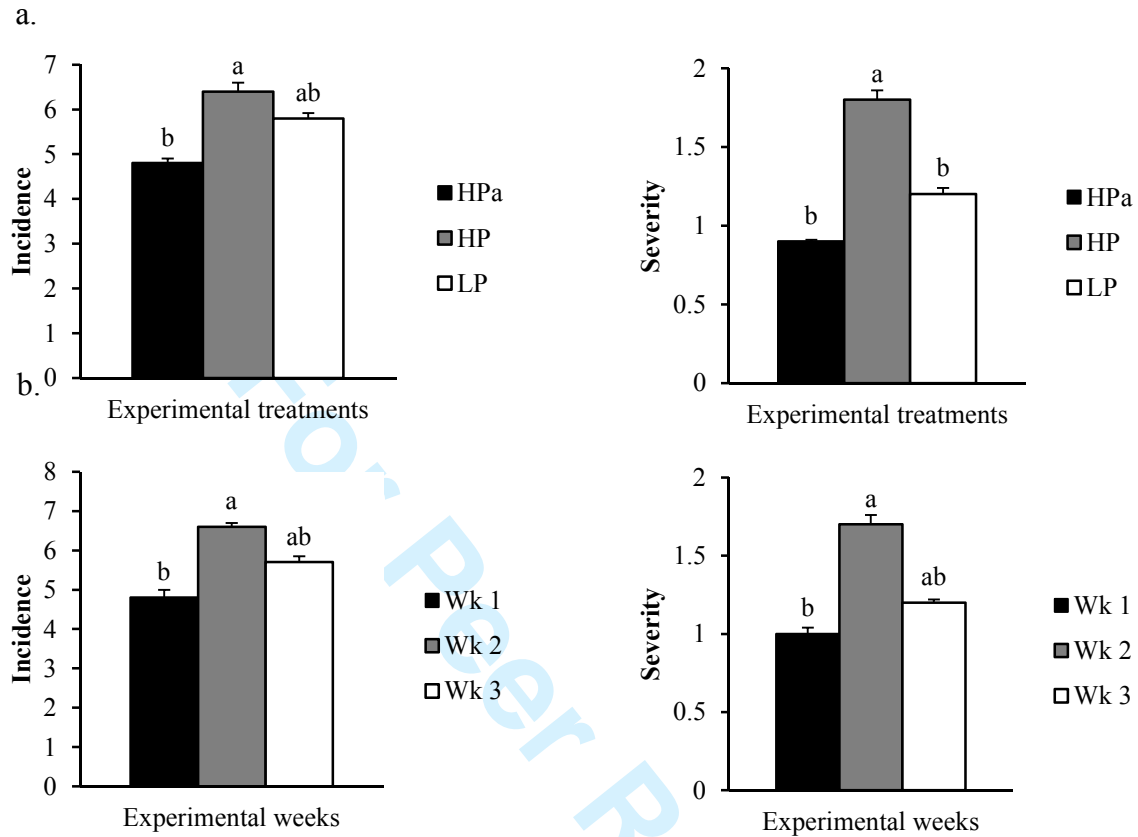
**Table 3.** Effect of experimental diets on volatile fatty acids, lactic acid ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ), and ammonia ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) in the large intestine.

	Diet									SEM	P value			
	HPa			HP			LP				pwd	diet	pwd*diet	
Post-weaning day (pwd)	0	7	14	21	7	14	21	7	14	21				
<b>Caecum</b>														
Acetate	22.4	14.5	19.6	25.1	11.3	16.3	17.5	35.3	48.3	56.4	0.04	***	***	***
Propionate	5.4	4.1	5.5	7.5	4.1	4.3	9.2	8.6	15.2	28.7	0.02	***	***	***
Butyrate	10.5	7.5	10.3	14	6.1	9.4	10.7	18.3	27.2	31.3	0.02	***	***	***
Valerate	2.6	1	1.4	1.8	6	11.1	13.7	0.6	1	2.1	0.03	***	***	***
SCFA	38	26	35	47	21	30	37	62	91	116	0.09	***	***	***
Isobutyrate	4.4	3	4.8	8	27.2	37.9	46.3	0.2	0.5	0.8	0.03	***	***	***
Isovalerate	10.7	5.4	6.3	8.5	18.3	26	31.5	2.2	2.5	2.9	0.02	***	***	***
Isocaproate	1.6	2.2	2.4	5.2	12	12.7	14.1	0.6	1.1	1.1	0.01	***	***	***
BCFA	19	17	26	37	64	88	106	4	5	7	0.07	***	***	***
Total VFA	57	43	61	84	85	118	143	66	96	123	3.2	***	***	***
Lactic acid	0.5	0.3	0.2	0.7	0.4	0.3	1	0.5	0.4	1.2	0.004	***	***	***
Ammonia	506	196	251	510	528	573	743	145	202	250	6.07	***	***	**
<b>Colon</b>														
Acetate	15	18	23	31	10	16	19	37	59	64	0.03	***	***	***
Propionate	7.5	8.5	10.5	11.4	6.5	7	9.2	16.1	24	29	0.02	***	***	***
Butyrate	8.4	9	11	12	7	9.6	11	21	31	39	0.02	***	***	***
Valerate	3	3.1	3.3	5.3	6.2	14.7	19.3	2.5	2.8	3	0.02	***	***	***
SCFA	39	34	39	54	24	33	39	69	115	132	0.06	***	***	***
Isobutyrate	5	4.4	6.4	7.4	37	43	58	1.3	1.5	2.2	0.04	***	***	***
Isovalerate	15	7.4	8.4	9.3	21	30	37	2	2.5	3	0.04	***	***	***
Isocaproate	1.1	2.1	2.6	4.4	5.2	12.5	17.4	1.1	1.2	1.9	0.02	***	***	***
BCFA	25	17	31	42	69	100	121	7	8	10	0.09	***	***	***
Total VFA	64	51	70	96	93	133	160	76	123	142	4.24	***	***	***
Lactic acid	0.5	0.6	0.3	1.2	0.7	0.5	1.9	1	0.6	2	0.007	***	***	***
Ammonia	377	148	302	393	528	823	1071	175	228	286	28.29	***	***	NS

HPa: high crude protein diet with antibiotics; HP: high crude protein diet without antibiotics; LP: low crude protein diet without antibiotics; VFA: volatile fatty acids; SCFA: short chain fatty acids; BCFA: branched chain fatty acids.

P: statistical significance; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS:  $p > 0.05$ ; pwd: post-weaning day; SEM: standard error of the mean.

**Figure 1.** a. Effect of diet treatments (a) and time post-weaning in weeks (b) on the incidence and severity of diarrhoea.



HCPa: high crude protein with antibiotics; HCP: high crude protein diet without antibiotics; LP: low crude protein diet without antibiotics.

Wk 1: first week post-weaning; Wk 2: second week post-weaning; Wk 3: third week post-weaning.

Bars with different letters (a, b, c) are significantly different ( $p < 0.01$ ).



**Table 1.** Composition of experimental diets on a feed basis.

	Diets		
	HPa	HP	LP
<b>INGREDIENTS</b>			
Maize	46.76	46.82	57.20
Soybean meal	15.00	15.00	7.00
Fish menhaden meal	9.23	9.23	6.54
Whey (dried)	24.69	24.69	24.69
Corn oil	1.49	1.48	1.06
Lysine	0.25	0.25	0.65
Glutamine	0.80	0.80	0.80
Threonine	0.10	0.10	0.26
Methionine	--	--	0.05
Tryptophan	0.05	0.05	0.10
Sodium carbonate	--	--	0.03
Limestone	0.90	0.90	0.94
LincoSpectin <sup>®*</sup>	0.05	--	--
Vitamins and minerals <sup>†</sup>	0.48	0.48	0.48
Gustor <sup>®‡</sup>	0.20	0.20	0.20
<b>CHEMICAL COMPOSITION</b>			
Dry matter (%) <sup>§</sup>	91.6	92.6	92.5
Crude protein (%) <sup>§</sup>	19.7	19.8	15.8
Ash (%) <sup>§</sup>	5.6	5.9	5.8
Crude fat (%) <sup>§</sup>	3.1	2.7	1.6
NDF (%) <sup>§</sup>	5.7	5.3	7.7
ME (kcal·kg <sup>-1</sup> ) <sup>¶</sup>	3300	3300	3300

HPa: high crude protein diet with antibiotics; HP: high crude protein diet without antibiotics; LP: low crude protein diet without antibiotics.

\* LincoSpectin<sup>®</sup>: 2.2 g lincomycin, 2.2 g spectinomycin.

† Vitamins per kg of diet: vitamin A 10,200 IU, vitamin D 1,980 IU, vitamin E 60 IU, vitamin K 1.20 mg, choline 967 mg, niacin 36 mg, pantothenate 17 mg, riboflavin 7.2 mg, vitamin B<sub>12</sub> 38 µg, thiamine 0.30 mg, pyridoxine 0.31 mg, biotin 0.08 mg, and folate 0.75 mg. Minerals per kg of diet: Cu 14.4 mg, I 800 mg, Fe 105 mg, Mn 36 mg, Se 0.3 mg, and Zn 144 mg.

‡ Gustor<sup>®</sup>: sodium butyrate.

§ Values analysed; ¶ Values calculated.

1

2

3

4

5

6

7

**Table 2.** Effect of experimental diets on volatile fatty acids, lactic acid ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ), and ammonia ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) in small intestine.

	Diet									SEM	P value			
	HPa			HP			LP				pwd	diet	pwd*diet	
Post-weaning day (pwd)	0	7	14	21	7	14	21	7	14	21				
<b>Jejunum</b>														
Acetate	6	3	5	7	7	7	14	15	21	32	0.13	***	***	***
Propionate	3	2	2.5	3	3.5	4	5	7	11	13	0.10	***	***	***
Butyrate	1	1	1.6	2	2.5	3.5	6	7	9.3	18	0.02	***	***	***
Valerate	2.5	1.5	2.5	4.1	9.3	10.1	12.3	0.3	0.8	1	0.01	***	***	***
SCFA	10	6	9	12	13	15	25	29	42	63	0.17	***	***	***
Isobutyrate	1	0.5	1	1.1	12	20.5	25	0.05	0.1	0.18	0.02	***	***	***
Isovalerate	1.5	1	2.1	3	10.1	12.1	14.1	1.3	1.6	2.1	0.01	***	***	***
Isocaproate	1.9	1	1.5	1.8	9.2	10.3	8.1	0.7	1.8	1	0.01	***	***	***
BCFA	7	4	7	10	41	53	60	2	4	4	0.05	***	***	***
Total VFA	17	10	16	22	54	68	85	31	46	67	1.20	***	***	***
Lactic acid	5.4	2.7	6.5	14	5	7	19	7	13	30	0.10	***	***	***
Ammonia	147	97	137	212	254	361	412	100	145	167	3.89	***	***	**
<b>Ileum</b>														
Acetate	10	6.3	7.2	11.1	8.3	10.1	15.3	20.1	37.4	45.3	0.01	***	***	***
Propionate	5	3.1	4.2	5.2	3.5	3.7	4.3	10.2	12.3	15.1	0.02	***	***	***
Butyrate	3.2	2	2.1	6.2	2.4	4.4	7.2	12	19.7	27.5	0.02	***	***	***
Valerate	1.5	3.3	4.2	7.3	15.3	16.3	19.3	1.8	2.6	3	0.02	***	***	***
SCFA	18	11	13.5	22.5	14	18	27	42	69	88	0.03	***	***	***
Isobutyrate	2.1	1	1.5	2.5	13.3	30.1	32.4	0.3	0.5	1.2	0.02	***	***	***
Isovalerate	5	1.5	3.2	3.7	12	15.1	21.3	2	2.2	2.3	0.01	***	***	***
Isocaproate	1.5	3.3	4.2	7.3	15.3	16.3	19.3	1.8	2.6	3	0.01	***	***	***
BCFA	9	7	11	16	52	74	88	5	6	8	0.05	***	***	***
Total VFA	27	18	24.5	38.5	66	92	115	47	75	96	2.70	***	***	***
Lactic acid	8	5	7	16	6	8	30	9	12	36	0.05	***	***	***
Ammonia	335	150	201	361	398	466	515	120	180	197	13.12	***	***	NS

HPa: high crude protein diet with antibiotics; HP: high crude protein diet without antibiotics; LP: low crude protein diet without antibiotics; VFA: volatile fatty acids; SCFA: short chain fatty acids; BCFA: branched chain fatty acids.

P: statistical significance; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS:  $p > 0.05$ ; pwd: post-weaning day; SEM: standard error of the mean.

**Table 3.** Effect of experimental diets on volatile fatty acids, lactic acid ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ), and ammonia ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) in the large intestine.

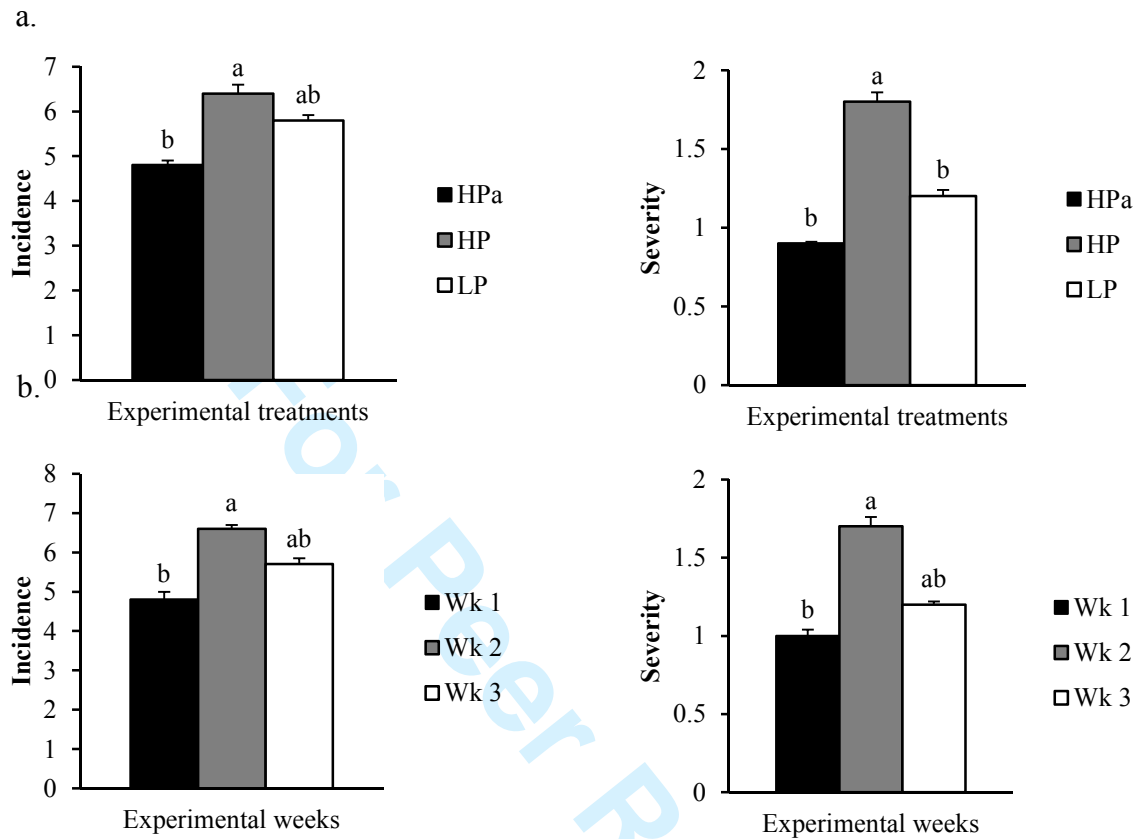
	Diet									SEM	P value			
	HPa			HP			LP				pwd	diet	pwd*diet	
Post-weaning day (pwd)	0	7	14	21	7	14	21	7	14	21				
<b>Caecum</b>														
Acetate	22.4	14.5	19.6	25.1	11.3	16.3	17.5	35.3	48.3	56.4	0.04	***	***	***
Propionate	5.4	4.1	5.5	7.5	4.1	4.3	9.2	8.6	15.2	28.7	0.02	***	***	***
Butyrate	10.5	7.5	10.3	14	6.1	9.4	10.7	18.3	27.2	31.3	0.02	***	***	***
Valerate	2.6	1	1.4	1.8	6	11.1	13.7	0.6	1	2.1	0.03	***	***	***
SCFA	38	26	35	47	21	30	37	62	91	116	0.09	***	***	***
Isobutyrate	4.4	3	4.8	8	27.2	37.9	46.3	0.2	0.5	0.8	0.03	***	***	***
Isovalerate	10.7	5.4	6.3	8.5	18.3	26	31.5	2.2	2.5	2.9	0.02	***	***	***
Isocaproate	1.6	2.2	2.4	5.2	12	12.7	14.1	0.6	1.1	1.1	0.01	***	***	***
BCFA	19	17	26	37	64	88	106	4	5	7	0.07	***	***	***
Total VFA	57	43	61	84	85	118	143	66	96	123	3.2	***	***	***
Lactic acid	0.5	0.3	0.2	0.7	0.4	0.3	1	0.5	0.4	1.2	0.004	***	***	***
Ammonia	506	196	251	510	528	573	743	145	202	250	6.07	***	***	**
<b>Colon</b>														
Acetate	15	18	23	31	10	16	19	37	59	64	0.03	***	***	***
Propionate	7.5	8.5	10.5	11.4	6.5	7	9.2	16.1	24	29	0.02	***	***	***
Butyrate	8.4	9	11	12	7	9.6	11	21	31	39	0.02	***	***	***
Valerate	3	3.1	3.3	5.3	6.2	14.7	19.3	2.5	2.8	3	0.02	***	***	***
SCFA	39	34	39	54	24	33	39	69	115	132	0.06	***	***	***
Isobutyrate	5	4.4	6.4	7.4	37	43	58	1.3	1.5	2.2	0.04	***	***	***
Isovalerate	15	7.4	8.4	9.3	21	30	37	2	2.5	3	0.04	***	***	***
Isocaproate	1.1	2.1	2.6	4.4	5.2	12.5	17.4	1.1	1.2	1.9	0.02	***	***	***
BCFA	25	17	31	42	69	100	121	7	8	10	0.09	***	***	***
Total VFA	64	51	70	96	93	133	160	76	123	142	4.24	***	***	***
Lactic acid	0.5	0.6	0.3	1.2	0.7	0.5	1.9	1	0.6	2	0.007	***	***	***
Ammonia	377	148	302	393	528	823	1071	175	228	286	28.29	***	***	NS

HPa: high crude protein diet with antibiotics; HP: high crude protein diet without antibiotics; LP: low crude protein diet without antibiotics; VFA: volatile fatty acids; SCFA: short chain fatty acids; BCFA: branched chain fatty acids.

P: statistical significance; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS:  $p > 0.05$ ; pwd: post-weaning day; SEM: standard error of the mean.

For Peer Review

**Figure 1.** a. Effect of diet treatments (a) and time post-weaning in weeks (b) on the incidence and severity of diarrhoea.



HCPa: high crude protein with antibiotics; HCP: high crude protein diet without antibiotics; LP: low crude protein diet without antibiotics.

Wk 1: first week post-weaning; Wk 2: second week post-weaning; Wk 3: third week post-weaning.

Bars with different letters (a, b, c) are significantly different ( $p < 0.01$ ).

## 1   **References**

- 2   AOAC, 2002: *Official Methods of Analysis*, 17th edn. Association of Official Analytical  
3   Chemists, Arlington, VA, USA.
- 4   Williams, B.A.; Bosch, M.W.; Awati, A.; Konstantinov, S.R.; Smidt, H.; Akkermans,  
5   A.D.L.; Verstegen, M.W.A.; Tamminga, S., 2005: In vitro assessment of gastrointestinal  
6   tract (GIT) fermentation in pigs: Fermentable substrates and microbial activity. *Animal*  
7   *Research* 54, 191–201.
- 8   Bhandari, S.K.; Opapeju, F.O.; Krause, D.O.; Nyachoti, C.M., 2010: Dietary protein level  
9   and probiotic supplementation effects on piglet response to *Escherichia coli* K88  
10   challenge: Performance and gut microbial population. *Livestock Science* 133, 185–188.
- 11   Bikker, P.; Dirkzwager, A.; Fledderus, J.; Trevisi, P.; le Huërou-Luron, I.; Lallès, J.P.;  
12   Awati, A., 2007: Dietary protein and fermentable carbohydrates contents influence  
13   growth performance and intestinal characteristics in newly weaned pigs. *Livestock*  
14   *Science* 108, 194–197
- 15   Blachier, F.; Mariotti, F.; Huneau, J.F.; Tomé, D., 2007: Effects of amino acid-derived  
16   luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences.  
17   *Amino Acids* 33, 547–562.
- 18   Burrin, D.G.; Petersen, Y.; Stoll, B.; Sangulid, P., 2001: Glucagon-like peptide 2: A  
19   nutrient-responsive gut growth factor. *Journal of Nutrition* 131, 709–712.
- 20   Caliendo, G.; Cirino, G.; Santagada, V.; Wallace, J.L., 2010: Synthesis and biological  
21   effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S): Development of H<sub>2</sub>S-releasing drugs as  
22   pharmaceuticals. *Journal of Medical Chemistry* 53, 6275–6286.
- 23   CIOMS, 1985: International guiding principles for biomedical research involving animals.  
24   The development of science-based guidelines for laboratory animal care–NCBI  
25   Bookshelf. [http://cioms.ch/publications/guidelines/1985\\_texts\\_of\\_guidelines.htm](http://cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm).
- 26   David, F.; Sandra, P.; Wylie, P.L., 2003: Improving the analysis of fatty acid methyl esters  
27   using retention times locked methods and retention time data bases. Agilent Technologies,  
28   Santa Clara.
- 29   Donohoe, D.R.; Garge, N.; Zhang, X.; Sun, W.; O’Connell, T.M.; Bunger, M.K.; Bultman,  
30   S.J., 2011: The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in  
31   the mammalian colon. *Cell Metabolism* 13, 517–526.
- 32   Escobar, G.K.; Reis, S.T.C.; Mariscal, L.G.; Aguilera, B.A.; Bernal, S.M.G.; Gómez,  
33   S.J.G., 2014: Microbial fermentation patterns, diarrhea incidence, and performance in  
34   weaned piglets fed a low protein diet supplemented with probiotics. *Food and Nutrition*  
35   *Sciences* 5, 1776–1786.

- 36 Hermes, R.G.; Molist, F.; Ywazaki, M.; Nofrarias, M.; Gomez de Segura, A.; Gasa, J.;  
37 Pérez, J.F., 2009: Effect of dietary level of protein and fiber on the productive  
38 performance and health status of piglets. *Journal of Animal Science* 87, 3569–3577.
- 39 Lallès, J.P.; Bosi, P.; Smidt, H.; Stokes, C.R., 2007: Weaning—A challenge to gut  
40 physiologists. *Livestock Science* 108, 82–93.
- 41 National Research Council (NRC), 1998: *Nutrient Requirements of Swine*, 11th edn.  
42 National Academy Press, Washington DC, USA.
- 43 Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999., 2001: Especificaciones técnicas para la  
44 producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación,  
45 México, D.F.
- 46 Opapeju, F.O.; Krause, D.O.; Payne, R.L.; Rademacher, M.; Nyachoti, C.M., 2009: Effect  
47 of dietary protein level on growth performance, indicators of enteric health, and  
48 gastrointestinal microbial ecology of weaned pigs induced with postweaning colibacillosis.  
49 *Journal of Animal Science* 87, 2635–2643.
- 50 Roberts, S.A.; Xin, H.; Kerr, B.J.; Russell, J.R.; and Bregendahl, K., 2007: Effects of  
51 dietary fiber and reduced crude protein on ammonia emission from laying-hen manure.  
52 *Poultry Science* 86, 1625–1632.
- 53 SAS, 2008: *Statistical Analysis System, User's Guide, SAS/ETS 9.2*. SAS Institute, Inc.,  
54 Cary, NC, USA.
- 55 Steel, R.G.D.; Torrie, J.H., 1997: *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical*  
56 *Approach*, 3rd edn. McGraw-Hill, NY, USA.
- 57 Stein, H.H.; Kil, D.Y., 2006: Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to  
58 weanling pigs: dietary tools, part 2. *Animal Biotechnology* 17, 217–231.
- 59 Taciak, M.; Pastuszewska, B.; Tuśnio, A.; Świąch, E., 2010: Effects of two protein and  
60 fibre sources on SCFA concentration in pig large intestine. *Livestock Science* 133, 138–  
61 140.
- 62 Van Soest, P.J.; Roberts, J.; Lewis, B.A., 1991: Methods for dietary fiber, neutral detergent  
63 fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy*  
64 *Science* 74, 3583–3594.
- 65 Wellock, I.J.; Houdijk, J.G.M.; Kyriazakis, I., 2007: Effect of dietary non-starch  
66 polysaccharide solubility and inclusion level on gut health and the risk of post weaning  
67 enteric disorders in newly weaned piglets. *Livestock Science* 108, 186–189.
- 68 Windey, K.; De Preter, V.; Verbeke, K., 2012: Relevance of protein fermentation to gut  
69 health. *Molecular Nutrition & Food Research* 56, 184–196.

## **8. CAPÍTULO 3**

**MORPHO-PHYSIOLOGY OF INTESTINAL TRACT OF NEWLY WEANED  
PIGLETS CAN BE ALTERED AS RESPONSE TO STARTER DIET COMPONENTS**



# **MORPHO-PHYSIOLOGY OF INTESTINAL TRACT OF NEWLY WEANED PIGLETS CAN BE ALTERED AS RESPONSE TO STARTER DIET COMPONENTS**

## **Introduction.**

At weaning an important change of the diet composition was observed, including plant protein sources with a low digestibility. Moreover, piglets suffered a transitory anorexia that causes villus atrophy and crypts hypertrophy. This situation affects all morphophysiology, changing pH and decreasing secretions, leading piglets to a limited digestive capacity. As a consequence undigested proteins remaining in intestinal lumen and are fermented by pathogenic microorganisms which favors its proliferation (Lallès *et al.*, 2007). Probably this is one of the triggers of post-weaning diarrhea (Blachier *et al.*, 2007; Hermes *et al.*, 2009). Gastrointestinal tract (GIT) as a defense mechanism produce mucus (mucins), which forms a layer over intestinal epithelium protecting it of bacterial action. Thus, when pathogenic bacteria proliferates, GIT respond producing more mucins, thickening the mucus layer. Once piglets start to consumed feed, villus recovered and its digestive capacity has a notably improve, but this recovery takes a few days (Wellock *et al.*, 2007). The ban of antibiotics in animal nutrition worsened that situation. Recently there was an increase in studies to search alternatives to antibiotics (AB) in piglet diets. One alternative is the use of low protein diets, under the hypothesis that ingestion of a smaller amount of protein reduces the substrate for bacterial fermentation. The objective of the present study was to evaluate the effect of dietary protein level and the presence or not of AB, over main indicators of morpho-physiology action in GIT (pH, Intestinal morphology and mucins production).

## **Materials and methods.**

The experiment was conducted at the experimental farm of CENID-Physiology (INIFAP, Mexico). The protocol was reviewed and approved by the bioethical committee of the Faculty of Natural Sciences of Autonomous University of Queretaro. The experimental animals were treated according to the guidelines of the

Mexican official norm (NOM-062-ZOO-1999) for production, care, and use of animals for experimentation (Diario oficial de la federación, 2001) and the guidelines of the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving animals (CIOMS, 1985).

### **Animals and diets.**

Seventy-two piglets weaned at  $20 \pm 1.4$  days weighing  $6.6 \pm 1.1$  kg, were randomly distributed among three treatments (diets). Six piglets were housed per pen, being four pens per treatment. The experimental diets were: high protein diet (20%), with antibiotic (HPa); high protein diet (20%) without antibiotic (HP) and low protein diet (16%) without antibiotic (LP) (Table 1). All diets provided the requirements for that production stage (NRC, 1998); in low protein diet lysine, methionine, threonine and tryptophan were supplemented as crystalline amino acids. Aminogut® was added to all diets as a mucous protector, and Gustor® to stimulate feed intake.

### **Animal management.**

Piglets were placed in a temperature-controlled room ( $30, 28, 26 \pm 2$  °C during first, second and third week post weaning, respectively). Piglets were housed in weaning pens, with a nipple drinker and a feeder with six compartments; having free access to feed and water throughout all experimental period.

### **Sampling and analysis.**

A control group of four piglets that never fed solid feed was slaughtered at weaning (0 d). Four animals of each treatment were slaughtered at 7, 14 and 21 post-weaning day. The animals were stunned by CO<sub>2</sub> inhalation, subsequently the jugular vein was sectioned for bleed and proceeded to open the abdominal cavity to collect stomach, duodenum, jejunum and terminal ileum. The digesta of every gastrointestinal compartment was extracted to measure pH. Small intestine was sectioned into three parts and every part was cut obtaining approximately a 10 cm section. Every section was gently washed with NaCl solution. The ends were tied with hemp thread and spread with buffered 10% formalin. After, each intestinal section was embedded in

paraffin and cut to 5 micron thick. The cuts were stained with hematoxylin-eosin and examined under an optical microscope Carl Zeiss performing ten measurements per sheet to determine the average villus height and crypt depth. In the remaining parts of each intestinal section underwent curettage to obtain samples of mucus layer on a refrigerated base. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and conserved at -80 °C until analysis. Mucins purification of each intestinal portion were made following the method proposed by Faure *et al* (2002). Briefly, 300 mg of mucosal samples were weight and homogenized at 4°C using 2 ml of 0.05M Tris/HCl buffer adjusted to pH 7.5. Once obtained, the homogenates were incubated for 2 h at 37°C with a fungal cocktail of proteases under agitation. To stop the reaction, Guanidinium hydrochloride was added to each sample to reach a final concentration of 4M. After that, homogenates were solubilized under reduction conditions with 10mM dithiotreitol for 2 h at room temperature under agitation. Later, gravity gel filtration was made using chromatography columns filled with sepharose CL-4B resin. One ml samples were loaded into the columns. The mucoprotein-containing fractions were dialyzed against deionized water for 48 h at 4°C using a 12000 – 14000 molecular cutoff membrane. Dialyzed samples were freeze-dried for 24 h and re-suspended in 0.2 ml of deionized water and store at 20°C until its quantification. Mucin quantification was made using sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoreses (SDS–PAGE) were performed under reducing conditions according to the method of Laemmli (1970). Bands obtaining through electrophoreses were analyzed using a specialized software (Quantity one, BIORAD, CA) to measure the density of each band, and a curve was made using BSA as a known standard. Dry matter, ashes, crude protein, crude fat (AOAC, 2002) and NDF (van Soest *et al.*, 1991) were analyzed in experimental diets (Table 1).

### **Statistical analysis.**

Data obtained were analyzed using a completely randomized design, with a factorial arrangement, where post-weaning age and diet were the main factors. The experimental unit was the piglet (Steel and Torrie, 1997). Statistical differences were

accepted at a  $P < 0.05$  value, and means were compared by Tukey test using the GLM procedure of SAS (SAS, 2008).

**Table 1.** Centesimal and chemical composition of experimental diets.

	Diets		
	HPa	HP	LP
<b>INGREDIENTS</b>			
Maize	46.76	46.82	57.20
Soybean meal	15.00	15.00	7.00
Fish Menhaden meal	9.23	9.23	6.54
Whey dried	24.69	24.69	24.69
Corn oil	1.49	1.48	1.06
Lysine	0.25	0.25	0.65
Glutamine	0.80	0.80	0.80
Threonine	0.10	0.10	0.26
Methionine	--	--	0.05
Tryptophan	0.05	0.05	0.10
Sodium Carbonate	--	--	0.03
Limestone	0.90	0.90	0.94
LincoSpectin®*	0.05	--	--
Vitamins and minerals**	0.48	0.48	0.48
Gustor®***	0.20	0.20	0.20
<b>CHEMICAL COMPOSITION</b>			
Dry matter (%) <sup>1</sup>	91.6	92.6	92.5
Crude protein (%) <sup>1</sup>	19.7	19.8	15.8
Ashes (%) <sup>1</sup>	5.6	5.9	5.8
Crude fat (%) <sup>1</sup>	3.1	2.7	1.6
NDF (%) <sup>1</sup>	5.7	5.3	7.7
ME (Kcal·kg <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	3300	3300	3300

## Results

### ***Gastrointestinal pH.***

The values obtained of pH of intestinal contents can be appreciated in table two and three. There was not interaction between post-weaning age and treatments (diets). In stomach, post-wening age has a significant effect ( $P < 0.01$ ) being day of weaning which presented the most acid pH, followed by 7, 14 and 21 post-weaning days

without differences between them (Table 1). In duodenum and jejunum there was not differences between different ages. In ileum we observed significant differences. 0 and 7 post-weaning days has the most alkaline pH, while 14 and 21 days has the lower pH (Table 2).

**Table 2.** Effect of age on gastrointestinal pH.

	Post-weaning age				P	SEM
	0	7	14	21		
Stomach	4.1 <sup>a</sup>	2.9 <sup>b</sup>	2.7 <sup>b</sup>	2.5 <sup>b</sup>	**	0.06
Duodenum	6.2	6.7	6.2	6.2	NS	0.02
Jejunum	6.5	6.7	6.5	6.6	NS	0.03
Ileum	7.0 <sup>a</sup>	7.7 <sup>a</sup>	6.5 <sup>b</sup>	6.6 <sup>b</sup>	**	0.02

The treatments has no effects over intestinal digesta pH ( $P > 0.05$ ).

**Table 3.** Effect of treatments on gastrointestinal pH.

	Treatments			P	SEM
	HPa	HP	LP		
Stomach	3.1	3.1	2.9	NS	0.03
Duodenum	6.3	6.4	6.3	NS	0.07
Jejunum	6.7	6.6	6.6	NS	0.05
Ileum	6.7	6.8	6.8	NS	0.05

### ***Villous morphology.***

The result of villous length and width and crypt depth can be observed in table four. In this case there was an interaction between post-weaning age and treatments. Animals fed with HPa diet has the longest villous followed by animals of LP and HP diets in every day of measure ( $P < 0.001$ ). However, in duodenum, at 7 post-weaning day, piglets fed with HPa diet has shorter villous than that observed on day of weaning, but in jejunum and ileum the length of villous of piglets fed with HPa diet was higher every day of measure compared with 0 post-weaning day and with other treatments ( $P < 0.01$ ). In animals fed with high protein level diets (HPa and HP), between 7 and 14 post-weaning day, there was a reduction in villous length in

duodenum and jejunum. In ileum of animals fed with HPa diet there was observed a continue reduction of villous length until 21 post-weaning day. Contrary of that observation, animals fed with HP diet showed a slightly recovery at the end of experimental period (21 post-weaning day). Piglets fed with LP diets showed a constant growth of its villous (all portions). Villous width exhibited a similar behavior in animals fed with HPa and LP diets. In duodenum, pigs fed with HP diet revealed high villous width values compared with other two diets (HPa and LP), while in jejunum and ileum villus width of that animal did not showed differences with other treatments. Crypt depth of animals fed with HPa and LP diets showed similar values, while crypt depth of piglets fed with HP diets showed higher values ( $P < 0.001$ ).

**Table 4.** Effect of protein level and presence or absence of antibiotic on intestinal villous morphology.

Post-weaning age (pwa)		Treatments									pwa*ttm	SE M	
		HPa			HP			LP					
		0	7	14	21	7	14	21	7	14	21		
Duodenum	Lenght	75	62	61	64	25	24	36	53	54	57	***	0.46
	h	9	7	7	3	1	4	6	6	2	4		
	Width	11	10	11	10	11	11	10	10	10	10	***	
	1	6	0	5	6	3	4	4	5	3			
Crypt	10	11	11	10	12	12	10	11	10	10	***	0.20	
	6	0	2	2	1	3	2	2	6	4			
Jejunum	Lenght	52	53	53	55	25	24	30	40	42	45		***
	h	3	7	3	6	3	7	6	6	6	8		
	Width	10	10	11	10	90	99	10	10	10	10	***	0.19
	8	3	0	2	5	3	2	5	3	3			
Crypt	10	10	10	10	14	14	10	10	10	10	***	0.36	
	9	3	9	0	5	7	6	7	5	3			
Ileum	Lenght	41	45	45	42	24	24	27	40	41	42		***
	h	5	9	1	7	4	2	9	2	8	3		
	Width	10	10	10	10	96	98	10	10	10	10	***	0.17
	7	5	5	4	7	6	2	7	6	4			
Crypt	10	10	11	11	12	12	11	10	10	10	***	0.12	
	6	4	4	3	4	3	1	5	7	6			

### ***Mucin secretion.***

In Table 5 can be observed the effect of dietary protein level and presence or absence of antibiotics over intestinal mucins secretion. In present study there was not interaction between post-weaning age and treatments. Neither post-weaning age nor diet has effect on mucin production in duodenum. In jejunum and ileum there

were effects of post-weaning age and diets separately ( $P < 0.001$ ). 14 post-weaning day present the highest mucin production, followed by 7 and 21 days, while day 0 has the lowest values ( $P < 0.001$ ). Similarly, treatment produced the same effect in jejunum and ileum, showing the highest values animals fed with HP diet, followed by piglets that consumed HPa and LP diets and pigs that never consumed starter diet has the lowest mucin production ( $P < 0.001$ ).

## DISCUSSION

### *Gastrointestinal pH.*

Differences in pH observed in stomach were due to post-weaning age, being more alkaline on 0 post-weaning day, this has a logical explanation because the diet of piglets until weaning moment was only breast milk. That means, diet of the piglets can act as a buffer increasing gastric pH. This situation in combination with the immaturity of gastrointestinal tract of piglets, whom did not have a full capacity to produce HCl, probably was the reason why piglets at 0 post-weaning age exhibited higher values of pH (Bosi *et al.*, 2007).

**Table 5.** Effect of dietary components over mucin production (mg/g) in different intestinal portions.

	Post-weaning age				P	SE M	Treatments				P	SE M
	0	7	14	21			W	HPa	HP	LP		
D	1.0	1.0	1.3	1.0	NS	0.07	1.0	1.0	1.0	1.0	NS	0.07
J	2.3 <sup>c</sup>	11.0 <sup>b</sup>	14.3 <sup>a</sup>	12.3 <sup>b</sup>	***	0.9	2.3 <sup>c</sup>	11.0 <sub>b</sub>	14.6 <sub>a</sub>	12.3 <sub>b</sub>	***	0.9
I	2.6 <sup>c</sup>	12.0 <sup>b</sup>	16.0 <sup>a</sup>	13.6 <sup>b</sup>	***	0.8	2.6 <sup>c</sup>	13.0 <sub>b</sub>	16.0 <sub>a</sub>	13.0 <sub>b</sub>	***	0.9

D: duodenum; J: jejunum; I: ileum; W: weaning day; HPa: high protein diet with antibiotics; HP: high protein diet without antibiotics; LP: low protein diet without antibiotics. NS:  $P > 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ . Row with different letter were statistically different.

Once animals were growing, its gastrointestinal tract was maturing and the capacity of stomach to produce HCl was increasing, that is why a decrease in pH values was observed as piglets grow (Lallès *et al.*, 2007, Zentek *et al.*, 2013). In duodenum and jejunum there was not differences due to post-weaning age, this can be explained

thinking about buffer system of the gastrointestinal tract. Once gastric content reach duodenum, immediately was sent a signal through secretin, that signal goes to pancreas and this organ start with the secretion of bicarbonate, which is an important buffer and can neutralize the acid content that comes from stomach (Chey and Chang, 2014). In ileum was observed differences due to age again. In this case three factors may influenced the ileum digesta pH. The presence of protein partially digested due to immaturity of gastrointestinal tract of piglets, the existence of anaerobic bacteria which ferment that protein and quantity of oxygen present in ileal digesta. Anaerobic bacteria which ferment protein and amino acids producing BCFA and ammonia can caused a rise in ileum digesta pH, like was observed on 0 and 7 post-weaning day (Windey *et al.*, 2012; Bikker *et al.*, 2007). Post-weaning diet had no effect on gastrointestinal pH due to the efficiency of the buffer system of the gastrointestinal tract. This data indicates that post-weaning age is more important than post-weaning diets to alter gastrointestinal pH, at least in stomach and ileum.

### ***Villous morphology.***

In duodenum of all piglets used in this study (animals of all treatments), villous length never reached the size of those animals who did not consumed solid feed. This finding can be explained by low feed consume of animals during first days of weaning, because piglets did not adapted to a solid diet, lowering feed intake. This transient anorexia lasts three to five days, causing a decrease in energy and protein intake, necessaries to normal development of intestinal villi. Once piglets start to consume solid feed, recovery of intestinal villi begins (Lallès *et al.*, 2007). In jejunum and ileum animals fed with HPa diet, at 7 day, villous length reached and surpassed those observed in controls. Perhaps this animals who has a diet with high protein content and antibiotic suffered less stress because the antibiotic controls the challenge that means the change in nutritional components of diet, limiting pathogenic bacteria proliferation, and then inflammatory responses that lead to increase the protein requirements of animals (Koopmans *et al.*, 2012). Piglets fed with HP diets suffered more gastrointestinal stress due to the lack of antibiotic in diet,



because the remaining protein present in intestinal lumen was fermented by opportunistic bacteria generating toxic metabolites that causing atrophy and fusion of villi. The Lieberkühn crypts reacts increasing depth due to a rise in mitosis rate (Zhong *et al.*, 2011). That is why this pigs showed shorter villi and deepest crypts (Table 4). Villi of piglets fed with LP diet never reach the length observed in those fed with HPa diet or those of the control group, but maintained a constant growth and its values were intermediate. This pattern of growth exhibited by intestinal villi of animals fed with LP diet can be explained by the effect of short chain fatty acids (SCFA) produced by bacterial fermentation of carbohydrates (Hermes *et al.*, 2010). Williams *et al.* (2005); Lallés *et al.* (2007) and Kiarie *et al.* (2011) mentioned that intestinal microbial fermentation of carbohydrates produces SCFA, this metabolites contributes to the active regeneration of the intestinal epithelium, favoring proliferation, maturation and migration of enterocytes, whom reach the tip of villi with a full digestive capacity, improving gastrointestinal function, promoting a better digestion and absorption of nutrients, that implies a better availability of protein an energy to villous growth.

### ***Mucin secretion.***

Mucin secretion can be influenced by several factors including protein and amino acid balance, dietary fiber, use of probiotics and prebiotics and bacterial challenge (Deplancke and Gaskins, 2001; Montagne *et al.*, 2003; Duncker *et al.*, 2006; Law *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Iñiguez *et al.*, 2011). Threonine is an essential amino acid for mucin synthesis in order to maintain an adequate gut barrier function (Puiman *et al.*, 2011). All diets were balanced to reach the piglets requirements, that implies threonine was offered in correct quantity to ensure an adequate mucin secretion, even in LP diet (Table 2). That is why, changes of quantity of dietary protein did not affect mucin production.

**Table 2.** Threonine composition of experimental diets

Diet	Threonine content of diets (AIDb)*
HPa	0.84
HP	0.83
LP	0.66

HPa: high protein diet with antibiotics; HP: high protein diet without antibiotics; LP: low protein diet without antibiotics. \*: calculated data in apparent ileal digestibility basis (AIDb).

Mucin secretion by Goblet cells can be influenced by the quantity of dietary fiber, (Montagne *et al.*, 2003; Lallès *et al.*, 2004; Hedemann *et al.*, 2005; Serena *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2013). In this study LP diet had 2% more NDF than diets with high protein content (HPa and HP diets) due to a greater inclusion of maize. This could influence the mucin secretion in animal fed with LP diet. Nevertheless, animals fed with HPa and LP diets had similar mucin secretion during this experiment, that is why fiber concentration on diets did not influenced mucin secretion.

By the other hand; probiotics, prebiotic and symbiotics can affect mucin secretion by stimulation of goblet cells to produce sialylated mucins, sialic acid can be fermented by certain bacteria to produce energy, that energy can be used to allow bacterial proliferation (Duerkop *et al.*, 2009). In this study we did not measure sialylated mucin, but an increase of this kind of mucin would be reflected on total amount of secreted mucins, moreover in this study no probiotics was used.

Bacterial challenge can change the quantity of mucin secretion; the thickness of mucous layer is determined by the amount and kind of bacteria present in intestinal lumen as a defense mechanism against microbial proliferation (Hedemann *et al.*, 2005; Lallès *et al.*, 2007). This situation was corroborated with the present study. Piglets that not consumed solid diets (control) had the lowest mucin secretion, because its diet (breast milk) did not caused any stress. When piglets consumed HPa diet, its mucin secretion was increased but it is maintained in low values maybe as a result of action mechanism of antibiotic, which limit the growth of pathogenic bacteria. In piglets fed with HP diet, the absence of antibiotic increase the risk of bacterial proliferation, which triggers a higher secretion of mucin to increase the

thickness of mucous layer as a response to that challenge. In piglets fed with LP diet, probably the increase of carbohydrates on diet composition contributes to the development of a “healthy” microbial profile, which creates hostile environmental conditions, which inhibits the growth of pathogenic bacteria (Williams *et al.*, 2005; Duerkop *et al.*, 2009). As consequence, piglets fed with LP diets had similar mucin secretion as animals fed with HPa diet.

## **CONCLUSION**

Gastrointestinal pH was not affected by dietary components, but post-weaning age was determinant for pH of stomach and ileum. The quantity of protein and the presence of antibiotic in diet can change gastrointestinal morpho-physiology as a response to the changes of intestinal environment based on differences in the development of intestinal microbiota after weaning, which is influenced by substrate in intestinal lumen.

## **References**

Abad R., Ibáñez M.A., Carabaño R., García J. 2013. Quantification of soluble fiber in feedstuffs for rabbits and evaluation of the interference between the determinations of soluble fiber and intestinal mucin. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 182:61-70.

AOAC, 2002: *Official Methods of Analysis*, 17th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

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.

Blachier F., Mariotti F., Huneau J.F., Tomé D. 2007. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids.* 33: 547–562.

Bosi P., Casani L., Finamore A., Cremokolini C., Meriardi G., Trevisi P., Nobili F., Mengheri E. 2004. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J. Anim. Sci.* 82: 1764-1772.

Chey W.Y., Chang T.M. 2014. Secretin: Historical perspective and current status. *Pancreas.* 43: 162-182.

CIOMS, 1985: International guiding principles for biomedical research involving animals. The development of science-based guidelines for laboratory animal care—NCBI Bookshelf.

[http://cioms.ch/publications/guidelines/1985\\_texts\\_of\\_guidelines.htm](http://cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm).

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

Duerkop B.A., Vaishnav S., Hooper L.V. 2009. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosa surface. *Cell.* 31: 368-376.

Duncker S.C., Lorentz A., Schroeder B., Breves G., Bischoff S.C. 2006. Effect of orally administered probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 on intestinal mucosal immune cells of healthy young pigs. *Vet. Imm. Imm.* 111: 239-250.

Faure M., Moënoz D., Montigon F., Fay L.B., Breuillé D., Finot P.A., Bellèvre O., Boza J. 2002. Development of a rapid and convenient method to purify mucins and determine their in vivo synthesis rate in rats. *Anal. Biochem.* 307: 244-251.

Hedemann M.S., Mikkelsen L.L., Naughton P.J., Jensen B.B. 2005. Effect of feed particle size and feed processing on morphological characteristics in the small and

large intestine of pigs and on adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT12 in the ileum in vitro. J. Anim. Sci. 83: 1554-1562.

Hermes, R.G., Molist, F., Ywazaki, M., Nofrarías, 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. J. Anim. Sci. 87:3569–3577.

Iñiguez P.C., Jiménez F.R., Vázquez M.L., Ramos C.M., Acedo F.E. 2011. Protein-carbohydrate interactions between *Lactobacillus salivarius* and pig mucins. J. Anim. Sci. 89: 3125-3131.

Kiarie E., Bhandari S., Scott M., Krause D.O., Nyachoti C.M. 2011. Growth performance and gastrointestinal microbial ecology responses of piglets receiving *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products after an oral challenge with *Escherichia coli* (K88). J. Anim. Sci. 89: 1062-1078.

Koopmans S.J., van der Staay F.J., Le Floc'h N., Dekker R., van Diepen J.th.M., Jansman J.M. 2012. Effects of surplus dietary L-tryptophan on stress, immunology behavior, and nitrogen retention in endotoxemic pigs. J. Anim. Sci. 90: 241-251.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Lallès J.P., Boudry G., Favier C., Le Floc'h N., Luron I., Montagne L., Oswald I.P., Pié S., Piel C., Sève B. 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. Anim. Res. 53: 301-316.

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

Law G.K., Bertolo R.F., Adjiri-Awere A., Pencharz P.B., Ball R.O. 2007. Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292: 1293-1301.

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. Tech.* 108: 95-117.

National Research Council (NRC), 1998: *Nutrient Requirements of Swine*, 11th edn. National Academy Press, Washington DC, USA.

Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999., 2001: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación*, México, D.F.

Puiman P., Jensen M., Stoll B., Renes I., de Bruijn A., Dorst K., Schierbeek H., Schmidt M., Boehm G., Burrin D., Sangild P., van Goudoever J. 2011. Intestinal threonine utilization for protein and mucin synthesis is decreased in formula-fed preterm pigs. *J. Nutr.* 141: 1306-1311.

SAS, 2008: *Statistical Analysis System, User's Guide, SAS/ETS 9.2*. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.

Serena A., Hedemann M.S., Bach Knudsen K.E. 2008. Influence of dietary fiber on luminal environment and morphology in the small and large intestine of sows. *J. Anim. Sci.* 86: 2217-2227.

Van Soest P.J., Roberts J., Lewis B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583–3594.

Wang W.W., Qiao S.Y., Li D.F. 2009. Amino acids and gut function. *Amino acids*. 37: 105-110.

Wang X., Qiao S., Yin Y., Yue L., Wang Z., Wu G. 2007. A deficiency or excess of dietary threonine reduces protein synthesis in jejunum and skeletal muscle of young pigs. *J. Nutr.* 137: 1442-1446.

Wellock I.J., Houdijk J.G.M., Kyriazakis I. 2007. Effect of dietary non-starch polysaccharide solubility and inclusion level on gut health and the risk of post weaning enteric disorders in newly weaned piglets. *Livest. Sci.* 108: 186-189.

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.

Windey K., De Preter V., Verbeke K. 2012. Relevance of protein fermentation to gut health. *Mol. Nutr. Food Res.* 56: 184-196.

Zentek J., Ferrara F., Pieper R., Tedin L., Meyer W., Vahjen W. 2013. Effects of dietary combinations of organic acids and medium chain fatty acids on the gastrointestinal microbial ecology and bacterial metabolites in the digestive tract of weaning piglets. *J. Anim. Sci.* 91: 3200-3210.

Zhong X., Zhang X.H., Li X.M., Zhou Y. M., Li W., Huang X. X., Zhang L. L., Wang T. 2011. Intestinal growth and morphology is associated with the increase in heat shock protein 70 expression in weaning piglets through supplementation with glutamine. *J. Anim. Sci.* 89: 3634-3642.

## 9. CONCLUSIONES GENERALES

1. El uso de dietas bajas en proteína modula la fermentación bacteriana, debido a que la presencia de una mayor cantidad de carbohidratos a nivel intestinal produce un patrón de fermentación benéfico, a través de un incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico, el cual se ve reflejado en una disminución en la severidad de las diarreas, observándose valores similares a los de los animales que consumieron las dietas con antibiótico.
2. La inclusión de altas cantidades de proteína en la dieta con ausencia de antibióticos, permite la fermentación de la proteína presente en la luz intestinal, con lo cual se genera un perfil fermentativo dañino para el medio ambiente intestinal, a través de la producción de ácidos grasos de cadena ramificada y amonio, lo cual causa un incremento en la incidencia y la severidad de las diarreas posdestete.
3. La inclusión de probióticos en las dietas bajas en proteína produjo un incremento importante en la producción de ácidos grasos de cadena corta, principalmente ácido acético, lo cual indica que el probióticos tiene una función especial en cuanto a la fermentación de carbohidratos, esto tuvo un impacto similar a las dietas bajas en proteína en cuanto a la severidad de la diarrea, pero en la incidencia, la presencia de probióticos disminuyó el número de días con diarrea similares a los observados en los animales que consumieron antibióticos con sus dietas. Sin embargo este es un punto que se debe de investigar con mayor interés, debido a que no hay datos que indique cual es el efecto de una mayor producción de ácidos grasos volátiles sobre el metabolismo de las células del epitelio intestinal.
4. El comportamiento productivo de los animales que consumieron la dieta baja en proteína no se vio afectado, mientras que cuando se adicionó probióticos en la dieta se observaron diferencias estadísticas que favorecieron a los



animales que consumieron dicha dieta, equiparándolos con los animales que consumieron antibiótico en la dieta.

5. La secreción de mucinas también se vio influenciada por la cantidad de por la cantidad de proteína en la dieta, haciendo que los animales que consumieron la dieta baja en proteína tuvieran una secreción similar a los animales que consumieron antibióticos en la dieta.
6. La morfología de las vellosidades intestinales se vio influenciada por la cantidad de proteína y la presencia de antibiótico de la en la dieta, ya que los lechones que consumieron la dietas altas en proteína con antibiótico, la baja en proteína y la baja en proteína con probióticos, presentaron una recuperación más rápida en la altura de sus vellosidades intestinales, lo cual probablemente disminuyó la incidencia y la severidad de las diarreas posdestete.
7. Por último con los datos obtenidos en este estudio se puede concluir que los componentes dietéticos pueden ser manipulados con el objetivo de modular la ecofisiología gastrointestinal propendiendo por un establecimiento de un medio intestinal saludable que favorezca a los lechones durante la etapa posdestete, maximizando su bienestar y productividad.