UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto del reemplazo de antibióticos promotores de crecimiento por una butirina esterificada en dietas de preiniciación en el rendimiento productivo y algunos parámetros de salud intestinal de lechones destetados a 21 días

Johana Katerine González Castiblanco

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Bogotá, Colombia
2023

Efecto del reemplazo de antibióticos promotores de crecimiento por una butirina esterificada en dietas de preiniciación en el rendimiento productivo y algunos parámetros de salud intestinal de lechones destetados a 21 días

Johana Katerine González Castiblanco

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Producción Animal

Directora:

DMV., MSc., PhD Gloria Amparo Casas Bedoya

Codirector (a):

DMV., MSc., PhD José Darío Mogollón Galvis

Línea de Investigación:

Nutrición Animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Bogotá, Colombia

2023

A mi familia

Agradecimientos

Inicialmente quiero agradecerle a la Dra. Gloria Amparo Casas Bedoya directora de este proyecto por darme la oportunidad de realizar esta investigación, por su incondicional apoyo, paciencia, consejos y por todo su aporte para mi desarrollo profesional y personal. Muchas gracias por la confianza de estos años y sembrar en mí una pasión por la nutrición de cerdos y la investigación, ha sido un honor aprender de una gran profesora.

Al Dr. José Darío Mogollón por su disposición, apoyo y contribución al desarrollo de la investigación. Al Unidad Porcina de Centro Agropecuario Marengo, por permitirme el uso de las instalaciones, por su apoyo y colaboración para el desarrollo de las actividades y por todas las actividades en las que logre aprender más de cerdos. Al laboratorio de Nutrición Animal su apoyo en la evaluación de las dietas. Al profesor Álvaro Wills por su aporte en la asesoría de la formulación de las dietas y al profesor Carlos Martínez por su apoyo en el análisis estadístico. Al Centro de Investigación de Inmunología e Infectología Veterinaria (CI_3V), por su apoyo en el análisis de muestras y su aporte en mi formación científica.

También a mis padres, por su amor y apoyo en momentos desesperantes, a mis hermanas y mis perros Negro y Milo, por acompañarme en las noches largas. A mis amigas Natalia, Carolina y Laura por sus consejos y por siempre creer en mí. Un especial agradecimiento a Angela por todos estos años de paciencia y constancia, gracias por estar ahí.

Resumen

Efecto del reemplazo de antibióticos promotores de crecimiento por una butirina esterificada en dietas de preiniciación en el rendimiento productivo y algunos parámetros de salud intestinal de lechones destetados a 21 días

Los antibióticos promotores de crecimiento (APC) han sido usados por años para mejorar los parámetros productivos y la salud intestinal en los animales, sin embargo, su uso desmedido ha contribuido al aumento de la resistencia antimicrobiana tanto en animales como en humanos, siendo un problema relevante de salud pública. En consecuencia, se ha impulsado tendencia de buscar nuevas alternativas como las tributirinas o butirinas esterificadas que alcanzan a tener un mayor efecto en la parte distal del intestino, mejorando los parámetros productivos y la salud intestinal de lechones destetos. El objetivo del proyecto fue evaluar el efecto de la inclusión de una butirina esterificada como alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento en lechones destetos, en algunos parámetros productivos y de salud intestinal. En este estudio se seleccionaron 96 lechones de 21 días de edad y fueron asignados a tres tratamientos: un control negativo (CN) sin APC, ácidos orgánicos u óxido de zinc, un control positivo (CP), en el que se incluyó un antibiótico promotor de crecimiento (avilamicina 0,3kg/Ton) y el tratamiento de evaluación que consistió en adicionar una butirina esterificada (2kg/Ton) (CN+B), al control negativo. Los lechones fueron alimentados por 14 días. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en los parámetros productivos. Sin embargo, el score de consistencia de las heces en los lechones tratados con butirinas esterificadas fue menor que en CP o el CN ($p<0.05$). El uso de butirinas esterificadas incrementó ($p<0.05$) la altura de la vellosidad en yeyuno e íleon, así como la relación altura de la vellosidad: profundidad de la cripta en íleon. Así mismo, la expresión de TNF-α en yeyuno fue mayor, mientras que la expresión de IL-6 disminuyó en íleon ($p<0.05$) en lechones alimentados con dietas suplementadas con butirinas. Se concluyó que las

butirinas esterificadas pueden mejorar la función intestinal por su efecto en la morfología intestinal y la consistencia fecal.

Palabras clave: Antibióticos promotores de crecimiento, butirinas, biomarcadores, citoquinas, *Escherichia coli*, vellosidad, lechones destetos.

Abstract

Effect of replacing antibiotic growth promoters with tributyrin in pre-starter diets on growth performance and some intestinal health parameters of weaned piglets

Antibiotic growth promoters have been used for years to improve growth performance and gut health, however, their excessive use has contributed to the increase in antimicrobial resistance in animals and humans, being a problem relevant to health. Consequently, there has been a tendency to look for new alternatives such as tributyrin or esterified butyrin that have a greater effect on the distal part of the intestine, improving the growth performance and gut health of weaned piglets. The objective of the project was to evaluate the effect of the inclusion of esterified butyrate as an alternative to antibiotic growth promoters in weaned piglets on some growth performance and gut health parameters. In this study, 96 piglets of 21 days of age were selected and allowed three treatments: a negative control (NC) without APC, organic acid, or zinc oxide, a positive control (PC), in which an antibiotic growth promoter was included (avilamycin 0.3kg/Ton), and the evaluation treatment which consisted of adding an esterified butyrate (2kg/Ton) (NC+B), to the negative control. The piglets were fed for 14 days. No statistically significant differences were observed between treatments in growth performance. However, the fecal consistency score in piglets treated with esterified butyrates was lower than in PC or NC ($p<0.05$). The use of esterified butyrines increased ($p<0.05$) the height of the villus in the jejunum and ileum, as well as the ratio of villus height: to crypt depth of the ileum. Likewise, the expression of TNF-α in the jejunum was higher, while the expression of IL-6 decreased in the ileum. Overall, esterified butyrates can improve intestinal function due to their effect on intestinal morphology and fecal consistency.

Keywords: Growth promoting antibiotics, tributyrin, biomarkers, weaned pigs, cytokines, *Escherichia coli*, villus.

Contenido

Pág.

Agradecimientos ..... **VI**

Resumen ..... **VII**

Abstract ..... **IX**

Lista de tablas ..... **XII**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de Símbolos y abreviaturas **14**

Introducción **15**

Objetivos **17**

Capítulo 1: Alternativas al uso de antibióticos promotores de crecimiento en lechones destetos: Revisión sistemática de literatura **18**

Introducción 18
1.1 Materiales y Métodos 19
1.1.1 Criterios de elegibilidad 19
1.1.2 Fuente de información y estrategia de búsqueda 20
1.1.3 Procesos de recolección de datos y elementos de datos 20
1.2 Resultados y discusión 21
1.2.1 Evaluación de la salud intestinal en lechones destetos 22
1.3 Aditivos mejoradores de la salud intestinal en el post destete 39
1.3.1 Antibióticos como promotores de crecimiento y su influenza en parámetros productivos y de salud intestinal de lechones 40
1.3.2 Alternativas al uso de antibióticos promotores de crecimiento 43
1.4 Conclusiones 49
1.5 Bibliografía 51

Capítulo 2: Efecto de la inclusión de una butirina esterificada en reemplazo de un antibiótico promotor de crecimiento (APC) en el rendimiento productivo y en algunos parámetros de salud intestinal en lechones destetados a los 21 días **67**

Introducción 67
2.1. Materiales y Métodos 68
2.1.2. Análisis químico de las dietas 71
2.1.3. Score fecal 72
2.1.4. Morfología intestinal 72

2.1.5. pH intestinal 73
2.1.6. Citoquinas pro y antinflamatorias proe 73
2.1.7. Recuento de *Escherichia coli* y coliformes 76
2.1.8. Detección de factores de virulencia para *Escherichia coli* enterotoxigénica ETEC con PCR Multiplex 77
2.1.9. Análisis estadístico 78
2.2. Resultados 81
2.3. Discusión 89
2.4. Conclusiones 96
2.5. Conclusiones generales 96
2.6 Bibliografía 97

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1. Cambios morfológicos en el intestino delgado después del destete 30
Tabla 1-2. Altura de la vellosidad en yeyuno, µm 31
Tabla 1-3. Profundidad de la cripta en yeyuno, µm 32
Tabla 1-4. Relación altura de la vellosidad: profundidad de la cripta en yeyuno (V:C).... 32
Tabla 1-5. Altura de la vellosidad en íleon, µm..... 33
Tabla 1-6. Profundidad de la vellosidad en íleon, µm 33
Tabla 1-7. Relación altura de la vellosidad: profundidad de la cripta en íleon, µm 34
T**abla 1-8**. Expresión génica de citoquinas pre y antinflamatorias, y proteínas de unión en yeyuno de lechones al destete 35
Tabla 1-9. Familias y géneros de bacterias que se encuentran en diferentes segmentos intestinales de lechones sanos al destete. 37
Tabla 1-10. Patotipos, adhesinas y toxinas asociadas a algunos patotipos de *Escherichia coli* 38
Tabla 1-11. Efectos de inclusión de antibióticos en dietas de lechones al destete 41
Tabla 2-1. Composición nutricional de la dieta la dieta fase 1 (1-14 días, pos-destete)[1]. 70
Tabla 2-2. Reactivos empleados en la RT-PCR para la obtención de DNAc de muestras de mucosa..... 74
Tabla 2-3. Secuencias de los primers utilizados en muestras de mucosa. 75
Tabla 2-4. Reactivos empleados en la qPCR para la cuantificación de genes porcinos . 76
Tabla 2-5. Tamaño del amplicón de 5 genes que codifican para fimbrias..... 78
Tabla 2-6. Rendimiento productivo, score fecal y frecuencia de diarrea de lechones destetos a 21 d, alimentados con dietas con APC o butirinas esterificadas 82
Tabla 2-7. Variables morfométricas en yeyuno e íleon en lechones destetados a 21 días, alimentados con dietas con APC o butirinas esterificadas[1] 83

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1. Diagrama de flujo de PRISMA (Elementos de informes preferidos para los protocolos de revisión sistemática y metaanálisis). 21
Figura 1-2. Morfología de la pared intestinal. 27
Figura 2-1. Detección de factores de virulencia en *Escherichia coli* enterotoxigénica ETEC Recuento de UFC de coliformes a los 0, 7 o 14d pos-destete en lechones alimentados con dietas con APC (CP), dieta control negativo (CN) o dieta con butirinas esterificadas (CN+TB)..... 85
Figura 2-2. Recuento de UFC de *Escherichia coli* a los 0, 7 o 14 días pos-destete en lechones alimentados con dietas que contiene APC (CP), dieta control negativo (CN) y dieta con butirinas esterificadas (CN+TB) 85
Figura 2-3. Detección de factores de virulencia en *Escherichia coli* enterotoxigénica ETEC 86
Figura 2-4. Niveles de expresión génica de TNF-α, IL-1β, IL6 e IL-10, CLA y ZO en el yeyuno de lechones destetados a 21 días, alimentados con dietas con APC (CP), dietas control negativo (CN) o butirinas esterificadas (CN+B). 87
Figura 2-5. Niveles de expresión génica de TNF-α, IL-1β, IL6 e IL-10, CLA y ZO en el yeyuno de lechones destetados a 21 días, alimentados con dietas con APC (CP), dietas control negativo (CN) o butirinas esterificadas (CN+B). 87

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AGGC	Ácidos Grasos de Cadena Corta
AGCM	Ácidos Grasos de Cadena Media
APC	Antibiótico promotor de crecimiento
ATP	Adenosín Trifosfato
cAMP	Adenosín Monofosfato Cíclico
cGMP	Monofosfato de Guanosina Cíclico
Ct	Threshold value
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DFM	Direct Feed Microbial
DPD	Diarrea Pos-destete
GPRC	G Protein-coupled Receptor
EPEC	Enteropatogénica
ETEC	Enterotoxigénica
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IL	Interleuquinas
INF	Interferon
MCT1	Monocarboxylate transporter 1
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTU	Operational Taxonomic Unit
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PIC	Pig Improvement Company
PICO	Population, Intervention, Comparison, Outcome
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
PRRs	Pattern Recognition Receptor
RAM	Resistencia Antimicrobiana
TEER	Transepithelial/Transendothelial Electrical Resistance
TGI	Tracto gastrointestinal
TLRs	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
UFC	Unidad Formadora de Colonias

Introducción

El uso inadecuado de antibióticos en animales de producción se ha descrito como una de las principales causas de resistencia a antimicrobianos. Actualmente se reconoce que el consumo de antibióticos para animales es casi dos veces la cantidad de antibióticos usados en humanos (Aarestrup, 2012). Los antibióticos han sido usados para el tratamiento de diferentes enfermedades en animales de producción y en mascotas, sin embargo, desde los años 40s algunos antibióticos han sido incluidos en la dieta de animales de producción en concentraciones sub-terapéuticas, con el objetivo de mejorar el rendimiento productivo, estos son conocidos como antibióticos promotores de crecimiento.

En los sistemas de producción porcina de tipo intensivo la inclusión de antibióticos promotores de crecimiento en dietas pos-destete ha sido una de las opciones más usadas para el control de bacterias patógenas, como *Escherichia coli,* causantes de respuestas inflamatorias severas y disbiosis del microbioma que afectan la productividad de los lechones en la etapa de precebo (Fairbrother et al., 2005; Luppi, 2017). No obstante, la evidente tendencia mundial orientada a la reducción y/o prohibición del uso de antibióticos promotores de crecimiento en producción animal, ha obligado a los productores a desarrollar diferentes estrategias para mantener los estándares de productividad que se alcanzan con este tipo de sustancias y así minimizar el riesgo de generar resistencia antimicrobiana (Maron et al., 2013).

En la actualidad existe una gran oferta de principios activos que se presentan como alternativas al uso de antibióticos promotores de crecimiento y que declaran tener efectos en la salud intestinal de los lechones (Grand View Research, 2022). En este sentido, la evaluación de estas estrategias involucra, además de las tradicionales medidas zootécnicas, la comprensión de otros aspectos tales como la integridad de la barrera intestinal, el microbioma y la respuesta inmune, entre otros.

Por consiguiente, este proyecto tuvo como objetivo principal evaluar el efecto de reemplazar los antibióticos promotores de crecimiento en dietas de preiniciación para

lechones, por un producto que contiene butirinas esterificadas en el rendimiento productivo y la salud intestinal de lechones. La importancia de este proyecto radica en la posibilidad de generar evidencia científica de la efectividad de la inclusión productos diferentes a los antibióticos promotores de crecimiento en dietas de lechones, para mantener los parámetros productivos y la salud intestinal, bajo condiciones locales de producción, así como generar una alternativa para reducir el uso de estos productos que ponen en riesgo la bioseguridad de las explotaciones porcinas, la inocuidad de la carne y la salud pública a nivel nacional.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del reemplazo de antibióticos promotores de crecimiento por una butirina esterificada en dietas de preiniciación en el rendimiento productivo y algunos parámetros de salud intestinal de lechones destetados a 21 días.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la inclusión de butirinas esterificadas como sustitutos de antibióticos promotores de crecimiento, en una dieta de preiniciación en el rendimiento productivo de lechones destetados a 21 días de edad.
- Establecer el efecto de la inclusión de butirinas esterificadas como sustituto de antibióticos promotores de crecimiento, en una dieta de preiniciación sobre la morfología de las vellosidades intestinales y las concentraciones de TNF- α, IL-6, IL0, IL1β, claudina y zónula occludens en la mucosa intestinal de lechones destetados a los 21 días de edad.
- Determinar el efecto de inclusión de butirinas esterificadas como sustituto de antibióticos promotores de crecimiento en una dieta de preiniciación, sobre la excreción de *Escherichia coli*, al destete y a los días 7 y 14 pos-destete.

Capítulo 1: Alternativas al uso de antibióticos promotores de crecimiento en lechones destetos: Revisión sistemática de literatura

Introducción

En un ambiente natural los lechones se destetan alrededor de las 12 semanas de vida, en este punto el epitelio intestinal, el sistema inmune y el sistema nervioso entérico alcanzan un desarrollo y funcionalidad que le permiten al lechón superar la transición del destete sin mayor estrés (Moeser et al., 2017). En contraste, en la producción intensiva el destete es el evento más crítico en la vida del cerdo puesto que se realiza entre la tercera y la cuarta semana de vida, momento en el que la función intestinal e inmune no están suficientemente desarrolladas y además compromete una serie de cambios sociales, ambientales y dietarios que generan un alto estrés en el lechón y lo predispone a infecciones causadas por bacterias entéricas como *Salmonella spp* o *Escherichia coli* (Cera et al., 1988; Main et al., 2005; Pluske et al., 2003).

El estrés alimenticio asociado al cambio de una dieta altamente digestible, basada en la leche de la cerda, con un alto contenido de lactosa a un alimento sólido con un alto contenido de carbohidratos, proteínas y grasas complejas; sumado al estado de inmadurez fisiológicas del lechón suponen un gran desafío que resulta en rápidos cambios en la morfología del intestino delgado, en la actividad enzimática, en el microbiota y en el sistema inmune. Estos cambios, deben ser manejados correctamente y monitoreados para evitar retrasos en el crecimiento e infecciones que finalmente se evidencian en la reducción de productividad de los lechones (Cera et al., 1988; Main et al., 2005; Pluske et al., 2003).

Se han propuesto diferentes estrategias para reducir los efectos negativos del destete y mantener la salud intestinal del lechón en esta etapa. Los antibióticos promotores de crecimiento (APC) se han consolidado como la alternativa más utilizada por la industria para mantener los índices productivos; sin embargo, problemas como la resistencia

antimicrobiana (RAM), han conducido al desarrollo de diferentes estrategias para mitigar el efecto negativo del destete para mantener los índices productivos. Es así, como hoy las dietas de transición y de fase 1 para lechones, obligatoriamente incluyen diferentes aditivos cuyos principios activos pueden ser entre otros; ácidos orgánicos, probióticos, prebióticos, aceites esenciales, fitobióticos, etc. Así mismo, diferentes tecnologías tales como asociaciones de diferentes moléculas (mezclas de ácidos orgánicos), recubrimientos de moléculas, vehículos e inclusión de excipientes, entre otras, son aplicadas a la producción de estos aditivos, con el objeto de potencializar sus efectos a lo largo del tracto gastrointestinal, buscando una mejor expresión de los indicadores de salud intestinal.

En consecuencia, surge la necesidad de estudiar y evaluar objetivamente el efecto de las diferentes estrategias y alternativas utilizadas para disminuir el impacto del destete, utilizando como criterio principal el rendimiento productivo y la funcionalidad del tracto gastrointestinal. Esta revisión sistemática se enfoca en describir los criterios comúnmente utilizados para evaluar la salud intestinal en lechones, así como los efectos de las estrategias de intervención para la mejora de la salud intestinal de lechones al momento del destete, con énfasis en aquellas que involucren la sustitución de APC.

1.1 Materiales y Métodos

El presente estudio siguió el protocolo recomendado por la declaración PRISMA 2020 (Page et al., 2021)

1.1.1 Criterios de elegibilidad

Se incluyeron únicamente artículos originales de revistas indexadas, en idioma inglés o español, con información bibliográfica completa (título, autor y año de publicación), publicados entre el primero de enero del 2000 hasta el 20 de noviembre de 2021 y que hacían referencia a lechones destetos. Se excluyeron artículos que se referían a especies diferentes a la porcina o cuyo objeto de estudio implicaba una etapa productiva diferente a la de precebo.

1.1.2 Fuente de información y estrategia de búsqueda

La información fue recopilada de las bases de datos Google Scholar, Science Direct, Web of science, Pubmed y Scopus. El algoritmo de búsqueda fue: gut health AND antibiotic AND alternative AND post weaned AND pig or piglet, el cual fue diseñado a partir de la estrategia PICO (O'Connor et al., 2014). La pregunta de investigación utilizada fue: ¿Cuál es el efecto de las alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento en la salud intestinal de lechones destetos?

Las referencias duplicadas fueron eliminadas y los artículos fueron seleccionados basados en que los algoritmos de búsqueda estuvieran incluidos en el título, así como en el contenido de los resúmenes. Los artículos que a criterio del investigador se consideraron relevantes fueron recuperados en su totalidad.

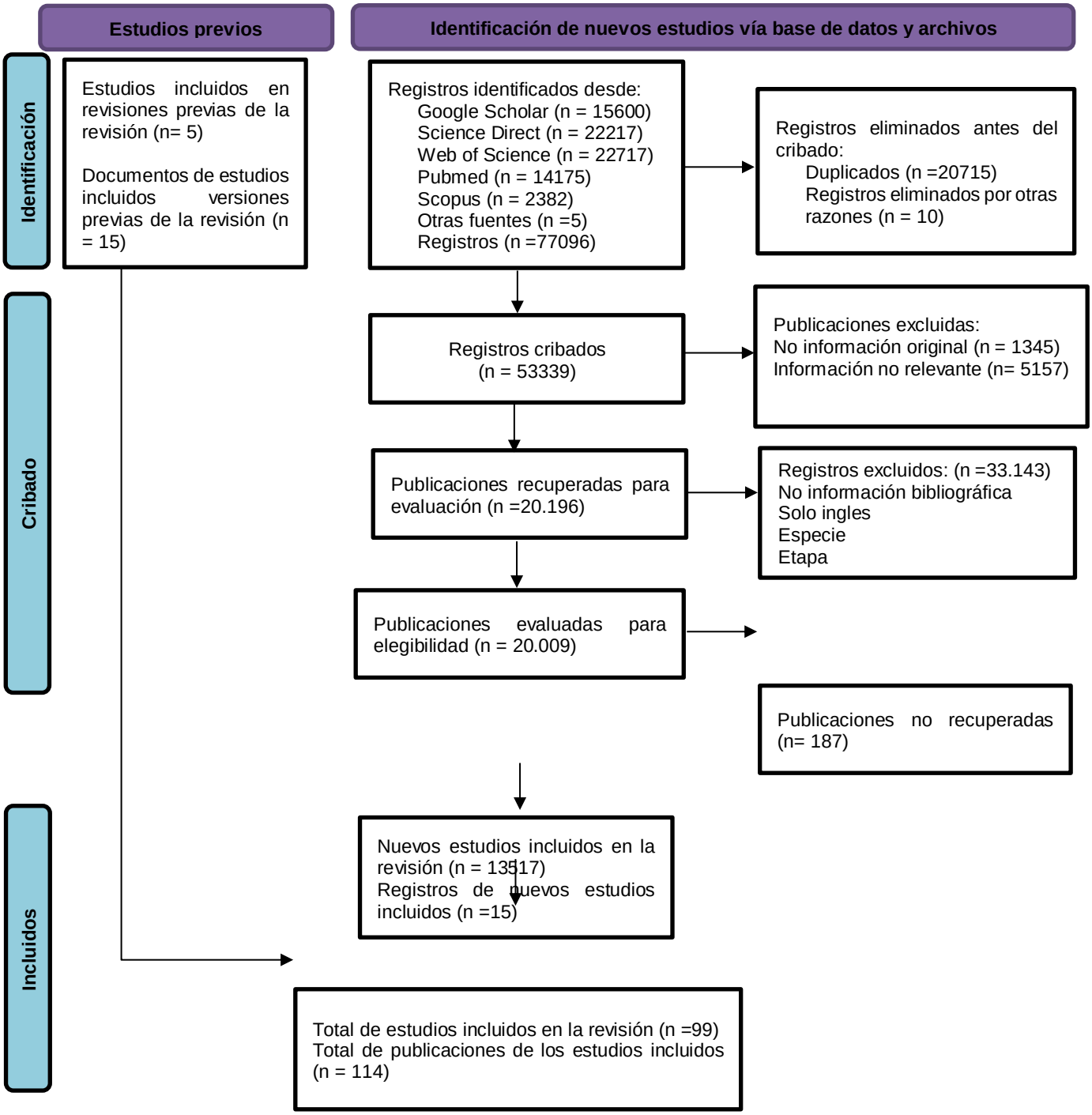
1.1.3 Procesos de recolección de datos y elementos de datos

La información clave de los artículos se recolectó en un archivo de Excel que incluyó los siguientes datos: autor, año de publicación, país, palabras claves, e información relacionada con la salud intestinal, tales como morfología intestinal, citoquinas pre y proinflamatorias y biomarcadores, antibióticos promotores de crecimiento y sus alternativas usadas en los lechones destetos. La información recolectada correspondió a información cualitativa y cuantitativa. Los documentos seleccionados fueron revisados nuevamente por otro investigador para disminuir los sesgos de recolección de datos.

1.2 Resultados y discusión

Se seleccionaron 114 artículos que cumplieron los criterios descritos para documentar la revisión sistemática (Figura 1-1).

Figura 0-1. Diagrama de flujo de PRISMA (Elementos de informes preferidos para los protocolos de revisión sistemática y metaanálisis).



Fuente: Adaptado de Prisma, 2022

1.2.1 Evaluación de la salud intestinal en lechones destetos

Estructura y función de la barrera intestinal

El sistema digestivo es un conjunto de órganos encargado de transformar y absorber los nutrientes contenidos en el alimento consumido y de excretar residuos. La boca, esófago, estómago, intestino y glándulas anexas hacen parte de este sistema. La boca es la encargada de romper de forma mecánica el alimento entero, para luego ser transportado por medio del esófago al estómago donde se secretan sustancias químicas que dan inicio a la digestión del alimento (Ewing, 2008).

El intestino es un órgano muy dinámico ya que desde el nacimiento requiere más adaptaciones que cualquier otro órgano. La transición de una alimentación fetal parenteral a una alimentación enteral, que inicia con el consumo de calostro permite un aumento del peso, la longitud y el diámetro del intestino, así como un rápido recambio celular en la mucosa, que favorece el funcionamiento que se expresa en una alta capacidad de absorción de nutrientes (Pluske, 2016). En etapas más avanzadas de la vida del lechón la tasa de renovación de la mucosa puede ser de hasta de un 100% en 2 o 3 días (Verdile et al., 2019).

Anatómicamente el intestino se divide en intestino delgado e intestino grueso. La función del intestino delgado se asocia a la digestión y absorción de carbohidratos, proteínas y lípidos, mientras que en el intestino grueso se lleva a cabo la fermentación de fracciones de fibra y la absorción de ácidos grasos volátiles, agua, vitaminas y algunos electrolitos (Ewing, 2008; Lærke & Hedemann, 2012).

En el intestino delgado se pueden identificar tres segmentos con diferencias estructurales y funcionales: el duodeno el cual se caracteriza por la presencia de las glándulas de Bruner en la submucosa y de las criptas de Lieberkühn en la lámina propia, además se observan algunos nódulos linfáticos aislados que se asocian al GALT (Tejido linfoide asociado al intestino). Por otra parte, en el yeyuno, las vellosidades son más largas y finas, no se encuentran estructuras glandulares, pero aumenta el número de células linfoides y de

células caliciformes mientras que en el íleon las vellosidades son más cortas y es característica la presencia de las placas de Peyer, que son agregados de nódulos linfáticos que incluso protruyen en la superficie de la mucosa intestinal (Lærke & Hedemann, 2012).

La pared intestinal se encuentra conformada por 4 capas: la serosa que es la capa más externa constituida por tejido conectivo el cual se encarga de producir un lubricante que favorece los movimientos peristálticos y reduce la fricción con los otros órganos. La capa muscular, formada por dos capas de células musculares lisas, una longitudinal y la otra circular, que permiten la motilidad y la digestión mecánica (Eurell, 2004; Modina et al., 2021; Yoo & Mazmanian, 2017). La submucosa está compuesta por tejido conectivo y contiene el plexo nervioso submucoso, los nódulos linfáticos y los vasos sanguíneos. Las glándulas de Brunner del duodeno se ubican en esta capa y se encargan de producir y secretar bicarbonato para amortiguar el pH ácido proveniente del estómago (Eurell, 2004; Modina et al., 2021).

La capa más interna es la mucosa en la que se pueden diferenciar tres subcapas: la más externa es la muscular de la mucosa formada por musculo liso, con una capa longitudinal y otra que rodea el intestino, esta capa muscular forma los pliegues intestinales transitorios que permiten una mayor exposición de las células de absorción (Lærke & Hedemann, 2012; Yoo & Mazmanian, 2017). La segunda capa es la lámina propia constituida por tejido conectivo e incluye los vasos sanguíneos, linfocitos y neuronas (Modina et al., 2021; Pluske et al., 2018). La tercera capa es el epitelio la cual presenta unas elongaciones que se proyectan hacia el lumen conocidas como vellosidades y unas invaginaciones llamadas criptas en donde se encuentran las células madre encargadas de originar otros tipos de células. Estas vellosidades disminuyen de tamaño a lo largo del intestino, de tal forma que en el íleon son muy cortas y en segmentos como ciego, recto y colón no se observan (Lærke & Hedemann, 2012).

Los enterocitos son las células más abundantes en el epitelio intestinal, cubren toda la superficie de la mucosa y son responsables de la absorción de nutrientes y agua. Sin embargo, en el epitelio se han identificado otros tipos de células con múltiples funciones (Figura 1-2); las células caliciformes que secretan mucina, las células enteroendocrinas,

encargadas de producir hormonas, las células de Paneth que liberan factores antimicrobianos como lisozimas, las células M, cuya función se relaciona con la presentación de antígenos al sistemas inmune y células Tuft, las cuales tienen quimio-sensores que se relacionan con protección contra la infestación de helmintos (Allaire et al., 2018).

Los enterocitos migran desde el fondo de la cripta hasta al ápice en un proceso de maduración, cuentan con microvellosidades que permiten aumentar la superficie de absorción, se caracterizan por contener enzimas intestinales encargadas de realizar procesos de hidrólisis sobre los nutrientes del alimento y participar en el transporte de los nutrientes a los diferentes órganos (Welcome, 2018; Yoo & Mazmanian, 2017)

La función de absorción de nutrientes de los enterocitos está mediada por tres mecanismos de transporte: paracelular donde pequeñas moléculas como el agua atraviesan el epitelio intestinal a través de las proteínas de unión estrecha; transcelular activo, donde algunas moléculas como glucosa logran sobrepasar los enterocitos por medio de moléculas transportadoras que usan energía en contra de un gradiente; y transcelular pasivo donde las moléculas pequeñas como iones traspasan los enterocitos a través de canales por diferencia de concentraciones y sin uso de energía (Wijtten et al., 2011a).

La integridad del epitelio intestinal es un factor crítico para el mantenimiento de las funciones de absorción y defensa. Esta integridad depende de la presencia de complejos proteicos asociados a membrana conocidos como uniones estrechas. Estas proteínas de membranas tienen como principal función unir células adyacentes entre sí, formando verdaderos sellos, los cuales sirven como canales para permitir el ingreso de ciertos iones o restringir la entrada de agentes y moléculas nocivos. Entre los grupos de proteínas descritos se encuentran: zónula occludens (ZO-1, ZO-2 y ZO-3), claudinas y ocludinas, (Kim et al., 2012).

El epitelio intestinal se interrelaciona con el microbiota, las células del sistema inmune y el sistema neuroendocrino para cumplir con otra importante función, la defensa contra potenciales agresores presentes en el lumen intestinal, conformando lo que se conoce

como la "***barrera intestinal"*** (Moeser et al., 2017). En la barrera intestinal se evidencia la presencia de mucina, un gel viscoso de proteínas glicosiladas producido y secretado por las células caliciformes, que se unen a receptores presentes en las células epiteliales, para bloquear la adhesión de microorganismos patógenos (Modina et al., 2021).

Otro componente importante de la barrera intestinal son los microorganismos, entre los cuales se reportan principalmente *Lactobacillus*, *Streptococcus, Bifidobacterium, Bacteroides*, *Provotella* y *Escherichia col*i, los cuales desarrollan interacciones con los enterocitos para desencadenar la activación del sistema inmune (Duarte & Kim, 2022; Yoo & Mazmanian, 2017). El número de familias y especies bacterianas (diversidad) así como la cantidad de bacterias presentes de cada una de ellas (abundancia) depende de factores tales como la edad del animal, la dieta, el ambiente, las condiciones de estrés y el estado de salud de los animales (Huting et al., 2021; Kim et al., 2012).

El sistema nervioso entérico es otro componente de la barrera intestinal y está formado por una extensa red neuronas y glías en el TGI, en la que se encuentran mecanorreceptores y quimiorreceptores que responden a estímulos como abrasión, tensión, pH, osmolaridad o nutrientes, etc. Los plexos mesentérico y submucoso participan principalmente en la motilidad intestinal, la secreción y la absorción, así como en la modulación de la permeabilidad intestinal (Yoo & Mazmanian, 2017).

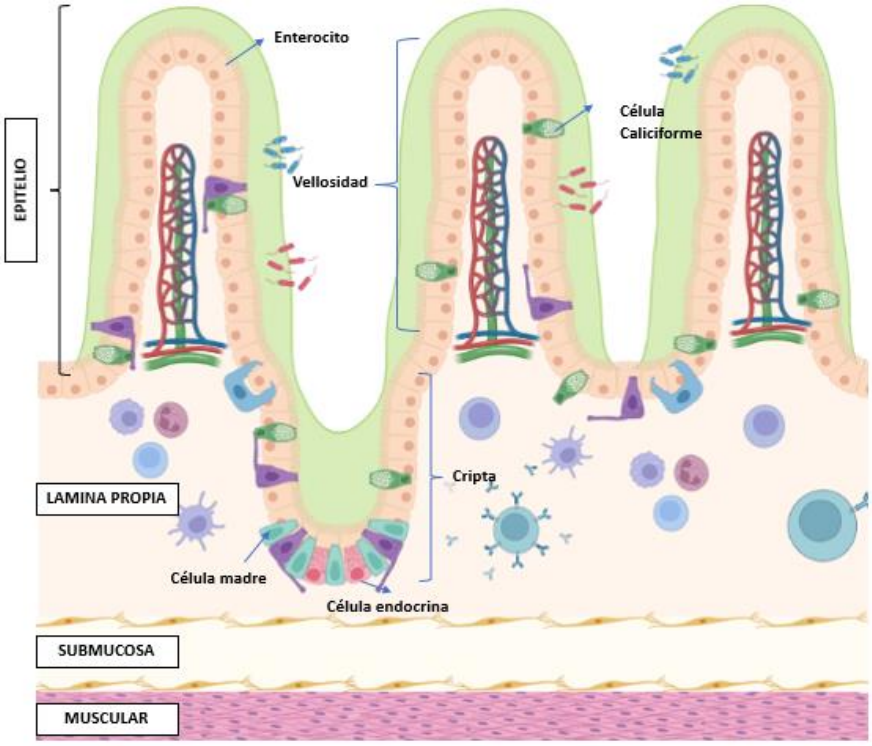
La función de defensa de la barrera intestinal, asociada a la respuesta inmune de la mucosa intestinal y depende de la presencia de diferentes tipos de células que interactúan para mantener el equilibro y generar una protección efectiva. En general, en la respuesta inmune a nivel intestinal se reconocen dos sitios, los inductores y los efectores. Los sitios inductores se asocian con el tejido linfoide presente en el intestino, GALT, el cual incluye las placas de Peyer, los nódulos linfáticos mesentéricos y los folículos linfoides aislados. En estas estructuras se atrapan y reconocen los antígenos para ser presentados a las células efectoras, las cuales son linfocitos ubicados en la lámina propia y en el epitelio, los cuales una vez activados producen anticuerpos y otros factores asociados a la respuesta inmune específica (Peng et al., 2021).

La inducción de la respuesta inmune está mediada por una serie de moléculas de señalización conocidas como receptores de patrones de reconocimiento (PRRs), los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los "Toll Like Receptors" (TLRs), son PRRs presentes en las células presentadoras de antígeno a nivel de membrana o citoplasma celular. En la especie porcina se han descrito 10 tipos de (TLR) que reconocen bacterias, virus RNA y hongos y desencadenan la respuesta inflamatoria con la activación de citoquinas proinflamatorias (Broom & Kogut, 2018; Mair et al., 2014; Peng et al., 2021).

La activación de la respuesta inmune se desencadena con el reconocimiento y extracción del antígeno por las células M, que lo fagocitan y transportan a través de mucosa epitelial hasta liberarlo en la lámina propia, donde las células dendríticas lo capturan y lo presentan a las células T cooperadoras en las placas de Peyer. Una vez los antígenos son presentados y reconocidos por los linfocitos T, por medio de las moléculas receptoras de antígeno, estos secretan linfoquinas que inducen la proliferación y diferenciación de linfocitos B, los cuales liberan inmunoglobulina A al lumen intestinal (Peng et al., 2021).

Existe una estrecha relación entre las células del epitelio intestinal, la microbiota y sistema nervioso entérico, que resulta en la activación de moléculas neuro activas que pueden dar lugar a la estimulación o supresión del sistema inmune, así como a la modificación del microbiota y del ambiente intestinal, sin embargo, estas interacciones no están completamente entendidas (Yoo & Mazmanian, 2017).

Figura 0-2. Morfología de la pared intestinal.



Fuente: Creado con Biorander.com

Efecto del destete en la salud intestinal y su evaluación

La integridad estructural y funcional de la barrera intestinal son condiciones que varios autores han considerado a la hora de abordar el concepto de “salud intestinal”, sin embargo, existen otros aspectos asociados a la expresión productiva que se incluyen en la definición de este término.

El concepto de salud intestinal ha sido utilizado en medicina humana y fue definido como como un “estado físico y mental ausente de molestias gastrointestinales que requieran la consulta médica y donde hay ausencia de enfermedad” (Bischoff, 2011). En ciencia animal, (Lallès et al., 2007) realizaron un primer acercamiento al concepto y resaltaron la importancia de la diversidad y la estabilidad del microbiota, así como la interacción de ésta con la estructura del epitelio intestinal y su inmunidad.

Posteriormente, la salud intestinal fue definida como la “Ausencia/prevención/control de enfermedad de tal forma que el animal es capaz de realizar sus funciones fisiológicas y de resistir estresores exógenos e internos” (Kogut & Arsenault, 2016). Otros conceptos incluyen elementos importantes en la producción animal, como son la dieta, el bienestar animal y el rendimiento productivo, de tal forma que definen salud intestinal como “un estado estable donde el microbioma y el tracto gastrointestinal existen en equilibrio simbiótico y donde el bienestar y el rendimiento del animal no están limitados por la disfunción intestinal”. (Pluske et al., 2018)

El destete de lechones es un evento que conlleva a alteración de la salud intestinal. El destete consiste en la separación abrupta del lechón de la madre y marca el inicio de una fase crítica y estresante para el lechón ya que se enfrenta a cambios de orden social, alimenticio y ambiental. Inicialmente el reagrupamiento y la mezcla de camadas para la conformación de lotes de producción implica la jerarquización del grupo, lo que se da a través de peleas y agresiones. Por otra parte, el estrés alimenticio está relacionado con el cambio de una dieta líquida basada en la leche de la cerda, que contiene carbohidratos (lactosa), lípidos (ácidos grasos como el ácido linoleico y el palmítico) y proteínas (caseína) altamente digestibles, a una dieta sólida, basada en almidones y proteínas de origen vegetal. Adicionalmente, el lechón se expone a cambios ambientales, ya que precisa el alojamiento en corrales donde deben aprender a conocer el entorno como comederos y bebederos y en donde pueden estar expuestos a cambios severos de temperatura. Al mismo tiempo ocurre una disminución de anticuerpos maternos y una insuficiente capacidad para su termorregulación.

Estas condiciones deben ser tenidas en cuenta para tomar las medidas de manejo adecuadas para minimizar el efecto deletéreo del destete (Campbell et al., 2013). Una de las consecuencias de las condiciones estresantes a las que se somete el lechón en el destete es el retraso en el crecimiento, el cual está mediado por la reducción el en consumo de alimento que resulta en baja ganancia o pérdida de peso y predisposición o presencia de diarrea. Este efecto puede estar mediado por el aumento de la concentración de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, y TNF alfa) las cuales pueden afectar el metabolismo de nutrientes y activar las proteínas de fase aguda (Pluske et al., 2003)

Con el objetivo de entender la fisiología del lechón al destete se han propuesto 6 dominios que permiten enfocar la evaluación de la función intestinal: la barrera intestinal, el microbiota, la respuesta inmune, la digestión y absorción de nutrientes y su relación con la dieta y la funcionalidad neuroendocrina (Celi et al., 2019). A continuación, se describen algunos de estos dominios y las metodologías asociadas a la valoración de la salud intestinal, con especial énfasis en la morfología intestinal, la respuesta inmune y la microbiota.

Algunos métodos de evaluación de la salud intestinal utilizan sustancias o estructuras asociadas a la barrera intestinal como una forma de describir estados normales de los procesos biológicos y compararlos con estados de enfermedad, o también para describir el efecto de algún tipo de intervención nutricional, terapéutica (Strimbu & Tavel, 2010).

Los criterios para evaluar la salud intestinal son especialmente útiles en situaciones críticas como el destete, en el cual se describen cambios en la morfología intestinal, tales como la reducción en el espesor de la mucosa y la atrofia de las vellosidades intestinales. Estos cambios se asocian al bajo consumo de alimento, el cual provoca una reducción en la proliferación de células, así como una baja síntesis de proteína, en respuesta a una disminución en la secreción de factores de crecimiento, como el péptido similar a glucagón-2 o el IGF-1. Adicionalmente, se observa hiperplasia de la cripta y aumento de la densidad en la lámina propia como resultado de una proliferación de células de defensa.

Estos cambios, se presentan en los primeros 5 días pos-destete y se consideran una fase aguda de respuesta a los factores estresantes (Pluske et al., 2003). El aumento de cortisol a los 2 días pos-destete se relaciona con una disminución de la resistencia epitelial y en consecuencia un aumento en la permeabilidad de la mucosa intestinal lo que da lugar a un aumento de la entrada de agentes agresores y de la respuesta inflamatoria en la lámina propia (Spreeuwenberg et al., 2001). Después del día 5 se puede observar un aumento del apetito y del consumo de alimento, lo que se refleja en una recuperación de la estructura del epitelio y de la actividad enzimática, lo que se puede considerar una fase adaptativa (Pluske, 2016).

De esta manera, la altura de la vellosidad y la profundidad de la cripta en el yeyuno e íleon, y la relación entre las dos, son criterios que se tiene en cuenta con frecuencia en la evaluación de la salud intestinal y de la integridad de la barrera intestinal (Ducatelle et al., 2018). En la tabla 1-1 se presentan algunas referencias en las que se reportan variaciones en la estructura del epitelio.

Tabla 1-1. Cambios morfológicos en el intestino delgado después del destete

Edad al destete, días	Segmento intestinal	Resultado	Referencia
14	Intestino delgado	Dia 7 pos-destete: Disminuye la relación altura de la vellosidad: profundidad de la cripta	(Pasick et al., 2014)
21	Intestino delgado	Día 11 días pos-destete: Disminuye la altura de la vellosidad e incrementa la profundidad de la cripta	(Hampson, 1986)
21	Yeyuno	Dia 2 pos-destete: Disminuye altura de la vellosidad; desde el día 5 pos-destete incrementa la profundidad de la cripta	(Murugesan et al., 2015)
21 o 35	Yeyuno	Día 3 pos-destete: Disminuye la altura de la vellosidad	(Cera et al., 1988)
26	Intestino delgado	Del día 2 al 4 pos-destete: Disminuye la altura de la vellosidad y la relación altura de la vellosidad: profundidad de la cripta	(Spreeuwenberg et al., 2001)
28	75% del intestino delgado	Día 5 pos-destete: Incrementa la profundidad de la cripta	(Aubry et al., 2017)
29	Yeyuno	Día 2 pos-destete: Disminuye la altura de la vellosidad con una altura mínima al día 3 pos-destete, al día 5 pos-destete incrementa la profundidad de la cripta	(Hedemann et al., 2003)

Fuente: Adaptado de (Zheng et al., 2021)

Al destete de los lechones se puede presentar una amplia variabilidad en la altura de la vellosidad en yeyuno: en las descripciones de la literatura se reportan valores entre 351 y 898 µm con una media de 546 µm. En las referencias revisadas se evidenció que no hay una relación clara entre la edad de destete y la altura, sin embargo, los valores reportados para longitud de la vellosidad presentan una tendencia a disminuir con la edad del destete y pueden estar influenciados por las condiciones en las que se lleva a cabo la lactancia. Algunos estudios reportan que 2 días pos-destete se presenta una disminución de un 55% en la atura de la vellosidad con una media de 304 µm. Mientras que al finalizar la primera semana se observó una recuperación del 23% con valores de 361 µm y al final de la

segunda semana se encontró el 87% de recuperación de la altura de la vellosidad alcanzando 476 µm.

En cuanto a la profundidad de la cripta en el yeyuno al momento del destete los valores varían de 59.74 µm hasta 274 µm, con una media de 176 µm. Únicamente después del día 4 pos-destete se encontró un aumento en la profundidad de la cripta variando entre 183 a 233 µm, al finalizar la primera semana pos-destete esta se ve incrementada en un 27% y para la segunda semana el aumento es de 44%, con valores entre 126 µm a 308 µm, y una media de 253 µm, lo que podría estar causado por una inflamación de la mucosa intestinal.

Por otro lado, la relación de la altura de la vellosidad y la profundidad de la cripta en yeyuno (tabla 1-4) en los lechones también presentó una variabilidad durante las dos primeras semanas pos-destete. El primer día pos-destete se han reportado valores de 2.25 en promedio, mientras que para el día 2, se ha observado una reducción de un 29%, con una media de 1.6. Al día 4 también se observó una recuperación de la relación de la altura de la vellosidad, y al finalizar la primera semana post destete se reportó una media de 1,95. Para el día 14 pos-destete la mucosa aún está en proceso de recuperación y la relación V:C se encuentra en un 84% del valor inicial (Boudry et al., 2004; de Groot et al., 2021; Hu et al., 2013; Ming et al., 2021; Spreeuwenberg et al., 2001; Verdile et al., 2019; Verdonk, 2006). En las tablas 1-2, 1-3 y 1-4 se resumen los valores de altura de la vellosidad, profundidad de la cripta y relación vellosidad: cripta, en yeyuno reportados en la literatura.

Tabla 1-2. Altura de la vellosidad en yeyuno, µm

Autor	Destete	Días pos-destete				
		0	2	4	7	14
Hu et al., 2013	20	765	-	-	468	731
Boudry et al., 2004	21	597	356	-	377	457
Verdile et al., 2019	21	898	-	-	202	-
Ming et al., 2021	21	-	-	-	323	241
Groot et al., 2020	22	430	-	-	-	475
Spreeuwenberg et al., 2001	25	351	253	318	-	-
Verdonk et al., 2006	26	491	-	397	438	-

Fuente: Elaboración propia

Tabla 1-3. Profundidad de la cripta en yeyuno, µm

Autor	Destete	Días pos-destete				
		0	2	4	7	14
Hu et al., 2013	20	274	-	-	320	285
Boudry et al., 2004	21	216	211	-	304	308
Verdile et al., 2019	21	59.76	-	-	100	-
Ming et al., 2021	21	-	-	-	124	126
Groot et al., 2020	22	223	-	-	-	296
Spreeuwenberg et al., 2001	25	176	162	183	-	-
Verdonk et al., 2006	26	181	-	233	272	-

Fuente: Elaboración propia

Tabla 1-4. Relación altura de la vellosidad: profundidad de la cripta en yeyuno (V:C)

Autor	Destete	Días pos-destete				
		0	2	4	7	14
Hu et al., 2013	20	2.8	-	-	1.4	2.5
Boudry et al., 2004	21	2.76*	1.6*	-	1.24*	1.48*
Verdile et al., 2019	21	15.23	-	-	2.1	-
Ming et al., 2021	21	-	-	-	2.71	1.96
Groot et al., 2020	22	1.95	-	-	-	1.64
Spreeuwenberg et al., 2001	25	2	1.6	0.58	0.58	-
Verdonk et al., 2006	26	2.71*	-	1.7*	1.61	-

Fuente: Elaboración propia

En relación con la altura de la vellosidad en el íleon en lechones destetados entre los 20 y 26 días de edad, se han encontrado valores en un rango entre 255 µm y 357 µm, con una media 310 µm (tabla 1-5). Al día 1 pos-destete se ha observado una disminución del 19% en la altura de la vellosidad, con una media de 254 µm, sin embargo, desde el día 4 pos-destete ocurre una rápida proliferación celular alcanzando una recuperación del 98% de la altura de la vellosidad (García et al., 2016).

En cuanto la profundidad de la cripta en el íleon, al finalizar la lactancia de los lechones se presentan valores que varía entre 104 y 172 µm, con una media de 147 µm, mientras que hacia el día 4 post destete se reportan un aumento en la profundidad de la cripta, que se

mantiene hasta finalizar la segunda semana post destete, alcanzando valores entre 317 µm y 451 µm.

La relación de la altura de la vellosidad y la profundidad de la cripta en el íleon presenta valores iniciales entre 1.7 y 2.78, con una media 1.9, los cuales tras el destete disminuyen y se mantienen bajos hasta finalizar la segunda semana pos-destete donde algunos autores han reportado valores de 1.3 y 1.7 (Boudry et al., 2004; de Groot et al., 2021). En las tablas 1-5, 1-6 y 1-7 se presentan los valores reportados para la altura de la vellosidad y la profundidad de la cripta en el Íleon.

Tabla 1-5. Altura de la vellosidad en íleon, µm

Autor	Destete	Días pos-destete				
		0	2	4	7	14
García et al., 2016	20	290.5	-	341.8	-	-
Boudry et al., 2004	21	340	295	-	329	317
Ming et al., 2021	21	-	-	-	288	290
Groot et al., 2020	22	357	-	-	-	451
Spreeuwenberg et al., 2001	25	255	214	244	-	-

Fuente: Elaboración propia

Tabla 1-6. Profundidad de la vellosidad en íleon, µm

Autor	Destete	Días pos-destete				
		0	2	4	7	14
García et al., 2016	20	104.4	-	158.1	-	-
Boudry et al., 2004	21	156	146	-	204	240
Ming et al., 2021	21	-	-	-	161	120
Groot et al., 2020	22	172	-	-	-	274
Spreeuwenberg et al., 2001	25	158	145	153	-	-

Fuente: Elaboración propia

Tabla 1-7. Relación altura de la vellosidad: profundidad de la cripta en íleon, µm

Autor	Destete	Días pos-destete				
		0	**2**	**4**	7	14
Garcia et al., 2016	20	2.78*	-	2.17*	-	-
Boudry et al., 2004	21	2.18*	1.38*	-	1.61*	1.32*
Ming et al., 2021	21	-	-	-	1.83	2.7
Groot et al., 2020	22	2.17	-	-	-	1.7
Spreeuwenberg et al., 2001	25	1.7	1.5	1.7	-	-

*Calculados a partir de los valores de la altura de la vellosidad y profundidad de la cripta
Fuente: Elaboración propia

Las concentraciones de citoquinas proinflamatorias como TNFα, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 e IL-1β, también han sido estudiadas como criterio de evaluación de salud intestinal, por lo que se reportan: incrementos de 3.38, 2.04 y 2.85 “fold change” (cambio de intensidad) de TNF-alfa, INF-gama e Interleukina-6, respectivamente, a los 3 días de destete. (Hu et al., 2013). Tabla 1-8

Otro criterio de estabilidad de la barrera intestinal es la evaluación de la permeabilidad intestinal, la cual se determina, midiendo la concentración de moléculas como lactulosa, L-ramnosa, y manitol en orina, después del suministro de concentraciones conocidas. Cuando estos compuestos son suministrados en agua a animales sanos el total de la concentración de lactulosa no es absorbido en el intestino delgado y sigue hasta el intestino grueso para luego ser excretado. La L-ramnosa y el manitol son fácilmente absorbidos por las microvellosidades y luego medidos en la orina. Sin embargo, cuando la permeabilidad es alterada la proporción de lactulosa medida en la orina aumentan y la cantidad de L-ramnosa o manitol disminuyen como consecuencia de la ruptura de la barrera intestinal (Celi et al., 2019; Gilani et al., 2017; Wijtten et al., 2011b).

Otra técnica utilizada para evaluación de integridad intestinal es la resistencia eléctrica tras-epitelial (TEER) la cual disminuye como resultado del bajo consumo en la primera semana pos-destete. La TEER se mide en in vitro utilizando un segmento del tejido intestinal fresco, el cual es llevado a una cámara para evaluar el tránsito de iones y moléculas por el transporte paracelular. (Celi et al., 2019; Wijtten et al., 2011a).

La expresión de proteínas de unión una herramienta útil para la evaluación de la estabilidad de la barrera intestinal. Así, se reporta el uso de técnicas de biología molecular como q-PCR para estimar la expresión de genes de occludin, claudin-1 y zónula ocludens en muestras de tejido intestinal o plasma, observando una disminución del 47% 36% y 38% de la expresión de cada una de las proteínas en los primeros días pos-destete (Celi et al., 2019; Hu et al., 2013), en la Tabla 1-8.

T**abla 1-8**. Expresión génica de citoquinas pre y antinflamatorias, y proteínas de unión en yeyuno de lechones al destete

Ítem	Días pos-destete			
	0	**3**	**7**	**14**
TNF-a	1	4.48	2.97	1.38
INF-y	1	3.04	1.94	1.06
IL-10	1	1.48	1.51	1.36
IL-6	1	3.85	3.08	1.31
Occludin	1	0.53	0.41	0.57
Claudin-1	1	0.64	0.53	0.61
Zónula Ocludens	1	0.62	0.72	0.79

Fuente: Construido a partir de datos reportados por (Hu et al., 2013). N=6

Otros Indicadores

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), aminas, fenoles, indoles, sulfuros y tioles son productos de la fermentación bacteriana de excesos de proteína que no logran ser digeridas en su totalidad debido a cambios enzimáticos en los primeros días post destete. La concentración de estos compuestos puede ser medida en las heces usando técnicas de cromatografía de gases y pueden ser un buen marcador de la función intestinal (Celi et al., 2019; Fan et al., 2002).

La detección de niveles de lactato y succinato, producidos por bacterias intestinales, causantes de diarreas y que pertenecen principalmente a las familias *Enterobacteriaceae* y *Streptococcaceae*, las cuales aumentan en población tras los cambios de pH del intestino, se reportan como indicadores de alteración de la permeabilidad intestinal (Celi et al., 2019; Tsukahara & Ushida, 2001). Así mismo, las concentraciones de fenol y p-cresol,

en sangre, heces u orina se asocian con una reducida funcionalidad de la barrera intestinal (Celi et al., 2019; Saito et al., 2018).

Otros compuestos relacionados con la respuesta inmune, como la neopterina, un marcador de la activación de los macrófagos y las células dendríticas, eosinófilos, linfocitos que participan en la inflamación o la calprotectina y mieloperoxidasa, marcador de la actividad de los neutrófilos también han sido estudiados como indicadores de inflamación del tejido intestinal (Celi et al., 2019).

Disbiosis y diarrea pos-destete

El microbiota juega un papel importante en la maduración del intestino del lechón, así como en la modulación y funcionamiento de la barrera intestinal. El cambio de dieta al momento del destete es el elemento que más afecta la composición del microbiota, dado el cambio de sustratos y la ausencia de inmunoglobulinas y otros factores de la leche. Al mismo tiempo, el microbiota puede afectar la digestión de nutrientes y generar algunos metabolitos (ej. acetato, butirato), que pueden modular la respuesta inmune y la proliferación de células propias de la mucosa intestinal, adicionalmente puede considerarse una línea de defensa que previene la colonización de bacterias patógenas (Duarte & Kim, 2022). En la tabla 1.9 se listan los principales familias y géneros de bacterias que se encuentran en el intestino de lechones sanos al pos-destete.

Tabla 1-9. Familias y géneros de bacterias que se encuentran en diferentes segmentos intestinales de lechones sanos al destete.

Segmento intestinal	Familia	Genero
Yeyuno	Lactobacillaceae Enterobacteriaceae Streptococcaceae Ruminonoccaceae Pasteurellaceae	Lactobacillus Actinobacillus Streptococcus Staphylococcus
Íleon	Lactobacillaceae Christensenellaceae Enterobacteriaceae Pasteurellaceae	Lactobacillus Actinobacillus Streptococcus Romboutsia Escherichia-Shigella
Ciego	Ruminococcaceae Provotellaceae Lachnospiraceae Bacteroidaceae Lactobacillaceae	Lactobacillus Ruminococcus Bacteroides Prevotellaceae

Fuente: Construido con información de (Gresse et al., 2019).

Actualmente la metagenómica y las tecnologías asociadas a la bioinformática permiten caracterizar la composición y la dinámica de las poblaciones microbianas del intestino. Es así como se han desarrollado diferentes índices como el índice de Shannon-Weaver o el índice de diversidad de Simpson los cuales se basan en los OTUs (unidades taxonómicas operacionales) y expresan tanto el número de especies como abundancia de estas. Otros índices como ACE (Estimador de cobertura y abundancia) y el índice de Chao 1 se utilizan para estimar principalmente la riqueza relativa en una muestra (Kim et al., 2017).

El estrés ocasionado al momento del destete da lugar a alteración en el microbiota intestinal o disbiosis, lo cual es la principal causa de infecciones intestinales y por tanto de diarreas pos-destete. *Escherichia coli, es* el agente etiológico que se asocia con mayor frecuencia a brotes de diarrea en lechones al momento del destete; esta bacteria se encuentra normalmente en el microbiota intestinal, pero su sobreexpresión, la inmadurez intestinal, los cambios dietarios y los factores estresantes en el destete, se combinan dando como resultado cuadros clínicos de diarrea (Liu et al., 2022).

La patogenicidad de *Escherichia coli* inicia con la adhesión a las microvellosidades de los enterocitos, la cual está mediada por la presencia de las fimbrias F4 (variantes antigénicas ab, ac, y ad) y F18 (ab y ac) que se expresan en los patotipos enterotoxigénicos de *Escherichia Coli* (ETEC). Una vez adheridas al enterocito estas bacterias liberan enterotoxinas termoestables como STa y STb que alteran la permeabilidad intestinal causando la diarrea en los lechones (Fairbrother & Nadeau, 2019). En la tabla 1-10 se presenta la clasificación de los patotipos de *Escherichia coli* y sus potenciales efectos en los lechones.

Tabla 1-10. Patotipos, adhesinas y toxinas asociadas a algunos patotipos de *Escherichia coli*

Patotipos	Adhesina	Toxina	Enfermedad
ETEC	F5(K99), F6, F41	STa	Diarrea neonatal
	F4(K88)	STa, STb, LT, α-hemolisina	
	F4(K88) AIDA	STa, STb, LT, EAST-1, α-hemolisina	Diarrea post destete
	F18 AIDA	STa, STb, LT, EAST-1, α -hemolisina, Stx2e	
EPEC	Eae	-	Diarrea pot destete
STEC	*saa*	Stx1, Stx2	Colitis hemorrágica - disentería bacilar
EIEC	IpaH-pINV	-	Disentería

saa: Adhesina auto aglutinante

Eae: Gen

Fuente: Adaptado de (Fairbrother & Nadeau, 2019; Luppi, 2017)

La enterotoxina termo lábil (LT) consta de una subunidad enzimática llamada A (dos fragmentos) y una subunidad B (pentámera), que se unen al ganglósido GM1 (monosialotetrahexosylganglioside) presente en el receptor de los enterocitos, ingresa por los receptores del epitelio y es transportada través del retículo endoplasmático y se libera en el citosol de la célula epitelial donde estimula la activación de adenilato ciclasa que aumenta el adenosín monofosfato cíclico (cAMP), el cual regula la activación de los canales de cloro, lo que resulta en un aumento de la secreción de cloro, reducción de la absorción de sodio y una filtración de agua hacia el lumen intestinal (Fairbrother et al., 2005; Kim et al., 2022; Sun & Kim, 2017).

Por otro lado, enterotoxina estable (STa) es un péptido de bajo peso molecular de 18 aminoácidos y 3 puentes de disulfuro que se une al receptor transmembranal de los enterocitos, con lo que se induce la acumulación monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) en el interior de la célula, el cual inhibe el transporte del Na/Cl en los enterocitos e impide la absorción de agua y electrolitos en las puntas de las vellosidades y genera la secreción de agua y cloro de las células de las criptas (Cox et al., 2012; Fairbrother et al., 2005; Sun & Kim, 2017).

De otro lado, tras la infección con el patógeno la evaluación de la consistencia de heces en los primeros días del post destete se convierte en un criterio de respuesta que mide la severidad de la diarrea causada por *Escherichia coli* ETEC o EPEC y su relación con diferentes estrategias nutricionales que permiten reducir la proliferación de bacterias patógenas en el intestino (Adewole et al., 2016; Kim et al., 2012). El score de diarreas es un método no invasivo que permite evaluar la salud intestinal en la granja y es ampliamente usado por los investigadores debido a la baja complejidad de uso.

La evaluación se realiza a través de una clasificación descriptiva de 0 a 3, usado con más frecuencia, donde 0= heces normales, 1=heces suaves, 2= diarrea media, 3 diarrea severa, usado con más frecuencia (Adewole et al., 2016) o de 1 a 5, donde 1= heces normales, 2=heces suaves 3= diarrea media, 4= diarrea severa 5= diarrea acuosa (Lei & Kim, 2018).

1.3 Aditivos mejoradores de la salud intestinal en el post destete

Los aditivos son compuestos, moléculas, organismos o combinaciones de estos, que son incluidos en las dietas para animales para suplir los requerimientos nutricionales, para mejorar las ganancias de peso, la eficiencia alimenticia, la salud intestinal o para controlar las enfermedades en las granjas (Tariq et al., 2020; Van Saun, 2013). En el año 2021 el mercado de los aditivos fue estimado en 39.6 billones de dólares, con una proyección de crecimiento anual del 3.5% desde el 2022 al 2030. La industria porcina es considerada el segundo consumidor de aditivos después de la industria avícola, con un estimado de

13.737 millones de dólares, siendo los antimicrobianos, antioxidantes, mezclas, emulsificantes, enzimas y agentes controladores del pH los aditivos más utilizados (Grand View Research, 2022).

1.3.1 Antibióticos como promotores de crecimiento y su influenza en parámetros productivos y de salud intestinal de lechones

Los antibióticos son utilizados como terapéuticos es decir para tratar individuos clínicamente enfermos, como metafilácticos para prevenir el aumento de síntomas en un lote o corrales donde se han presentado síntomas previamente, o como profilácticos cuando se suministran a animales sanos para prevenir la aparición de síntomas clínicos (Aarestrup, 2012; Landers et al., 2012). La profilaxis es la principal forma de uso de antibióticos en la industria porcina y el destete y las primeras semanas de la fase de precebo es donde se reportan los efectos más significativos en cuanto a ganancia de peso (16.4%) y eficiencia alimenticia. (Cromwell, 2002; Lekagul et al., 2019; Tiseo et al., 2020). Los antibióticos también pueden ser suministrados de forma continua en el alimento en dosis sub-terapéuticas con el objeto de mejorar el crecimiento, caso en el cual son considerados promotores de crecimiento (Lekagul et al., 2019). El mecanismo de acción de los antibióticos promotores de crecimiento (APC) no está completamente dilucidado, sin embargo, los efectos positivos de la adición APC a las dietas de cerdos se han asociado al control de infecciones subclínicas, a mayor disposición y utilización de nutrientes por parte del cerdo debido a la reducción en la población bacteriana, a una reducción de metabolitos bacterianos que disminuyen el crecimiento, así como a un incremento en la digestibilidad de proteínas posiblemente debido a una mejor estructura de la pared intestinal (Gaskins et al., 2002; Maron et al., 2013).

Desde los primeros reportes del uso de clortetraciclina junto con vitamina B12 en dietas de cerdos como mejorador de los parámetros productivos, los antibióticos fueron catapultados para ser usados a nivel mundial como promotores de crecimiento (Jukes, 1950). Los antibióticos que se han utilizado con mayor frecuencia en la industria porcina son: avilamicina, bacitracina, enramicina, flavomicina, halquinol, lincomicina narasina, salinomicina, tiamulina, tylosina y virginamicina (Cardinal et al., 2020). En la tabla 1-11 se

presentan algunos resultados de reportes recientes de efectos de la inclusión de antibióticos en dietas de lechones al destete.

Tabla 1-11. Efectos de inclusión de antibióticos en dietas de lechones al destete

Antibióticos	N	Destete	Dosis	Diferencias significativas	Referencia
Apramicina	144	18	165mg/Kg	Incremento de GDP y G: F Incremento de DTT en MS y EB	(Zhang & Kim, 2014)
Carbadox	40	21	50mg/Kg	Incremento de G: F	(Lourenco et al., 2021)
Fase 1: Clortetraciclina Fase 2: Tiamulina	1300	21	-	Incremento de GDP, G: F CDA y peso final	(Olsen et al., 2018)
Carbadox	34	28	50mg/Kg	Incremento PF Disminución de la frecuencia de diarrea, recuento de coliformes totales en nódulos linfáticos, concentración de citoquinas proinflamatorias mesentéricos y bazo Incremento proteínas de unión	(Kim et al., 2021)
Fase 1: Clortetraciclina Fase 2: Carbadox Fase 3: Clortetraciclina	1230	15-18	662mg/Kg 28mg/kg 441 mg/kg	Incremento GDP, CDA	(Ruckman et al., 2020)
Mezcla: Clortetraciclina, oxitetraciclina de calcio y bacitracina de zinc	192	28	75mg/kg, 50mg/kg y 40mg/kg	Incremento G: F Disminución de la incidencia de diarrea y citoquinas proinflamatorias Mejora de la altura de la vellosidad en duodeno e íleon	(Han et al., 2021)
Clortetraciclina	48	28	75mg/kg	Incremento de la abundancia relativa de microbiota patogénica	(Mo et al., 2022)
Clortetraciclina	126	29	75mg/kg	Aumento de GDP y G: F Disminución de diarrea y citoquinas proinflamatorias Incremento de proteínas de unión	(Ma et al., 2019)
Carbadox	192	21	55mg/kg	Incremento de GDP, CDA, G: F y PF Incremento V:C Incremento de citoquinas proinflamatorias	(Hung et al., 2020)
Tilosina de fosfato	18	28	100 mg/kg	Disminución de citoquinas proinflamatorias Incremento de GDP, pero disminuyo G: F	(Yan et al., 2020)

GDP: Ganancia de peso, G: F: Eficiencia alimenticia, DTT: Digestibilidad Total, EB: Energía Bruta, MS: Materia Seca, CDA: Consumo de alimento, PF: Peso Final, V:C: Relación vellosidad: profundidad de la cripta

Fuente: Elaboración propia

A pesar de los efectos positivos en los resultados productivos con el uso de antibióticos promotores de crecimiento surge la amenaza de la aparición de bacterias resistentes o multirresistente a antibióticos que se usan con fines terapéuticos en medicina humana y veterinaria. El aumento de microorganismos resistentes a sustancias antimicrobianas a nivel mundial es muy evidente y probablemente es el resultado del uso excesivo e indiscriminado de antibióticos en animales (Aslam et al., 2018).

La Resistencia Antimicrobiana (RAM) se define “como el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible” (OMS, 2019). Aunque no es claro el origen de los genes de resistencia en bacterias patógenas, se conocen tres posibles rutas a través de la transferencia horizontal de genes que involucran integrones, trasposones y plasmidos. La primera es la trasferencia directa de genes de resistencia desde bacterias del suelo productoras de antibióticos, la segunda una transferencia intermedia a las bacterias del suelo no productoras de antibióticos y la última ruta desde las bacterias que se encuentran circulando en el ambiente (Peterson & Kaur, 2018).

Se estima que para el año 2050, aproximadamente 10 millones de muertes humanas podrían estar relacionadas con algún tipo de microorganismos resistentes a antimicrobianos, y los costos de tratamientos en pacientes con infecciones ocasionadas por microrganismos resistentes a antibióticos podrían ascender a US$29.000 por paciente, en países como Estados Unidos y Canadá (Ventola, 2015).

Por lo anterior, la resistencia antimicrobiana es considerada un problema de salud pública, en consecuencia, el 70% de países a nivel mundial han prohibido el uso algunos antibióticos en alimentación animal. El ejemplo más conocido es de la Unión Europea en donde desde enero del año 2006 se prohibió totalmente el uso de antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal, permitiendo su utilización únicamente bajo estricta prescripción veterinaria (Li, 2017; OIE, 2021).

1.3.2 Alternativas al uso de antibióticos promotores de crecimiento

La prohibición del uso de antibióticos promotores de crecimiento, tras el aumento de la aparición de bacterias resistentes, ha creado la necesidad de probar diferentes alternativas para reemplazar de manera efectiva a los antibióticos y de esta manera mantener y/o mejorar la salud y la productividad en las granjas. Entre las alternativas que más se utilizan y están disponibles en el mercado se cuentan: los ácidos orgánicos, los prebióticos, los probióticos, los fitobióticos (extractos, aceites esenciales, taninos, etc.) los péptidos microbianos y bacteriófagos. A continuación, se describirán brevemente, los mecanismos de acción, así como los principios activos y efectos en la salud intestinal y la productividad reportados en la literatura, para cada uno de ellos.

Acidificantes

Los acidificantes son unos de los aditivos más empleados en la industria porcina, por su efecto positivo en el crecimiento de los lechones y en el control de diarreas en fases de destete, razón por cual su participación en el mercado de aditivos se ha incrementado de manera notoria en los últimos años (Gran View Research, 2022). Los acidificantes pueden ser ácidos orgánicos, inorgánicos o sales de ácidos y pueden encontrarse solos o en mezclas buscando efectos complementarios entre los principios activos. A su vez los ácidos orgánicos se clasifican en ácidos grasos de cadena cortas (AGCC), con máximo 5 carbonos, tales como el ácido fórmico, acético, propiónico y butírico. Los ácidos de cadena media (AGCM) que tienen entre 6 a 12 carbonos: como por ejemplo el caproico, caprílico, cáprico y láurico; y los ácidos tricarboxilicos entre los que se cuentan el ácido cítrico, alfa ketoglutárico, fumárico y málico, este último grupo en general se caracteriza porque son compuestos intermediarios del ciclo de Krebs. Otros ácidos como como el benzoico, sórbico y láctico también son reportados con efectos positivo en variables tanto productivas como de salud intestinal (Tugnoli et al., 2020a). Entre los ácidos inorgánicos se reportan efectos benéficos para productos que contienen ácido sulfúrico, ácido hidroclórico y ácido fosfórico, entre otros (Suiryanrayna & Ramana, 2015).

Entre los efectos positivos de la adición de ácidos orgánicos a los alimentos para lechones se ha mencionado que tienen la capacidad de disminuir el pH del estómago, favoreciendo las condiciones de crecimiento de bacterias benéficas como lo son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium,* las cuales se caracterizan por mantener el balance del microbiota y ayudan a crear ambientes adversos para la adhesión y colonización de bacterias patógenas como *Escherichia coli, Salmonella spp*. y otras enterobacterias, disminuyendo así las poblaciones de las mismas en el intestino (Kim et al., 2005; Pearlin et al., 2020; Suiryanrayna & Ramana, 2015).

También se ha descrito que los ácidos orgánicos mejoran la digestibilidad de los nutrientes debido a su capacidad de disminuir el pH, aumentando la actividad de la pepsina y la hidrólisis de proteínas. Por otro lado, la actividad antimicrobiana, depende del pKa (valor de pH al cual 50% del ácido se encuentra en forma disociada), el cual se encuentra entre 3 y 5 para la mayoría de principios activos utilizados. De esta manera, el mecanismo de acción se basa en la capacidad del ácido de atravesar la capa lipídica de la membrana celular de los microorganismos en su forma no disociada, para disociarse dentro de la célula, lo que provoca una disminución del pH intracelular, con aumento de la concentración de iones H^+; lo que induce a la activación de la bomba de protones para la eliminación de iones, la cual consume la energía y causa la muerte de la bacteria. Adicionalmente, los radicales $RCOO^-$, inhiben varias funciones de la célula y por tanto el crecimiento bacteriano (Dibner & Buttin, 2002; Freitag, 2009; Nguyen et al., 2020; Pearlin et al., 2020).

Los efectos de la suplementación de dietas con ácidos grasos de cadena corta, como acético y propiónico no han sido consistentes, sin embargo, efectos benéficos de la adición de ácido butírico se relacionan con mejoras en el metabolismo y la salud intestinal, estos serán analizados en detalle más adelante dado que es el tema principal de este trabajo.

La microencapsulación de los ácidos orgánicos permite reducir posibles problemas de palatabilidad, olor o inestabilidad de los principios activos durante el procesamiento de los alimentos o en el producto final, así como posibles interacciones negativas con otros ingredientes. Al mismo tiempo pueden favorecer la liberación y actividad del principio activo

en secciones posteriores del tracto gastrointestinal, en donde mejorar el microambiente, la estructura de los enterocitos o la estabilidad del microbiota (Tugnoli et al., 2020b).

Probióticos

Los probióticos también conocidos como de DFM (microorganismos de alimentación directa) son "microorganismos vivos que cuando son suministrados en las cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del hospedero (FAO/OMS, 2001, 2002). Los productos probióticos pueden contener uno o más grupos de microorganismos, dentro de los géneros de bacterias más utilizados como probióticos se reportan: *Lactobacillus, Enterococcus, Bifidobacterium, Bacillus y Streptococcus*; mientras que en el grupo de levaduras se mencionan *Sacharomyces cerevisiae* y *Kluiveromyce*, y para hongos el género *Aspergillus* es el más utilizado (Markowiak & Ślizewska, 2018).

Entre las características más relevantes de productos probióticos, se cuentan la seguridad, la funcionalidad y la estabilidad tecnológica. En cuanto a la seguridad, se requiere evidencia de no tener efectos adversos en los animales, no estar asociado a enfermedades y no ser portador de genes de resistencia. En referencia a la funcionalidad, es importante que los microrganismos probióticos puedan vivir en las condiciones del tracto gastrointestinal (pH y sales biliares), que puedan adherirse y colonizar el epitelio y que tengan actividad antagónica con patógenos. Desde el punto de vista tecnológico se requieren microrganismos que se puedan producir en grandes cantidades, que sean estables durante el almacenamiento y que no alteren la palatabilidad de los productos terminados (Markowiak & Ślizewska, 2018).

Los mecanismos de acción de los prebióticos se relacionan con su capacidad de inhibir la adhesión de bacterias patógenas al intestino, la producción de proteínas con actividad bactericida o de productos como AGCC o el ácido láctico que crean ambientes intestinales adversos para la sobrevivencia de los agentes patógenos debido al bajo pH. También se ha reportado que los probióticos pueden estimular el sistema inmune debido a su efecto benéfico sobre el microbioma del hospedador ya que regula la respuesta inmune de PRRs por medio de moléculas microbianas asociados a patógenos conocido como MAPs,

adicionalmente se estimula la diferenciación celular y la inactivación de procesos inflamatorios (Anee et al., 2021; Liao & Nyachoti, 2017; Su et al., 2022).

Prebióticos

Los prebióticos se han descrito como sustratos, generalmente carbohidratos, que no pueden ser digeridos por los lechones y que pueden ser utilizados por los microrganismos del tracto gastrointestinal y que favorecen la proliferación de bacterias benéficas, de esta forma permiten mejorar la salud del hospedador y modular el microbiota intestinal (Liu et al., 2018; San Andres et al., 2019). Al igual que los probióticos, los prebióticos deben ser estables al ambiente del tracto gastrointestinal y deben resistir las condiciones de procesamiento de los alimentos (Markowiak & Ślizewska, 2018).

Los compuestos más utilizados como prebióticos para cerdos son: fructanos, galacto-oligosacáridos, fructooligosacáridos, manano-oligosacáridos, almidones resistentes, xilooligosacáridos, lactulosa, inulina y lactulosa (Azad et al., 2020; Guarino et al., 2020). Los prebióticos como los xiloogosacáridos puede ser fermentados por bacterias y transformados en AGCC, productos que actúan como fuente de energía para los enterocitos y que disminuyen el pH favoreciendo así la proliferación de microbiota benéfica como Lactobacillus o Bifidobacterium en lechones destetos (Yin et al., 2019). Otros, compuestos como los oligosacáridos compiten con bacterias patógenas por sitios receptores de reconocimiento de carbohidratos en la barrera intestinal, y estimulan diferentes componentes del sistema inmune, modificando la expresión de citoquinas pro y preinflamatorias y de proteínas de unión estrecha (Xiong et al., 2015). Asimismo, se reporta que sustratos como la inulina y galacto-oligosacáridos mejoran el metabolismo de minerales como calcio, hierro, zinc y magnesio en modelos animales de cerdos (Azad et al., 2020; Scholz-Ahrens et al., 2001).

Fitobióticos

Los fitobióticos, también llamados aditivos fitogénicos para alimentos, son sustancias bioactivas derivadas de plantas o partes de plantas, las cuales tienen efectos positivos

sobre el crecimiento y salud de los animales (Grashorn, 2010; Mohammadi Gheisar & Kim, 2018). Los fitobióticos en general son metabolitos secundarios de las plantas, los cuales tienen funciones de defensa para ellas a diferentes agresores, como microbios, insectos, radiación, etc. Los principios activos pueden ser extraídos por procesos como destilación, maceración, presión y extracción con solventes (Kerrola, 1995). Existe una gran diversidad de extractos de plantas, que difieren en cuanto al origen (hojas, tallos, granos, especias, frutas, etc.), estructura química (terpenos, saponinas, flavonoides, fitoestrógenos, etc.), métodos de procesamiento (extractos, aceites esenciales, aislados) y actividad biológica (antimicrobial, antioxidante, moduladores del apetito y de la digestión; etc.) lo que hace que su clasificación sea extremadamente difícil (Valenzuela-Grijalva et al., 2017).

En lechones los principios activos utilizados se caracterizan por que tienen la capacidad de mejorar la digestibilidad de nutrientes del animal, disminuir los procesos oxidativos y el crecimiento de bacterias patógenas. Los extractos como los aceites esenciales se utilizan con frecuencia en el destete, debido a que han demostrado efectos benéficos como agentes antimicrobianos, por su capacidad de alterar la membrana bacteriana, aumentando la permeabilidad y generando muerte celular (Nazzaro et al., 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que diferentes extractos de plantas tienen efecto modulador de la respuesta inmune, mediado por vías de señalización celular que mejoran la integridad de la membrana y disminuyen el estrés oxidativo generado durante el destete (Y. Liu et al., 2014; Omonijo et al., 2018).

Minerales

Son elementos inorgánicos requeridos de forma normal por los animales para el desarrollo de ciertas funciones metabólicas. El Zinc y el cobre son cofactores de varias enzimas claves de metabolismo y son requeridos en pequeñas concentraciones (menos de 100 mg/kg) por lo que son considerados micro-minerales. Sin embrago, se ha reportado que compuestos de zinc y cobre, tales como el óxido de zinc o el sulfato de cobre, tienen propiedades antimicrobianas, cuando son suministrados en cantidades superiores a las requeridas nutricionalmente (Liu et al., 2018).

El zinc es un elemento esencial en la eficiencia reproductiva, el apetito y el sistema inmune de los animales, hace parte de las enzimas que participan en la síntesis de proteínas y en las enzimas digestivas. La adición de 150mg/kg zinc en dietas para lechones, cubre el requerimiento nutricional; sin embargo, se ha demostrado que inclusiones de 1000 a 3000mg/kg tienen efectos positivos en el consumo de alimento, posiblemente mediado por la regulación de hormonas de la saciedad y el hambre, al mismo tiempo se han reportado mejoras en el crecimiento, la morfología intestinal, la respuesta antinflamatoria y reducción en el deterioro de la barrera intestinal (Bonetti et al., 2021).

Debido a su relación con la resistencia antimicrobiana y la evidente contaminación ambiental causada por trazas del mineral encontradas en heces de diferentes especies; surgen tecnologías como las nanopartículas, el cloruro de zinc tetrabásico y el zinc poroso que mejoran la biodisponibilidad del zinc como aditivo en las dietas de los cerdos y reducen la excreción (Lei et al., 2022).

Péptidos antimicrobianos

Son oligopéptidos (6 - 100 aminoácidos) producidos por diferentes organismos animales o vegetales, que juegan un papel importante en la línea de defensa del sistema inmune del hospedador contra bacterias, virus y hongos (Silveira et al., 2021). La acción bactericida se basa en la capacidad de atacar la membrana plasmática, alterando la estructura y funcionalidad de la misma con mecanismos como la electroporación, despolarización, engrosamiento o adelgazamiento de la membrana, etc. Adicionalmente, se sabe que los péptidos pueden alterar la síntesis de ADN, ARN y de proteínas, generando muerte de las bacterias (Xiao et al., 2015).

En cerdos, dosis de 0.01% de péptidos mejoran el crecimiento de los lechones, modulan el sistema inmune, especialmente la producción de IgA secretora y del sistema inmune adaptativo, y mejoran la morfología intestinal aumentando la altura de la vellosidad debido a su actividad antimicrobiana frente a bacterias como *Escherichia coli* (Xu et al., 2020).

Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que se encuentran de forma normal en el ambiente (10^{31} partículas de fagos) con genoma de tipo ADN o ARN encapsulado que tiene la capacidad de infectar las bacterias específicas y replicarse dentro de ellas para causar la muerte de estas. Se clasifican según su ciclo de vida en ciclo líticos o ciclo lisogénico. En los ciclos líticos, tras la infección lisan la bacteria y expulsan fagos para continuar el proceso de infección; mientras que en el ciclo lisogénico tras la infección inician un mecanismo de dormancia dentro del ADN o ARN de la bacteria hasta que un cambio en el medio celular reactive el fago (Żbikowska et al., 2020).

Los cocteles de bacteriófagos, son la principal forma en la que se incluyen en las dietas para alimentación animal, sin embargo, existe un evidente riesgo que puedan ser portadores de genes de resistencia antimicrobiana (Kahn et al., 2019). Su uso como alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento ha mostrado resultados prometedores debido a su capacidad de disminuir bacterias patógenas objetivo en las primeras 48h post consumo de tratamiento (Desiree et al., 2021).

1.4 Conclusiones

El destete es el evento más estresante en la vida productiva del cerdo, el cual está acompañado por una alta susceptibilidad de lechón a diferentes agresores y agentes patógenos que comprometen su expresión productiva, razón por la cual es común el uso de antibióticos como agentes terapéuticos o como promotores de crecimiento para mejorar los parámetros productivos y mantener la salud intestinal de los lechones. El uso frecuente de estas sustancias ha generado un aumento de poblaciones de bacterias resistentes a los antibióticos más utilizados, razón por la cual se hace necesario encontrar alternativas para reducir el uso de antibióticos sin afectar la productividad. Aditivos como los ácidos orgánicos e inorgánicos, probióticos, prebióticos, fitobióticos, minerales, péptidos antimicrobianos o bacteriófagos han sido utilizados y constante evaluados utilizando diferentes criterios entre los que se cuentan aspectos como la digestibilidad, la integridad

intestinal, el indicadores de inmunidad, evaluación del microbiota y microbioma intestinal, sin embargo, los resultados son variables y altamente dependientes de las condiciones experimentales, por lo que es necesario seguir trabajando para obtener evidencias objetivas del posible reemplazo efectivo para los antibióticos promotores de crecimiento.

1.5 Bibliografía

Aarestrup, F. (2012). Get pigs off antibiotics. *Nature*, *486*, 465–466. https://doi.org/10.1038/486465a.

Adewole, D. I., Kim, I. H., & Nyachoti, C. M. (2016). Gut health of pigs: Challenge models and response criteria with a critical analysis of the effectiveness of selected feed additives - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *29*(7), 909–924. https://doi.org/10.5713/ajas.15.0795

Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S. Y., Ko, H. J., & Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, *39*(9), 677–696. https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002

Anee, I. J., Alam, S., Begum, R. A., Shahjahan, R. M., & Khandaker, A. M. (2021). The role of probiotics on animal health and nutrition. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, *82*(1). https://doi.org/10.1186/s41936-021-00250-x

Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Mohsin, K., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, *11*, 1645–1658. https://doi.org/10.2147/IDR.S173867

Aubry, P., Thompson, J. L., Pasma, T., Furness, M. C., & Tataryn, J. (2017). Weight of the evidence linking feed to an outbreak of porcine epidemic diarrhea in Canadian swine herds. *Journal of Swine Health and Production*, *25*(2), 69–72.

Azad, M. A. K., Gao, J., Ma, J., Li, T., Tan, B., Huang, X., & Yin, J. (2020). Opportunities of prebiotics for the intestinal health of monogastric animals. *Animal Nutrition*, *6*(4), 379–388. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.08.001

Bischoff, S. C. (2011). “Gut health”: A new objective in medicine? *BMC Medicine*, *9*. https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-24

Bonetti, A., Tugnoli, B., Piva, A., & Grilli, E. (2021). Towards zero zinc oxide: Feeding strategies to manage post-weaning diarrhea in piglets. *Animals*, *11*(3), 1–24. https://doi.org/10.3390/ani11030642

Boudry, G., Péron, V., Le Huërou-Luron, I., Lallès, J. P., & Sève, B. (2004). Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and

barrier properties of piglet intestine. *Journal of Nutrition*, *134*(9), 2256–2262. https://doi.org/10.1093/jn/134.9.2256

Broom, L. J., & Kogut, M. H. (2018). Gut immunity: Its development and reasons and opportunities for modulation in monogastric production animals. *Animal Health Research Reviews*, *19*(1), 46–52. https://doi.org/10.1017/S1466252318000026

Campbell, J. M., Crenshaw, J. D., & Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *4*(1), 2–5. https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-19

Cardinal, K. M., Pires, P. G. da S., & Ribeiro, A. M. L. R. (2020). Promotor de crescimento na produção de frangos e suínos. *Pubvet*, *14*(3), 1–6. https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n3a532.1-11

Celi, P., Verlhac, V., Pérez Calvo, E., Schmeisser, J., & Kluenter, A. (2019). Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Animal Feed Science and Technology*, *250*(July 2018), 9–31. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.07.012

Cera, K. R., Mahan, D. C., Cross, R. F., Reinhart, G. A., & Whitmoyer, R. E. (1988). Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *Journal of Animal Science*, *66*(2), 574–584. https://doi.org/10.2527/jas1988.662574x

Cox, E., Loos, M., Coddens, A., Devriendt, B., Melkebeek, V., Vanrompay, D., & Goddeeris, B. M. (2012). Post-weaning E. coli infections in pigs and importance of the immune system. *Association Française de Médecine Vétérinaire Porcine*, *December*, 1–13.

Cromwell, G. L. (2002). Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology*, *13*(1), 7–27. https://doi.org/10.1081/ABIO-120005767

de Groot, N., Fariñas, F., Cabrera-Gómez, C. G., Pallares, F. J., & Ramis, G. (2021). Weaning causes a prolonged but transient change in immune gene expression in the intestine of piglets. *Journal of Animal Science*, *99*(4), 1–12. https://doi.org/10.1093/jas/skab065

Desiree, K., Mosimann, S., & Ebner, P. (2021). Efficacy of phage therapy in pigs: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Animal Science*, *99*(7), 1–11. https://doi.org/10.1093/jas/skab157

Dibner, J. J., & Buttin, P. (2002). Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *Journal of Applied Poultry Research*, *11*(4), 453–463. https://doi.org/10.1093/japr/11.4.453

Duarte, M. E., & Kim, S. W. (2022). Intestinal microbiota and its interaction to intestinal health in nursery pigs. *Animal Nutrition*, *8*(1), 169–184. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.05.001

Ducatelle, R., Goossens, E., De Meyer, F., Eeckhaut, V., Antonissen, G., Haesebrouck, F., & Van Immerseel, F. (2018). Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: Present status and future perspectives. *Veterinary Research*, *49*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s13567-018-0538-6

Eurell, J. A. C. (2004). *VETERINARY HISTOLOGY*. Teton NewMedia.

Ewing, W. N. (2008). *The Living gut* (L. A. Tucker, Ed.; 2nd ed.). Nottingham University Press.

Fairbrother, J. M., & Nadeau, É. (2019). Colibacillosis. In J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, & J. Zhang (Eds.), *Diseases of Swine* (Eleventh). John Wiley and Sons.

Fairbrother, J. M., Nadeau, É., & Gyles, C. L. (2005). Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*, *6*(1), 17–39. https://doi.org/10.1079/ahr2005105

Fan, M. Z., Adeola, O., Asem, E. K., & King, D. (2002). Postnatal ontogeny of kinetics of porcine jejunal brush border membrane-bound alkaline phosphatase, aminopeptidase N and sucrase activities. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *132*(3), 599–607. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00102-2

Freitag, M. (2009). Organic Acids ansd Salts Promote Performance and Health in Animal Husbandry. In C. Lückstädt (Ed.), *Acidifiers in Animal Nutrition* (First, pp. 1–85). Nottingham University Press.

García, G. R., Dogi, C. A., Ashworth, G. E., Berardo, D., Godoy, G., Cavaglieri, L. R., de Moreno de LeBlanc, A., & Greco, C. R. (2016). Effect of breast feeding time on physiological, immunological and microbial parameters of weaned piglets in an

intensive breeding farm. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *176*, 44–49. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.009

Gaskins, H. R., Collier, C. T., & Anderson, D. B. (2002). Antibiotics as growth promotants: Mode of action. *Animal Biotechnology*, *13*(1), 29–42. https://doi.org/10.1081/ABIO-120005768

Gilani, S., Howarth, G. S., Kitessa, S. M., Tran, C. D., Forder, R. E. A., & Hughes, R. J. (2017). New biomarkers for increased intestinal permeability induced by dextran sodium sulphate and fasting in chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *101*(5), e237–e245. https://doi.org/10.1111/jpn.12596

Grand View Research. (2022). Animal Feed Additives Market Size, Share & Trends Analysis Report by Product (Antibiotic, Vitamin, Antioxidant), By Livestock (Poultry, Pork, Cattle, Aquaculture), By Region, And Segment Forecasts, 2022 – 2030. https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/animal-feed-additives-market

Grashorn, M. A. (2010). Use of phytobiotics in broiler nutrition - An alternative to infeed antibiotics? *Journal of Animal and Feed Sciences*, *19*(3), 338–347. https://doi.org/10.22358/jafs/66297/2010

Gresse, R., Durand, F. C., Dunière, L., Blanquet-Diot, S., & Forano, E. (2019). Microbiota composition and functional profiling throughout the gastrointestinal tract of commercial weaning piglets. *Microorganisms*, *7*(9). https://doi.org/10.3390/microorganisms7090343

Guarino, M. P. L., Altomare, A., Emerenziani, S., Di Rosa, C., Ribolsi, M., Balestrieri, P., Iovino, P., Rocchi, G., & Cicala, M. (2020). Mechanisms of action of prebiotics and their effects on gastro-intestinal disorders in adults. *Nutrients*, *12*(4), 1–24. https://doi.org/10.3390/nu12041037

Hampson, D. J. (1986). Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in Veterinary Science*, *40*(1), 32–40. https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)30482-x

Han, Y., Zhan, T., Tang, C., Zhao, Q., Dansou, D. M., Yu, Y., Barbosa, F. F., & Zhang, J. (2021). Effect of Replacing in-Feed Antibiotic Growth Promoters with a Combination of Egg Immunoglobulins and Phytomolecules on the Performance, Serum Immunity, and Intestinal Health of Weaned Pigs Challenged with Escherichia coli K88. *Animals*, *11*(1292), 1–13. https://doi.org/10.3390/ani11051292

Hedemann, B., Højsgaard, S., & Jensen, B. (2003). Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.*, *87*, 32–41. https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2003.00405.x

Hu, C. H., Xiao, K., Luan, Z. S., & Song, J. (2013). Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. *Journal of Animal Science*, *91*(3), 1094–1101. https://doi.org/10.2527/jas.2012-5796

Hung, Y. T., Hu, Q., Faris, R. J., Guo, J., Urriola, P. E., Shurson, G. C., Chen, C., & Saqui-salces, M. (2020). Analysis of gastrointestinal responses revealed both shared and specific targets of zinc oxide and carbadox in weaned pigs. *Antibiotics*, *9*(8), 1–17. https://doi.org/10.3390/antibiotics9080463

Huting, A. M. S., Middelkoop, A., Guan, X., & Molist, F. (2021). Using nutritional strategies to shape the gastro-intestinal tracts of suckling and weaned piglets. *Animals*, *11*(2), 1–37. https://doi.org/10.3390/ani11020402

Kahn, L. H., Bergeron, G., Bourassa, M. W., De Vegt, B., Gill, J., Gomes, F., Malouin, F., Opengart, K., Ritter, G. D., Singer, R. S., Storrs, C., & Topp, E. (2019). From farm management to bacteriophage therapy: strategies to reduce antibiotic use in animal agriculture. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1441*(1), 31–39. https://doi.org/10.1111/nyas.14034

Kerrola, K. (1995). Literature review: Isolation of essential oils and flavor compounds by dense carbon dioxide. *Food Reviews International*, *11*(4), 547–573. https://doi.org/10.1080/87559129509541061

Kim, B., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(12), 2089–2093. https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027

Kim, J., Hansen, C., Mullan, B., & Pluske, J. (2012). Nutrition and pathology of weaner pigs: Nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. *Animal Feed Science and Technology*, *173*(1–2), 3–16. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.022

Kim, K., He, Y., Jinno, C., Kovanda, L., Li, X., Song, M., & Liu, Y. (2021). Trace amounts of antibiotic exacerbated diarrhea and systemic inflammation of weaned pigs infected

with a pathogenic Escherichia coli. *Journal of Animal Science*, *99*(3), 1–13. https://doi.org/10.1093/jas/skab073

Kim, K., Song, M., Liu, Y., & Ji, P. (2022). Enterotoxigenic Escherichia coli infection of weaned pigs: Intestinal challenges and nutritional intervention to enhance disease resistance. *Frontiers in Immunology*, *13*(885253), 1–15. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.885253

Kim, Y., Kil, D., Oh, H. K., & Han, I. K. (2005). Acidifier as an alternative material to antibiotics in animal feed. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *18*(7), 1048–1060. https://doi.org/10.5713/ajas.2005.1048

Kogut, M. H., & Arsenault, R. J. (2016). Editorial: Gut health: The new paradigm in food animal production. *Frontiers in Veterinary Science*, *3*(AUG), 10–13. https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00071

Lærke, H. N., & Hedemann, M. S. (2012). The digestive system of the pig. In K. E. B. Knudsen, N. J. Kjeldsen, H. D. Poulsen, & B. B. Jensen (Eds.), *Nutritional physiology of pigs - Online Publication. ed.* Videncenter for Svineproduktion.

Lallès, J. P., Bosi, P., Smidt, H., & Stokes, C. R. (2007). Weaning - A challenge to gut physiologists. *Livestock Science*, *108*(1–3), 82–93. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.091

Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. *Public Health Reports*, *127*(1), 4–22. https://doi.org/10.1177/003335491212700103

Lei, X. J., & Kim, I. H. (2018). Low dose of coated zinc oxide is as effective as pharmacological zinc oxide in promoting growth performance, reducing fecal scores, and improving nutrient digestibility and intestinal morphology in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, *245*, 117–125. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.06.011

Lei, X. J., Liu, Z. Z., Park, J. H., & Kim, I. H. (2022). Novel zinc sources as antimicrobial growth promoters for monogastric animals: a review. *Journal of Animal Science and Technology*, *64*(2), 187–196. https://doi.org/10.5187/jast.2022.e1

Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., & Yeung, S. (2019). Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Veterinary and Animal Science*, *7*(April). https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058

Liao, S. F., & Nyachoti, M. (2017). Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition*, *3*(4), 331–343. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.007

Li, J. (2017). Current status and prospects for in-feed antibiotics in the different stages of pork production - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *30*(12), 1667–1673. https://doi.org/10.5713/ajas.17.0418

Liu, X., Liu, Q., Cheng, Y., Liu, R., Zhao, R., Wang, J., Wang, Y., Yang, S., & Chen, A. (2022). Effect of Bacterial Resistance of Escherichia coli From Swine in Large-Scale Pig Farms in Beijing. *Frontiers in Microbiology*, *13*(March), 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.820833

Liu, Y., Espinosa, C. D., Abelilla, J. J., Casas, G. A., Lagos, L. V, Lee, S. A., Kwon, W. B., Mathai, J. K., Navarro, D. M. D. L., Jaworski, N. W., & Stein, H. H. (2018). Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. *Animal Nutrition*, *4*(2), 113–125. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.007

Liu, Y., Song, M., Che, T. M., Lee, J. J., Bravo, D., Maddox, C. W., & Pettigrew, J. E. (2014). Dietary plant extracts modulate gene expression profiles in ileal mucosa of weaned pigs after an Escherichia coli infection. *Journal of Animal Science*, *92*(5), 2050–2062. https://doi.org/10.2527/jas.2013-6422

Lourenco, J. M., Hampton, R. S., Johnson, H. M., Callaway, T. R., Jr, M. J. R., & Azain, M. J. (2021). The Effects of Feeding Antibiotic on the Intestinal Microbiota of Weanling Pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*(March), 1–12. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.601394

Luppi, A. (2017). Swine enteric colibacillosis: Diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Management*, *3*, 1–18. https://doi.org/10.1186/s40813-017-0063-4

Main, R. G., Dritz, S. S., Tokach, M. D., Goodband, R. D., & Nelssen, J. L. (2005). Effects of weaning age on growing-pig costs and revenue in a multi-site production system. *Journal of Swine Health and Production*, *13*(4), 189–197.

Mair, K. H., Sedlak, C., Käser, T., Pasternak, A., Levast, B., Gerner, W., Saalmüller, A., Summerfield, A., Gerdts, V., Wilson, H., & Meurens, F. (2014). *The porcine innate immune system: An update*. *January*. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.022

Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, *10*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0

Maron, D. F., Smith, T. J. S., & Nachman, K. E. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: An international regulatory and economic survey. *Globalization and Health*, *9*(1). https://doi.org/10.1186/1744-8603-9-48

Ma, X. K., Shang, Q. H., Wang, Q. Q., Hu, J. X., & Piao, X. S. (2019). Comparative effects of enzymolytic soybean meal and antibiotics in diets on growth performance, antioxidant capacity, immunity, and intestinal barrier function in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, *248*(July 2018), 47–58. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.12.003

Ming, D., Wang, W., Huang, C., Wang, Z., Shi, C., Ding, J., Liu, H., & Wang, F. (2021). Effects of weaning age at 21 and 28 days on growth performance, intestinal morphology and redox status in piglets. *Animals*, *11*(8), 1–12. https://doi.org/10.3390/ani11082169

Modina, S. C., Aidos, L., Rossi, R., Pocar, P., Corino, C., & Di Giancamillo, A. (2021). Stages of gut development as a useful tool to prevent gut alterations in piglets. *Animals*, *11*(5), 1–11. https://doi.org/10.3390/ani11051412

Moeser, A. J., Pohl, C. S., & Rajput, M. (2017). Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Animal Nutrition*, *3*(4), 313–321. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.003

Mohammadi Gheisar, M., & Kim, I. H. (2018). Phytobiotics in poultry and swine nutrition–a review. *Italian Journal of Animal Science*, *17*(1), 92–99. https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1350120

Mo, K., Li, J., Liu, F., Xu, Y., Huang, X., & Ni, H. (2022). Superiority of Microencapsulated Essential Oils Compared With Common Essential Oils and Antibiotics: Effects on the Intestinal Health and Gut Microbiota of Weaning Piglet. *Frontiers in Nutrition*, *8*(January), 1–14. https://doi.org/10.3389/fnut.2021.808106

Murugesan, G. R., Ledoux, D. R., Naehrer, K., Berthiller, F., Applegate, T. J., Grenier, B., Phillips, T. D., & Schatzmayr, G. (2015). Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poultry Science*, *94*(6), 1298–1315. https://doi.org/10.3382/ps/pev075

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, *6*(12), 1451–1474. https://doi.org/10.3390/ph6121451

Nguyen, D. H., Seok, W. J., & Kim, I. H. (2020). Organic acids mixture as a dietary additive for pigs—a review. *Animals*, *10*(6). https://doi.org/10.3390/ani10060952

O'Connor, A. M., Anderson, K. M., Goodell, C. K., & Sargeant, J. M. (2014). Conducting Systematic Reviews of Intervention Questions I: Writing the Review Protocol, Formulating the Question and Searching the Literature. *Zoonoses and Public Health*, *61*(SUPPL1), 28–38. https://doi.org/10.1111/zph.12125

OIE. (2021). Annual Report on Antimicrobia Agents Intender for Use in Animals. In *OIE*.

Olsen, K. M., Gabler, N. K., Rademacher, C. J., Schwartz, K. J., Schweer, W. P., Gourley, G. G., & Patience, J. F. (2018). The effects of group size and subtherapeutic antibiotic alternatives on growth performance and morbidity of nursery pigs: a model for feed additive evaluation 1. *Translational Animal Science*, *2*, 298–310. https://doi.org/10.1093/tas/txy068

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2019.AntimicrobialResistance. (Consultado en Noviembre 15 de 2019). [En línea]. Disponible en: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/

Omonijo, F. A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., & Yang, C. (2018). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, *4*(2), 126–136. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001

Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., … Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *The BMJ*, *372*. https://doi.org/10.1136/bmj.n71

Pasick, J., Berhane, Y., Ojkic, D., Maxie, G., Embury-Hyatt, C., Swekla, K., Handel, K., Fairles, J., & Alexandersen, S. (2014). Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada. *Transboundary and Emerging Diseases*, *61*(5), 397–410. https://doi.org/10.1111/tbed.12269

Pearlin, B. V., Muthuvel, S., Govidasamy, P., Villavan, M., Alagawany, M., Ragab Farag, M., Dhama, K., & Gopi, M. (2020). Role of acidifiers in livestock nutrition and health: A review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *104*(2), 558–569. https://doi.org/10.1111/jpn.13282

Peng, J., Tang, Y., & Huang, Y. (2021). Gut health: The results of microbial and mucosal immune interactions in pigs. *Animal Nutrition*, *7*(2), 282–294. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.01.001

Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *9*(NOV), 1–21. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928

Pluske, J. (2016). Invited review: Aspects of gastrointestinal tract growth and maturation in the pre- and postweaning period of pigs. *Journal of Animal Science*, *94*(7), 399–411. https://doi.org/10.2527/jas2015-9767

Pluske, J., Le Dividich, J., & Verstegen, M. (2003). *Weaning the pig – concepts and consequences*. Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-513-0

Pluske, J. R., Kim, J. C., & Black, J. L. (2018). Manipulating the immune system for pigs to optimise performance. *Animal Production Science*, *58*(4), 666–680. https://doi.org/10.1071/AN17598

Pluske, J., Turpin, D., & Kim, J. (2018). Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Animal Nutrition*, *4*(2), 187–196. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.12.004

Ruckman, L. A., Petry, A. L., Gould, S. A., & Patience, J. F. (2020). The impact of porcine spray-dried plasma protein and dried egg protein harvested from hyper-immunized hens, provided in the presence or absence of subtherapeutic levels of antibiotics in the feed, on growth and indicators of intestinal function and phys. *Translational Animal Science*, 1–16. https://doi.org/10.1093/tas/txaa095

Saito, Y., Sato, T., Nomoto, K., & Tsuji, H. (2018). Identification of phenol- and p-cresol-producing intestinal bacteria by using media supplemented with tyrosine and its metabolites. *FEMS Microbiology Ecology*, *94*(9). https://doi.org/10.1093/femsec/fiy125

San Andres, J. V., Mastromano, G. A., Li, Y., Tran, H., Bundy, J. W., Miller, P. S., & Burkey, T. E. (2019). The effects of prebiotics on growth performance and in vitro immune biomarkers in weaned pigs. *Translational Animal Science*, *3*(4), 1315–1325. https://doi.org/10.1093/tas/txz129

Scholz-Ahrens, K. E., Schaafsma, G., Van den Heuvel, E. G. H. M., & Schrezenmeir, J. (2001). Effects of prebiotics on mineral metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(2 SUPPL.). https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.459s

Silveira, R. F., Roque-Borda, C. A., & Vicente, E. F. (2021). Antimicrobial peptides as a feed additive alternative to animal production, food safety and public health implications: An overview. *Animal Nutrition*, *7*(3), 896–904. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.01.004

Spreeuwenberg, M. A. M., Verdonk, J. M. A. J., Gaskins, H. R., & Verstegen, M. W. A. (2001). Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *Journal of Nutrition*, *131*(5), 1520–1527. https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1520

Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, *5*(6), 463–466. https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177

Suiryanrayna, M. V. A. N., & Ramana, J. V. (2015). A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *6*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s40104-015-0042-z

Sun, Y., & Kim, S. W. (2017). Intestinal challenge with enterotoxigenic Escherichia coli in pigs, and nutritional intervention to prevent postweaning diarrhea. *Animal Nutrition*, *3*(4), 322–330. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.10.001

Su, W., Gong, T., Jiang, Z., Lu, Z., & Wang, Y. (2022). The Role of Probiotics in Alleviating Postweaning Diarrhea in Piglets From the Perspective of Intestinal Barriers. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*(May), 1–12. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.883107

Tariq, H., Sharma, A., Sarkar, S., Ojha, L., Pal, R. P., & Mani, V. (2020). Perspectives for rare earth elements as feed additive in livestock - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *33*(3), 373–381. https://doi.org/10.5713/ajas.19.0242

Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., & Van Boeckel, T. P. (2020). Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. *Antibiotics*, *9*(12), 1–14. https://doi.org/10.3390/antibiotics9120918

Tsukahara, T., & Ushida, K. (2001). Organic Acid Profiles in Feces of Pigs with Pathogenic or Non-Pathogenic Diarrhea. *Journal of Veterinary Medical Science*, *63*(12), 1351–1354. https://doi.org/10.1292/jvms.63.1351

Tugnoli, B., Giovagnoni, G., Piva, A., & Grilli, E. (2020a). From acidifiers to intestinal health enhancers: How organic acids can improve growth efficiency of pigs. *Animals*, *10*(1), 1–18. https://doi.org/10.3390/ani10010134

Tugnoli, B., Piva, A., Sarli, G., & Grilli, E. (2020b). Tributyrin differentially regulates inflammatory markers and modulates goblet cells number along the intestinal tract segments of weaning pigs. *Livestock Science*, *234*(October 2018), 103996. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.103996

Valenzuela-Grijalva, N. V., Pinelli-Saavedra, A., Muhlia-Almazan, A., Domínguez-Díaz, D., & González-Ríos, H. (2017). Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production. *Journal of Animal Science and Technology*, *59*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/s40781-017-0133-9

Van Saun, R. J. (2013). Feeds for Camelids. In *Llama and Alpaca Care: Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health: First Edition* (Issue 1). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2352-6.00010-9

Ventola, Lee. (2015). The Antibiotics Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. *P&T*, *40*(4), 277–283.

Verdile, N., Mirmahmoudi, R., Brevini, T. A. L., & Gandolfi, F. (2019). Evolution of pig intestinal stem cells from birth to weaning. *Animal*, *13*(12), 2830–2839. https://doi.org/10.1017/S1751731119001319

Verdonk, J. M. A. J. (2006). Nutritional strategy affects gut wall integrity in weaned piglets. *Wageningen Institute for Animal Sciences*.

Welcome, M. (2018). *Gastrointestinal physiology. Development, Principles and Mechanisms of Regulation*. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91056-7

Wijtten, P., Meulen, J., & Verstegen, M. (2011a). Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: A review. *British Journal of Nutrition*, *105*(7), 967–981. https://doi.org/10.1017/S0007114510005660

Wijtten, P., Verstijnen, J., Van Kempen, T., Perdok, H., Gort, G., & Verstegen, M. (2011b). Lactulose as a marker of intestinal barrier function in pigs after weaning. *Journal of Animal Science*, *89*(5), 1347–1357. https://doi.org/10.2527/jas.2010-3571

Xiao, H., Shao, F., Wu, M., Ren, W., Xiong, X., Tan, B., & Yin, Y. (2015). The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *6*(1), 1–6. https://doi.org/10.1186/s40104-015-0018-z

Xiong, X., Yang, H. S., Wang, X. C., Hu, Q., Liu, C. X., Wu, X., Deng, D., Hou, Y. Q., Nyachoti, C. M., Xiao, D. F., & Yin, Y. L. (2015). Effect of low dosage of chito-oligosaccharide supplementation on intestinal morphology, immune response, antioxidant capacity, and barrier function in weaned piglets. *Journal of Animal Science*, *93*(3), 1089–1097. https://doi.org/10.2527/jas.2014-7851

Xu, B. C., Fu, J., Zhu, L. Y., Li, Z., Wang, Y. Z., & Jin, M. L. (2020). Overall assessment of antimicrobial peptides in piglets: a set of meta-analyses. *Animal*, *14*(12), 2463–2471. https://doi.org/10.1017/S1751731120001640

Yan, H., Yu, B., Degroote, J., Spranghers, T., Van Noten, N., Majdeddin, M., Van Poucke, M., Peelman, L., De Vrieze, J., Boon, N., Gielen, I., Smet, S. De, Chen, D., & Michiels, J. (2020). Antibiotic affects the gut microbiota composition and expression of genes related to lipid metabolism and myofiber types in skeletal muscle of piglets. *BMC Veterinary Research*, *16*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02592-0

Yin, J., Li, F., Kong, X., Wen, C., Guo, Q., Zhang, L., Wang, W., Duan, Y., Li, T., Tan, Z., & Yin, Y. (2019). Dietary xylo-oligosaccharide improves intestinal functions in weaned piglets. *Food and Function*, *10*(5), 2701–2709. https://doi.org/10.1039/c8fo02485e

Yoo, B. B., & Mazmanian, S. K. (2017). The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity*, *46*(6), 910–926. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.011

Żbikowska, K., Michalczuk, M., & Dolka, B. (2020). The use of bacteriophages in the poultry industry. *Animals*, *10*(5). https://doi.org/10.3390/ani10050872

Zhang, Z. F., & Kim, I. H. (2014). Effects of levan supplementation on growth performance, nutrient digestibility and fecal dry matter content in comparison to apramycin (antibacterial growth promoter) in weanling pigs. *Livestock Science*, *159*, 71–74. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.10.027

Zheng, L., Duarte, M. E., Sevarolli Loftus, A., & Kim, S. W. (2021). Intestinal Health of Pigs Upon Weaning: Challenges and Nutritional Intervention. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*(February), 1–18. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.628258

Capítulo 2: Efecto de la inclusión de una butirina esterificada en reemplazo de un antibiótico promotor de crecimiento (APC) en el rendimiento productivo y en algunos parámetros de salud intestinal en lechones destetados a los 21 días

Introducción

El ácido butírico es uno de los principios activos con alto potencial para ser utilizado como sustituto de los APC, debido a los efectos positivos en la salud intestinal en los animales. El ácido butírico se considera como una fuente de energía para los enterocitos del intestino delgado y grueso, es absorbido por células epiteliales del intestino mediante transportadores de membrana que una vez ingresa a la circulación portal, el ácido butírico alcanza el hígado donde es degradado vía β-oxidación y ciclo de Krebs para producción de ATP (adenosín trifosfato) (Hamer et al., 2008; Salvi & Cowles, 2021).

Entre los ácidos grasos de cadena corta, el butírico es conocido como un modificador de la estructura intestinal puesto que incrementa la proliferación, la diferenciación y la maduración y reduce la apoptosis celular (Guilloteau et al., 2010; Le Gall et al., 2009). Además, se ha sugerido que el ácido butírico tiene un efecto inmunomodulador, asociado a su capacidad de activar la respuesta antinflamatoria, al unirse a receptores de la membrana intestinal como la familia GPRC (Receptores acoplados a proteína G); inducir la diferenciación de las células T reguladoras e inhibir la enzima histona deacetilasa (Melaku et al., 2021; Salvi & Cowles, 2021).

Así mismo, el ácido butírico puede tener actividad antimicrobiana frente a enterobacterias como *Salmonella spp*. o *Escherichia coli* lo cual está relacionado con su pKa (4,3), el cual le permite atravesar la membrana celular lipídica de estas bacterias y disociarse en el interior de ellas en aniones y protones, provocando un cambio del pH interno de la bacteria.

En respuesta al aumento de aniones se incrementa la actividad de las ATPasas con el objeto de transportar el exceso de protones al exterior de la célula, generando un gasto exagerado de energía, lo cual lleva a la muerte celular (Barba-Vidal et al., 2017; Namkung et al., 2011).

A pesar de las bondades del ácido butírico, su uso en dietas para lechones es todavía restringido debido a condiciones propias de los productos disponibles como son su volatilidad y fuerte olor, así como la baja liberación en la parte distal del tracto gastrointestinal, debido a su rápida absorción en el intestino delgado, lo que resulta en inconsistencia de los resultados de campo (Tugnoli et al., 2020a). Una reciente tecnología de encapsulación del butirato que consiste en una reacción de esterificación de hasta tres moléculas de ácido butírico y un glicerol permiten que el butirato sea liberado en el intestino delgado por acción de una lipasa incrementando así la disposición de monobutirato o dibutirato en la parte media y posterior del intestino (Bedford & Gong, 2018). Esta encapsulación favorece la estabilidad y la seguridad en el manejo del producto y permiten una entrega dirigida del principio activo en el lugar objetivo a nivel intestinal (Öztürk & Temiz, 2018; Tugnoli et al., 2020b).

Estas nuevas estrategias para potencializar los efectos ya documentados del ácido butírico en lechones requieren ser evaluadas en condiciones naturales de granja. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de adicionar butirinas esterificadas a una dieta de preiniciación, en los parámetros productivos y de salud intestinal (scores de consistencia fecal, morfología intestinal y colonización de *Escherichia coli)* en lechones destetados a 21 días edad.

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1 Animales, alojamiento y alimentación

Los procedimientos utilizados en el presente experimento fueron aprobados por el Comité de Bioética (CB-FMVZ-UN-022-2022) de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá.

Se utilizaron 96 lechones destetos (48 hembras y 48 machos) de un cruce terminal (PIC410® ×Hyporc®), con una edad promedio 21± 0.5 días y peso promedio de 5.8 ± 0.5 kg. Los lechones provenían de camadas de madres de 2 a 8 partos y durante la lactancia fueron manejados con los procedimientos rutinarios establecidos en la granja. Los lechones fueron divididos en 3 periodos consecutivos con 48 lechones en el primer periodo, 24 lechones en el segundo y 24 lechones en el tercero

Los lechones fueron alojados en las instalaciones de la Unidad de Porcinos del Centro Agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia ubicada en Mosquera (Cundinamarca), en una sala dotada con 12 jaulones de 1.2 m x 1.5 m cada uno. En cada jaulón se alojaron 4 lechones de tal forma que cada lechón contó con un área de 0.45 m^2. La temperatura de la sala varió entre 25 y 30°C y fue garantizada durante el periodo experimental, mediante el uso de calefactoras de gas.

Los lechones fueron asignados aleatoriamente (Kim & Lindemann, 2007) a cada jaulón y a uno de los tres tratamientos, de tal forma que en el primer grupo se tuvieron 4 repeticiones de cada tratamiento mientras que en los grupos 2 y 3, se tuvieron 2 repeticiones de cada tratamiento, para un total de 8 repeticiones por tratamiento. El jaulón fue la unidad experimental.

Los tratamientos experimentales consistieron en tres dietas diferentes: un control negativo (CN) el cual no contenía antibióticos promotores de crecimiento o butirina esterificada, un control positivo (CP), el cual fue igual al control negativo en cuanto a la inclusión de ingredientes pero incluyó un antibiótico promotor de crecimiento (Avilamicina 0,3kg/Ton) y no incluyó butirinas esterificada, el tercer tratamiento fue igual al control negativo, pero incluyó butirinas esterificadas a la dosis de 2 kg por tonelada en la fase 1 (CN+B). La butirina esterificada era de origen comercial con una concentración de ácido butírico del 44%, para un total agregado en la dieta de 0.88 Kg/Ton. La dieta fue formulada para cubrir

los requerimientos nutricionales para lechones de la edad y peso reportados en el (NRC, 2012). La composición de la dieta se muestra en la tabla 2-1. Para garantizar la homogenización de los aditivos en las dietas, estos se adicionaron a expensas del maíz, en una premezcla que luego se adicionó a la mezcla final, las tres dietas fueron mezcladas durante 7 minutos. Los lechones tuvieron agua potable constantemente y fueron alimentados a voluntad por un periodo de 14 días.

Tabla 2-1. Composición nutricional de la dieta la dieta fase 1 (1-14 días, pos-destete)[1]

Ingredientes, %	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	CN + BUTIRINA ESTERIFICADA
Maíz extruido	44.87	44.90	44.70
Salvado de Trigo	2.00	2.00	2.00
Lactosa	20.73	20.73	20.73
Torta de Soya	8.00	8.00	8.00
Plasma	6.00	6.00	6.00
Harina de trigo	4.00	4.00	4.00
Gluten 60%	1.52	1.52	1.52
Concentrado soya	5.00	5.00	5.00
Hemoglobina	2.50	2.50	2.50
Aceite de Soya	1.61	1.61	1.61
Fosfato bicálcico	1.34	1.34	1.34
Carbonato de Calcio	0.90	0.90	0.90
Sal	0.10	0.10	0.10
L-Lisina HCl	0.48	0.48	0.48
Dl-Metionina	0.23	0.23	0.23
L-Treonina	0.12	0.12	0.12
L-Triptofano	0.02	0.02	0.02
L-Valina	0.00	0.00	0.00
Vitaminas+minerales	0.12	0.12	0.12
Butirina Esterificada	-	-	0.20
Betaina	0.10	0.10	0.10
Atrapante de toxinas	0.15	0.15	0.15
Saborizante	0.10	0.10	0.10

Cloruro de Colina	0.08	0.08	0.08
Avilamicina	0.03	-	-
Total	100.00	100.00	100.00
Composición			
EM, kcal/kg	3400	3400	3400
Proteína cruda. %*	20.8	21.9	21.2
Extracto etéreo, %*	3.2	3.0	2.8
Cenizas, %*	5.8	5.9	4.9
Ca, %*	1.25	1.21	1.06
P, %*	0.83	0.88	0.89
Na, %	0.49	0.49	0.49
Cl, %	0.66	0.66	0.66
Potasio	0.98	0.98	0.99
Lys digestible, %	1.50	1.50	1.50
Balance electrolítico, mEq	279	279	279
Lactosa, %	17.00	17.00	17.00

*Valores analizados. Los demás valores fueron estimados.
[1] Contiene por kg de dieta: Vitamina A, 8000000 UI; Vitamina D3, 2000000; Niacina, 25000 mg; Vitamina B12, 10000 µg; Ácido pantoténico, 10000 mg; Vitamina E, 4000 UI; Riboflavina, 4000mg; Vitamina K, 3000mg; Piridoxina, 1500 mg; Tiamina, 500 mg; Zinc, 100 g; Hierro 90 g; Manganeso, 50 g; BHT, 20 mg; Cobre, 8 g; Yodo 0.6 g; Selenio 0.2 g; Excipientes c.s.p., 1000 g.

El peso de los lechones fue registrado individualmente al inicio y al final del experimento. La cantidad de alimento ofrecida fue registrada diariamente y la cantidad encontrada en el comedero el último día de la prueba (d14) fue pesada. El consumo de alimento por corral fue calculado como la suma de alimento suministrado menos el residuo. La ganancia diaria de peso fue igual al peso final menos el peso inicial de cada animal dividido el número de días durante el cual fueron alimentados los lechones. La conversión alimenticia fue calculada dividiendo la cantidad de alimento consumida entre la ganancia de peso, para cada jaulón (Zhai et al., 2017).

2.1.2. Análisis químico de las dietas

En cada una de las dietas se determinó el contenido de materia seca (método 930.15), proteína cruda (método 968.06), cenizas (método 942.05), extracto etéreo (método 920.39), calcio (método 968.08) y fósforo (método 965.17); conforme a las metodologías descritas por (AOAC, 2006).

2.1.3. Score fecal

Diariamente se evaluó visualmente la consistencia de la materia fecal en cada corral con una observación de 10 minutos por corral, un observador se encargó de utilizar una escala descriptiva de cinco categorías, donde 1 eran heces normales; 2, heces húmedas; 3 había una diarrea leve, 4 si había diarrea severa y 5 si había una diarrea acuosa. La frecuencia de diarrea en cada corral fue calculada contado los lechones que evidenciaron un score mayor o igual a 3 (Lei & Kim, 2018; Limbach, 2020; Liu et al., 2010; O'Shea et al., 2014).

2.1.4. Morfología intestinal

Al final del experimento (día 14), se seleccionó un lechón de cada jaulón con el peso corporal más cercano al peso promedio y se les aplicó eutanasia utilizando el método de electrocución cabeza-corazón, seguido de exanguinación (American Association Swine Veterinarian, 2016). La cavidad abdominal fue abierta para la toma de muestras. Se colectaron muestras del intestino delgado: yeyuno e íleon, las cuales fueron extendidas en láminas de corcho, fijadas con pines y sumergidas en una solución de formalina al 10% para su conservación y fijación (Casas et al., 2020; Itza-Ortiz et al., 2018; Nabuurs et al., 1993). Las muestras de yeyuno e íleon fueron incluidas en bloques de parafina y cortadas con un microtomo para la elaboración de láminas histológicas, las cuales fueron coloreadas con hematoxilinina y eosina según el protocolo rutinario del laboratorio de histotecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

Para la evaluación de la morfología intestinal las láminas fueron fotografiadas con un aumento de 4x en el microscopio Olimpus CX21, utilizando una cámara digital para microscopio OMAX A3550s. Para la medición de la altura de la vellosidad, profundidad de la cripta, ancho apical y ancho de la base se usó el software Toup view 3.7

(RRID:SCR_017998). En cada lámina se evaluaron 8 campos y se eligieron aleatoriamente 10 vellosidades y 10 criptas que estuvieran completas y en lo posible rectas (Casas et al., 2020; Maneewan et al., 2012). Se registró la altura de la vellosidad, la profundidad de la cripta, el ancho basal y el ancho apical de la vellosidad y con estos datos se calculó el área aparente de las vellosidades (Iji et al., 2001).

2.1.5. pH intestinal

El pH intestinal fue medido en los lechones recién sacrificados realizando una incisión en el yeyuno 30 cm distal al asa sigmoidea del duodeno y en el íleon a 20cm craneal de la válvula ileocecal, utilizando un pH-metro marca OAKTON

2.1.6. Citoquinas pro y antinflamatorias proe

Se tomaron segmentos adicionales de yeyuno y de íleon de cada lechón, los cuales fueron abiertos y lavados con solución salina al 0.9% para remover el contenido intestinal. Posteriormente, se colectaron muestras de mucosa mediante raspado con una lámina portaobjetos de 76 x 25 mm, en tubos criogénicos los cuales fueron almacenados inmediatamente a -80°C, hasta su análisis (Gresse et al., 2019; Wick, 2008).

Posteriormente se realizó la extracción del ARN de todas las muestras mediante el empleo de Trizol (Reagent Ambion®). Las muestras de mucosa fueron descongeladas a temperatura ambiente, se pesó 0.5 g de muestra y se diluyó en 1000 µl de PBS (Phosphate Buffered Saline), se homogenizó la suspensión mediante el empleo del homogeneizador Fisherbrand™ 150. Luego, en un tubo Eppendorf de 1.5ml, se mezclaron 200µl del homogenizado con 750 µl de Trizol y se dejó esta mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos, en seguida, se adicionaron 200µl de cloroformo se mezcló e incubó por 3 minutos, para su posterior centrifugación a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Al centrifugar la muestra se logró la separación de la mezcla en 3 fases: una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una interfase y una fase superior acuosa incolora; esta última fase se transfirió a un nuevo tubo para el aislamiento de ARN. Para la precipitación del ARN, se adicionaron 500µl de isopropanol al 100% y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, luego se

centrifugó a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. El ARN total se precipitó formando un pellet blanco en el fondo del tubo. Luego, se adicionó 1ml de etanol al 75%, posteriormente la mezcla se homogenizó en un vortex y se centrifugó a 7500 g por 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ARN por 7 minutos a temperatura ambiente. Para la solubilización de ARN, el pellet fue re-suspendido en 100 µl de agua molecular libre de ARNasas, y se incubó en baño de maría a 50-60°C por 15 minutos. Finalmente, el ARN se cuantificó en un NanoDrop® ND-1000 (Thermo sientific), y se dejaron todas las muestras a concentraciones inferiores de 800 ng/µl. El ARN fue congelado a -70°C para su posterior uso (Rio et al., 2010; Thermo Fisher Scientific, 2016).

Síntesis de DNAc con RT-PCR y cuantificación de DNA con q-PCR

La síntesis de DNA complementario, cDNA, se realizó con el kit "High capacity cDNA reverse transcription" (Applied Biosystem®). Los volúmenes y las concentraciones de los reactivos son los recomendados por la casa comercial (Tabla 2-2). Las síntesis de cDNA se realizó en el termociclador (BIORAD) y las condiciones fueron un ciclo a 25°C por 10 minutos, un ciclo a 37°C por 120 minutos, 1 ciclo a 85°C por 5 minutos. Finalmente, el cDNA fue cuantificado y almacenado a -20° C para usos posteriores.

Tabla 2-2. Reactivos empleados en la RT-PCR para la obtención de DNAc de muestras de mucosa

Reactivos	Concentración por muestra	Volumen por muestra, µl
Random Primers	1x	2
MVL-RT polimerasa[a]	2U	1
dNTPs[b]	4Mm	0,8
Buffer	1x	2
RNAse inhibitor	1U	1
Agua	No aplica	3,2
RNA	500-800ng	10

[a] MVL-TR: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
[b] dNTPs: Deoxynucleoside triphosphate

Para la amplificación y cuantificación de DNAc (qPCR) se usó el kit SsoAdvanced ™ Universal SYBR® Green Supermix (BIORAD). Los genes porcinos cuantificados fueron TNF- α, IL-6, IL-1β, IL-10, ZO y CLA. El gen de β-actina se usó para la normalización de la prueba. Los primers y las concentraciones de los reactivos utilizados para la qPCR se presentan en la tabla 2-3 y 2-4, respectivamente. El control negativo de la prueba fue agua molecular y los controles positivos para cada gen fueron sintetizados artificialmente por GeneArt Gen Synthesis®, (Thermo scientifc). La amplificación se realizó en el equipo LightCycler®480 de Roche con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 57°C por 15 segundos y 72°C por 2 segundos donde se adquiere la fluorescencia. Finalmente, para eliminar la inespecificidad se corrió un ciclo de temperatura melting entre 70 a 90°C. Todas las muestras, los controles positivos y los controles negativos se amplificaron por duplicado.

Tabla 2-3. Secuencias de los primers utilizados en muestras de mucosa.

Genes	Secuencia	Tamaño, pb	Referencia
TNF-α	F: CCAATGGCAGAGTGGGTATG R: TGAAGAGGACCTGGGAGTAG	116	(Droessler et al., 2021)
IL-6	F: ATCAGGAGACCTGCTTGATG R: TGGAGATGGCTTTGTCTGGATTC	177	(Wang et al., 2018)
IL-1β	F: AGAAGAGCCCATCGTCCTTG R: GAGAGCCTTCAGCTCATGTG	139	(Shifflett et al., 2004)
IL-10	F: GGTTGCCAAGCCTTGTCAG R: AGGCACTCTTCACCTCCTC	202	(Kruse et al., 2008)
Claudin-3	F: GCCAAAGCCAAGATCCTCTA R: GTAGTCCTTGCGGTCGTAGG	87	(Feng et al., 2018)
Zonula Occludens	F: GCCATCCACTCCTGCCTAT R: CGGGACCTGCTCATAACTTC	133	(Feng et al., 2018)
β -actina	F: CAGGTCATCACCATCGGCAACG R: GACAGCACCGTGTTGGCGTAGAGGT	164	XM_021086047

Tabla 2-4. Reactivos empleados en la qPCR para la cuantificación de genes porcinos

Reactivos	concentración por muestra	Volumen por muestra, µl
Buffer	1x	10
Primer forward	0.5µm	0.2
Primer reverse	0.5µm	0.2
Agua	No aplica	7.6

2.1.7. Recuento de *Escherichia coli* y coliformes

Se colectó un pool de materia fecal de cada jaulón, los días 0, 7 y 14. Las muestras fueron tomadas en bolsas Whirl pack de 4 Oz estériles, directamente del recto de los lechones mediante estimulación directa. Una vez colectada la muestra, la bolsa fue sellada, refrigerada a -4°C y transportada inmediatamente al laboratorio para el procesamiento.
Al llegar al laboratorio se tomó 1g del pool de heces al cual se le adicionaron 9ml de agua peptonada, se mezcló y se realizaron 6 diluciones seriadas de 1ml hasta $1x10^{-6}$ para permitir el recuento de colonias. En seguida se transfirió 1ml de cada dilución decimal en una caja de Petri con agar para coliformes cromogénicos (Neogen®), el cual, permitió detectar simultáneamente colonias de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes; su diferenciación se realizó basados en una reacción cromática, donde *Escherichia coli* aparecerá de color azul a violeta y las bacterias coliformes de rosado a rojo. Después se invirtieron las cajas preparadas y se incubaron a 37°C por 24h (ICONTEC, 2005).

Para el recuento de colonias se seleccionaron cajas que contuvieran entre 15 a 150 colonias, se contaron solo colonias que fueran circulares, sin partes blanquecinas y que correspondan al color azul a violeta para *Escherichia coli* y rosado a rojo para coliformes (ICONTEC, 2018). El número de colonias se estableció según lo indicado en el NTC 4458-2018.

Para el aislamiento de *Escherichia coli* , se seleccionó una colonia que cumpliera aspectos de forma (circular) y color (azul); para lo cual, esta fue revitalizada en agua peptonada por 18h, seguido por sembrado en agar Mackonkey® a 37°C por 24h, para su posterior

confirmación por pruebas bioquímicas tales como: oxidasa, prueba de indol, glucosa, H2S (TSI), citrato de Simmons, producción de gas, lisina descarboxilasa, movilidad a 36°C fermentación de lactosa y fermentación de sacarosa características para *Escherichia coli*. Se seleccionaron un total de 18 (6 por tratamiento) cepas de *Escherichia coli* presuntivamente enterotoxigénicas escogidas aleatoriamente y se conservaron a 6°C en culturetes Transystem™ (W. Liu et al., 2014).

2.1.8. Detección de factores de virulencia para *Escherichia coli* enterotoxigénica ETEC con PCR Multiplex

La tipificación de las cepas *Escherichia coli ETEC* se realizó utilizando el kit AccuPower® ETEC-Pili 5-Plex PCR de Bioneer, para la identificación del ADN de 5 genes relacionados con fimbrias de adherencia: F4, F5, F6, F18 y F41. Las cepas fueron revitalizadas para su posterior extracción de ADN, según el protocolo de Quick-DNA™ Miniprep Plus de Zymo Research. Para el procedimiento se usó un control de ADN positivo y un control negativo al cual no se le adicionó ADN, la mezcla fue preparada adicionando 3 µl de la muestra y 17 µl de agua desionizada y destilada en cada tubo. La mezcla fue homogenizada y llevada al termociclador Roche® donde se programó la pre-desnaturalización a 95°C por 1 minuto en 1 ciclo, desnaturalización a 95°C por 30 segundos junto con el alineamiento y la extensión a 65°C por 1 minuto y 30 segundos, durante 30 ciclos y la extensión final a 72°C por 5 minutos durante 1 ciclo.

El DNA amplificado se evaluó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2%, donde 5 µl del DNA amplificado fue agregado al gel junto con el marcador, después, el gel de agarosa fue corrido a 150V por 30-40 minutos, por último, el resultado fue comprobado con un trasiluminador de luz azul y el tamaño del amplicón de la muestra fue comparado con los reportados por el kit (Tabla 2-5).

Tabla 2-5. Tamaño del amplicón de 5 genes que codifican para fimbrias

Gen	Tamaño del amplicón, pb
F4	767
F5	439
F6	324
F18	562
F41	182

2.1.9. Análisis estadístico

El estudio se realizó bajo un diseño en bloques completos al azar generalizado, donde la unidad experimental fue el corral (correspondiente a un grupo de 4 cerdos). Las variables zootécnicas respuesta consideradas fueron el peso por animal, el consumo de alimento por animal y la ganancia de peso por animal, la ganancia diaria de peso, el consumo de alimento diario por animal y la conversión alimenticia, el score fecal y el pH intestinal. Adicionalmente, para las variables de morfología intestinal incluyeron la altura de la vellosidad, la profundidad de la cripta, la relación altura de la vellosidad: profundidad de la cripta (AV: PC) y el área aparente de las vellosidades, según lo establecido por (Iji et al., 2001). El modelo utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \mathrm{T}_j + \mathrm{B}_k + (TB)_{jk} + E_{ijk}$$

$$iid$$
$$E_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$$

En donde,

μ es la media general,

T_j es el efecto del j-ésimo tratamiento,

B_k es el efecto del K-ésimo bloque,

$(TB)_{jk}$ es el efecto de interacción en tre el j-ésimo tratamiento y el k-ésimo bloque

E_{ijk} es el error experimental

iid quiere decir idéntica e independientemente distribuido

$N(0, \sigma^2)$ representa la distribución normal o Gaussiana con media 0 y varianza σ^2.

El supuesto de normalidad se comprobó mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Anderson-Darling, la homogeneidad de varianzas y la independencia de errores mediante gráficos de residuales. Las medias de los tratamientos se compararon por pares utilizando el método de Tukey para corregir por multiplicidad, la probabilidad de error tipo 1 utilizada fue 0.05.

La variable score de fecal se empleó para indicar la consistencia de las heces, para lo cual se generó una variable dicotómica que indicara si se presentó o no diarrea y se totalizó el número de eventos de diarrea, donde lechones con diarrea contaban con un score fecal de 3-4 y 5, y lechones sin diarrea con score fecal de 1 o 2. Así se construyó una variable que indicó el número de casos de diarrea observados en el total de 14 evaluaciones en cada corral. Esta variable fue analizada mediante un modelo de regresión logística, el cual corresponde a un modelo lineal generalizado con una función logit como función de enlace que asume distribución Bernoulli (un caso especial de la Binomial) para la observación de cada corral. El predictor lineal del modelo incluyó los efectos fijos de periodo, tratamiento y la interacción tratamiento-periodo. Siendo p la probabilidad de observar un evento de diarrea, esta se modeló como función de los efectos de periodo, tratamiento y su interacción. Así, el componente sistemático del modelo se escribe como:

$$logit(p) = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \mu + \mathrm{T}_j + \mathrm{B}_k + (TB)_{jk}$$

Donde $\ln$ corresponde a la función logaritmo natural y los demás elementos son tal y como se definieron antes. Este modelo puede expresarse de manera equivalente al aplicar la función inversa de logit, conocida como expit, lo que resulta en:

$$p = \frac{1}{1 + \exp\left(-\left(\mu + \mathrm{T}_j + \mathrm{B}_k + (TB)_{jk}\right)\right)}$$

Como se indicó antes, el componente estocástico del modelo corresponde a distribución binomial.

La bondad de ajuste del modelo se evaluó mediante el estadístico chi-cuadrado de Pearson y la desviación encontrando un ajuste satisfactorio. Se encontró un efecto significativo de los tratamientos ($p<0.05$) y se llevaron a cabo pruebas de comparación de

todos los posibles pares de medias empleando el método de Tukey para corregir por multiplicidad.

Las variables de recuento de *Escherichia coli* y coliformes se midieron tres veces durante el experimento en cada corral; por lo tanto, fueron analizadas mediante un modelo de medidas repetidas en el tiempo con las estructuras de covarianza: autorregresiva de orden 1 (AR1), simetría compuesta o intercambiable (SC), no estructurada (NE). En el caso de la estructura AR1, también se consideró un modelo lineal mixto que incluía el efecto aleatorio del corral, para las demás estructuras no se consideró este modelo debido a que esto induce problemas de identificabilidad de la verosimilitud, es decir, no se pueden estimar los componentes de varianza de individuo y del error y, por ello, no es adecuado incluir efecto de corral cuando el error tiene estas estructuras de covarianza. Además, en cada caso se contempló una versión más general de estas estructuras que contempló matrices de covarianza heterogéneas a través de tratamientos. La estimación de componentes de varianza se realizó mediante máxima verosimilitud restringida (MVR).

Como los componentes de varianza se estimaron vía MVR y los efectos fijos de los modelos fueron siempre los mismos, la elección de la estructura de covarianza se hizo empleando los criterios de información de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC), escogiendo los modelos con menores valores de estos índices.

Los datos de recuento se transformaron usando la función Log_{10} debido a que la variable original no mostró una distribución normal según las pruebas de Shapiro-Wilk y Anderson-Darling. El modelo utilizado fue:

donde:

$$Y_{ijkl} = \mu + \mathrm{T}_j + \mathrm{B}_k + (TB)_{jk} + T_k + \ E_{ijk}$$

$$E_{ijk} \overset{iid}{\sim} N(0, \sigma^2)$$

En donde,

μ es la media general,

T_j es el efecto del j-ésimo tratamiento,

B_k es el efecto del K-ésimo bloque,

$(TB)_{jk}$ es el efecto de interacción entre el j-ésimo tratamiento y el k-ésimo bloque,

T_k es el efecto fijo del l-ésimo tiempo de medición (0, 7, 14 días),

E_{ijkl} es el error experimental

iid quiere decir idéntica e independientemente distribuido

$N(0, \sigma^2)$ representa la distribución normal o Gaussiana con media 0 y varianza σ^2.

Las medias de cada tratamiento se compararon por pares utilizando el método de Tukey para corregir por multiplicidad, la probabilidad de error tipo 1 que se manejó fue 0.05. Todos los análisis se realizaron empleando el programa SAS.

La expresión de genes de citoquinas pro y antinflamatorias se analizó por el método de la cuantificación relativa, donde los datos fueron normalizados utilizando el gen de β-actina como referencia; la expresión relativa de cada muestra se calculó con el método ΔCt (Livak & Schmittgen, 2001). La validación del gen de la β-actina se hizo utilizando la prueba de Kruskal Wallis aplicada a los valores de Ct obtenido entre los grupos. Adicionalmente, se realizó una correlación de Spearman entre los valores de expresión de citoquinas y la morfología intestinal.

2.2. Resultados

Parámetros Zootécnicos y score fecal

No se registró mortalidad de lechones en ninguno de los grupos experimentales. Los parámetros zootécnicos obtenidos se presentan en la tabla 2-6. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (P>0.05) en los parámetros de rendimiento productivo evaluados. Sin embargo, el peso final fue numéricamente menor en el control negativo, al igual que la ganancia de peso total por animal y la ganancia diaria promedio. Por su parte, el consumo total de alimento por animal, el consumo de alimento diario por animal y el índice de conversión alimenticia fueron numéricamente menores en los lechones alimentados con el control positivo. La ganancia total fue de 1.85 kg en el control

negativo y de 2kg para los lechones alimentados con la dieta control positivo y con butirina esterifica. De esta manera la ganancia diaria promedio fue de 143 y 144 g en lechones alimentados con el tratamiento control positivo y el tratamiento de butirina esterificada, respetivamente y solamente fue 12 g menor en el control negativo.

La evaluación del score fecal y la frecuencia de diarrea durante los 14 días se presenta en la tabla 2-6 Los lechones alimentados con la dieta que contenía butirina esterificada tuvieron valores de score fecal menores (P<0,05), que los lechones alimentados con la dieta control negativo o el tratamiento control positivo. Así mismo, los lechones alimentados con la dieta control positivo y con butirinas esterificadas presentaron una frecuencia de diarrea menor que los lechones alimentados con la dieta control negativo (P<0,05).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en los valores pH en yeyuno o en el en íleon.

Tabla 2-6. Rendimiento productivo, score fecal y frecuencia de diarrea de lechones destetos a 21 d, alimentados con dietas con APC o butirinas esterificadas

Ítem	Dietas			Error Estándar	*P*-Valor
	Control Positivo	Control Negativo	Control Negativo + Butirina		
Día 0 al día 14 (Fase I)					
Peso Inicial, kg	5,91	5,83	5,92	0,249	0,963
Peso final, kg	7,91	7,68	7,94	0,355	0,859
Ganancia de pesor total	2.00	1.85	2.01	0,215	0,839
Ganancia de peso diaria, Kg	0,143	0,132	0,144	0,015	0,574
Consumo total de alimento por animal, kg	3,37	3,77	3,66	0,215	0.412
Consumo de Alimento diario, Kg	0,241	0,269	0,261	0,015	0,412
Conversión Alimenticia	1,69	1,96	1,84	0,113	0.120
Score fecal[1,2]					
0- 14 días	2.02[a]	2.53[a]	1.84[b]	0.171	0.032
Frecuencia de diarrea[1,2]					
0-14 días, %	26	49	24	0,233	0.0004
pH intestinal					
pH Yeyuno	5,71	5,92	6,21	0,140	0,111
pH Íleon	6,83	7,09	6,59	0,348	0,645

[1]Valores de cada columna representan los estimados de medias de mínimos cuadrados calculados a partir de 8 observaciones.
[2]Observaciones realizadas todos los días durante la fase.
[ab] Letras diferentes indican un p<0.05

Morfología Intestinal

En la tabla 2-7 se muestran los valores obtenidos para las variables de morfología intestinal. Los resultados indicaron que en el yeyuno la altura de las vellosidades de lechones alimentados con dietas que contenían antibióticos tendió a ser mayor (P = 0.057), que la altura de la vellosidad de los lechones alimentados con el control negativo o con la dieta que contenía butirina esterficada. Así mismo, la relación altura de la vellosidad: profundidad de la cripta, fue mayor (P < 0.05) en los lechones del grupo control positivo en comparación con el control negativo o la dieta que contenía butirina esterificada. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para las variables profundidad de la cripta y área aparente de las vellosidades en el yeyuno.

Tabla 2-7. Variables morfométricas en yeyuno e íleon en lechones destetados a 21 días, alimentados con dietas con APC o butirinas esterificadas[1]

Ítem	Dietas			Error Estándar	*P*-Valor
	Control Positivo	Control Negativo	Control Negativo + Butirina		
Yeyuno					
Altura de la Vellosidad, µm	335. 06[a]	296.56[b]	303.56[b]	12.03	0.057
Profundidad de la Cripta, µm	218.52	226.66	235.87	0.019	0.473
Vellosidad/profundidad de Cripta	1.73[a]	1.43[b]	1.47[b]	0.025	0.049
Área aparente de la vellosidad, µm^2	43,411	36,697	35,283	4272	0.385
Íleon					
Altura de la Vellosidad, µm	298.95[a]	247.09[b]	275.71[a]	0.017	0.001
Profundidad de la Cripta, µm	228.02	238.03	225.17	0.021	0.676
Vellosidad/profundidad de Cripta	1.52[a]	1.12[b]	1.46[a]	0.026	0.003
Área aparente de la vellosidad, µm	39,546	32,271	33,833	3753	0.382

[1]Los valores con de 6 lechones por tratamiento.
[ab] Letras diferentes indican un p<0.05

La altura de las vellosidades del íleon y la relación altura de la vellosidad: profundidad de la cripta fueron mayores ($P < 0.05$) en lechones alimentados con el control positivo y el tratamiento que contenía butirina esterificada en comparación con el control negativo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en la variable profundidad de la cripta y el área aparente de la vellosidad del íleon ($P > 0.05$).

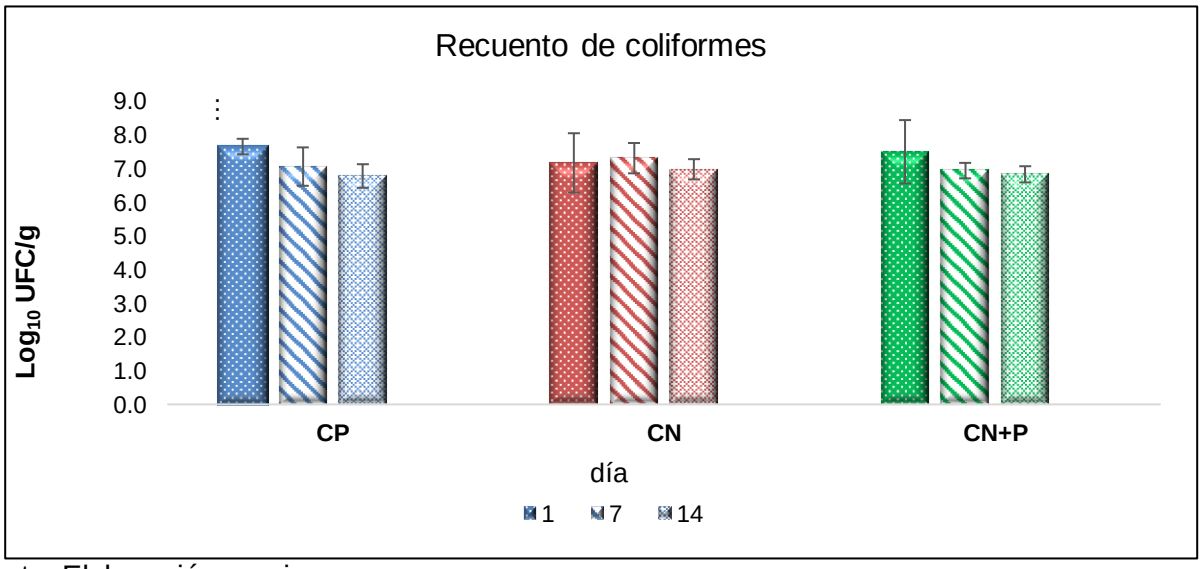
Recuento de coliformes y *Escherichia coli*

El recuento de coliformes y *Escherichia coli* en heces colectadas al destete y a los 7 y 14 días pos-destete se presenta en la Figura 2-1 y 2-2, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para los recuentos de coliformes o *Escherichia coli* ($P > 0.05$). De igual forma no se observó efecto significativo del día de muestreo en los recuentos bacterianos ($P>0.05$).

Se observó que en los lechones alimentados con la dieta que contenía butirina esterificada, el recuento de coliformes disminuyó de 7,5 $\log_{10}$ UFC/g el día del destete a 6,94 $\log_{10}$ UFC/g para el día 7 y a 6,83 $\log_{10}$ UFC/g para el día 14. Así mismo los recuentos de *Escherichia coli* se redujeron progresivamente de 7,15 $\log_{10}$ UFC/g, el día del destete a 5.95 $\log_{10}$ UFC/g, el día 14.

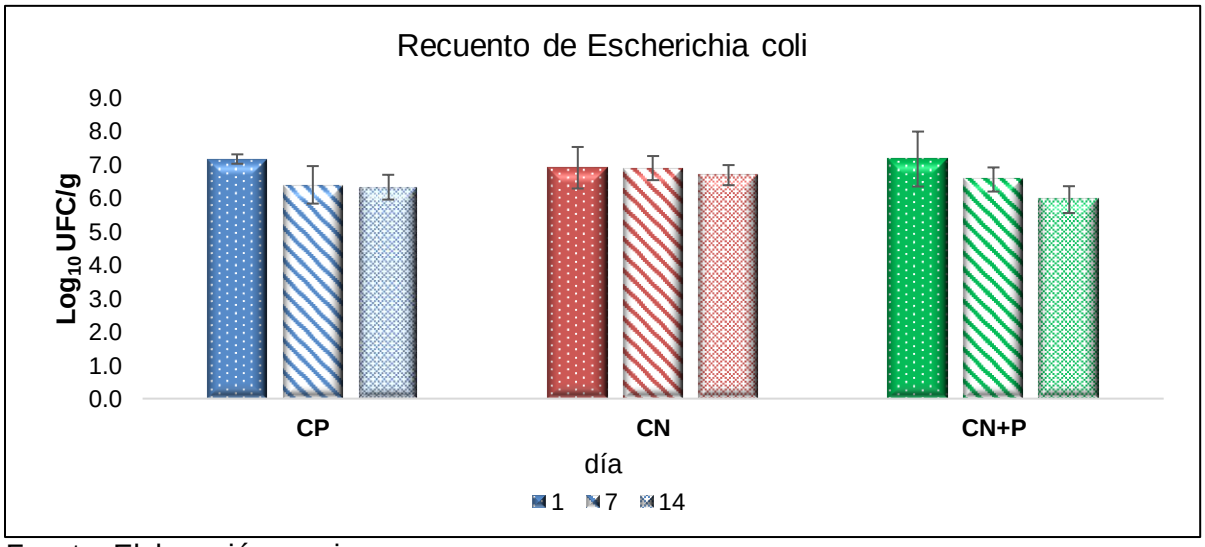
En contraste en el grupo control negativo el recuento de coliformes incrementó para el día 7 y disminuyó levemente en el día 14 y los recuentos de *Escherichia coli* en el grupo control negativo se mantuvieron estables en los 3 días de muestreo. Por su parte, los recuentos de grupo control positivo, solo se redujeron al día 7.

Figura 2-1. Detección de factores de virulencia en *Escherichia coli* enterotoxigénica ETEC Recuento de UFC de coliformes a los 0, 7 o 14d pos-destete en lechones alimentados con dietas con APC (CP), dieta control negativo (CN) o dieta con butirinas esterificadas (CN+TB)



Fuente: Elaboración propia

Figura 2-2. Recuento de UFC de *Escherichia coli* a los 0, 7 o 14 días pos-destete en lechones alimentados con dietas que contiene APC (CP), dieta control negativo (CN) y dieta con butirinas esterificadas (CN+TB)

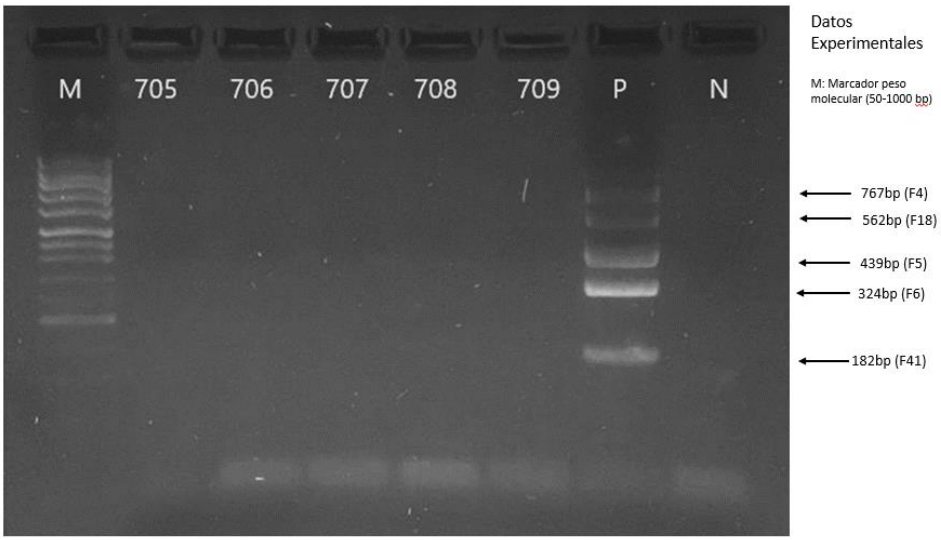


Fuente: Elaboración propia

Detección de factores de virulencia en *Escherichia coli* enterotoxigénica ETEC

No se detectó ADN de ninguno de los cinco genes asociados a factores de virulencia (F4, F5, F6, F18 y F41) en ninguna de 18 cepas de *Escherichia coli* evaluadas provenientes de las heces de los lechones destetados a los 21 días (Figura 2-3).

Figura 2-3. Detección de factores de virulencia en *Escherichia coli* enterotoxigénica ETEC

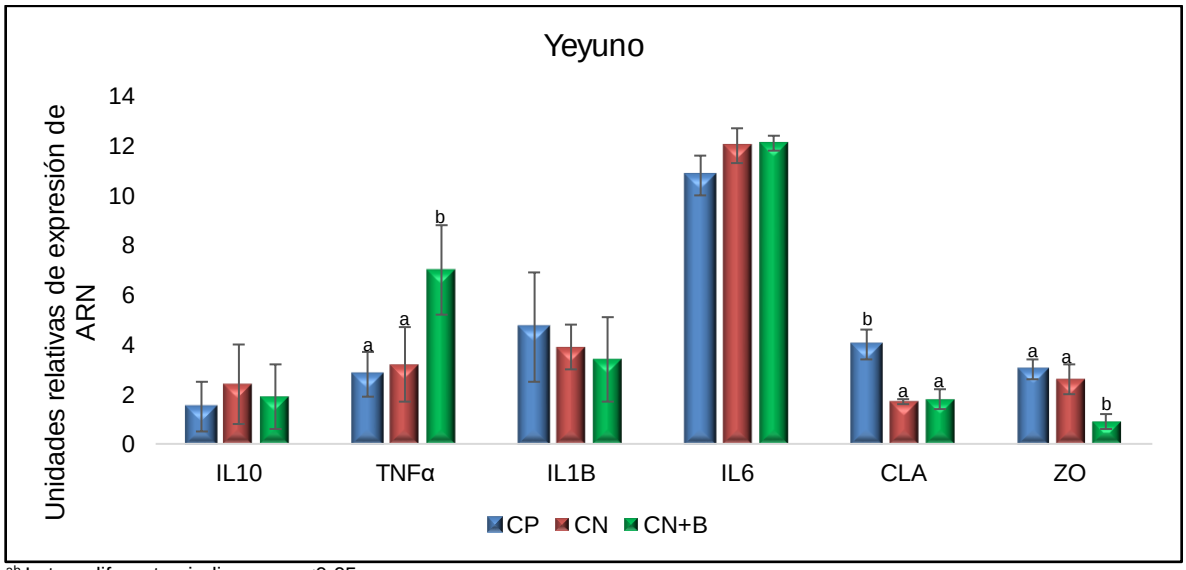


Fuente: Elaboración propia

Expresión de citoquinas pre y antinflamatorias

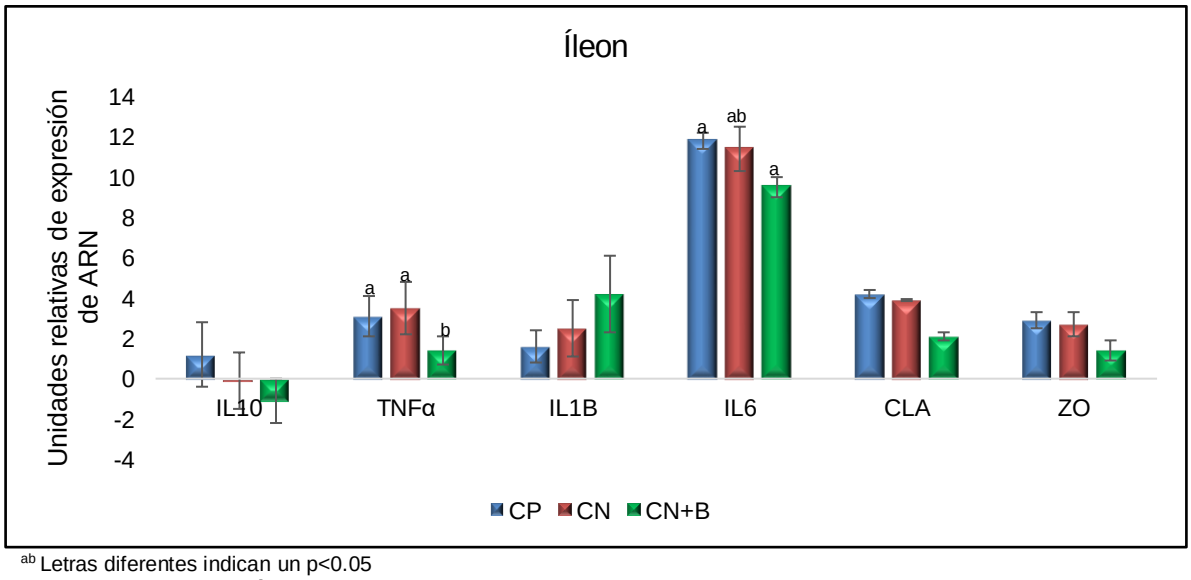
Los niveles de expresión génica (indicado como valores del delta Ct) de TNF-α, IL-1β, IL6 e IL-10, CLA y ZO en yeyuno e íleon se presentan en las figuras 2-4 y 2-5.

Figura 2-4. Niveles de expresión génica de TNF-α, IL-1β, IL6 e IL-10, CLA y ZO en el yeyuno de lechones destetados a 21 días, alimentados con dietas con APC (CP), dietas control negativo (CN) o butirinas esterificadas (CN+B).



[ab] Letras diferentes indican un p<0.05
Fuente: Elaboración propia

Figura 2-5. Niveles de expresión génica de TNF-α, IL-1β, IL6 e IL-10, CLA y ZO en el yeyuno de lechones destetados a 21 días, alimentados con dietas con APC (CP), dietas control negativo (CN) o butirinas esterificadas (CN+B).



[ab] Letras diferentes indican un p<0.05
Fuente: Elaboración propia

En general, en el yeyuno se observó una mayor expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6, TNF-α e IL-1β. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en los valores de delta-Ct, para la expresión de IL-10, IL- 1β e IL6. Sin embargo, la expresión de TNF- α fue mayor ($P < 0.05$) en la mucosa de yeyuno de lechones que consumieron la dieta que contenía butirina esterificada. A pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del TNF- α en lechones alimentados con dietas del control positivo y el control negativo, la expresión de esta citoquina fue 12% más baja en lechones alimentados con el control positivo comparado con la dieta que contenía la butirina esterificada.

Para el caso de las proteínas de unión estrecha como claudina (CLA) y Zónula Occludens (ZO) en yeyuno, la expresión de CLA fue mayor ($P < 0.05$) para lechones alimentados con la dieta control positivo, mientras que la expresión ZO fue menor ($P < 0.05$) en los lechones alimentados con la dieta que contenía butirina esterificada.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, en los valores de delta del Ct de IL-10 e IL- 1β en el íleon. Se obtuvieron valores negativos en la expresión de IL-10, lo que indica que los valores del delta del Ct de las muestras evaluadas fueron menores al delta del Ct del gen de referencia beta actina. En contraste, la expresión de TNF-α, en íleon fue menor ($P < 0.05$), en lechones alimentados con la dieta que contenía butirina, en comparación con la dieta control negativo o la dieta control positivo (con antibiótico). Por su parte, la expresión de IL-6, fue menor en lechones alimentados con la dieta que contenía butirina que en aquellos alimentados con la dieta control positivo, sin embargo, esta no fue diferente del control negativo. Para el caso de la expresión de proteínas de unión estrecha en íleon, CLA y ZO, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

2.3. Discusión

Parámetros productivos y score de diarrea

En general, los valores obtenidos en este estudio para las variables zootécnicas se encuentran por debajo de los valores de referencia para la genética (consumo promedio día de 284g, ganancias diarias de 254g, PIC, 2022), lo que podría explicarse en parte por la edad de destete, la falta de adaptación previa al consumo de alimento sólido, así como por la presentación del alimento en harina, factores que son frecuentemente reportados en la literatura como críticos en la etapa de transición del lechón.

El ácido butírico y sus derivados como la tributirina han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento de los lechones en la etapa de precebo al mejorar la ganancia diaria de peso, el consumo de alimento, la eficiencia alimenticia y el peso final (Piva et al., 2002; Sotira et al., 2020; Wang et al., 2019b). Estos efectos se han asociado con una mejora en la digestibilidad de nutrientes (Guilloteau et al., 2010), a un incremento de la hipertrofia muscular como consecuencia de la inhibición de la histona deacetilasa (Murray et al., 2018) y a un aumento de la abundancia de microbiota (McCormack et al., 2017).

Sin embargo, en el presente experimento no se observaron mayores diferencias en los parámetros zootécnicos tras la inclusión de butirina esterificada en las dietas de lechones, lo cual coincide con lo reportado por otros investigadores (Fang et al., 2014; Grilli et al., 2016; Tugnoli et al., 2020b). Es posible que factores como el tiempo de suministro y el porcentaje de inclusión de la butirina puedan explicar diferencias en los parámetros productivos obtenidos en otros estudios (Gu et al., 2017; Sotira et al., 2020; Tugnoli et al., 2020b; Wang et al., 2019b).

Los factores estresantes del destete, como el cambio dieta y el bajo consumo de alimento, conllevan a una atrofia en la vellosidad intestinales y a un desbalance del microbiota que generan un ambiente que propicia la proliferación de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, las cuales se adhieren a la mucosa, liberan enterotoxinas y causan alteración en la permeabilidad, incremento de la secreción de agua y electrolitos,

inflamación, reducción en la absorción de nutrientes, diarrea y deshidratación en los animales (Rhouma et al., 2017)

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la inclusión de una butirina esterificada tiene un efecto positivo en el score de fecal durante las primeras semanas después del destete, lo que concuerda con lo reportado por (Lin et al., 2020; Wang et al., 2019b). Este efecto positivo se puede asociar al efecto del ácido butírico en la integridad de la barrera intestinal, ya que es una fuente de energía para los enterocitos que propicia una rápida recuperación de la mucosa intestinal. Adicionalmente, se ha reportado que la butirina esterficada ayuda a mejorar la expresión de proteínas de unión en la barrera lo que lleva a la disminución de la permeabilidad (Dell'anno et al., 2021; Huang et al., 2015; Ma et al., 2012).

pH Intestinal

El pH intestinal es un importante indicador en la evaluación de la salud intestinal debido a que un bajo pH en el contenido digestivo puede favorecer de la digestibilidad de nutrientes como las proteínas; o impedir la proliferación de bacterias patógenas (Suiryanrayna & Ramana, 2015). En el presente estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el pH intestinal entre los tratamientos, lo que concuerda con reportes previos, en los que lechones alimentados dietas que contenían butirato de sodio, tampoco evidenciaron cambios en el pH intestinal (Manzanilla et al., 2006)

Morfología intestinal

La medición de la altura de la vellosidad, de la profundidad de la cripta y su relación, se ha considerado como un método para evaluar la integridad de membrana y así de la salud intestinal (Ducatelle et al., 2018; Montagne et al., 2007). Los valores de altura de vellosidad en yeyuno reportados previamente están en el rango de 457 µm (Boudry et al., 2004) y 475 µm (de Groot et al., 2021), mientras que en íleon se reportan valores entre 317 y 451µm (Boudry et al., 2004; de Groot et al., 20219). Los valores observados en el presente

estudio fueron menores a los reportados, lo que podría asociarse a un retraso en la recuperación de la morfología intestinal ocasionado por la baja ingesta de alimento que conlleva a una baja absorción de nutrientes y a disminución la renovación de la mucosa (Ming et al., 2021).

Pese a que no se observaron diferencias significativas en los valores de profundidad de la cripta en ninguno de los segmentos, los valores reportados en este estudio fueron más altos que los descritos por (Boudry et al., 2004; de Groot et al., 2021; Ming et al., 2021). Se podría sugerir que los lechones presentaron un aumento de la profundidad de la cripta asociado a un posible aumento de la mitosis celular.

En el presente estudio, se evidenció una mejor respuesta de los lechones alimentados con la dieta que contenía butirina esterificada en el íleon, lo que podría indicar que la liberación lenta de moléculas de ácido butírico podría beneficiar la recuperación de la mucosa de esta sección en mayor proporción que en el yeyuno. Estudios previos han mostrado que las butirinas esterificadas liberan el 5% de ácido butírico en la digestión gástrica y el 75% en el intestino delgado (Donovan et al., 2017).

Recientes investigaciones relacionan el efecto positivo de las butirinas esterificadas con la disminución de los niveles de ROS (especies radioactivas de oxígeno) y del estrés oxidativo causado durante el destete (Cao et al., 2018), lo que se relaciona con una mejora en la funcionalidad de las mitocondrias y en consecuencia un posible aumento de la producción de energía celular que puede ser utilizada para la renovación de los enterocitos (Wang et al., 2019a). Además, se ha encontrado un aumento de la expresión del transportador del ácido butírico MCT1 en lechones alimentados con butirato de sodio, lo que podría mejorar la disponibilidad de energía para la reparación del daño celular tras el destete (Cuff et al., 2002; Yang et al., 2019).

Recuento de coliformes y Escherichia coli

La diarrea posdestete causada por *Escherichia coli*, es la principal causa de mortalidad en el precebo. Se ha reportado que el estrés causado durante el destete aumenta las

cantidades de microbiota en el intestino y que se requieren entre 10^9 a 10^{10} UFC/ *Escherichia coli* ETEC para causar diarrea en esta fase (Sun & Kim, 2017).

En este trabajo no se observaron diferencias significativas en la excreción de coliformes o de *Escherichia coli* entre los tratamientos, este hecho aunado a la estabilidad del pH en el yeyuno, mencionada anteriormente, indica que la butirina esterificada no tuvo un efecto importante como bactericida, lo que coincide con estudios previos, los cuales reportan resultados no concluyentes del efecto del ácido butírico en el control de *Escherichia coli*, (Lu et al., 2008).

Así mismo, en este estudio no se realizó ningún desafío bacteriano y se consideró el destete y el cambio de dieta como desafíos naturales, dado los antecedentes históricos de episodios de diarrea pos-destete en la granja, Sin embargo, se evidenció que este tipo desafío no fue suficiente para causar un aumento de las poblaciones de coliformes y específicamente de *Escherichia coli*, ETEC.

Detección de factores de virulencia en *Escherichia coli* enterotoxigénica ETEC

Las cepas de *Escherichia coli* evaluadas en el presente estudio no expresaron ninguno de los factores de virulencia analizados, lo que indica que los casos de diarrea pueden estar asociados a diferentes patotipos de *Escherichia coli. En este sentido*
demuestra la importancia de ampliar el análisis de las cepas con otros factores de virulencia de, debido a que, aunque se observaron diarreas después del destete, estas no se pueden asociar solamente con la presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica, sino que se debe considerar la presencia de otros agentes entero-patógenos causantes de diarrea. Se ha reportado la prevalencia de diferentes genes de *Escherichia coli* en lechones jóvenes en Estados Unidos con expresión de factores de los siguientes factores de virulencia: F4, STb, paa, LT, EAST1, F18, STa, AIDA-I, STx2e, EAE, F5 y F41 (Zhang et al., 2007)

Citoquinas pre y proinflamatorias y proteínas de unión

Durante el destete, diversos factores estresantes generan una alteración del sistema inmune en el intestino del lechón, que lleva al incremento de citoquinas como TNF- α, IL-1β e IL-6 que promueven la inflamación, la permeabilidad intestinal y por tanto generan ambientes propicios para infección de patógenos (Pié et al., 2004). El Factor de Necrosis Tumoral (TNF-α) es una citoquina con múltiples efectos, que es secretada principalmente por macrófagos, neutrófilos y linfocitos T. Actúa como mediador de la respuesta inflamatoria aguda a través de la atracción de células inmunitarias, de la modulación de proteínas de unión, la necroptosis y la apoptosis celular, mediante vías de señalización como NF- κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, (Leppkes et al., 2014).

Estudios previos han desmostaron que el ácido butírico tiene la capacidad de inhibir la producción de TNF-α, mediante la inhibición de la activación del NF- κB y de la degradación de IκBα (un inhibidor del NF- κB), de las células inmunes (Segain et al., 2000), Adicionalmente, se ha propuesto que puede existir un efecto indirecto del ácido butírico en el eje intestino- hígado, donde el butirato mejora el ciclo del ácido tricarboxilico donde se liberan ciertos metabolitos que inhiben HIF1α (Factor inducible de hipoxia- 1α) y así se desactiva la vía de señalización de NF- κB (Han et al., 2020).

En el presente estudio se evaluó la expresión de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias y antinflamatorias en los segmentos de yeyuno e íleon de lechones de 35 días de edad, que fueron destetados a 21 días. Los lechones alimentados con dietas que contenían butirina esterificada presentaron un incremento de la expresión de TNF-α en la mucosa del yeyuno y una disminución de la expresión en el íleon. Estos resultados coinciden con reportes en los cuales se encontró una menor expresión de TNF-α en íleon y colón tras la inclusión de butirato de sodio en la primera semana pos-destete de lechones destetados a los 21 días (Grilli et al., 2016). Para el caso de yeyuno, los resultados concuerdan con datos previos que relacionan un incremento de la absorción de butirato en

yeyuno con un efecto de maduración celular durante el periodo de transición de los lechones. Este efecto también se ha relacionado con un posible desafío de bacterias patógenas cercano al momento de la toma de muestra de la mucosa (Tugnoli et al., 2020b; Zhong et al., 2019).

La IL1-β tiene un rol en la inflamación y en el daño intestinal, es secretada por macrófagos y células T de tipo Th1 (Al-Sadi & Ma, 2007). En este estudio no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de IL1-β, sin embargo, al igual que en estudios previos, los valores de expresión obtenidos fueron menores en yeyuno en comparación con el íleon. (Liu et al., 2019; Tugnoli et al., 2020b).

La IL-6 se encuentra presente en procesos inflamatorios y es importante para el desarrollo de células Th 17. Los resultados del presente ensayo mostraron diferencias significativas a nivel de íleon, donde los animales alimentados con dietas que contenían butirina esterificada disminuyeron la expresión de IL-6 en los dos segmentos estudiados. Estudios previos han señalado que el butirato de sodio tiene la capacidad de disminuir IL-6 en yeyuno, debido a que suprime la vía de señalización MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), y el inicio de la transcripción de IL-6, asociado con el efecto inhibitorio de histonas deacetilasa (Wang et al., 2018).

Por otro lado, la IL-10 es una citoquina antinflamatoria ya que inhibe otras citoquinas como el TNF α y es producida por linfocitos T reguladores, monocitos y macrófagos (Andrews et al., 2018). El mecanismo por el cual el ácido butírico podría mejorar la expresión de IL-10, no es muy claro, pero se ha evidenciado que altas cantidades de ácido butírico incrementan los receptores de IL-10, en células T84 y Caco-2 y mejoran la integridad de la barrera intestinal (Zheng et al., 2017).

A pesar de que los resultados de este estudio en relación con la expresión de citoquinas no son concluyentes, se podría sugerir que la adición de las butirinas tiene un mayor alcance y efecto en el íleon, donde se presentó una disminución de los efectos proinflamatorios del TNF-α y de IL-6. Así mismo, el incremento de la expresión TNF- α en yeyuno podría estar asociado a procesos de maduración celular del intestino de los

lechones, los cuales durante las primeras dos semanas pos-destete aún se encuentran en proceso de adaptación del sistema inmune (de Groot et al., 2021; Pié et al., 2004).

Se debe reconocer que las citoquinas pueden tener un efecto en la proliferación del epitelio intestinal, este sería el caso de la IL-6, la cual se puede unir a los receptores presentes en la parte basal de la cripta y estimular la proliferación celular en procesos de daño severo del intestino, lo que induce a una recuperación rápida de la estructura (Andrews et al., 2018; Kuhn et al., 2014). Adicionalmente, recientes investigaciones en ratones han mostrado que el microbiota ayuda a regular la producción de IL-6 en los linfocitos intraepiteliales y de esta manera pueden incrementar la permeabilidad paracelular (Kuhn et al., 2018).

Las proteínas de unión estrecha son las principales estructuras que permiten la unión entre los enterocitos, participan en la formación de la barrera intestinal y regulan la permeabilidad paracelular y transcelular (Ghosh et al., 2021). Se encuentran ubicadas en la zona apical-lateral de la membrana, donde se identifican proteínas transmembranales como las Claudinas, Occludinas y Tricelulina, y proteínas citoplasmáticas de la periferia como Zonula Occludens que unen las proteínas del citoesqueleto al complejo de proteínas de unión estrecha (Suzuki, 2020).

En los últimos años diferentes estudios han reportado un efecto del butirato en la permeabilidad de la barrera intestinal en lechones al destete, debido a que participa en la activación de la proteína quinasa activada por AMP (Monofosfato de Adenina) que regulan la expresión de proteínas de unión estrecha (Peng et al., 2009; Xiong et al., 2019).

En el presente estudio se observó que los lechones alimentados con la dieta control positivo presentaron una mayor expresión CLA y ZO, sin embargo, los lechones alimentados con dieta que contenía butirina esterificada la expresión relativa de estos mismos genes fueron menores, lo que concuerda con los hallazgos de Grilli et al., 2016 y Tugnoli et al., 2020b. Este efecto se ha relacionado con el aumento de la expresión de genes de TNF-α, que induce la apoptosis de los enterocitos y la degradación de las proteínas de unión estrecha (Gitter et al., 2000).

2.4. Conclusiones

En el presente estudio, la inclusión de 2 kg/tonelada (0,2%) de butirina esterificada en dietas de preiniciación mejoró la consistencia fecal, redujo la frecuencia de diarrea y tuvo un efecto positivo en la morfología intestinal y en la expresión de citoquinas especialmente en el íleon. Sin embargo, con la adición de butirina esterificada no se observaron cambios significativos en los parámetros productivos o en la excreción de *Eschericia coli* durante los 14 días evaluados.

Los resultados muestran que la inclusión de butirina esterificadas en dietas de preiniciación, bajo las condiciones de este estudio, en el cual solamente se tuvo un desafío natural, asociado a las condiciones de una granja comercial, pueden ser una alternativa que puede llegar a sustituir parcialmente los antibióticos promotores de crecimiento, debido a su efecto benéfico sobre la morfología intestinal y en ciertos aspectos antinflamatorios. Se recomienda realizar nuevas investigaciones que involucren desafíos controlados de bacterias enteropatógenos que permitan generar resultados más consistentes sobre parámetros productivos y otros indicadores de salud intestinal.

2.5. Conclusiones generales

En la industria porcina el pos-destete es una etapa crítica para el desarrollo final del lechón. Un buen manejo de esta etapa es esencial para el desempeño productivo del cerdo en etapas posteriores, por tanto, la investigación de nuevas alternativas que mejoren los parámetros zootécnicos y la salud intestinal son de gran importancia para la industria. La butirina esterificada se presenta como una alternativa prometedora para ser usada en la industria porcina con miras a disminuir la inclusión de antibióticos promotores de crecimiento en las dietas de transición y de preiniciación, ya que favorece la expresión de algunos elementos de la barrera intestinal, especialmente a nivel del íleon.

2.6 Bibliografía

Al-Sadi, M., & Ma, T. Y. (2007). IL-1β Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *J Immunol.*, *178*(7), 4641–4649.

American Association Swine Veterinarian. (2016). On-Farm Euthanasia. In *Pork Checkoff*.

Andrews, C., McLean, M. H., & Durum, S. K. (2018). Cytokine tuning of intestinal epithelial function. *Frontiers in Immunology*, *9*(JUN). https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01270

AOAC. (2006). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. *Aoac*, *February*.

Barba-Vidal, E., Roll, V. F. B., Castillejos, L., Guerra-Ordaz, A. A., Manteca, X., Mallo, J. J., & Martín-Orúe, S. M. (2017). Response to a Salmonella Typhimurium challenge in piglets supplemented with protected sodium butyrate or Bacillus licheniformis: Effects on performance, intestinal health and behavior. *Translational Animal Science*, *1*(2), 186–200. https://doi.org/10.2527/tas2017.0021

Bedford, A., & Gong, J. (2018). Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Animal Nutrition*, *4*(2), 151–159. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.010

Boudry, G., Péron, V., Le Huërou-Luron, I., Lallès, J. P., & Sève, B. (2004). Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *Journal of Nutrition*, *134*(9), 2256–2262. https://doi.org/10.1093/jn/134.9.2256

Cao, S. T., Wang, C. C., Wu, H., Zhang, Q. H., Jiao, L. F., & Hu, C. H. (2018). Weaning disrupts intestinal antioxidant status, impairs intestinal barrier and mitochondrial function, and triggers mitophagy in piglets. *Journal of Animal Science*, *96*(3), 1073–1083. https://doi.org/10.1093/jas/skx062

Casas, G. A., Blavi, L., Cross, T. W. L., Lee, A. H., Swanson, K. S., & Stein, H. H. (2020). Inclusion of the direct-fed microbial Clostridium butyricum in diets for weanling pigs increases growth performance and tends to increase villus height and crypt depth, but does not change intestinal microbial abundance. *Journal of Animal Science*, *98*(1), 1–12. https://doi.org/10.1093/jas/skz372

Cuff, M. A., Lambert, D. W., & Shirazi-Beechey, S. P. (2002). Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *Journal of Physiology*, *539*(2), 361–371. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.014241

de Groot, N., Fariñas, F., Cabrera-Gómez, C. G., Pallares, F. J., & Ramis, G. (2021). Weaning causes a prolonged but transient change in immune gene expression in the intestine of piglets. *Journal of Animal Science*, *99*(4), 1–12. https://doi.org/10.1093/jas/skab065

Dell'anno, M., Reggi, S., Caprarulo, V., Hejna, M., Rossi, C. A. S., Callegari, M. L., Baldi, A., & Rossi, L. (2021). Evaluation of tannin extracts, leonardite and tributyrin supplementation on diarrhoea incidence and gut microbiota of weaned piglets. *Animals*, *11*(6). https://doi.org/10.3390/ani11061693

Donovan, J. D., Bauer, L., Fahey, G. C., & Lee, Y. (2017). In Vitro Digestion and Fermentation of Microencapsulated Tributyrin for the Delivery of Butyrate. *Journal of Food Science*, *82*(6), 1491–1499. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13725

Droessler, L., Cornelius, V., Markov, A. G., & Amasheh, S. (2021). Tumor necrosis factor alpha effects on the porcine intestinal epithelial barrier include enhanced expression of TNF receptor 1. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16). https://doi.org/10.3390/ijms22168746

Ducatelle, R., Goossens, E., De Meyer, F., Eeckhaut, V., Antonissen, G., Haesebrouck, F., & Van Immerseel, F. (2018). Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: Present status and future perspectives. *Veterinary Research*, *49*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s13567-018-0538-6

Fairbrother, J. M., Nadeau, É., & Gyles, C. L. (2005). Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*, *6*(1), 17–39. https://doi.org/10.1079/ahr2005105

Fang, C. L., Sun, H., Wu, J., Niu, H. H., & Feng, J. (2014). Effects of sodium butyrate on growth performance, haematological and immunological characteristics of weanling piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *98*(4), 680–685. https://doi.org/10.1111/jpn.12122

Feng, W., Wu, Y., Chen, G., Fu, S., Li, B., Huang, B., Wang, D., Wang, W., & Liu, J. (2018). Sodium Butyrate Attenuates Diarrhea in Weaned Piglets and Promotes Tight Junction Protein Expression in Colon in a GPR109A-Dependent Manner. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *47*(4), 1617–1629. https://doi.org/10.1159/000490981

Ghosh, S., Whitley, C. S., Haribabu, B., & Jala, V. R. (2021). Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Celullar and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *11*(5), 1463–1482. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.02.007

Gitter, A. H., Bendfeldt, K., Schulzke, J.-D., & Fromm, M. (2000). Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-α-induced single-cell apoptosis. *The FASEB Journal*, *14*(12), 1749–1753. https://doi.org/10.1096/fj.99-0898com

Gresse, R., Durand, F. C., Dunière, L., Blanquet-Diot, S., & Forano, E. (2019). Microbiota composition and functional profiling throughout the gastrointestinal tract of commercial weaning piglets. *Microorganisms*, *7*(9). https://doi.org/10.3390/microorganisms7090343

Grilli, E., Tugnoli, B., Foerster, C. J., & Piva, A. (2016). Butyrate modulates inflammatory cytokines and tight junctions components along the gut of weaned pigs. *Journal of Animal Science*, *94*(7), 433–436. https://doi.org/10.2527/jas2015-9787

Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., & Van Immerseel, F. (2010). From the gut to the peripheral tissues: The multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*, *23*(2), 366–384. https://doi.org/10.1017/S0954422410000247

Gu, Y., Song, Y., Yin, H., Lin, S., Zhang, X., Che, L., Lin, Y., Xu, S., Feng, B., Wu, D., & Fang, Z. (2017). Dietary supplementation with tributyrin prevented weaned pigs from growth retardation and lethal infection via modulation of inflammatory cytokines production, ileal expression, and intestinal acetate fermentation. *Journal of Animal Science*, *95*(1), 226. https://doi.org/10.2527/jas2016.0911

Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. J., & Brummer, R. J. (2008). Review article: The role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *27*(2), 104–119. https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x

Han, Y., Zhao, Q., Tang, C., Li, Y., Zhang, K., Li, F., & Zhang, J. (2020). Butyrate Mitigates Weanling Piglets From Lipopolysaccharide-Induced Colitis by Regulating Microbiota and Energy Metabolism of the Gut–Liver Axis. *Frontiers in Microbiology*, *11*(December). https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.588666

Heo, J. M., Opapeju, F. O., Pluske, J. R., Kim, J. C., Hampson, D. J., & Nyachoti, C. M. (2013). Gastrointestinal health and function in weaned pigs: A review of feeding

strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *97*(2), 207–237. https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01284.x

Huang, C., Song, P., Fan, P., Hou, C., Thacker, P., & Ma, X. (2015). Dietary sodium butyrate decreases postweaning diarrhea by modulating intestinal permeability and changing the bacterial communities in weaned piglets. *Journal of Nutrition*, *145*(12), 2774–2780. https://doi.org/10.3945/jn.115.217406

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y certificación. ICONTEC. (2005). Microbiología de alimentos para animales, Prepearación de muestars para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológico. Parte 1. Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y de diluciones decimales-NTC-4491-1.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y certificación. ICONTEC. (2018). Microbiología de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o Escherichia coli o ambos. Técnicas de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos.

Iji, P. A., Saki, A., & Tivey, D. R. (2001). Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 1. Intestinal weight and mucosal development. *British Poultry Science*, *42*(4), 505–513. https://doi.org/10.1080/00071660120073151

Itza-Ortiz, M., Quezada-Casasola, A., Castillo-Castillo, Y., Rodríguez-Galindo, E., Carrera-Chávez, J. M., Martín-Orozco, U., Jaramillo-López, E., & Calzada-Nieves, A. (2018). Comparison of three sampling procedures for evaluating intestinal villi: A swine model. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *31*(1), 3–9. https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v31n1a01

Kim, B.G., & Lindemann, M.D. (2007). A spreadsheet method for experimental animal allotment.

Kruse, R., Essén-Gustavsson, B., Fossum, C., & Jensen-Waern, M. (2008). Blood concentrations of the cytokines IL-1beta, IL-6, IL-10, TNF-alpha and IFN-gamma during experimentally induced swine dysentery. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *50*(1). https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-32

Kuhn, K. A., Manieri, N. A., Liu, T. C., & Stappenbeck, T. S. (2014). IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury. *PLoS ONE*, *9*(12), 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114195

Kuhn, K. A., Schulz, H. M., Regner, E. H., Severs, E. L., Hendrickson, J. D., Gaurav, M., Whitney, A. K., Neha Ohri, D. I., Robertson, C. E., Frank, D. N., Campbell, E. L., & Colgan, S. P. (2018). Bacteroidales recruit IL-6 producing intraepithelial lymphocytes in the colon to promote barrier integrity. *Mucosal Immunol.*, *11*(2), 357–368. https://doi.org/10.1038/mi.2017.55

Lallès, J. P., & Montoya, C. A. (2021). Dietary alternatives to in-feed antibiotics, gut barrier function and inflammation in piglets post-weaning: Where are we now? In *Animal Feed Science and Technology* (Vol. 274). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114836

Le Gall, M., Gallois, M., Sève, B., Louveau, I., Holst, J. J., Oswald, I. P., Lallès, J. P., & Guilloteau, P. (2009). Comparative effect of orally administered sodium butyrate before or after weaning on growth and several indices of gastrointestinal biology of piglets. *British Journal of Nutrition*, *102*(9), 1285–1296. https://doi.org/10.1017/S0007114509990213

Lei, X. J., & Kim, I. H. (2018). Low dose of coated zinc oxide is as effective as pharmacological zinc oxide in promoting growth performance, reducing fecal scores, and improving nutrient digestibility and intestinal morphology in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, *245*, 117–125. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.06.011

Leppkes, M., Roulis, M., Neurath, M. F., Kollias, G., & Becker, C. (2014). Pleiotropic functions of TNF-α in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation. *International Immunology*, *26*(9), 509–515. https://doi.org/10.1093/intimm/dxu051

Limbach, J. R. (2020). *Reducing Crude Protein Levels in Diets Fed To Young Pigs To Optimize*. 133. https://nutrition.ansci.illinois.edu/sites/nutrition.ansci.illinois.edu/files/LIMBACH-THESIS-2020.pdf

Lin, F., Li, X., Wen, J., Wang, C., Peng, Y., Feng, J., & Hu, C. (2020). Effects of coated sodium butyrate on performance, diarrhea, intestinal microflora and barrier function of pigs during the first 2-week post-weaning. *Animal Feed Science and Technology*, *263*(866), 114464. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114464

Liu, D., Zong, E. Y., Huang, P. F., Yang, H. S., Yan, S. L., Li, J. Z., Li, Y. L., Ding, X. Q., He, S. P., Xiong, X., & Yin, Y. L. (2019). The effects of dietary sulfur amino acids on serum biochemical variables, mucosal amino acid profiles, and intestinal inflammation in weaning piglets. *Livestock Science*, *220*, 32–36. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.12.013

Liu, P., Piao, X. S., Thacker, P. A., Zeng, Z. K., Li, P. F., Wang, D., & Kim, S. W. (2010). Chito-oligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with Escherichia coli K88. *Journal of Animal Science*, *88*(12), 3871–3879. https://doi.org/10.2527/jas.2009-2771

Liu, W., Yuan, C., Meng, X., Du, Y., Gao, R., Tang, J., & Shi, D. (2014). Frequency of virulence factors in Escherichia coli isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. *Veterinary Journal*, *199*(2), 286–289. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.11.019

Lu, J. J., Zou, X. T., & Wang, Y. M. (2008). Effects of sodium butyrate on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*, *17*(4), 568–578. https://doi.org/10.22358/jafs/66685/2008

Maneewan, C., Yamauchi, K. en, Mekbungwan, A., Nakano, T., Fukuta, K., Kashimura, J., Mizu, M., Kawai, T., & Nakagawa, J. (2012). Histological alterations of intestinal villi and epithelial cells after feeding dietary sugar cane extract in piglets. *Italian Journal of Animal Science*, *11*(3), 236–241. https://doi.org/10.4081/ijas.2012.e43

Ma, X., Fan, P. X., Li, L. S., Qiao, S. Y., Zhang, G. L., & Li, D. F. (2012). Butyrate promotes the recovering of intestinal wound healing through its positive effect on the tight junctions. *Journal of Animal Science*, *90*(SUPPL4), 266–268. https://doi.org/10.2527/jas.50965

McCormack, U. M., Curião, T., Buzoianu, S. G., Prieto, M. L., Ryan, T., Varley, P., Crispie, F., Magowan, E., Metzler-Zebeli, B. U., Berry, D., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Gardiner, G. E., & Lawlor, P. G. (2017). Exploring a possible link between the intestinal microbiota and feed efficiency in pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(15). https://doi.org/10.1128/AEM.00380-17

Melaku, M., Zhong, R., Han, H., Wan, F., Yi, B., & Zhang, H. (2021). Butyric and citric acids and their salts in poultry nutrition: Effects on gut health and intestinal microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19). https://doi.org/10.3390/ijms221910392

Ming, D., Wang, W., Huang, C., Wang, Z., Shi, C., Ding, J., Liu, H., & Wang, F. (2021). Effects of weaning age at 21 and 28 days on growth performance, intestinal morphology and redox status in piglets. *Animals*, *11*(8), 1–12. https://doi.org/10.3390/ani11082169

Montagne, L., Boundry, G., Favier, C., Le Huerou-Luron, I., Lallès, J. P., & Sève, B. (2007). Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. *British Journal of Nutrition*, *97*(1), 45–57. https://doi.org/10.1017/S000711450720580X

Murray, R. L., Zhang, W., Iwaniuk, M., Grilli, E., & Stahl, C. H. (2018). Dietary tributyrin, an HDAC inhibitor, promotes muscle growth through enhanced terminal differentiation of satellite cells. *Physiological Reports*, *6*(10), 1–11. https://doi.org/10.14814/phy2.13706

Nabuurs, M. J. A., Hoogendoorn, A., Van Der Molen, E. J., & Van Osta, A. L. M. (1993). Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Research in Veterinary Science*, *55*(1), 78–84. https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90038-H

Namkung, H., Yu, H., Gong, J., & Leeson, S. (2011). Antimicrobial activity of butyrate glycerides toward salmonella typhimurium and clostridium perfringens. *Poultry Science*, *90*(10), 2217–2222. https://doi.org/10.3382/ps.2011-01498

O'Shea, C. J., McAlpine, P., Sweeney, T., Varley, P. F., & O'Doherty, J. V. (2014). Effect of the interaction of seaweed extracts containing laminarin and fucoidan with zinc oxide on the growth performance, digestibility and faecal characteristics of growing piglets. *British Journal of Nutrition*, *111*(5), 798–807. https://doi.org/10.1017/S0007114513003280

Öztürk, E., & Temiz, U. (2018). Encapsulation Methods and Use in Animal Nutrition. *Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences*, *32*(3), 624–631. https://doi.org/10.15316/sjafs.2018.145

Peng, L., Zhong-Rong, L., Green, R. S., Holzman, I. R., & Lin, J. (2009). Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *The Journal of Nutrition*, *139*, 1619–1625. https://doi.org/10.3945/jn.109.104638

PIC. (2022). PIC® Nutrition and Feeding Guidelines. MetricVersion 2022.10.20. In https:/ /www.pic.com/ resources/nutrition

Pié, S., Lallès, J. P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., & Oswald, I. P. (2004). Weaning Is Associated with an Upregulation of Expression of Inflamatory Cytokines in the Intestine of Piglets. *Journal of Nutrition*, *134*(3), 641–647. https://doi.org/10.1093/jn/134.3.641

Piva, A., Prandini, A., Fiorentini, L., Morlacchini, M., Galvano, F., & Luchansky, J. B. (2002). Tributyrin and lactitol synergistically enhanced the trophic status of the intestinal mucosa and reduced histamine levels in the gut of nursery pigs. *Journal of Animal Science*, *80*(3), 670–680. https://doi.org/10.2527/2002.803670x

Pluske, J. R., Williams, I. H., & Aherne, F. X. (1996). Villous height and crypt depth in piglets in response to increases in the intake of cows' milk after weaning. *Animal Science*, *62*(1), 145–158. https://doi.org/10.1017/S1357729800014429

Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F., & Letellier, A. (2017). Post weaning diarrhea in pigs: Risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *59*(1), 1–19. https://doi.org/10.1186/s13028-017-0299-7

Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, *5*(6), 2010–2013. https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439

Salvi, P. S., & Cowles, R. A. (2021). Butyrate and the intestinal epithelium: Modulation of proliferation and inflammation in homeostasis and disease. *Cells*, *10*(7). https://doi.org/10.3390/cells10071775

Segain, J. P., Galmiche, J. P., Raingeard De La Blétière, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., & Blottière, H. M. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: Implications for Crohn's disease. *Gut*, *47*(3), 397–403. https://doi.org/10.1136/gut.47.3.397

Shifflett, D. E., Bottone, F. G., Young, K. M., Moeser, A. J., Jones, S. L., & Blikslager, A. T. (2004). Neutrophils augment recovery of porcine ischemia-injured ileal mucosa by an IL-1-and COX-2-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastroi-Ntest Liver Physiol*, *287*, 50–57. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00076.2003.-Polymorphonuclear

Sotira, S., Dell'Anno, M., Caprarulo, V., Hejna, M., Pirrone, F., Callegari, M. L., Tucci, T. V., & Rossi, L. (2020). Effects of tributyrin supplementation on growth performance,

insulin, blood metabolites and gut microbiota in weaned piglets. *Animals*, *10*(4). https://doi.org/10.3390/ani10040726

Sun, Y., & Kim, S. W. (2017). Intestinal challenge with enterotoxigenic Escherichia coli in pigs, and nutritional intervention to prevent postweaning diarrhea. *Animal Nutrition*, *3*(4), 322–330. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.10.001

Suzuki, T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal*, *91*(1), 1–12. https://doi.org/10.1111/asj.13357

Thermo Fisher Scientific. (2016). TRIzol Reagent User Guide - Pub. no. MAN0001271 - Rev. A.0. *User Guide*, *15596018*(15596026), 1–6.

Tugnoli, B., Giovagnoni, G., Piva, A., & Grilli, E. (2020a). From acidifiers to intestinal health enhancers: How organic acids can improve growth efficiency of pigs. *Animals*, *10*(1), 1–18. https://doi.org/10.3390/ani10010134

Tugnoli, B., Piva, A., Sarli, G., & Grilli, E. (2020b). Tributyrin differentially regulates inflammatory markers and modulates goblet cells number along the intestinal tract segments of weaning pigs. *Livestock Science*, *234*(October 2018), 103996. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.103996

Wang, C., Cao, S., Shen, Z., Hong, Q., Feng, J., Peng, Y., & Hu, C. (2019a). Effects of dietary tributyrin on intestinal mucosa development, mitochondrial function and AMPK-mTOR pathway in weaned pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *10*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s40104-019-0394-x

Wang, C. C., Wu, H., Lin, F. H., Gong, R., Xie, F., Peng, Y., Feng, J., & Hu, C. H. (2018). Sodium butyrate enhances intestinal integrity, inhibits mast cell activation, inflammatory mediator production and JNK signaling pathway in weaned pigs. *Innate Immunity*, *24*(1), 40–46. https://doi.org/10.1177/1753425917741970

Wang, C., Shen, Z., Cao, S., Zhang, Q., Peng, Y., Hong, Q., Feng, J., & Hu, C. (2019b). Effects of tributyrin on growth performance, intestinal microflora and barrier function of weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, *258*(866), 114311. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114311

Wick, M. R. (2008). *Diagnostic Histochemistry Pathology*. Cambridge University Press.

Xiong, X., Tan, B., Song, M., Ji, P., Kim, K., Yin, Y., & Liu, Y. (2019). Nutritional intervention for the intestinal development and health of weaned pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*(FEB), 1–14. https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00046

Yang, Q., Huang, X., Wang, P., Yan, Z., Sun, W., Zhao, S., & Gun, S. (2019). Longitudinal development of the gut microbiota in healthy and diarrheic piglets induced by age-related dietary changes. *MicrobiologyOpen*, *8*(12), 1–17. https://doi.org/10.1002/mbo3.923

Zhai, H., Ren, W., Wang, S., Wu, J., Guggenbuhl, P., & Kluenter, A. M. (2017). Growth performance of nursery and grower-finisher pigs fed diets supplemented with benzoic acid. *Animal Nutrition*, *3*(3), 232–235. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.05.001

Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A., & Francis, D. (2007). Prevalence of virulence genes in Escherichia coli strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Veterinary Microbiology*, *123*(1–3), 145–152. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.018

Zheng, L., Kelly, C. J., Battista, K. D., Schaefer, R., Lanis, J. M., Alexeev, E. E., Wang, R. X., Onyiah, J. C., Kominsky, D. J., & Colgan, S. P. (2017). Microbial-Derived Butyrate Promotes Epithelial Barrier Function through IL-10 Receptor–Dependent Repression of Claudin-2. *The Journal of Immunology*, *199*(8), 2976–2984. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700105

Zhong, X., Zhang, Z., Wang, S., Cao, L., Zhou, L., Sun, A., Zhong, Z., & Nabben, M. (2019). Microbial-driven butyrate regulates jejunal homeostasis in piglets during the weaning stage. *Frontiers in Microbiology*, *10*(JAN), 1–18. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03335