



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA  
DE AMAZONAS**



**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**TESIS**

**“Dieta suplementada con fitobióticos (*Thymus vulgaris* y *Ceratonía siliqua*) y su efecto en la acción nutricional y la salud intestinal de cerdos recién destetados, Chachapoyas, Perú”**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL**

**Presentado por:** Bach. Sergio Rafael Bernardo Del Carpio Hernández

**Asesor:** Dr. Pedro Antonio Del Carpio Ramos

**Registro:**

**CHACHAPOYAS – PERÚ  
2018**

## **DEDICATORIA**

Gracias a Dios por permitirme tener y disfrutar a mi familia, gracias a mi familia por apoyarme en cada decisión y proyecto, gracias a la vida porque cada día me demuestra lo hermosa que es y lo justa que puede llegar a ser.

A mis padres Nelly María y Pedro Antonio que siempre están para apoyarme con su amor, consejo y enseñanzas, gracias infinitas.

A mis hermanos Aldo y Lucilla, que con su fraterno amor siempre me impulsan a querer lograr ser mejor.

A Ivel que con infinito amor ha sabido en señarme que todo se puede lograr y que me ha dado lo mejor del mundo.

A Ignacio, lo mas hermoso que he podido crear hasta el momento, no hay palabras para describir el amor que te tengo.

Les agradezco, y hago presente mi gran afecto hacia ustedes, mi hermosa familia.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas por haber aceptado que sea parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar esta maestría, así como también al Ph. D. Jorge Luis Maicelo Quintana past rector que nos guío y orientó durante la realización de la maestría, así como a los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos y apoyo para seguir adelante día a día.

Al programa de Becas y cofinanciamiento de CONCYTEC, CIENCIACTIVA. Por promover el desarrollo de la ciencia, tecnología e innovación y apoyar el financiamiento y realización de la presente maestría.

A la empresa Inveragro S. A. C., y a todo su personal por el apoyo brindado para el desarrollo del presente trabajo de investigación, ya que sin este hubiera sido imposible su culminación.

A la empresa Phartec S. A. C. por haber proporcionado Dysantic®, producto empleado en el presente ensayo.

A mi asesor, Dr. Pedro Antonio Del Carpio Ramos, por el constante e invaluable apoyo para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

## **AUTORIDADES**

Dr. Policarpio Chauca Valqui  
Rector

Dr. Miguel Ángel Barrena Gurbillón  
Vicerrector Académico

Dra. Flor Teresa García Huamán  
Vicerrectora de Investigación

Dr. Oscar Andrés Gamarra Torres  
Director de la Escuela de Posgrado

## VISTO BUENO DEL ASESOR

El que suscribe, asesor de la tesis “**Dieta suplementada con fitobióticos (*Thymus vulgaris* y *Ceratonia siliqua*) y su efecto en la acción nutricional y la salud intestinal de cerdos recién destetados, Chachapoyas, Perú**”, realizada por el Bachiller Sergio Rafael Bernardo Del Carpio Hernández, para obtener el grado de Maestro en Producción Animal, hace constar que he revisado el documento y considero que se encuentra apta de ser sustentada.

Ing. Zoot. Pedro Antonio Del Carpio Ramos, Dr. C.

## **JURADO EVALUADOR**

M.Sc. Zamora Huamán Segundo José  
Presidente

M. Sc. Tony Steven Chuquizuta Trigoso  
Secretario

M. Sc. Efraín Manuelito Castro Alayo  
Vocal

## INDICE GENERAL

PORTADA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
AUTORIDADES.....	iv
VISTO BUENO DEL ASESOR.....	v
JURADO EVALUADOR.....	vi
INDICE GENERAL.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE ANEXOS.....	x
INDICE DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Extractos de plantas (EP).....	3
1.2. Aparato digestivo y su colonización por microorganismos.....	6
1.3. Micro-biota intestinal.....	19
1.4. Efectos biológicos de los extractos de plantas.....	29
1.5. Efecto de los extractos de plantas sobre la salud y rendimiento animal.....	33
1.6. Tomillo y algarrobo europeo en alimentación animal.....	36
1.7. Problema, hipótesis y objetivos.....	40
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
2.1. Diseño de la investigación.....	41
2.2. Población, muestra y muestreo.....	41
2.3. Variables evaluadas.....	41
2.4. Métodos.....	42
2.5. Técnicas e instrumentos.....	43
2.6. Procedimiento.....	44
2.7. Análisis estadístico.....	47
III. RESULTADOS.....	48
3.1. Aspectos Productivos.....	48
3.2. Aspectos del Epitelio Intestinal.....	54
3.3. Análisis microbiológico.....	57
IV. DISCUSIÓN.....	59
4.1. Aspectos Productivos.....	59
4.2. Aspectos del Epitelio Intestinal.....	73
4.3. Análisis microbiológico.....	79
V. CONCLUSIONES.....	82
VI. RECOMENDACIONES.....	83
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
VIII. ANEXOS.....	101

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición porcentual de la ración local para cerdos en la fase de Crecimiento I.....	46
<b>Tabla 2.</b> Consumo de alimento (kg/ animal) de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo.....	48
<b>Tabla 3.</b> Cambios en el peso vivo (kg/ animal) de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo.....	51
<b>Tabla 4.</b> Conversión alimenticia de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo.....	52
<b>Tabla 5.</b> Mérito económico de la alimentación de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo.....	53
<b>Tabla 6.</b> Rendimiento de carcasa de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo.....	54
<b>Tabla 7.</b> Longitud de vellosidades (L), profundidad de criptas (P) y relación L: P de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo.....	54
<b>Tabla 8.</b> Conteo de ufc de Clostridium perfringens en el contenido del intestino grueso de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo.....	58



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Comparativo porcentual del consumo de alimento según las repeticiones (Categorías de peso vivo al iniciar el ensayo).....	50
<b>Figura 2.</b> Comparativo porcentual del incremento de peso vivo según las repeticiones (Categorías de peso vivo al iniciar el ensayo).....	52
<b>Figura 3.</b> Interacción % de fitobiótico x categoría de peso corporal al inicio del ensayo, para la profundidad de criptas intestinales.....	55
<b>Figura 4.</b> Interacción % de fitobiótico x categoría de peso corporal al inicio del ensayo, para la relación L: P.....	55
<b>Figura 5.</b> Fotografía del epitelio intestinal interno del duodeno de un cerdo que no recibió fitobióticos y de la categoría de mayor peso al inicio del ensayo.....	56
<b>Figura 6.</b> Fotografía del epitelio intestinal interno del duodeno de un cerdo que recibió 0.1% de fitobióticos y de la categoría de mayor peso al inicio del ensayo.....	57
<b>Figura 7.</b> Fotografía del epitelio intestinal interno del duodeno de un cerdo que recibió 0.2% de fitobióticos y de la categoría de mayor peso al inicio del ensayo.....	57

## INDICE DE ANEXOS

<b>Tabla 1A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con el consumo de alimento en el período de Pre-Inicio.....	101
<b>Tabla 2A.</b> Análisis de la varianza con el consumo de alimento en el período de Pre-Inicio.....	101
<b>Tabla 3A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con el consumo de alimento en el período de Inicio.....	101
<b>Tabla 4A.</b> Análisis de la varianza con el consumo de alimento en el período de Inicio.....	101
<b>Tabla 5A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con el consumo de alimento en el período de Crecimiento I.....	102
<b>Tabla 6A.</b> Análisis de la varianza con el consumo de alimento en el período de Crecimiento I.....	102
<b>Tabla 7A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con el consumo de alimento acumulado.....	102
<b>Tabla 8A.</b> Análisis de la varianza con el consumo de alimento acumulado.....	102
<b>Tabla 9A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Pre-Inicio.....	103
<b>Tabla 10A.</b> Análisis de la varianza con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Pre-Inicio.....	103
<b>Tabla 11A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Inicio.....	103
<b>Tabla 12A.</b> Análisis de la varianza con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Inicio.....	103
<b>Tabla 13A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Crecimiento I.....	104
<b>Tabla 14A.</b> Análisis de la varianza con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Crecimiento I.....	104
<b>Tabla 15A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con los incrementos acumulados de peso vivo, según repeticiones.....	104
<b>Tabla 16A.</b> Análisis de la varianza con los incrementos acumulados de peso vivo, según repeticiones.....	104
<b>Tabla 17A.</b> Análisis de covarianza entre peso inicial (X) y los incrementos acumulados de peso.....	105
<b>Tabla 18A.</b> Análisis de la varianza con el peso vivo al finalizar el Pre-Inicio.....	105
<b>Tabla 19A.</b> Análisis de la varianza con el peso vivo al finalizar el Inicio.....	105
<b>Tabla 20A.</b> Análisis de la varianza con el peso vivo al finalizar el Crecimiento I.....	106
<b>Tabla 21A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Pre-Inicio.....	106
<b>Tabla 22A.</b> Análisis de la varianza con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Pre-Inicio.....	106
<b>Tabla 23A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Inicio.....	106
<b>Tabla 24A.</b> Análisis de la varianza con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Inicio.....	107
<b>Tabla 25A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Crecimiento I.....	107

<b>Tabla 26A.</b> Análisis de la varianza con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Crecimiento I.....	107
<b>Tabla 27A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con la conversión alimenticia acumulada, según repeticiones.....	107
<b>Tabla 28A.</b> Análisis de la varianza con la conversión alimenticia acumulada, según repeticiones.....	108
<b>Tabla 29A.</b> Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con el rendimiento de carcasa de los animales sacrificados.....	108
<b>Tabla 30A.</b> Análisis de la varianza con el rendimiento de carcasa de los animales sacrificados.....	108
<b>Tabla 31A.</b> Análisis de la varianza con la altura de las vellosidades intestinales.....	108
<b>Tabla 32A.</b> Análisis de la varianza con la profundidad de las criptas de Lieberkühn....	109
<b>Tabla 33A.</b> Análisis de la varianza con la relación entre altura de las vellosidades: profundidad de las criptas de Lieberkühn.....	109
<b>Tabla 34A.</b> Análisis de la varianza con el conteo de ufc de Clostridium perfringens en el contenido del intestino grueso.....	109
<b>Anexo 1.</b> Fundamentos generales para el procesamiento histológico de los tejidos....	110
<b>Anexo 2.</b> Cuenta en placa de bacterias.....	126
<b>Figura 1A.</b> Microfotografías del epitelio intestinal.....	134

## INDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
AE: Aceites esenciales  
AEO: Aceite esencial de orégano  
AGV: Ácidos grasos volátiles  
APC: Antibiótico promotor del crecimiento  
CDAD: Enfermedades vinculadas a *Clostridium difficile*  
Cp: *Clostridium perfringens*  
CpG: Cisteína fosfato Guanina  
DMAPP: Di-metil-alil-pirofosfato  
EP: Extracto de plantas  
ETEC: *Escherichia coli* entero-toxigénica  
FAOSTAT: Organización de las Naciones Unidas - División de Estadística  
GALT: Tejido linfocítico asociado con el intestino  
GPP: Geranil pirofosfato  
Gpx: Glutathion peroxidasa  
HCl: Ácido clorhídrico  
HMG-CoA: Hidróxi-metil-glutaril-Coenzima A  
ID: Intestino delgado  
IEC: Células epiteliales intestinales  
Ig: Inmunoglobulina  
IL-8: Interleukina-8  
iNKT: Células asesinas invariantes T  
IPP: Isopentenil pirofosfato  
LPS: Sustrato polisacárido  
NEC: Enterocolitis necrosante  
NF-κB: Complejo proteico que controla la transcripción de ADN  
ON: Óxido nítrico  
ONS: Óxido nítrico sintetasa  
PRRS: Síndrome reproductivo y respiratorio porcino  
ROS: Especies oxígeno-reactivas  
T-SOD: Súper óxido dismutasa total  
TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico  
TcdA: Enterotoxina monomérica A producida por *Clostridium difficile*  
TGI: Tracto gastrointestinal  
TLR: Receptor tipo peaje  
U.F.C.: Unidades formadoras de colonias  
UE: Unión Europea  
USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos  
ZO-1: Zona occludens-1  
ZPS: Polisacáridos zwitter-iónicos

## RESUMEN

Principios químicos contenidos en especias y hierbas son considerados como fitobióticos debido a que ejercen algún tipo de control sobre bacterias intestinales permitiendo el adecuado rendimiento de animales de interés zootécnico. El tomillo (*Thymus vulgaris*) y las semillas de algarrobo europeo (*Ceratonia siliqua*) son proveedores de estos principios. Se implementó un ensayo en el que se suministró, a través de la dieta, un producto comercial constituido por extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo, según los siguientes tratamientos: **T<sub>1</sub>**, testigo; **T<sub>2</sub>**, 0.1 y **T<sub>3</sub>**, 0.2% del producto en la dieta. Se emplearon 180 cerdos comerciales recién destetados del plantel de la empresa Inveragro San Martín de Porras SAC, distrito de Jazán, Amazonas. Dentro de cada tratamiento hubo tres réplicas de 20 cerdos cada una. El período experimental estuvo constituido por el Pre-Inicio (9 días), Inicio (14 días) y Crecimiento I (10 días). En la evaluación del rendimiento zootécnico, medido a través del incremento de peso, conversión alimenticia y rendimiento de carcasa, los resultados indicaron que la presencia del producto no afectó negativamente a los indicadores mencionados; por el contrario, en algunos de los períodos se mejoró la eficiencia de utilización del alimento para incrementar peso vivo; haciendo recomendable su empleo. No hubo efecto significativo sobre la longitud de vellosidades intestinales, profundidad de criptas y relación longitud: profundidad; asimismo, los conteos de *C. perfringens* no difirieron significativamente.

**Palabras clave:** fitobióticos; tomillo; algarrobo; cerdos; alimentación.

## ABSTRACT

Chemical principles contained in spices and herbs are considered as phytobiotics because they exert some kind of control over intestinal bacteria allowing the adequate performance of animals of zootechnical interest. Thyme (*Thymus vulgaris*) and seeds of European carob (*Ceratonia siliqua*) are suppliers of these principles. An assay was implemented in which a commercial product consisting of extracts of thyme and seeds of European carob tree was supplied through the diet, according to the following treatments: T1, control, T2, 0.1 and T3, 0.2% of the product in the diet. 180 commercial pigs recently weaned from the Inveragro San Martín de Porras SAC plant, Jazán district, Amazonas. Within each treatment, there were three replicates of 20 pigs each. The experimental period consisted of the Pre-Start (9 days), Start (14 days) and Growth I (10 days). In the evaluation of the zootechnical performance, measured through weight gain, feed conversion and carcass yield, the results indicated that the presence of the product did not negatively affect the aforementioned indicators; On the contrary, in some of the periods the efficiency of utilization of the food was improved to increase live weight; making its use advisable. There was no significant effect on intestinal villus length, depth of crypts and length: depth ratio; likewise, counts of *C. perfringens* did not differ significantly.

**Key words:** phytobiotics; thyme; carob; pigs; feeding.

## I. INTRODUCCIÓN

Bajo el punto de vista de la eficiencia económica a gran escala, la producción animal se realiza, comúnmente, en condiciones industriales. Esto significa que la producción porcina moderna es un sistema altamente diseñado y los niveles de producción se han incrementado considerablemente en los últimos 40 años, en tanto que se redujo la necesidad de mano de obra. Se debe considerar que la producción intensiva de cerdos involucra la concentración de grandes cantidades de animales en áreas relativamente pequeñas, ocasionando alto rendimiento de productos animales por unidad de superficie; esta realidad genera un efecto sobre el ambiente local que se traduce en una alta acumulación de nitrógeno y fósforo (Menzi *et al.*, 2010; Kittawornat y Zimmerman, 2011).

Así, los animales en sistemas intensivos de producción se mantienen en una alta densidad de población y tienen que soportar varios factores desfavorables; entre ellos el estrés de hacinamiento, las peleas de jerarquía y la presión de infección. Por mucho tiempo se empleó antibióticos promotores del crecimiento (APC; antibiótico en el alimento) para compensar algunos de los efectos de estos factores negativos. En la actualidad se acepta, generalmente, que el uso intensivo e incontrolado de antibióticos afecta la salud humana y animal, debido a un aumento en las resistencias múltiples de las infecciones bacterianas. Además, los consumidores están cada vez más preocupados por los residuos de medicamentos en los productos cárnicos. En consecuencia, últimamente se ha considerado críticamente el uso de antibióticos en la alimentación y su uso como aditivos para piensos se prohibió por completo en la UE en 2006, y en otros países como Estados Unidos, Canadá, Japón, entre otros (de Groot *et al.*, 2001; Menzi *et al.*, 2010; Thacker, 2013; Khafipour *et al.*, 2014). La pregunta pertinente es ¿y en América Latina por qué no?

Frente a esto, parece plausible que las mejoras en las estrategias nutricionales de los cerdos sean de gran valor y que una gran cantidad de investigación se centre en el desarrollo de alternativas a los antibióticos para mantener la salud y el rendimiento de los cerdos. Tales alternativas incluyen probióticos, prebióticos, enzimas, acidificantes, extractos de plantas y nutraceuticos como el cobre y el zinc, así como algunas alternativas menos tradicionales. Desafortunadamente, la mayoría de estos compuestos producen resultados inconsistentes y pocas veces son iguales a los antibióticos en su efectividad. Por lo tanto, aún se necesita investigación en esta área y la alternativa perfecta no parece existir hasta ahora (Thacker, 2013).

El cerdo no sólo es un importante animal de granja, también es de gran importancia en la investigación biomédica, farmacéutica y de la medicina. Su organismo tiene varias similitudes biológicas con el ser humano y, por lo tanto, es un animal experimental importante, un sistema modelo para la investigación biológica y un tema para la investigación y capacitación médica y farmacéutica (De Almeida y Bendixen, 2012).

Desde el punto de vista de la alimentación humana, el cerdo es uno de los animales de granja más importantes y la producción de su carne tiene un enorme impacto económico en todo el mundo. Según FAOSTAT (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - División de Estadística, <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>), ha habido un aumento constante en la producción mundial de carne de cerdo, que llegó a cerca de 113 millones de toneladas en 2013. En esta producción, la cuota de Europa es de alrededor del 28% y Alemania se encuentra entre los 5 principales productores de carne de cerdo en todo el mundo.

En la producción porcina, el período post-destete es una de las etapas más desafiantes y críticas. Sus efectos son múltiples y afectan el comportamiento, el medio ambiente,



las enfermedades, la inmunidad y la nutrición. En este período, los lechones son sometidos inmediatamente a una combinación de factores de estrés que los predisponen a la diarrea, lo que puede tener un impacto adverso en la supervivencia en una etapa muy temprana y más vulnerable. El destete generalmente se asocia con una ingesta baja y variable de alimento, lo que resulta en un menor rendimiento y alteraciones en el ambiente y función intestinal, haciendo que los lechones sean muy sensibles a problemas digestivos. En Estados Unidos, un país que dispone de información detallada, la encuesta Swine 2006 (NAHMS, USDA, 2008), indicó que la mortalidad de los cerdos post-destete aumentó de 2.6% a 2.9% debido a diarrea, problemas respiratorios o SNC / meningitis causada por *Escherichia coli* diarreica, síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), *Streptococcus*, *Haemophilus* u otros. Por lo tanto, se vuelve particularmente importante mejorar la salud de los lechones después del destete (Pluske *et al.*, 1997; Moeser *et al.*, 2007).

En la industria porcina, en la actualidad muchos de los ingredientes de los piensos y los aditivos disponibles para su uso como "alternativas a los antibióticos" alteran las poblaciones microbianas en el tracto gastrointestinal o influyen en el sistema inmunitario.

### **1.1. Extractos de plantas (EP)**

Diferentes autores indican que los extractos de plantas (EP) se han utilizado en gran medida para la nutrición y la mejora de la salud humana. En la actualidad, se conocen miles de EP, cientos de los cuales son comercialmente importantes, especialmente para las industrias farmacéutica, agronómica, alimentaria, sanitaria, cosmética y de perfumes. Los extractos vegetales son de interés potencial debido a su efecto antiviral,

antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio y otros efectos biológicos (Baydar *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Sökmen *et al.*, 2004; Sosa *et al.*, 2005; Dundar *et al.*, 2008).

Estas propiedades documentadas de los EP pueden conducir a la capacidad de utilizarlos, en lugar de antibióticos, en las dietas para mejorar el rendimiento y la salud de los animales. Varios estudios han revisado bien los aceites esenciales y sus efectos biológicos, tanto *in vitro* e *in vivo*, habiendo demostrado que pueden mejorar la salud animal a través de varios mecanismos, como la supresión directa de la proliferación de patógenos, la alteración de las poblaciones microbianas intestinales y la mejora de las funciones inmunitarias (Lee *et al.*, 2004; Pettigrew, 2006; Stein y Kil, 2006; Calsamiglia *et al.*, 2007; Bakkali *et al.*, 2008).

Los EP son los responsables del olor y el color de las plantas, y están constituidos de más de cien componentes individuales. Se describen como metabolitos secundarios de plantas y pueden obtenerse de forma natural a partir de partes de materiales vegetales, como flores, brotes, semillas, hojas, ramas, corteza, madera, frutas y raíces. Se indican cuatro métodos comúnmente usados para extraer los EP, la destilación de vapor, la maceración, el prensado en frío y la extracción con solvente (Kerrola, 1995).

Por otra parte, los EP pueden sintetizarse directamente. Están en dos formas diferentes, aceite líquido y polvo sólido. A muchos de los aceites que conforman los EP se les denomina aceites esenciales (AE), son compuestos mixtos de aceite con variables composiciones y concentraciones químicas de compuestos individuales dependiendo de las plantas y los métodos de extracción; muchos son insolubles en agua (Lee *et al.*, 2004).

Muchos de los EP extraídos de plantas, verduras, o flores no son puros; es decir, los EP pueden contener entre 20 a 60 componentes en concentraciones muy diferentes.

Los componentes principales pueden constituir hasta 85% de los AE, en tanto que otros pueden representar sólo trazas. Así, se ha reportado que la concentración de timol en *Origanum vulgare* puede variar desde trazas hasta 64%; en el caso de *Thymus vulgaris* desde 10 a 64%. Así mismo, se ha indicado que otro componente predominante, el carvacrol, puede variar desde trazas hasta 80% en *Origanum vulgare* y de 2 a 11% en *Thymus vulgaris*. Para el caso de cinnamaldehído, un componente principal del AE de canela, se han mencionado cantidades de aproximadamente 60 a 75% del aceite total. En consecuencia, debido a la gran variabilidad en la composición, los efectos biológicos de los diferentes lotes del mismo AE pueden diferir (Lawrence y Reynolds, 1984; Duke, 1986; Lens-Lisbone *et al.*, 1987; Burt, 2004; Surburg y Panten, 2006).

Básicamente, los extractos de plantas están constituidos de dos clases de compuestos, los terpenos y fenilpropanos. Los terpenos están constituidos de combinaciones de varios isoprenos, unidades de cinco carbonos de base. La bio-síntesis de los terpenos se realiza principalmente a través de la ruta del ácido mevalónico; descrita en forma breve, tres unidades de acetato forman 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), el que es convertido a ácido mevalónico por el enzima HMG-CoA reductasa, el ácido mevalónico puede ser convertido a isopentenil-1-5-pirofosfato (IPP) y dimetilalil-PP (DMAPP), los que entonces se combinan en la proporción molar 1:1 para generar al precursor de los mono terpenos, el geranyl pirofosfato (GPP). Se ha determinado que los mono terpenos (C<sub>10</sub>) son las moléculas más representativas que constituyen el 90% de los AE y permiten una gran variedad de estructuras; el timol y el carvacrol se sintetizan a partir de GPP y se clasifican como productos mono terpenos. La adición repetitiva de unidades IPP a DMAPP pueden formar los precursores de varias clases de terpenos, tales como C<sub>15</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>30</sub> (Bakkali *et al.*, 2008; Miziorko, 2011).

Los fenilpropanos son sintetizados a través de la ruta del ácido siquímico, que produce al aminoácido aromático fenilalanina; luego este aminoácido puede ser transconfigurado a ácido cinámico y ácido p-cumárico. Los compuestos fenilpropano más importantes son el eugenol, el trans-cinnamaldehído, y la capsaicina (Seigler, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Herrmann y Weaver, 1999).

## **1.2. Aparato digestivo y su colonización por microorganismos**

Para entender con mayor detalle el accionar de los EP y la conveniencia de su empleo sobre los indicadores productivos de los cerdos existe la necesidad de tener una imagen, más o menos clara, sobre el sistema en el que se desempeñarán y la íntima relación con los microbios, principalmente bacterias, que colonizan el TGI.

*Crecimiento y morfología intestinal post-nacimiento.* Según diversas investigaciones, en el período inmediato después del nacimiento el crecimiento de tejido del TGI es rápido. El peso del intestino delgado se incrementa hasta en 80% durante los primeros tres días de vida post-natal. También se ha mostrado que la ingesta de calostro incrementa el peso intestinal, el área superficial y las actividades de los enzimas del ribete de cepillo. La mucosa intestinal está constituida de cuatro capas: una mono-capa de células epiteliales intestinales columnares (IEC) que cubren la lámina propia y la que, en cambio, consiste de tejido conectivo sub-epitelial y tejido linfoide con función inmunológica muy importante. La lámina propia está conectada a la mucosa *muscularis*, una delgada capa de músculo suave, seguida por la sub-mucosa. En todo el tracto gastrointestinal, las células caliciformes especializadas se intercalan entre las células epiteliales y secretan moco en cantidades variables dependiendo del estado inmune y el propósito del tejido. La capa de mucus está constituida por mucina que son glucoproteínas con una cadena principal de proteínas

que consiste en aproximadamente 80% de carbohidratos que imparten las principales propiedades viscosas y formadoras de gel. La función principal de las mucinas es presentar moléculas de reconocimiento similares a la superficie de las células epiteliales para proporcionar sitios de fijación de superficie de pseudo-célula para microbios y para atrapar nutrientes muy cerca del sitio de absorción en el intestino delgado (Bell *et al.*, 1984; Allen *et al.*, 1986, 1998; Audus *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1992; Wang y Xu, 1996; Zhang *et al.*, 1997; Atuma *et al.*, 2001; Fan, 2003; Pearson y Brownlee 2005; Acosta 2009).

Así mismo, se sabe que la capa mucosa está dividida en dos capas: la adherente de enterocito o capa de mucus “sin agitación” y la no adherente o capa de mucus “húmeda” que está ligeramente unida a la capa de moco “sin agitación”. Las células caliciformes gástricas están concentradas en hoyos, para prevenir la auto-degradación del enterocito y evitar la adherencia de bacterias al epitelio. También puede encontrarse células caliciformes productoras de *Muc2* en las criptas intestinales y dispersas entre los vellos en el intestino delgado. Las células gástricas también contienen células parietales, que son las responsables de la secreción de HCl y factor intrínseco, así como células principales para la secreción del precursor de pepsinógeno, y células endocrinas y neuroendocrinas. En el intestino, los hoyos o criptas contienen células caliciformes y células de Paneth en lugar de células parietales y principales. Las células de Paneth están localizadas en la base de la cripta, secretan lisozima y una variedad de defensinas anti-microbianas. Las células madre están localizadas medialmente, a lo largo de la pared de las criptas, y migran hacia la base del hoyo o hacia el cuello y más allá mientras se diferencian para formar el enterocitos del TGI. La mayoría de las células epiteliales que recubren la luz del intestino delgado son

enterocitos capaces de digerir y absorber nutrientes (Ouellette y Selsted, 1996; Falk *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 2001; Laux *et al.*, 2005; Pearson y Brownlee, 2005).

La moderna industria porcina practica ampliamente el destete de los lechones a una edad temprana con la finalidad de maximizar la productividad de las marranas y la utilización de las maternidades. Durante la década de 1990 la edad de destete se adelantó continuamente, de tal manera que en la actualidad los lechones son destetados, rutinariamente, entre los 21 a 35 días de edad en las grandes unidades productivas. En Europa las edades de destete (generalmente a los 28 días de edad o más viejos) se basan en el bienestar animal predicho debido a que el destete temprano de los lechones se asocia, a menudo, con desordenes gastrointestinales y retardo en el crecimiento. Sin embargo, el destete, sin tener en cuenta la edad del animal, incrementa en peso relativo, el diámetro y la longitud del intestino delgado; pero no cambia la relación proteína: ADN del órgano. La observación del incremento en la tasa relativa de crecimiento del intestino delgado después del destete es respaldada por los reportes de incrementos de profundidad de las criptas en los cerdos neonatos en respuesta a la asociación del destete con el incremento en la proliferación de enterocitos; pero, la reducción en la altura de las vellosidades se asoció con incrementos en la apoptosis y la combinación con un incremento en las tasas de renovación de las células epiteliales; lo que sugiere una alta demanda de nutrientes, en general, para el mantenimiento del intestino del lechón recién destetado. Es variable la cantidad de tiempo que toman los lechones para adaptarse al destete; algunos investigadores concluyen que los lechones destetados a las tres semanas de edad son capaces de reasumir su estado fisiológico normal a los 4 días post-destete. Otros han mostrado que los lechones destetados a los 7 a 10 días de edad no se recuperaron del daño a la mucosa intestinal asociado con el destete hasta que transcurrieron 11 a 14 días desde el destete. Esto indica que, al

parecer, la edad al destete y la composición de la dieta post-destete son los factores principales que determinan la longitud y período de adaptación (Cranwell y Moughan, 1989; McCracken *et al.*, 1999; Maxwell y Carter, 2001; Fan, 2003; Lackeyram, 2003; Lallès *et al.*, 2007).

Los estudios indican que la mucosa intestinal participa en importantes funciones de absorción y de excreción. Está expuesta al ambiente externo no-estéril, formando una barrera al ambiente interno, esencialmente estéril. Aunque el epitelio intestinal es sólo una gruesa capa celular es una barrera relativamente impermeable a los microbios debido a su rotación rápida, uniones estrechas entre las células, producción de mucinas y secreción de defensinas antimicrobianas; pero es el lugar preferido de la absorción de nutrientes. La presencia de estrechas uniones intracelulares, que se unen a las células epiteliales, le ayuda a formar una importante barrera, prevenir la libre combinación de material antigénico luminal con el sistema inmune mucosal en la lámina propia. Estas uniones estrechas son estructuras dinámicas que controlan la permeación pasiva de solutos a través del espacio paracelular utilizando proteínas y moléculas de señalización. Las secreciones gastrointestinales, incluyendo la secreción de mucinas, proveen una línea de defensa no inmune, regula el pH del lumen, recicla el agua y nutrientes esenciales y participa en varios estados de la digestión y absorción de nutrientes. La capa de mucus consiste en la formación de gel, mucinas secretadas derivadas de la expresión de los genes del hospedero *Muc2*, *Muc5AC* y *Muc6* que son secretadas por las células caliciformes del estómago. Las mucinas trans membrana son producidas por epitelio celular intestinal derivadas de la expresión de los genes del hospedero *Muc1*, *Muc3*, *Muc4*, *Muc13*, *Muc15*, *Muc17* y *Muc20* en el intestino delgado; así como los genes adicionales *Muc11* y *Muc12* dentro de las células epiteliales del intestino grueso. Dentro del intestino posterior se secretan una amplia

variedad de mucinas presumiblemente con la intención de crear una barrera más fuerte debido a la mayor carga de barreras comensales. Se ha determinado que la capa de mucina adjunta es más gruesa en el estómago y el intestino grueso en comparación con el intestino delgado. Aunque se sabe poco sobre la ontogenia de la secreción de moco en el cerdo, se ha demostrado que hay claros cambios de composición en la secreción de moco asociada con la maduración gastrointestinal. Algunos investigadores han determinado que al nacimiento el lechón tiene algunas células caliciformes que están listas para la descarga y otras son inmaduras. Una gran proporción de estas células descargan en el duodeno y son reemplazadas por una nueva generación de células caliciformes dentro de las primeras 24 horas del nacimiento. En el intestino grueso se dan cambios similares pero más lentamente (hasta los 10 días de edad) (Widdowson *et al.*, 1976; Turck *et al.*, 1993; Atuma *et al.*, 2001; Fan, 2003; Pearson y Brownlee, 2005; McCormick, 2005).

Se ha podido determinar que la digestión de nutrientes en el intestino delgado requiere de enterocitos bien diferenciados que posean una membrana apical específica (membrana del borde de cepillo) que exprese diversos enzimas hidrolíticos y transportadores de nutrientes. La actividad de los enzimas del borde de cepillo se incrementa gradualmente con la maduración de los enterocitos junto con el axis cripta-vello. Además de la diferenciación progresiva a lo largo del eje cripta-vello, el enterocito intestinal también se somete a un proceso de maduración relacionado con la edad. El enterocito tiene una actividad de sacarasa en el borde en cepillo en cerdos fetales antes del nacimiento. Las actividades de lactasa y peptidasa en el borde del cepillo son detectables en cerdos fetales a las 7 semanas de gestación y alcanzan un nivel máximo en el momento del nacimiento. La habilidad para absorber macromoléculas, incluyendo inmunoglobulina, se incrementa rápidamente durante el



período pre-natal y alcanza su nivel pico al nacimiento. Habiéndose determinado que la actividad de la sacarasa, maltasa y maltosa-glucoamilasa del borde de cepillo es muy baja en cerdos neonatos. Contrariamente, la actividad lactasa del borde de cepillo alcanza el más alto nivel al momento del nacimiento y la lactosa de la leche es bien digerida por los lechones lactantes. El enterocito intestinal expresa un alto nivel de actividad de transportador monosacárido al momento del nacimiento y puede absorber monosacáridos muy eficientemente. Así, los cerdos lactantes pueden digerir bien la lactosa, pero tienen una capacidad limitada para digerir otros disacáridos y polisacáridos. El nivel de actividad de la aminopeptidasa N en los enterocitos del borde de cepillo es relativamente alto en los lechones y la actividad continúa aumentando hasta la edad del destete (Puchal y Buddington, 1992; Cranwell, 1995; Buddington y Malo, 1996; Fan *et al.*, 2001; Sangild, 2001).

***Influencias microbianas sobre la función del TGI.*** Varios investigadores concuerdan en que los efectos fisiológicos de la colonización microbiana sobre el hospedero incluyen no sólo el desarrollo de respuesta inmune adaptativa, sino también a muchos parámetros de inmunidad innata, función digestiva, metabolismo de los nutrientes absorbidos y aún efectos sistémicos. Los reportes iniciales en los que se comparó animales libres de gérmenes y convencionales mostraron muchas diferencias fisiológicas en el hospedero, incluyendo cambios microbianos dependientes en el peso de los órganos y en la estructura intestinal. Investigaciones posteriores empezaron a examinar la interacción hospedero-microbiana a un nivel más próximo utilizando técnicas moleculares, genómicas, y proteómicas combinadas con gnotobiología para definir los efectos fisiológicos de organismos únicos o en grupo sobre poblaciones celulares específicas *in vivo* (Gordon *et al.*, 1966; Wostmann, 1981; Tanida *et al.*,

2005; Shirkey *et al.*, 2006; Chowdhury *et al.*, 2007; Danielsen *et al.*, 2007; Willing y Van Kessel, 2007).

Se determinó que la respuesta a un solo organismo, *Bacteroides thetaiotaomicron*, conduce a la transcripción diferencial de los genes responsables de la absorción de nutrientes, la fortificación de la barrera mucosa, el metabolismo xenobiótico, la angiogénesis y la maduración intestinal. Una respuesta similar observada en el pez cebra al mismo organismo indica una conservación evolutiva de las interacciones hospedero-microbio. Se ha descrito que *L. reuteri* induce tolerancia auto-específica del hospedador mediada por células dendríticas, como se demuestra en ratones libres de *Lactobacillus* específicos. Tras la introducción y la detección inicial de *L. reuteri*, las citocinas pro-inflamatorias se regularon temporalmente pero disminuyeron rápidamente a pesar de los altos niveles de *L. reuteri* en el intestino murino después de 21 días (Hooper *et al.*, 2001; Rawls *et al.*, 2006; Hoffman *et al.*, 2008; Livingston *et al.*, 2010).

A diferencia de las rutas del hospedero, diseñadas para reconocer y organizar las respuestas apropiadas a la micro-biota, las bacterias pueden producir moléculas efectoras específicas cuya función es regular las funciones del hospedero objetivo para beneficiar a las bacterias. El uso de moléculas efectoras por bacterias patógenas se ha estudiado intensamente y cumple una variedad de funciones en el establecimiento de patógenos, mientras que se entiende relativamente poco acerca de las moléculas efectoras secretadas por las bacterias comensales. Se ha demostrado que las bacterias comensales secretan moléculas efectoras que estimulan al hospedero para proporcionar una fuente de nutrientes, así como también inhiben la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, se determinó que *Saccharomyces boulardii* reduce la respuesta inflamatoria secretando un pequeño factor soluble en agua, estable al calor,

que bloquea el factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en la degradación del inhibidor de las células B (I $\kappa$ B $\alpha$ , derivado de la expresión de NFKBIA) reduciendo así el factor nuclear, potenciador kappa de cadena ligera, de células B activadas (NF $\kappa$ B) que se une al ADN, y posteriormente reduce la expresión de interleuquina-8 (IL-8). De forma similar al factor secretado por *S. boulardii*, el butirato es el metabolito antiinflamatorio microbiano más conocido. Igualmente inhibe la activación del complejo NF $\kappa$ B al evitar la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y al mismo tiempo previene la expresión del gen de la luciferasa en células colónicas humanas y de roedores. También se ha informado que otras bacterias con cualidades antiinflamatorias de los géneros *Streptococcus* y *Bifidobacterium* previenen la degradación del complejo NF $\kappa$ B debido a los metabolitos bacterianos. A diferencia de esto, se determinó que *Faecalibacterium prausnitzii* expresaba metabolitos antiinflamatorios reduciendo la expresión del gen *IL-8* en células Caco-2. Además, se observó un aumento de la expresión del gen *IL-10* antiinflamatorio debido a la suplementación sobrenadante de *F. prausnitzii* en colonocitos de ratón desafiados con enfermedad. Se determinó que ambos efectos son independientes de la producción por butirato de *F. prausnitzii* (Segain *et al.*, 2000; Hooper y Gordon, 2001a, b; Ménard *et al.*, 2004; Sougioultzis *et al.*, 2006; Sokol *et al.*, 2008).

***Efectos de la flora comensal sobre el hospedero.*** Los resultados de diversos estudios indican que las bacterias comensales son capaces de inhibir la inflamación y superar a los patógenos, constituyendo la micro-biota comensal la primera línea de defensa del huésped. Además de las defensas de las bacterias comensales, las uniones estrechas entre los enterocitos comienzan a formarse al nacer; sin embargo, la colonización bacteriana conduce a una barrera mucho más fuerte mediante la aplicación de uniones estrechas. La proteína de unión estrecha, zona occludens 1 (ZO-1), también está

regulada por el reconocimiento bacteriano. Se ha indicado que la barrera más fuerte da como resultado un gradiente electrolítico más estable y, por lo tanto, es compatible con la absorción pasiva de minerales y nutrientes co-transportados, como la glucosa. La secreción de mucina desempeña un papel importante en la defensa del huésped y también se ve muy afectada por la colonización bacteriana, por ejemplo *Lactobacillus casei* aumenta la expresión del gen mucina secretada de *Muc2* en mono capas de células epiteliales intestinales en comparación con células no tratadas, mientras que otras bacterias aumentan la expresión de *Muc2* secretada y *Muc3* trans-membrana por células caliciformes (Freter, 1974; Hecht, 1999; Mack *et al.*, 1999; Hudault *et al.*, 2001; Cario *et al.*, 2002; Mattar *et al.*, 2002; Mack *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2004).

Como se ha indicado, el sistema inmune mucosal sirve como un mecanismo principal que provee protección contra patógenos implicando al tejido linfoide asociado al intestino (GALT), también llamado Parches de Peyer. Sin embargo, primero el sistema inmune debe ser preparado mediante exposición a antígenos y otros estímulos externos los que, entonces activaran la detección microbiana a través del TLR (Receptor tipo peaje); esto ha sido respaldado a través de estudios múltiples con infantes pre-término que mostraron una, en general, baja IgA circulatoria con aumento de la IgM circulatoria siendo la única respuesta a la infección; esto contrastó con recién nacidos a término, también con cantidades iniciales bajas de IgA circulatoria, pero que aumentó rápidamente debido a la exposición a bacterias comensales y patógenas. En la mucosa intestinal, la IgM secretora es la inmunoglobulina más predominante del hospedero durante, aproximadamente, un mes después del nacimiento; se puede detectar IgA secretora más estable después de aproximadamente 10 días post-parto y se convierte en la inmunoglobulina secretada predominante después de un mes. Esto indicó que las bacterias comensales pueden ser críticas en la maduración de la

inmunidad del hospedero. La investigación ha llevado a la hipótesis de la higiene que se basa en la suposición de que la diversidad microbiana alterada y las actividades funcionales de la micro-biota luminal, debido a la falta de exposición temprana a agentes infecciosos, pueden estar relacionadas con la etiología de enfermedades inmunitarias en etapas posteriores de la vida (Crabbé *et al.*, 1970; McKay y Thom, 1969; Nahmias *et al.*, 1991; Stoll *et al.*, 1993; Bauer *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2007; Brandtzaeg, 2010).

Aunque se desconocen los mecanismos precisos, las investigaciones demostraron que la micro-biota comensal intestinal puede, generalmente, influenciar la biología de las células epiteliales y estromales, así como la función de las células dendríticas T y B. Esto sugiere que, al nivel del sistema inmune mucosal, los efectos de la micro-biota intestinal comensal son profundos y duraderos. Por ejemplo, un polisacárido bacteriano sencillo de una bacteria comensal, *Bacteroides fragilis*, es capaz de dirigir la maduración celular y física del sistema inmune mediante la producción de polisacáridos zwitter-iónicos (ZPS) que pueden corregir ciertas disfunciones inmunes; la investigación realizada con roedores simulando la enfermedad inflamatoria intestinal y el asma alérgica respaldaron este resultado. Se mostró que la exposición de la bacteria comensal al ratón libre de gérmenes, neonato pero no adulto, redujo la acumulación de células asesinas invariantes T (iNKT) en la lámina propia del colon y pulmón y síntomas asociados en animales evaluados. Se demostró que la micro-biota intestinal, en general, juega un rol clave en la estimulación de la enfermedad autoinmune y en el desarrollo de síntomas de diabetes tipo 1; sin embargo, se mostró que *Bifidobacterium pseudocatenulatum* exhibe efectos anti-alérgicos *in vitro* y que el incrementar la suplementación perinatal de pre y probióticos puede retardar el inicio de las alergias pasados los dos años de edad (Mazmanian y Kasper, 2006; Kelly *et al.*,

2007; Wen *et al.*, 2008; Kasakura *et al.*, 2009; Kukkonen *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2010; Berer *et al.*, 2011; Olszak *et al.*, 2012).

Debido a estos y otros efectos, los géneros de las bacterias comensales del intestino del hospedero han sido categorizados en microbios dañinos o benéficos, las bacterias dañinas como las reductoras de sulfato, *Vibrio*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas* se asociaron con diarrea, infecciones, producción de toxinas, putrefacción y constipación; el género benéfico, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se asociaron con resistencia a la colonización y exclusión competitiva, inmuno-modulación y desarrollo mejorado del huésped, modulación de lípidos sanguíneos, regulación hormonal mejorada y captación de nutrientes del hospedero. Los grupos de los géneros *Enterobacteria*, *Enterococcus* y *Bacteroides* no podían ser asociados con claridad con el desarrollo saludable del intestino puesto que se determinó que contenían representantes tanto benéficos como dañinos. Sin embargo, *Bacteroides thetaiotaomicron* es un microbio comensal conocido por su habilidad para inducir fucosilación; esta habilidad afectaría el ambiente mucoso y, de esta manera, la colonización por otras bacterias. Aunque *Clostridium* ha sido descrito como dañino, este representaría principalmente el clúster I proteolítico de *Clostridium* con su representante comensal predominante *Clostridium perfringens*. La investigación en cerdos y humanos ha indicado que los cluster IV y XIVa de *Clostridium* que degradan las fibras son beneficiosos para el hospedero (Gibson y Roberfroid, 1995; Barcenilla *et al.*, 2000; Hooper *et al.*, 2001; Castillo *et al.* 2007).

Se ha determinado que las poblaciones sucesivas y diferentes de bacterias que colonizan el TGI no sólo contribuyen a desarrollar el sistema inmune del hospedero sino también al desarrollo en la digestión de nutrientes. Los investigadores también han indicado que las bacterias comensales tienen efectos profundos sobre la

diferenciación inmunológica en desarrollo del hospedero y se enfatiza que el sistema inmune estaría estructural y funcionalmente dañado sin la micro-biota intestinal (Suzuki *et al.*, 2007; Dinan *et al.*, 2010).

*Mecanismos epigenéticos.* La conexión de la nutrición y la salud debido a factores epigenéticos ha sido correlacionada fuertemente a la variabilidad genética resultantes de la acetilación de histona/ metilación de ADN durante la gestación así como durante el período post-natal. Se ha desarrollado la hipótesis que indica que la nutrición durante la infancia es la causa de la impronta metabólica de la estructura y función gastrointestinal a través de la interacción del desarrollo epigenético, basado en la suposición de que las rutas epigenéticas están implicadas en el desarrollo y maduración del TGI. Se ha determinado que la micro-biota intestinal fibrolítica, como el clúster IV y XIVa de *Clostridium*, produce butirato a partir de fibra digestiva en el intestino grueso de los mamíferos, que luego está directamente involucrado en una vía epigenética bien descrita: la acetilación de histonas. Algunos investigadores han determinado que la producción de butirato por la micro-biota intestinal en el ciego de los cerdos tiene un impacto directo sobre la proliferación de células de las criptas, a través de la inhibición de los complejos enzimáticos histona deacetilasa que reducen la transcripción (Boffa *et al.*, 1978; Bergey y Holt, 1994; Barcenilla *et al.*, 2000; Waterland, 2006; Kien *et al.*, 2006, 2008a, b).

Investigación posterior concluyó que las bacterias comensales modifican epigenéticamente el genoma del hospedero en las células del epitelio intestinal (IEC, por sus siglas en inglés), no criptas, mediante metilación del gen del receptor tipo peaje 4 (*TLR4*) y la de-acetilación de histona para silenciar la respuesta inmune a la micro-biota comensal. Aunque se indica que los mecanismos subyacentes no se entienden completamente, se ha podido determinar que la expresión del gen *TLR4* en las IEC,

no cripta, está regulada por el sustrato de lipo-polisacárido (LPS) (Takahashi *et al.* 2009, 2011).

También se ha podido determinar que otro poderoso mecanismo de regulación epigenética es la influencia de la nutrición temprana sobre la metilación de cisteína fosfato guanina (CpG) a través de sus efectos sobre el metabolismo de los mamíferos del 1-carbono. Se ha establecido que este sistema proporciona los grupos metilo para la metilación de ADN y varios otros sustratos biológicos, y es dependiente de donadores metilo derivados de la dieta que incluyen al folato, las vitaminas B<sub>12</sub> y B<sub>6</sub>, colina y metionina. Aunque estos ingredientes mayormente son suplementados, en las dietas modernas de cerdos, en forma química pura, debería argüirse que, excepto la colina, son o deberían derivar de la fermentación microbiana. La deficiencia o el exceso dietético en algunos de estos importantes nutrientes afectarían la eficiencia de las rutas metabólicas de carbono-1 e influenciar el establecimiento estocástico de la metilación de CpG durante el desarrollo. El desbalance entre la ingestión (cualitativa y cuantitativa) de nutrientes, metabolitos, y los requerimientos precisos de estos procesos epigenéticos, dentro de límites espacio-temporales críticos, puede conducir a un desarrollo estructural y funcional defectuoso e incluso la ausencia de ciertos tipos especializados de células, conduciendo a una situación de “no retorno” debido a procesos irreversibles de diferenciación (Mondal *et al.* 1996; Martens *et al.* 2002; Van den Veyver, 2002; Zhu *et al.* 2005; Waterland, 2006; Shimizu, 2008).

Se han documentado numerosos cambios regulados del desarrollo en la expresión génica en modelos animales durante períodos pre-natal e inmediatamente post-natal, probando que estos momentos son críticos para el desarrollo. En tanto que sólo se conocen unos pocos ejemplos de influencias epigenéticas, a través de la nutrición, en la vida posterior, la investigación a empezado a mostrar el rol de la micro-biota



intestinal especialmente en el período post-natal. Sin embargo, a pesar del continuo avance en el entendimiento de los mecanismos epigenéticos, se requiere de investigación adicional para entender si existen períodos de desarrollo a lo largo de la maduración, cuando se pueden hacer impactos en estos mecanismos, y cómo actúan con la sucesión microbiana (Bouret *et al.*, 2004; Gluckman *et al.*, 2007; Nafee *et al.*, 2008).

**Sucesión microbiana.** La micro-biota intestinal humana, conformada por la larga historia co-evolutiva de la interacción simbiótica hospedero-microbio, juega un papel importante que influye en el hospedero. Las interrelaciones entre la micro-biota y el huésped son entonces claramente importantes en relación con la salud general y un desequilibrio entre estos sistemas (bebés nacidos por cesárea) produce cambios en la micro-biota intestinal que son bastante persistentes. Esto es respaldado por datos epidemiológicos y clínicos, lo que sugiere que la disminución de la incidencia de infecciones observadas durante las últimas tres décadas, particularmente en las sociedades occidentalizadas, puede predisponer a enfermedades como la diabetes mellitus tipo I, las enfermedades autoinmunes, así como las enfermedades atópicas e inflamatorias, especialmente de los intestinos (Grönlund *et al.*, 1999; Björkstén *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2006; Ott y Schreiber, 2006).

### **1.3. La micro-biota intestinal**

El aparato digestivo de los mamíferos es un ecosistema abierto e integrado, que consiste de seis áreas principales que incluyen a la cavidad oral, el esófago, el estómago, el intestino delgado (ID), el ciego y el colon. La estructura y secreciones localizadas del tracto gastrointestinal (TGI) dirige la ubicación de la micro-biota y, en alguna medida, también la composición de la micro-biota. La ecología del TGI fue

estudiada inicialmente en forma sistemática en los murinos a inicios del siglo XX (Dubos *et al.*, 1966; Gordon y Pesti, 1971).

Los habitantes microbianos del TGI pueden encontrarse en cualquiera de las áreas, desde la cavidad oral hasta el ano; en el lumen, sobre la superficie epitelial, o en la profundidad en las criptas de Lieberkühn. El lumen puede ser colonizado por los microbios en cualquier área del tracto, en una cantidad aproximada de  $10^3$  hasta  $10^5$  UFC/ g de contenido en el estómago e ID proximal, incrementándose los conteos hacia el ID distal hasta  $10^8$  UFC/ g de contenido. La colonización principal se da en la parte posterior del TGI, con  $10^{10}$  a  $10^{11}$  UFC/ g de contenido, promovida por la más lenta tasa de flujo del contenido que no supera la tasa de suplicación de la población microbiana. Así mismo, la superficie epitelial puede ser colonizada en cualquier área por biotas características y, de manera similar, en algunas especies animales, las criptas de la mucosa pueden poseer distintas bacterias a partir ya sea de las biotas lumbales o epiteliales (Savage, 1975, 1977; Mackie *et al.*, 1999).

Los comensales en general de la micro-biota intestinal de un mamífero saludable están en un permanente equilibrio cambiante con un componente tanto nativo como transeúnte. Algunas bacterias colonizan y se hacen indígenas permanentemente, en tanto que otras son no indígenas y entran desde el ambiente alimenticio ocasionando un impacto a corto plazo sobre el ambiente digestivo. Una vez que los nichos específicos son colonizados por la micro-biota indígena, estos microbios se desprenden de su hábitat ahora actual para migrar a través de otros hábitats sin colonizar dentro del canal gastrointestinal (Savage, 1977).

Durante el nacimiento, el TGI estéril es expuesto, inicialmente, a la micro-biota desde el canal de nacimiento maternal y luego es expuesto a varias otras fuentes de

microbios. En general, es colonizado primero por las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas, lo que reduce el contenido de oxígeno en el TGI creando un ambiente de limitado contenido de oxígeno y permitiendo la colonización por parte de las bacterias facultativas y anaeróbicas obligadas. Con la introducción inicial de bacterias en los hábitats estériles se inicia una secuencia de eventos que es única para el genotipo animal y una cantidad de factores ambientales. La colonización sucesiva de los varios hábitats del TGI por los microbios iniciales ocurre hasta que todos los hábitats son ocupados por las comunidades indígenas (Smith, 1961; Alexander, 1971; Gordon y Pesti, 1971; Savage, 1977; Gracey, 1982; Swords *et al.*, 1993; Mackie *et al.*, 1999; Buddington, 2003; Chen *et al.*, 2005).

Inicialmente, las poblaciones del TGI son dominadas por los anaerobios facultativos entonces cambian hacia los anaerobios obligados en los primeros días de vida. Los representantes típicos de la colonización neonatal temprana son anaerobios facultativos tales como entero-bacterias y *Streptococcus* spp., así como *Lactobacillus* spp. En algunas especies animales estos tipos bacterianos pueden temporalmente ganar predominancia y pueden encontrarse a estos altos niveles en todas las regiones del tracto, incluyendo el estómago. Se ha sugerido que el estómago y el duodeno tienen una relativamente baja densidad y diversidad microbiana debido al ambiente acidificado, secreciones biliares; tal que la comunidad microbiana es dominada por los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. La habilidad para unirse a la capa mucosa y colonizarla es importante en el proceso de sucesión de las especies bacterianas en el ID proximal conforme la tasa de pasaje se hace más rápida. Conforme la tasa de pasaje de la digesta se retarda hacia el ID distal, se incrementa la diversidad filogenética para incluir no sólo a aquellos géneros predominantes en el estómago y duodeno, sino también a los géneros incluidos dentro de las familias taxonómicas

Clostridiales y Bacteroides. En estas regiones la capa mucosa sirve como una matriz y fuente de nutrientes, respaldando la replicación bacteriana. La complejidad de la población bacteriana es mayor en el TGI distal y es dominado, generalmente, por los grupos Gram positivos de bajo G+C (guanina + citosina), incluyendo a *Clostridium*, *Bacillus*, *Ruminococcus* y *Fusobacterium* (Smith, 1961, 1965; Schaedler *et al.*, 1965; Savage *et al.*, 1968; Tannock y Smith, 1970; Swords *et al.*, 1973; Savage, 1977; Mackie *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2002, 2004; Leser *et al.*, 2002; Laux *et al.*, 2005; Richards *et al.*, 2005).

En el caso de los cerdos, la sucesión de la colonización microbiana ha recibido atención limitada y, en gran parte, esa atención se ha enfocado sobre las heces o el colon distal debido a la facilidad de acceso para el muestreo. Como en otros mamíferos, la colonización inicial del TGI en los cerdos empieza al nacimiento con una introducción a la población de bacterias en el tracto vaginal y las subsiguientes heces de la marrana. Rápidamente las bacterias pueblan todo el TGI del cerdo incluyendo el epitelio gástrico y dentro de las primeras doce horas después del nacimiento, el colon distal del cerdo ya está colonizado con  $10^9$  a  $10^{10}$  bacterias por gramo de digesta. Se ha encontrado que en las heces del cerdo a los, aproximadamente, dos días de edad *Lactobacillus* spp. tiene un pico de abundancia y que a los cinco días de edad *Clostridium* spp. es predominante. Se ha demostrado que los cambios en abundancia y diversidad tanto de *Lactobacillus* como de *Clostridium* spp. fluctúan a través del tiempo, particularmente al destete, después del que *Bacteroides* spp. se hace más prevalente en la micro-biota colónica del cerdo adulto. No está claro si los patrones de sucesión microbiana en el intestino delgado proximal reflejan lo observado en colon y heces; sin embargo, estudios del perfil molecular han demostrado marcadas diferencias en la composición microbiana entre las partes proximal y distal del

intestino. La investigación que ha examinado el desarrollo post-natal de la micro-biota del cerdo en la digesta ileal colectada a los dos días de edad, destete y post-destete ha identificado a *E. coli*, *S. flexneri* y *L. sobrius*, *L. reuteri* y *L. acidophilus* como las iniciales especies dominantes en el íleo. El proceso de sucesión continúa con el paso de los estados iniciales de la vida y un cambio significativo generalmente ocurre cuando los mamíferos empiezan a ingerir alimento sólido; generalmente en este momento se detecta a los anaerobios estrictos como los predominantes en el intestino grueso. Los niveles poblacionales de estas bacterias anaeróbicas se incrementan progresivamente y para el destete se consideran como concentraciones comunitarias microbianas de núcleo adulto y dominan completamente a otras poblaciones microbianas en el intestino grueso. Conforme se incrementan las cantidades de las bacterias anaerobias estrictas puede declinar concomitantemente el nivel de las bacterias anaerobias facultativas como *Enterobacteria* y *Streptococcus* spp. (Smith, 1961; Schaedler *et al.*, 1965; Smith, 1965; Savage *et al.*, 1968; Tannock y Smith 1970; Tannock *et al.*, 1990; Swords *et al.*, 1993; Konstantinov *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2005; Richards *et al.*, 2005; Konstantinov *et al.*, 2006; Janczyk *et al.*, 2007).

Ya antes de que el lechón sea expuesto al ambiente de la granja, la insuficiente oferta de oxígeno para el neonato durante el nacimiento puede ocasionar disfunción intestinal e incrementadas incidencias de enterocolitis más adelante en su vida; sin embargo, se desconoce el mecanismo directo. El ambiente inmediato después del nacimiento es de suma importancia y ha probado tener impacto directo sobre el desarrollo del TGI del neonato. Los factores extrínsecos esenciales incluyen la carga bacteriana del ambiente, la que para la mayoría de los cerdos depende de la composición de la micro-biota intestinal materna, la micro-biota del canal de nacimiento, la dieta, el modo de parto y la medicación. En los humanos, los microbios del canal vaginal y del área perineal

ingresan a la boca y al estómago de los infantes paridos vaginalmente y, dentro de unos pocos minutos después del nacimiento, el contenido gástrico del neonato está influenciado por la flora del cérvix y la refleja. Cuando los infantes son obtenidos por intervención cesárea y, de esta manera no expuestos a la flora vaginal y fecal, el ambiente que le rodea se transforma en extremadamente importante para la colonización intestinal; además, estos niños pueden ser separados de sus madres por largos períodos después del nacimiento. En infantes nacidos de cesárea, se retarda consistentemente el establecimiento de la flora estable, que se caracteriza por una baja incidencia de *Bacteroides* spp. y un bajo aislamiento de otra bacteria. En humanos, el parto por cesárea combinado con profilaxis maternal con antibióticos, se mostró un prolongado retardo en la colonización por *Bacteroides* que sólo fue evidente a los seis meses de edad. En países en vías de desarrollo, una exposición bacteriana pronunciada debido al ambiente puede inducir a un patrón de colonización no estable y favorecer la presencia de patógenos; en estas sociedades, el amamantamiento exclusivo es importante para desarrollar un micro-biota con bajo potencial patogénico. En cerdos no se ha realizado investigación comparable y aun cuando es probable que la alimentación con calostro reduzca el potencial patogénico, no está claro si los resultados son directamente transferibles. Se ha determinado que los cerdos son de crecimiento más rápido, más eficientes y de tamaño menos variable debido a los esfuerzos de la mejora genética; sin embargo, la morfología intestinal aún no ha sido considerada dentro de la lista de los objetivos de mejora genética, excepto para *E. coli* K88 o la supresión de fimbrias F4 y F18. Así, el desarrollo saludable y el rendimiento del crecimiento del lechón recién nacido en un ambiente estándar de producción es altamente dependiente de factores de manejo como el manejo de la salud del rebaño/ estado y manejo de la higiene del lugar de producción (Cohen *et al.* 1991; Adlerberth,

1999; Grönlund *et al.*, 1999; Mackie, 1999; Powell *et al.* 1999; Fanaro *et al.*, 2003; Thomson, 2006; Palmer *et al.*, 2007).

Se ha indicado que la plasticidad fenotípica es el cambio en la expresión fenotípica de un genotipo basado en la influencia del ambiente. Los eventos de sucesión microbiana involucran interacciones secuenciales complejas entre el genotipo del animal, la dieta, micro-ambientes del TGI, y los diversos tipos microbiales. Estas interacciones influyen la localización y sucesión de las comunidades microbianas en desarrollo así como dictan su composición final dando lugar a una amplia variedad de fenotipos (Savage, 1977; Scheiner, 1993; Van der Wielen *et al.*, 2000; Apajalahti *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2005).

Aunque se sabe que los factores del hospedero influyen la composición microbiana, la influencia de cualquier factor particular sobre la composición de la biota en cualquier hábitat no está muy clara. Los estudios realizados, evaluando una variedad de especies de mamíferos, han dado resultados inconsistentes con relación al impacto de la genética sobre la sucesión microbiana. Sin embargo, investigación realizada en humanos con la micro-biota digestiva de pares de gemelos uni y di vitelinos mostró que los individuos emparentados poseen perfiles microbianos intestinales más parecidos que los individuos no emparentados, indicando una influencia del genotipo del hospedero. Aunque las similitudes entre la micro-biota de individuos emparentados podría deberse al ambiente compartido, en otras especies también se ha mostrado la influencia del hospedero. La investigación en vacunos ha mostrado que en el ecosistema microbiano ruminal maduro, un animal hospedero puede restablecer sus características pH, AGV y composición de la comunidad bacteriana con relativo éxito, a pesar de una dramática perturbación de su comunidad microbiana, mediante la adición de contenidos ruminales de diferentes animales. Además, utilizando un

enfoque de genes candidatos, donde un gen es eliminado o adicionado a un hospedero modelo, se ha mostrado que un gen simple puede impactar tremendamente la diversidad y la estructura de la población de la micro-biota del TGI. Esto se ha mostrado en cerdos, donde los polimorfismos del gen *MUC20* la adición y proliferación de *Escherichia coli* F4K88 en la mucina, una conocida causa importante de diarrea y muerte en neonatos y jóvenes. Así, la susceptibilidad a la ETEC F4 se hereda como una característica monogénica en los cerdos y el genotipo del hospedero, que impacta la respuesta inmunológica, puede desencadenar un cambio en la estructura de la comunidad microbiana proporcionándole ventaja a algunas especies microbianas (Thompson *et al.*, 2008; Weimer *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2011; Spor *et al.*, 2011).

Para medir el impacto de la genética del hospedero sobre la diversidad microbiana es necesario entender a los factores adicionales que pueden influir la variación en la micro-biota en ausencia de la variación genética del hospedero. Sobre todo porque muchas veces estos factores ambientales pueden enmascarar los efectos genéticos del hospedero. La dieta ha mostrado, en forma consistente, jugar un rol significativo en la sucesión microbiana del TGI. Un ejemplo claro del impacto de la dieta puede observarse en los infantes humanos, se ha encontrado que los infantes alimentados con el pecho tienen, predominantemente, *Bifidobacterium* spp. en sus heces en comparación a otra micro-biota fecal más diversa, con una mayor abundancia de *Bacteroides* spp., en los infantes alimentados con fórmula. La explicación probable para esto es que los componentes de la leche humana contienen oligosacáridos no absorbibles, nucleótidos y gangliósidos, que afectan la colonización por *Bifidobacterium*. Sin embargo, a pesar del impacto potencial de la dieta, la diversidad de poblaciones microbianas intestinales entre los humanos adultos es



sorprendentemente alta aún con dietas y estilos de vida similares. Como se ha establecido, se dan transiciones particularmente profundas en la sucesión cuando los mamíferos empiezan a ingerir alimentos sólidos; esto puede representar más que un impacto profundo sobre la población microbiana del TGI en sistemas donde el proceso de destete y la transferencias hacia el alimento sólido es abrupta, como ocurre en muchos animales con manejo alimenticio como en el cerdo (Moore *et al.*, 1978, Lecce *et al.*, 1979; Kunz y Rudloff, 1993; Swords *et al.*, 1993; Wharton *et al.*, 1994; Rueda *et al.*, 1998; Deplancke *et al.*, 2000; Harmsen *et al.*, 2000; Apajalahti *et al.*, 2001; Buddington, 2003; Spor *et al.*, 2011).

Algo de la investigación relativamente reciente muestra claramente el impacto tanto del genotipo del hospedero como del ambiente en forma combinada. Se ha mostrado que el “efecto de cohabitación” describe el inicio de una transición donde, a pesar de la variación individual previa, los cerdos que co-habitan desarrollan repentinamente comunidades muy similares alrededor de los 21 días de edad. El inicio de este cambio después de dos semanas se predice por ser después que fueran observables (4 semanas) el desarrollo de los elementos clave del sistema inmune del hospedero y antes de los niveles significativos de IgA. Los resultados de la investigación indican que hubo dramática alteración de la comunidad microbiana del TGI ocasionando una similitud significativa entre las comunidades estables del TGI en los cerdos que cohabitaban. Además, se observó que este cambio persistió hasta los 420 días de edad, implicando que el efecto de la cohabitación ocasionó un efecto de largo plazo sobre la sucesión microbiana (Thompson *et al.*, 2008).

Uno de los impactos más dramáticos del ambiente sobre los patrones de sucesión puede observarse en la comparación de los infantes prematuros con los saludables a término. La adquisición y sucesión microbiana son alteradas en los infantes

prematuros debido a una cantidad de factores que incluyen limitado contacto materno, retardo en el inicio de la alimentación enteral, exposición a antibióticos, y procedimientos de control de infección que minimiza la exposición a organismos ambientales. Se asume que bajo estas condiciones es más probable que las bacterias patógenas colonicen debido a la escasez de o a la inhibición competitiva de una bacteria comensal normal y/o la maduración más lenta en los mecanismos de barrera. Lo común en los infantes prematuros, asociado con la introducción de la alimentación enteral, es la colonización y sobre crecimiento de bacterias de tipo patógeno incluyendo especies de los géneros *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* y *Staphylococcus*, y el desarrollo de enteritis necrosante (NEC), a menudo fatal. Todos estos factores constituyen una variedad de efectos ambientales que se unen para crear una influencia dramática sobre la sucesión microbiana del TGI (Hoyos, 1999).

***Clostridium***. La diarrea también puede ser causada por *Clostridium* spp., son grandes barras Gram positivas, formadores de esporas y anaerobios estrictos, constituyendo también parte de la micro-biota comensal del TGI del cerdo y, por lo tanto, ampliamente extendido entre las áreas productoras de cerdos. *Clostridium perfringens* causa las enteritis tipo A y tipo B (CpA y CpC, respectivamente) mayormente en lechones hasta los 14 días de edad. La toxina alfa (en CpA, CpC) y la toxina beta (sólo en CpC) de *C. perfringens* causan la diarrea hemorrágica marrón, más o menos severa, si la flora micro-biota comensal es trastornada y *C. perfringens* es capaz de colonizar en la mucosa del intestino delgado y necrotizar las células del epitelio intestinal. La severidad de CpC es mucho peor que la de CpA, que es considerada un organismo comensal a menos que sobre crezca, y aún puede causar lesiones en zonas tan lejanas como el colon proximal. Sin embargo, se dispone de vacunas de *C. perfringens* para cerdos. *Clostridium difficile* es una bacteria comensal usualmente productora de

entero-toxina monomérica A (TcdA) y/o citotoxina monomérica B (TcdB); no coloniza el epitelio colónico a menos que la flora micro-biota comensal sea alterada y *C. difficile* puede colonizar nichos no ocupado. Debido a su resistencia antibiótica, las enfermedades vinculadas a *C. difficile* (CDAD) están ganando importancia en lechones lactantes, mayormente cuando las marranas son tratadas con antibióticos; sin embargo, se ha encontrado sin asociación al uso de antibióticos. Puede observarse edema mesocolónico en cerdos infectados durante el examen a la necropsia, así como supuración focal en la lámina propia colónica. Puede ocurrir la exudación de neutrófilos y fibrina al interior de lumen. Los lechones afectados son tratados de manera similar que para los problemas con *E. coli* pero los lechones especialmente afectados por CDAD no prosperan y, a menudo, son sacrificados. Los métodos comunes para confirmar las infecciones bacterianas son el cultivo anaeróbico del organismo, ELISA, RT-PCR o hibridación de ADN (Kelly *et al.*, 1984; Martineau *et al.*, 1995; Songer *et al.*, 2000; King, 2003; Songer y Taylor, 2006; Thomson, 2006).

#### **1.4. Efectos biológicos de los extractos de plantas**

**Efectos antimicrobianos.** A lo largo del tiempo se ha reconocido la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas, tanto por la sabiduría popular y, en la actualidad, por la investigación científica. En varios extractos se ha observado un amplio espectro de actividad antibacteriana, tanto contra bacterias gram-positivas como gram-negativas, incluyendo *Salmonella*, *Stafilococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Micobacterium*; además de estas propiedades antibacterianas de los EP o de sus componentes también han exhibido propiedades antifungales, antiparasitaria, antiviral y antitoxigénica (Bishop, 1995; Hammer *et al.*, 1999; Dorman y Deans, 2000; Pandey *et al.*, 2000; Ultee y Smid, 2001; Pessoa *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006; Abed, 2007; Wong *et al.*, 2008; Garozzo *et al.*, 2009).

Diferentes investigadores concuerdan al indicar que teniendo en consideración la gran cantidad de grupos diferentes de compuestos químicos presentes en los EP, varios modos de acción están inmersos en la actividad antimicrobiana exhibida por ellos.

En primer lugar, la hidrofobicidad de los EP les permite la división al interior de los lípidos de la membrana celular bacteriana y las mitocondrias, alterando las estructuras y haciéndolas más permeables; esta mayor permeabilidad de la membrana ocasiona el escape de materiales intracelulares críticos lo que, finalmente, conduce a la muerte de la célula (Juven *et al.*, 1994; Helander *et al.*, 1998; Knobloch *et al.*, 1989; Carson *et al.*, 2002; Burt, 2004; Xu *et al.*, 2008).

En segundo lugar, las propiedades estructurales, como la presencia de los grupos funcionales y la aromaticidad también son responsables de la actividad antibacteriana de la EP. Los compuestos que poseen las propiedades antibacterianas más fuertes, como carvacrol, eugenol y timol, a menudo contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos; en general, se considera que los fenólicos alteran la membrana citoplasmática, alterando la fuerza motriz del protón, el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación del contenido celular (Frag *et al.*, 1989; Bowles y Miller, 1993; Helander *et al.*, 1998; Dorman y Deans, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Burt, 2004).

En tercer lugar, los extractos de plantas ejercen actividad antibacteriana a través de la modificación de los sistemas enzimáticos de las bacterias. Se ha indicado que la alicina, el principal componente activo en el ajo, puede reaccionar rápidamente con los grupos tiol de ciertos enzimas de los microorganismos y, subsiguientemente, inhibir su actividad enzimática. La inhibición de los sistemas enzimáticos, dependientes de tiol, puede bloquear la virulencia del microbio e, incluso, ser letal para

el microorganismo; así mismo, se ha reportado que el carvacrol puede prevenir el desarrollo de los flagelos en *E. coli* O157:H7, que son críticos para la adhesión en las membranas del epitelio intestinal (Ankri y Mireman, 1999; Burt *et al.*, 2007).

**Efectos anti-inflamatorios.** En el desarrollo de enfermedades inflamatorias están involucrados una variedad de mediadores inflamatorios, incluyendo al factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  y el IL-1 $\beta$ . En un ensayo se concluyó que los AE de los brotes de *C. operculatus* poseen potenciales efectos anti-inflamatorios debido a la inhibición de la expresión y secreción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a partir de células RAW 264.7 inducidas por lipo-polisacáridos (LPS). Otros ensayos demostraron que el eugenol, el aceite del árbol del té y el extracto de ajo pueden inhibir la secreción tanto de TNF- $\alpha$  como de IL-1 $\beta$ . Así mismo, se ha indicado que otra importante molécula involucrada en la defensa inmune es el óxido nítrico (ON), que es producido por los macrófagos a través de la actividad del enzima óxido nítrico sintetasa (ONS); una alta concentración de ON se asocia con enfermedades inflamatorias. Otros estudios reportaron que el cinnamaldehído y el eugenol fueron capaces de suprimir la liberación de ON y suprimir la expresión de ONS inducible en macrófagos murinos tratados con LPS. Por otra parte, se ha observado que el carvacrol, el eugenol y el cinamaldehído suprimieron la expresión del gen de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en células de macrófagos de ratón estimuladas con LPS; la ciclooxigenasa-2 es principalmente responsable de la producción de prostaglandinas, que están involucradas en diversos procesos fisiopatológicos que incluyen inflamación y carcinogénesis (MacMicking *et al.*, 1997; Dinarello, 2000; Hart *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Aggarwal y Shishodia, 2004; Lang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005, 2007; Li *et al.*, 2006; Tung *et al.*, 2008; Dung *et al.*, 2009; Landa *et al.*, 2009).

Los modos de acción para la actividad antiinflamatoria de los EP todavía no están claros, pero la evidencia sugiere que estos efectos están mediados, al menos en parte, al bloquear la ruta del factor nuclear kappa-potenciador de cadena ligera de las células B activadas (NF- $\kappa$ B); este factor es un regulador clave de varios genes implicados en respuestas inmunes e inflamatorias. En las células en reposo, el NF- $\kappa$ B existe en un estado inactivo en el citoplasma, en complejo con una proteína inhibitoria, llamada I $\kappa$ B; tras la activación, I $\kappa$ B sufre fosforilación y degradación, y NF- $\kappa$ B se transloca en el núcleo, donde se une al ADN y activa la transcripción de varios genes, incluidos TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOS. Los miembros de un grupo de investigación encontraron que la curcumina puede bloquear la actividad de unión del ADN NF- $\kappa$ B inducida por citoquinas, la translocación nuclear de RelA, la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , la fosforilación de I $\kappa$ B serina 32 y la actividad de I $\kappa$ B quinasa (IKK), todas ellas implicadas en la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B. En tanto que otro grupo de investigación también demostró el bloqueo de la translocación de p50 y p65, la fosforilación de ERK 1/2 y p38 quinasa y la degradación de I- $\kappa$ B $\alpha$  por el cinamaldehído y el eugenol (Hiscott *et al.*, 1993; Rice y Ernst, 1993; Xie *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 1998; Jobin *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2007).

***Efectos anti-oxidantes.*** Se ha llegado a determinar que los animales explotados en sistemas intensivos de producción están expuestos frecuentemente al estrés oxidativo, que puede resultar en daño de las proteínas, lípidos y ADN. Los antioxidantes actúan como limpiadores de radicales, inhibiendo la peroxidación de los lípidos y otros procesos mediados por radicales libres, protegiendo, de esta manera, al animal del daño oxidativo causado por los radicales libres (McCall y Frei, 1999).

Varios estudios *in vitro* han evaluado la propiedades antioxidantes de los extractos de orégano, tomillo, clavo de olor, pimienta, lavanda y albahaca. Por otro lado, algunos

estudios *in vivo* también informaron las propiedades antioxidantes de algunos EP. En un estudio se indicó que el carvacrol administrado en agua potable redujo el nivel de lesiones de ADN inducidas en hepatocitos recientemente aislados y células testiculares por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que podría estar asociado con un aumento de la actividad antioxidante del hígado y las células testiculares en estos animales. En otro ensayo se mostró que la suplementación de EP a los cerdos redujo el daño del ADN en los linfocitos, lo que indicó sus efectos potencialmente beneficiosos sobre el sistema inmune bajo el estrés oxidativo inducido por la dieta. En tanto que un estudio permitió descubrir que la administración de aceite de orégano en la dieta aumentaba el estado antioxidante de la carne de pollo de engorde (Economou *et al.*, 1991; Botsoglou *et al.*, 2002; Gülçin *et al.*, 2004; Oboh *et al.*, 2007; Slamenova *et al.*, 2008; Frankič *et al.*, 2010).

La alta correlación encontrada entre el contenido total de fenol de los EP y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad indicó que la alta actividad antioxidante de los EP está relacionada a su composición química. La presencia de grupos OH fenólicos en el timol, carvacrol y otros EP actúan como donadores de hidrógeno para los radicales peróxi producidos durante el primer paso de la oxidación de lípidos, retardando así la formación de hidroxil peróxido (Farag *et al.*, 1989; Teissedre y Waterhouse, 2000; Djeridane *et al.*, 2006).

### **1.5. Efecto de los extractos de plantas sobre la salud y rendimiento animal**

Las marranas son los motores físicos de la industria porcina y constituye el mayor desafío el mantenerlas saludables y produciendo eficientemente. Los resultados de diferentes estudios respaldan un efecto benéfico directo de los AE sobre el rendimiento de las marranas. En uno de tales estudios se mostró que las marranas que recibieron dietas que contenían 1000 ppm de orégano (hojas y flores deshidratadas de *Origanum*

*vulgare*, que consistieron en 50% de aceite esencial prensado al frío de *O. vulgare*) tuvieron una tasa de mortalidad anual de marranas más baja, menor tasa de eliminación de marranas durante la lactación, incremento en la tasa de parición, incremento en la tasa de nacimiento de lechones nacidos vivos por camada, y disminución en la tasa de natimortos. También se reportó que recibieron 100 ppm de la combinación de varios EP (1% de especias de pimiento, 1.25% de cinnamaldehído, y 0.85% de aceite de orégano) presentaron mayor rendimiento de camada, así como lechones más pesados y con mayor tasa de ganancia diaria; sin embargo, no se observó efectos benéficos en las marranas que recibieron extracto *Yucca schidigera* y *Quillaja saponaria* y AE de orégano (Ilsey *et al.*, 2002; Allan y Bilkei, 2005; Ariza-Nieto *et al.*, 2011).

La suplementación de EP a la dieta ha ocasionado una gran variación en el rendimiento del crecimiento de cerdos recién destetados. Así, Simonson (2004) utilizó lechones en maternidad para identificar los efectos benéficos de varios EP (rábanos picantes, mostaza, orégano y casia) en la dietas de lechones destetados; encontraron que solamente la mostaza y la casia incrementaron la ganancia diaria promedio, la ingestión diaria promedio de alimento y la conversión alimenticia. En tanto que en otro estudio, realizado por Sads y Bilkey (2003) se encontró que los lechones destetados que recibieron 1000 ppm de un suplemento de orégano presentaron mayores ganancias y menor incidencia de enfermedades en comparación con los animales control no suplementados. En tanto que otros investigadores (Manzanilla *et al.*, 2004; Neill *et al.*, 2006; Nofrarías *et al.*, 2006) no encontraron efecto benéfico de los EP sobre el rendimiento de los cerdos destetados.

Aunque fallaron para encontrar efectos benéficos sobre el rendimiento productivo, los investigadores han sugerido que los EP pueden mejorar la salud intestinal; Informaron que una mezcla de EP (XT) estandarizada a 5% (p / p) de carvacrol, 3% de



cinamaldehído y 2% de oleoresina de pimiento (orégano, canela y pimienta mexicana), incrementó el contenido estomacal y el porcentaje de materia seca, lo que sugiere un aumento en el tiempo de retención gástrica; además, el XT disminuyó la masa microbial total e incrementó la relación lactobacilos: enterobacterias (Manzanilla *et al.*, 2004; Norfarías *et al.*, 2006). Por otro lado, Michiels *et al.* (2010) también indicaron que suplementando con 500 ppm de carvacrol y timol se redujo la cantidad de linfocitos intra-epiteliales y se incrementó la relación altura de vellosidades/ profundidad de cripta en el intestino delgado distal.

En el período de crecimiento-acabado, la aplicación de diferentes proporciones y diferentes fuentes de EP mostraron algún beneficio sobre el rendimiento, como lo indicaron Cullen *et al.* (2005) y Janz *et al.* (2007) quienes reportaron que suministrando una dieta con ajo tratado tuvieron más alta ganancia diaria, ingestión diaria de alimento y conversión alimenticia en comparación con las dietas control. Así mismo, Grela *et al.* (1998) observaron una significativa mejora en la ganancia diaria promedio y conversión alimenticia con el uso de una combinación de hierbas (gran ortiga, ajo, hierba de trigo) en la dieta de cerdos de 25 a 105 kilos de peso. Así mismo, Dunshea *et al.* (2003) demostraron una mejora en el rendimiento del crecimiento con la inclusión de vanililnonamida, un análogo de la capsaicina, en la dieta de cerdos en acabado. Por otro lado, un experimento con cerdos en crecimiento-acabado de bajo peso y con retardo en el crecimiento (Walter y Bilkei, 2004) determinó que una dieta con 3000 ppm de orégano comercial que contenía 60 g de carvacrol y 55 de timol por kilo mejoró la ganancia diaria y la conversión alimenticia y se redujo la mortalidad de los cerdos.

Resulta evidente que algunos reportes de investigación son contradictorios en sus resultados y se requiere de investigación adicional y complementaria.

## 1.6. El tomillo y el algarrobo europeo en alimentación animal

El tomillo es una planta aromática de la flora del Mediterráneo comúnmente utilizada como especia y para propósitos medicinales. Como otras especies del género *Thymus*, el tomillo es utilizado tradicionalmente por sus efectos anti-séptico, anti-espasmódico y anti-tusígeno. Además, posee propiedades anti-microbianas, anti-fúngicas, anti-oxidativas y antivirales. El aceite esencial derivado del tomillo es una mezcla de monoterpenos y uno de los compuestos principales de este aceite es un terpenoide natural denominado timol; este compuesto exhibe múltiples actividades biológicas incluyendo propiedades anti-inflamatoria, inmuno-moduladora, anti-oxidante, anti-bacterial, anti-fungal y atrapadora de radicales libres (Suzuki y Furuta, 1988; Aeschbach *et al.*, 1994; Essawi y Srouf, 2000; Hudaib *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2002; Soliman y Badlaa, 2002; Venturini *et al.*, 2002; Braga *et al.*, 2006).

El algarrobo europeo se conoce científicamente como *Ceratonia siliqua*, su fruto tiene mucho parecido con los del algarrobo peruano; se asume que cuando los españoles llegados con Pizarro vieron los frutos de *Prosopis* dijeron que eran algarrobas, por eso que se perennizó el nombre en la especie americana.

La harina extraída de la pulpa es astringente, antidiarreico. El fruto verde se ha utilizado popularmente como anti-fúngico. La goma, por su riqueza en galactomananas tiene un efecto secuestrante (forma un gel viscoso que retrasa la absorción de lípidos y glúcidos), un efecto voluminizante (aumenta la repleción del estómago y prolonga la sensación de saciedad) y un efecto laxante emoliente, por el mucílago. En forma de harina se ha empleado para tratar: diarreas, gastritis, ulcus (úlceras) gastroduodenal, vómitos infantiles. En tanto que la goma: laxante y coadyuvante en tratamientos de sobrepeso, diabetes e hiperlipemias, prevención de la

arteriosclerosis, acción antioxidante (Hsouna *et al.*, 2011; Kotrotsios *et al.*, 2012; Roseiro *et al.*, 2013; Durazzo *et al.*, 2014).

Se asume que las distintas funciones benéficas sobre la salud atribuidas al tomillo y a la *ceratonia* podrían ser beneficiosas para el mejor desempeño de los cerdos en la fase de inicio (6-30 kg), toda vez que se combina un sustrato proveedor de anti-microbiales, anti-oxidantes e inmuno-estimulante y otro sustrato proveedor de efecto prebiótico.

El interés por desarrollar investigación en cerdos recién destetados con productos naturales radica en que siendo la fase crítica para la producción de los porcinos los productores peruanos continúan empleando APC, aún cuando tienen información sobre la problemática generada por su empleo; al parecer, prima en ellos la preocupación económica por encima de la salud del consumidor, de la que asumen no estaría en peligro. Es necesario demostrarle al productor comercial que existen alternativas al empleo de APC, las que tienen que ser validadas en el campo comercial.

Investigaciones relativamente recientes como la de Miladi *et al.* (2016) con el timol y el carvacrol, dos fenoles mono-terpénicos producidos por varias plantas aromáticas, entre ellas el Tomillo, se realizó para evaluar sus potencias antibacterianas e inhibidores de la bomba de eflujo contra un panel de patógenos clínicos y de los alimentos. Sus resultados demostraron una sustancial susceptibilidad de las bacterias probadas hacia el timol y carvacrol. Especialmente, el timol mostró una fuerte actividad inhibitoria (valores de MIC que variaron entre 32 y 64  $\mu\text{g/mL}$ ) contra la mayoría de cepas probadas en comparación al carvacrol. Además, se notó una reducción significativa en las MIC de tetraciclina y cloruro de benzalconio cuando se probaron en combinaciones con timol y carvacrol; este efecto sinérgico fue más

significativo en el caso de timol, el que generó una reducción de los valores de la MIC de la tetraciclina (de 2 a 8 veces) y del cloruro de benzalconio (de 2 a 8 veces).

Zou *et al.* (2016) realizaron un estudio en el que compararon los efectos del aceite esencial de orégano (AEO), quercetina o vitamina E, sobre las pérdidas de peso corporal vivo, características de la carcasa, calidad de la carne y el status antioxidante de cerdos después del transporte. Comparados con el grupo control, los grupos que recibieron AEO o quercetina tuvieron un promedio más alto de ganancia diaria ( $P \leq 0.05$ ) y el grupo que recibió AEO manifestó mayor eficiencia en la utilización del alimento ( $P \leq 0.05$ ). Las pérdidas de peso corporal vivo fueron menores en el grupo que recibió AEO después de 5 horas de transporte ( $P \leq 0.05$ ) en comparación con el grupo control. El peso y porcentaje de carcasa caliente fueron más altos en el grupo con AEO después de 5 horas de transporte ( $P \leq 0.05$ ) en comparación con el grupo control. Después del sacrificio, el valor de pH a los 45 minutos post-mortem y el valor Optostar (color de la carne) a las 24 horas post-mortem se incrementó en los grupos con vitamina E, AEO o quercetina ( $P \leq 0.05$ ) en comparación con el control. Los grupos vitamina E o quercetina también exhibieron valores más altos de pH a las 24 horas post-mortem ( $P \leq 0.05$ ) que el grupo control. El músculo *Longissimus thorcis et lumborum* de los cerdos de los grupos AEO o quercetina produjeron valores más bajos de pérdidas por goteo a las 24 horas ( $P \leq 0.05$ ) en comparación con el de los cerdos del grupo control. Comparados con los cerdos del grupo control, los de los grupos AEO o quercetina presentaron niveles reducidos de TBARS (sustancias reactivas al ácido tio-barbitúrico) y ROS (especies oxígeno reactivas) en el suero, músculo e hígado ( $P \leq 0.05$ ), en tanto que el grupo vitamina E tuvo niveles reducidos sólo en el suero ( $P \leq 0.05$ ). Los grupos AEO o quercetina también tuvieron niveles incrementados de actividad de Gpx (glutación peroxidasa) y T-SOD (súper óxido dismutasa total) en el

suero e hígado en comparación con el grupo control ( $P \leq 0.05$ ). Contrariamente, no hubo diferencias entre los grupos vitamina E y control en las actividades de Gpx o T-SOD. Los investigadores concluyeron que, la suplementación con el AEO o quercetina dietéticos puede ser superior a la suplementación con vitamina E dietética en aliviar los efectos negativos del transporte sobre los cerdos mediante mejoras del status antioxidante de los animales.

El efecto de las combinaciones de hierbas sobre el rendimiento y calidad de la carne de cerdos también ha sido evaluado por Tabasum *et al.* (2016); la suplementación redujo la ingestión de alimento y el grosor de grasa dorsal, en tanto que incrementó la producción de carne magra. Así mismo se observó incremento sobre el nivel de IgG. La ingestión de las combinaciones redujo el extracto etéreo en el músculo *longissimus dorsi* con incrementos en la humedad; así mismo, en una de las combinaciones se disminuyó el colesterol. Las combinaciones redujeron los valores de TBARS de la carne fresca y después de 2 y 3 semanas de almacenamiento; mejoraron la calidad de la carne incrementando los niveles de ácidos grasos n-3 y reduciendo el extracto etéreo y los valores TBARS.

Kotrotsios *et al.* (2012) realizaron un ensayo de alimentación de cerdos en crecimiento – acabado para determinar el efecto de la inclusión de harina de vainas de *Ceratonia siliqua* sobre el comportamiento productivo; los investigadores son concluyentes al informar que no se pueden utilizar proporciones importantes del producto debido a su alto contenido de taninos y de otras sustancias por lo que su labor única como aportante de nutrientes queda de lado y debe considerársele como un alimento funcional. Con la adición de 75 o 100 gramos de la harina lograron incrementos significativos en el peso vivo al sacrificio y en el peso de la carcasa de los cerdos.

## 1.7. Problema, hipótesis y objetivos

Para la realización del presente trabajo de investigación se planteó el siguiente **problema**: ¿Cuál será el comportamiento productivo de cerdos comerciales en la fase de inicio (6 – 25 kilos de peso) que reciben en la dieta un producto fitobiótico constituido por extractos de tomillo (*Thymus vulgaris*) y de vainas de algarrobo (*Ceratonia siliqua*)?

Se consideró la siguiente **hipótesis**: La incorporación del producto fitobiótico en la ración alimenticia de cerdos en la fase de inicio permitirá demostrar la influencia que tiene sobre el comportamiento productivo.

El **objetivo general** fue el siguiente:

Presentar la suplementación de la dieta con fitobióticos (*Thymus vulgaris* y *Ceratonia siliqua*) y su efecto en la acción nutricional y la integridad intestinal de cerdos recién destetados, Chachapoyas, Perú.

Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar y analizar el comportamiento de las variables productivas (incrementos de peso vivo, conversión alimenticia).
2. Determinar y analizar la integridad del epitelio intestinal (longitud de vellosidades, profundidad de criptas, relación longitud: profundidad).
3. Determinar y analizar el efecto sobre el contenido bacteriano (*Clostridium perfringens*) en el contenido intestinal.

## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Diseño de la investigación**

La investigación que se realizó se ajusta al diseño experimental. Según han indicado Hernández *et al.* (2010), un experimento implica un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes (supuestas causas-antecedentes), para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes (supuestos efectos-consecuentes), dentro de una situación de control para el investigador.

### **2.2. Población, muestra y muestreo**

En el caso de los experimentos, la población y la muestra tienen el mismo tamaño, de propiedad de la granja porcícola Inveragro San Martín de Porras S.A.C, localidad de Pedro Ruiz, distrito de Jazán, Provincia de Bongará, Región Amazonas.

Se emplearon 180 cerdos recién destetados, provenientes de madres Camborough 29 y machos de las líneas PIC 410 y 427, los que fueron distribuidos en tres grupos de tratamientos, con tres repeticiones dentro de cada tratamiento (Repetición I, machos y hembras por encima de 7 kilos; Repetición II, machos y hembras entre 6 y 7 kilos; Repetición III, machos y hembras por debajo de 6 kilos de peso); la distribución se hizo en forma aleatorizada para neutralizar los posibles efectos de las variables ajenas (sexo, peso inicial y línea genética) a la variable independiente del presente ensayo.

### **2.3. Variables evaluadas**

- Consumo de alimento, Kg.
- Incremento de peso vivo, Kg.

- Conversión alimenticia, Kg.
- Mérito económico, s/.
- Longitud de vellosidades intestinales duodenales,  $\mu\text{m}$ .
- Profundidad de criptas intestinales,  $\mu\text{m}$ .
- Relación longitud de vellosidad: profundidad de cripta.
- Recuento bacteriano (*Clostridium perfringens*), ufc.

#### **2.4. Métodos**

Para la determinación del efecto sobre el rendimiento se empleó el método cuantitativo que implica la determinación de la cantidad de alimento consumido y el incremento de peso vivo. El incremento de peso vivo se determinó por diferencia entre los pesos corporales tomados en las diferentes fases productivas evaluadas; la conversión alimenticia se determinó por la relación entre la cantidad de alimento consumido sobre el incremento de peso vivo (ecuación 1).

$$CA = \frac{\text{ALIMENTO CONSUMIDO}}{\text{VARIACIÓN DE PESO VIVO (Kg)}} \dots \text{(Ecuacion 1)}$$

Al finalizar la fase de campo se sacrificaron nueve cerdos, tres por cada uno de los tratamientos, en forma completamente al azar, y se tomaron muestras de intestino delgado (duodeno); porciones de tres centímetros, las que se guardaron en recipientes individuales con formol al 10% y se trasladaron a la ciudad de Trujillo; en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Privada Antenor Orrego, se hicieron cortes micrométricos, se aplicó la



tinción de núcleo citoplasmática empleando colorante corriente de hematoxilina y eosina, se preparó las láminas porta objetos que fueron evaluadas a través de microscopio equipado para realizar las mediciones y se tomaron fotografías del tejido epitelial. Se hizo varias lecturas de longitud de vellosidades intestinales y de la profundidad de las criptas.

Se aprovechó del sacrificio de los nueve animales para tomar muestras del contenido intestinal; se hizo punción directa, con un bisturí, sobre el intestino grueso y se recogió el contenido en vasos de plásticos esterilizados, provistos de tapa hermética; se almacenaron con hielo en un recipiente aislante y se enviaron a un laboratorio de análisis microbiológicos de la ciudad de Trujillo. En el laboratorio se determinó la cantidad de unidades formadoras de colonias (ufc) de la bacteria *Clostridium perfringens*.

## **2.5. Técnicas e instrumentos**

Dentro de las técnicas se consideró las siguientes:

- Técnica de crianza de cerdos jóvenes para determinar el rendimiento.
- Técnica de evaluación microscópica para el análisis del epitelio intestinal.
- Técnica de agar sangre para el cultivo, identificación y cuantificación de bacterias del contenido intestinal por el método de recuento en placa.

Dentro de los instrumentos se consideró:

- Guía de observación
- Ficha de monitoreo

- Libreta de campo
- Análisis documental
- Formato de informe

## **2.6. Procedimiento**

Se seleccionó 180 lechones recién destetados, 90 machos y 90 hembras, (comienzo de la fase de “inicio”), albergados en corrales de concreto y piso de rejilla alta a razón de 20 (10 machos y 10 hembras) por cada corral; ese implementó tres repeticiones (de 20 cerdos cada una) por cada tratamiento según el peso corporal (la primera repetición incluyó a los animales cuyo peso de destete estuvo por encima de 7 kilos; la segunda con un peso corporal entre 6 y 7 kilos; y la tercera con un peso corporal por debajo de los 6 kilos). Todos los animales fueron de composición racial parecida (cerdos de cruce comercial destinados a camal cuyas madres fueron de la línea Camborough 29 y machos de la línea PIC 410 y 427).

Se conformaron tres tratamientos. El **tratamiento 1** (testigo) no incluyó el suplemento de fitobióticos en el alimento, pero si incluyó antibiótico promotor de crecimiento; el **tratamiento 2** consideró la inclusión de 0.1% del suplemento de fitobióticos y el **tratamiento 3** incluyó 0.2% del suplemento de fitobióticos.

Los cerdos se pesaron al inicio del ensayo y luego al finalizar cada una de las fases. Pre-Inicio, desde el destete hasta completar nueve días post-destete; Inicio, de 14 días inmediatamente después del Pre-Inicio; Crecimiento I, los 10 días posteriores al Inicio.

Se utilizó las instalaciones y equipo de propiedad de la empresa, en el centro poblado de Pedro Ruiz. Las instalaciones son de material noble, provistos de parrilla en alto y

permiten mantener lotes de 20 cerdos; provistas de comederos de tipo tolva y bebederos de chupón. Además se empleó balanza electrónica, para pesar alimento y animales, lápices marcadores, libreta de campo, cámara fotográfica, equipo de disección, bolsas de colección de muestras biológicas y ordenador electrónico.

Previo al inicio del ensayo las instalaciones fueron limpiadas y desinfectadas. Producido el destete los cerditos fueron trasladados a estas instalaciones en lotes de 20 (10 machos y 10 hembras) y homogeneizados en función del peso corporal.

Las raciones para Pre-Inicio e Inicio fueron raciones preparadas Pig Master (fórmulas cerradas). En la planta procesadora de la empresa se preparó la ración para Crecimiento I; para cada ración se tuvo en consideración las necesidades nutritivas y se emplearon insumos de disponibilidad local como procedentes de distintos lugares del país (Tabla 1).

Se les suministró el alimento en cantidades pesadas, el consumo se determinó en función de la diferencia entre las cantidades ofrecidas y el residuo, para cada una de las repeticiones. En todo el ensayo el alimento se suministró en forma de harina y se humedeció ligeramente para formar una papilla y evitar que se levantara polvo. Debido a la presentación del producto este se adhirió muy bien y no hubo complicaciones para su homogeneización.

El producto empleado se comercializa con la denominación de Dysantic® producido por la firma Dr Bata® Ltd. (Biotechnology in Feeding) y comercializado en el país por la firma Phartec SAC, que es representante exclusivo en el país de la marca de origen. Se indica que es un suplemento alimenticio con extractos de plantas, específicamente del tomillo (Thyme), del cual se obtienen aceites esenciales como el timol, carvacrol y flavonoides que poseen actividad bactericida, viricida e inmuno modulador y de las

semillas de algarrobo europeo (St. John's bread seeds) el cual contiene sustancias como la galactopiranososa que son polisacáridos que actúan como prebióticos.

**Tabla 1. Composición porcentual de la ración local para cerdos en la fase de Crecimiento I**

<b>Insumo</b>	<b>%</b>
Máiz, amarillo nacional	27.6759
Arroz, granos partidos	25.0000
Soja, torta argentina-46	24.6722
Soja, harina integral extruida	05.0000
Arroz, polvillo	05.0000
Lactosa, 61%	04.9180
Hemoglobina bovina	01.5000
Fosfato monodivale	01.0331
Carbonato de calcio	01.0056
Dextrosa monohidratada	01.0000
Plasma porcino – AP920	01.0000
Sal común	00.4111
Lisina – HCL	00.3150
Metionina DL	00.2334
Bicarbonato de sodio	00.2000
Trigo, afrecho	00.1723
Acidificante	00.1500
Treonina	00.1034
Anti-fúngico	00.1000
Veg-Pro, enzimas	00.1000
Proapak 13	00.1000
Mycosorb A+	00.1000
Amoxicilina, droga pura	00.0600
Sulfato de cobre	00.0600
Bio-colina	00.0400
Saborizante Star-Rich	00.0300
SSF, enzimas	00.0200
<b>Total</b>	<b>100.0000</b>

Los cerdos se supervisaron todos los días para determinar la presencia de diarreas y su duración. Determinándose si hubo supresión espontánea del problema o era necesario implementar un tratamiento.

Finalizado el ensayo se procedió al sacrificar, al azar, a tres ejemplares de cada tratamiento para tomar muestras del intestino delgado (duodeno) y enviarlas al laboratorio de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad

Antenor Orrego, en Trujillo, donde se procesaron mediante el método histológico convencional para tejidos fijados (Anexo 1). Se tomó muestras del contenido del intestino grueso y se enviaron a un laboratorio de análisis microbiológicos de la ciudad de Trujillo, en el que se determinó la cantidad de unidades formadores de colonias (ufc) de la bacteria *Clostridium perfringens* y se aprovechó para determinar el rendimiento de carcasa (peso de la carcasa/ peso vivo antes del sacrificio x 100) (Anexo 2)

En cuanto al manejo sanitario, además del mantenimiento de la limpieza en las instalaciones y equipo se aplicó la vacunación contra el cólera porcino a los 53 días de edad.

## **2.7. Análisis estadístico**

Los datos se procesaron mediante la técnica de análisis de varianza para cada una de las variables productivas, de epitelio intestinal y de ufc, tomados durante el periodo experimental; previa verificación del cumplimiento de los supuestos de normalidad, homogeneidad, aditividad e independencia, y en los casos en los que se detectó diferencias significativas o altamente significativas entre los tratamientos objeto de estudio se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

Para el caso del rendimiento de carcasa, antes de aplicar el análisis de la varianza se transformó la información mediante la corrección arco-seno, para neutralizar la no normalidad típica de los datos porcentuales que son muy superiores al 50%.

Se mantuvo la disposición a tolerar una máxima probabilidad de 5% de cometer error de tipo alfa (Cochran y Cox, 2008).

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Aspectos Productivos

##### *Consumo de alimento*

Los resultados referidos al consumo de alimento de lechones recién destetados que recibieron un producto comercial fitobiótico, proveedor de tomillo y semillas de algarrobo europeo, se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Consumo de alimento (kg/ animal) de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo**

	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Lechones	60	60	60
Días experimentales	33	33	33
% del producto	0	0.1	0.2
Consumo total/ fase:			
Pre-Inicio	2.74 <sup>a</sup>	2.52 <sup>a</sup>	2.69 <sup>a</sup>
Inicio	10.3 <sup>a</sup>	10.2 <sup>a</sup>	10.0 <sup>a</sup>
Crecimiento I	9.21 <sup>a</sup>	8.84 <sup>a</sup>	8.60 <sup>a</sup>
Acumulado	22.2 <sup>a</sup>	21.6 <sup>a</sup>	21.3 <sup>a</sup>
Consumo diario/ fase:			
Pre-Inicio	0.31	0.28	0.30
Inicio	0.73	0.73	0.72
Crecimiento I	0.92	0.88	0.86
Acumulado	0.67	0.65	0.65

<sup>a</sup> Letras iguales sobre los promedios indican diferencias no significativas entre tratamientos dentro de cada fase y en el acumulado (P>0.05).

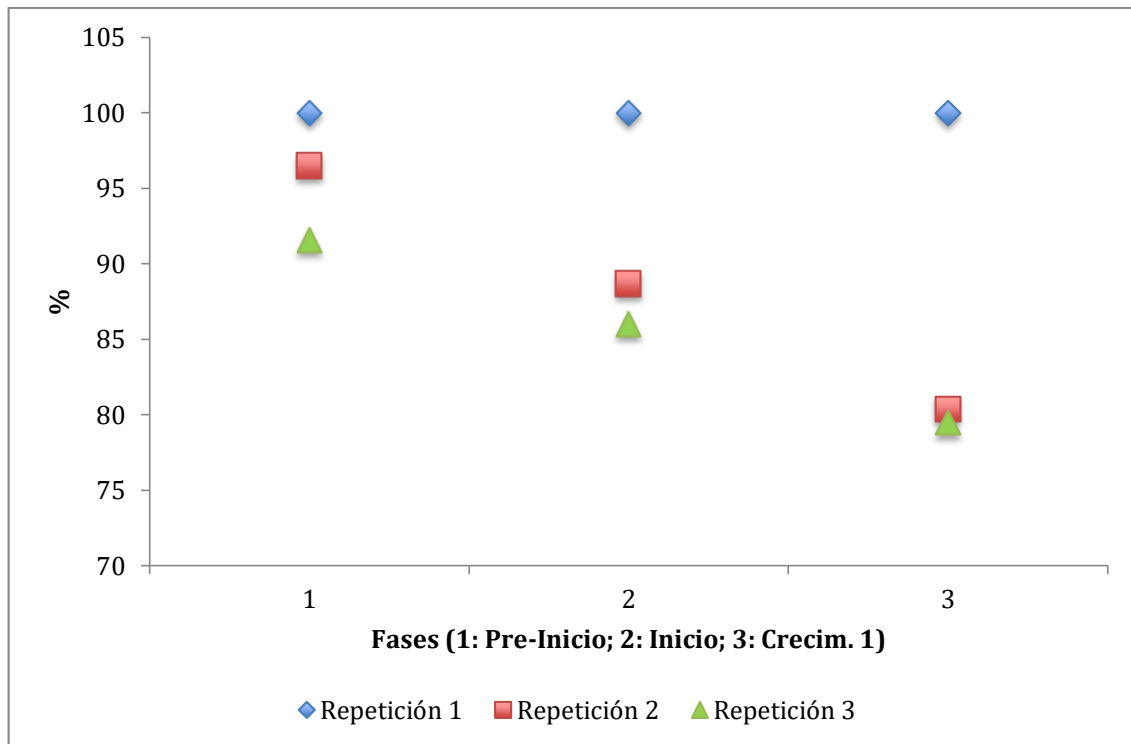
En las tablas del apéndice, desde A1 hasta A8, se presenta el análisis estadístico para el consumo de alimento para cada una de las tres fases y para los resultados de consumo acumulado. En las Tablas A1, A3, A5 y A7 se muestra la prueba de homogeneidad de varianzas; en todos los casos los resultados indicaron que hubo

homocedasticidad (distribución homogénea de la varianza residual entre todos los tratamientos). En tanto que el análisis de la varianza (Tablas A2, A4, A6 y A8) mostró que las diferencias entre los tratamientos, dentro de cada fase y del acumulado, no alcanzaron significación estadística.

Sin embargo, dado que las repeticiones representaron a los animales estratificados en función del peso corporal (Repetición 1, animales con pesos superiores a 7 kilos; Repetición 2, animales con pesos entre los 6 y 7 kilos; Repetición 3, animales por debajo de 6 kilos) se hizo comparación porcentual entre las repeticiones, tomando a la Repetición 1 como la referencia (100%). Así, en el Pre-Inicio las repeticiones 2 y 3 representaron 96.5 y 91.6%, respectivamente; en el Inicio, en el mismo orden, representaron 88.7 y 86%; en el Crecimiento I, 80.4 y 79.5%; en tanto que con el consumo acumulado representaron 86 y 84%.

Al realizar el análisis de la varianza con las cifras de consumo acumulado se generó la fuente de variación Blocks, para las repeticiones, resultando significativa ( $P \leq 0.01$ ), como se puede apreciar en la Tabla A8.

Se observó que conforme los lechones fueron incrementando la edad incrementaron la diferencia en el consumo de alimento. Pero en general, los lechones que tienen menores pesos de destete tienden a consumir menos alimento, en el orden de 14 y 16% en el acumulado con relación a los que se destetaron, tanto machos como hembras, con mejores pesos corporales. En la Figura 1 se ilustra este comportamiento de las Repeticiones (Categoría de peso vivo al inicio del ensayo) con relación al consumo de alimento. Dentro del tratamiento 2 (0.1% del producto fitobiótico) el consumo de la repetición 3 fue ligeramente (un poco más de 4%) superior al de la repetición 2.



**Figura 1. Comparativo porcentual del consumo de alimento según las repeticiones (Categorías de peso vivo al iniciar el ensayo)**

***Incremento de peso vivo***

Los resultados referidos al incremento de peso vivo de lechones recién destetados que recibieron un producto comercial fitobiótico, proveedor de tomillo y semillas de algarrobo europeo, se presentan en la Tabla 3.



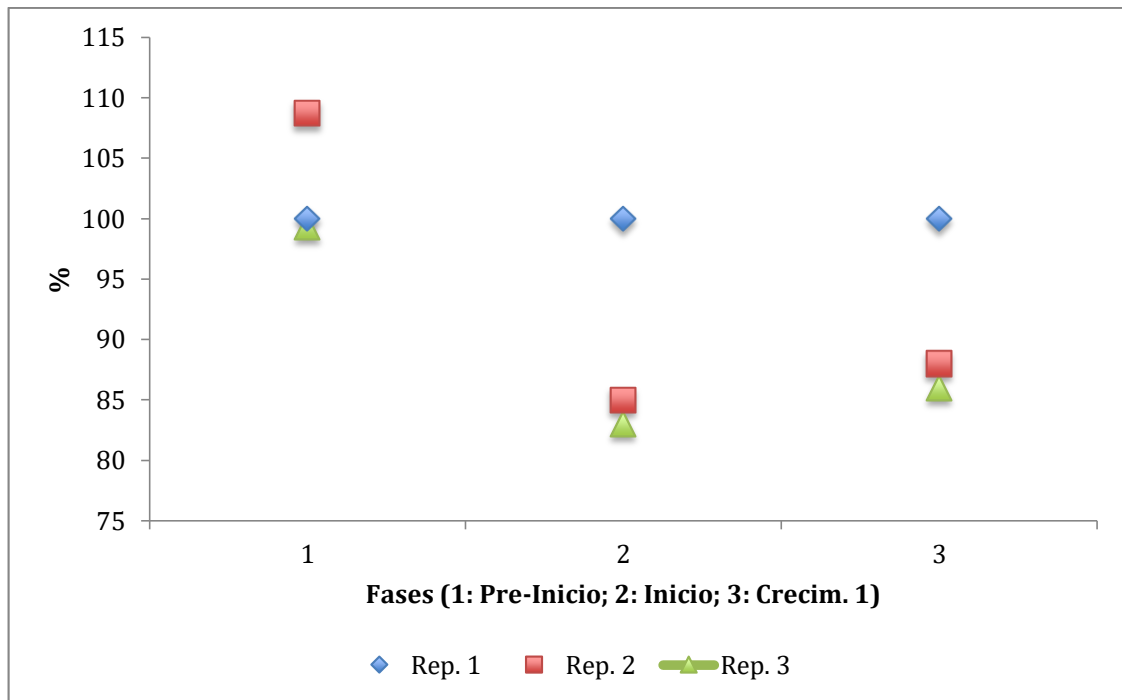
**Tabla 3. Cambios en el peso vivo (kg/ animal) de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo**

	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Lechones	60	60	60
Días experimentales	33	33	33
% del producto	0	0.1	0.2
Peso inicial	6.67	7.17	5.97
Cambio de peso total/ fase:			
Pre-Inicio	2.30 <sup>a</sup>	2.15 <sup>a</sup>	2.27 <sup>a</sup>
Inicio	6.65 <sup>a</sup>	6.67 <sup>a</sup>	6.28 <sup>a</sup>
Crecimiento I	6.76 <sup>a</sup>	6.48 <sup>a</sup>	6.15 <sup>a</sup>
Acumulado	15.7 <sup>a</sup>	15.3 <sup>a</sup>	14.7 <sup>a</sup>
Peso final	22.4	22.5	20.7
Cambio de peso diario/ fase:			
Pre-Inicio	0.26	0.24	0.25
Inicio	0.48	0.48	0.45
Crecimiento I	0.68	0.65	0.62
Acumulado	0.48	0.46	0.45

<sup>a</sup> Letras iguales sobre los promedios indican diferencias no significativas entre tratamientos dentro de cada fase y en el acumulado (P>0.05).

El análisis de la varianza para los incrementos de peso vivo de las distintas fases productivas se muestra en las tablas 10A, 12A, 14A y 16A.

En la Figura 2 se muestra el comparativo porcentual para los incrementos de peso según las repeticiones.



**Figura 2. Comparativo porcentual del incremento de peso vivo según las repeticiones (Categorías de peso vivo al iniciar el ensayo)**

### ***Conversión alimenticia***

Los resultados referidos a la conversión alimenticia de lechones recién destetados que recibieron un producto comercial fitobiótico, proveedor de tomillo y semillas de algarrobo europeo, se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4. Conversión alimenticia de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo**

	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>3</sub></b>
Lechones	60	60	60
Días experimentales	33	33	33
% del producto	0	0.1	0.2
CA/ fase:			
Pre-Inicio	1.20 <sup>a</sup>	1.17 <sup>a</sup>	1.19 <sup>a</sup>
Inicio	1.55 <sup>b</sup>	1.53 <sup>b</sup>	1.60 <sup>a</sup>
Crecimiento I	1.36 <sup>b</sup>	1.36 <sup>b</sup>	1.39 <sup>a</sup>
Acumulada	1.41 <sup>b</sup>	1.41 <sup>b</sup>	1.45 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Letras iguales sobre los promedios indican diferencias no significativas entre tratamientos dentro de cada fase y en el acumulado (P>0.05).

### ***Mérito económico***

Los resultados referidos a la conversión alimenticia de lechones recién destetados que recibieron un producto comercial fitobiótico, proveedor de tomillo y semillas de algarrobo europeo, se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5. Mérito económico de la alimentación de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo**

	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>3</sub></b>
Lechones	60	60	60
Días experimentales	33	33	33
% del producto	0	0.1	0.2
Gasto en alimento, s/. por lote:			
Pre-Inicio	2607.90	2395.74	2565.08
Inicio	7253.18	7222.93	7247.06
Crecimiento I	1016.56	991.40	1066.38
Total	10877.64	10610.07	10878.52
Mérito económico, s/.			
Pre-Inicio	18.93	18.55	18.86
Inicio	18.18	18.04	19.24
Crecimiento I	2.51	2.55	2.89
Acumulado	11.54	11.55	12.34

### ***Rendimiento de carcasa***

Los resultados referidos a rendimiento de carcasa de lechones recién destetados que recibieron un producto comercial fitobiótico, proveedor de tomillo y semillas de algarrobo europeo hasta que acabó la fase de Crecimiento 1, se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6. Rendimiento de carcasa de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo**

	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>3</sub></b>
Lechones sacrificados	03	03	03
Edad de destete, días	23	23	23
Días experimentales	33	33	33
Edad de sacrificio, días	56	56	56
% del producto	0	0.1	0.2
Peso vivo sacrificio, kg.	21.1	22.1	21.6
Peso de vísceras, kg.	3.67	4.14	4.37
Peso de carcasa, kg.	15.2	15.8	15.7
Rendimiento carcasa, %	72.0 <sup>a</sup>	71.7 <sup>a</sup>	71.9 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Letras iguales sobre los promedios indican diferencias no significativas entre tratamientos (P>0.05).

### 3.2. Aspectos del Epitelio Intestinal

#### *Longitud de vellosidades intestinales, profundidad de criptas intestinales y relación longitud: profundidad*

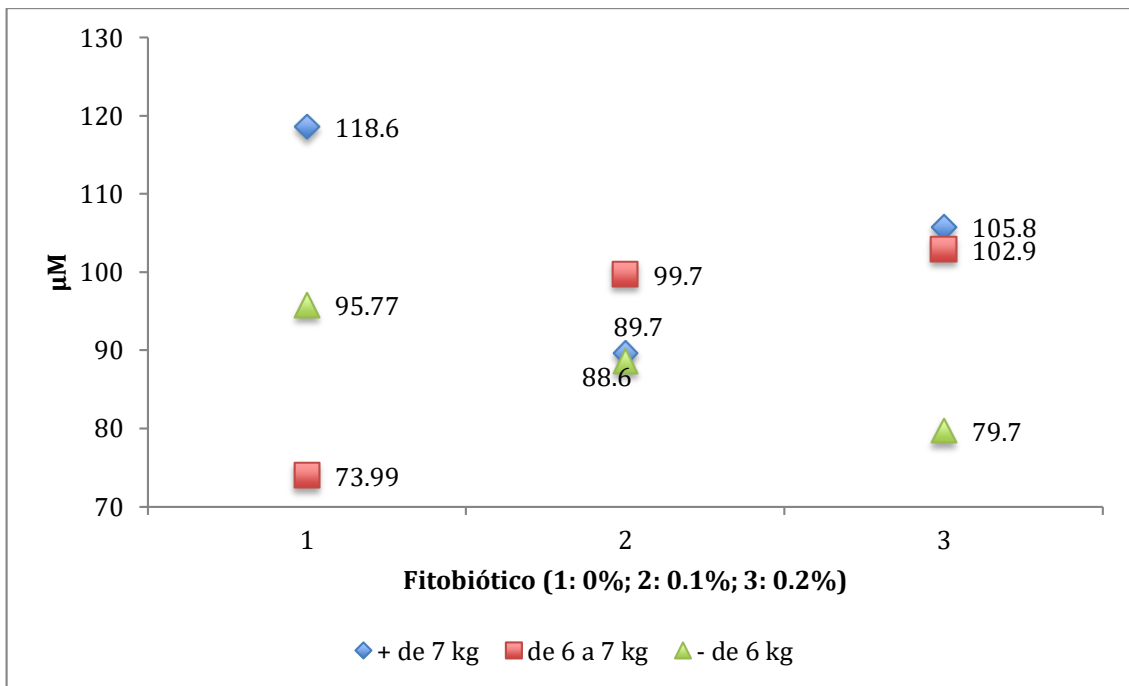
Los resultados referidos a longitud de vellosidades intestinales (L), profundidad de criptas intestinales (P) y relación L: P de lechones recién destetados que recibieron un producto comercial fitobiótico, proveedor de tomillo y semillas de algarrobo europeo, se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7. Longitud de vellosidades (L), profundidad de criptas (P) y relación L: P de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo**

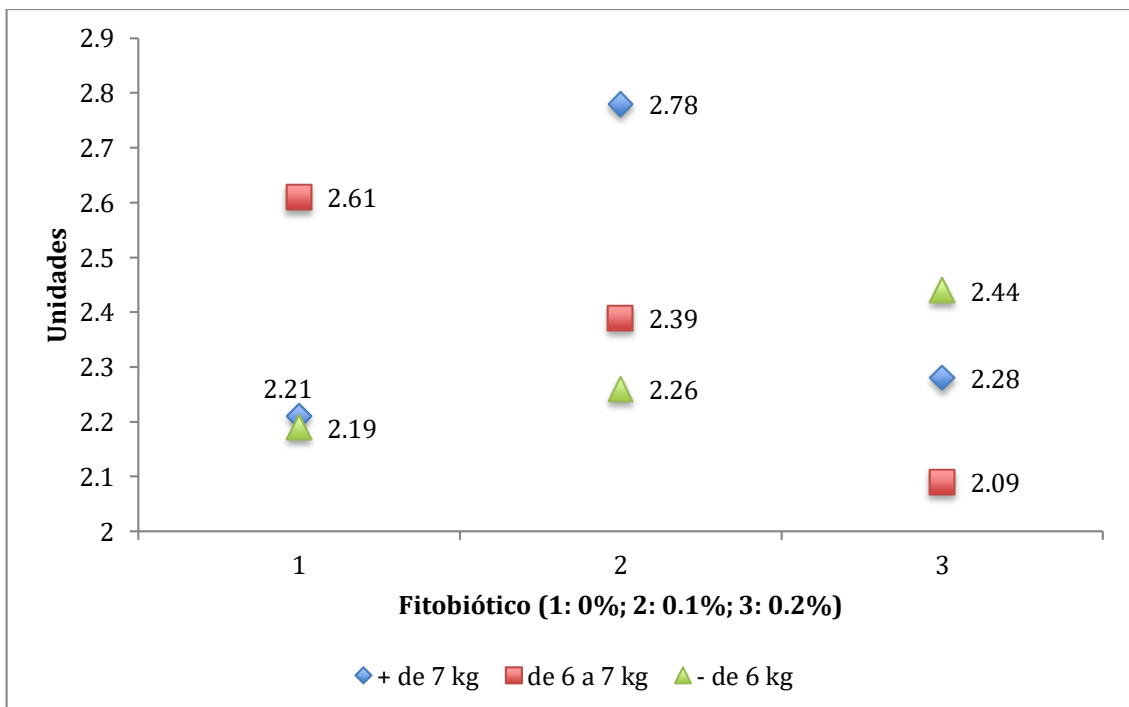
<b>Efecto principal</b>	<b>L, μM</b>	<b>P, μM</b>	<b>L: P</b>
% del fitobiótico:			
0	200.5 <sup>a</sup>	96.1 <sup>a</sup>	2.34 <sup>a</sup>
0.1	218.0 <sup>a</sup>	94.0 <sup>a</sup>	2.47 <sup>a</sup>
0.2	208.5 <sup>a</sup>	93.3 <sup>a</sup>	2.30 <sup>a</sup>
Peso inicial, kg.:			
+ de 7	224.4 <sup>a</sup>	106.1 <sup>a</sup>	2.39 <sup>a</sup>
de 6 a 7	210.7 <sup>ab</sup>	92.8 <sup>b</sup>	2.36 <sup>a</sup>
- de 6	193.7 <sup>b</sup>	86.2 <sup>b</sup>	2.33 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas entre las proporciones de fitobióticos y entre categorías de peso inicial, dentro de cada variable (P ≤ 0.05, Duncan).

En las Figuras 3 y 4 se ilustra las interacciones significativas para profundidad de cripta y relación L: P, respectivamente.



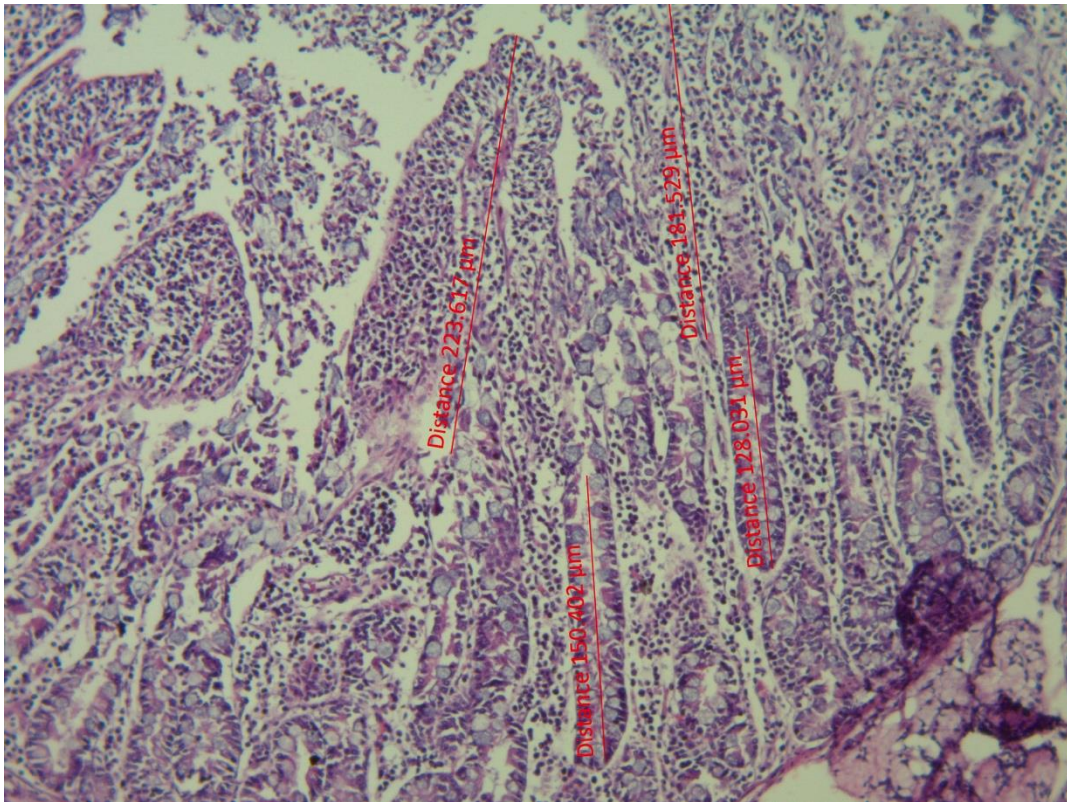
**Figura 3. Interacción % de fitobiótico x categoría de peso corporal al inicio del ensayo, para la profundidad de criptas intestinales**



**Figura 4. Interacción % de fitobiótico x categoría de peso corporal al inicio del ensayo, para la relación L: P**

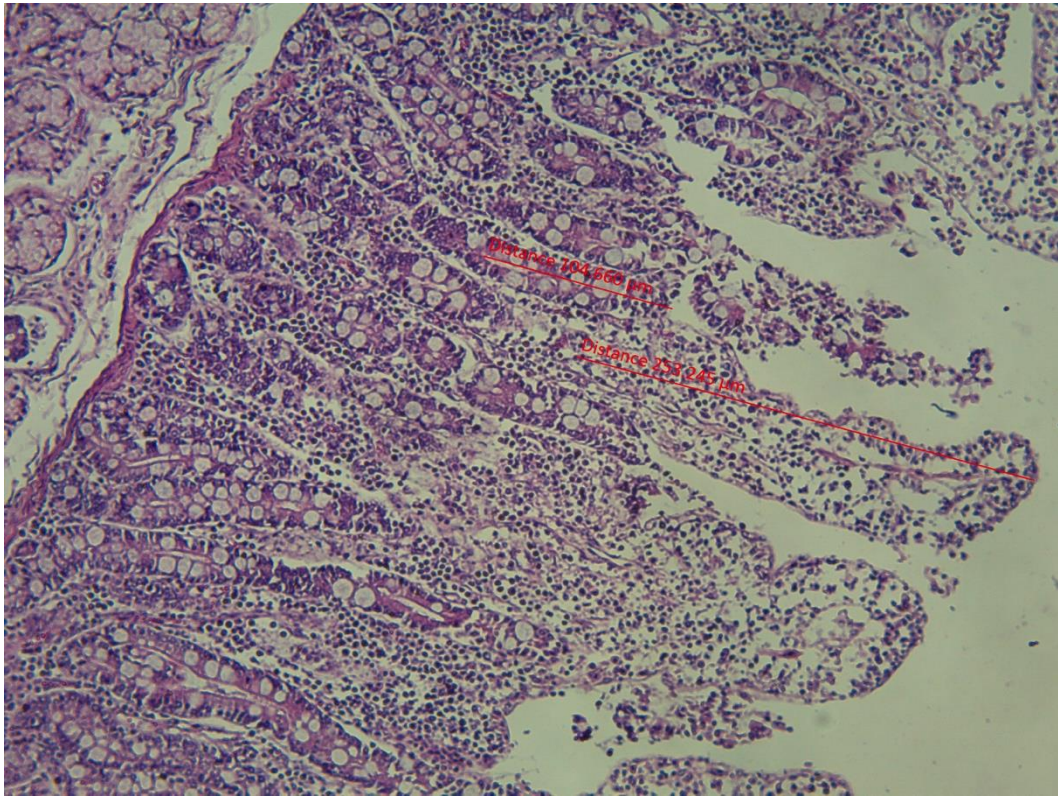
En las Figuras se puede observar que el comportamiento errático dio lugar a la significación de las interacciones en estas dos variables.

Se tomaron fotografías para determinar el estado del epitelio intestinal duodenal interno, las que se muestran en las Figuras 5, 6 y 7.

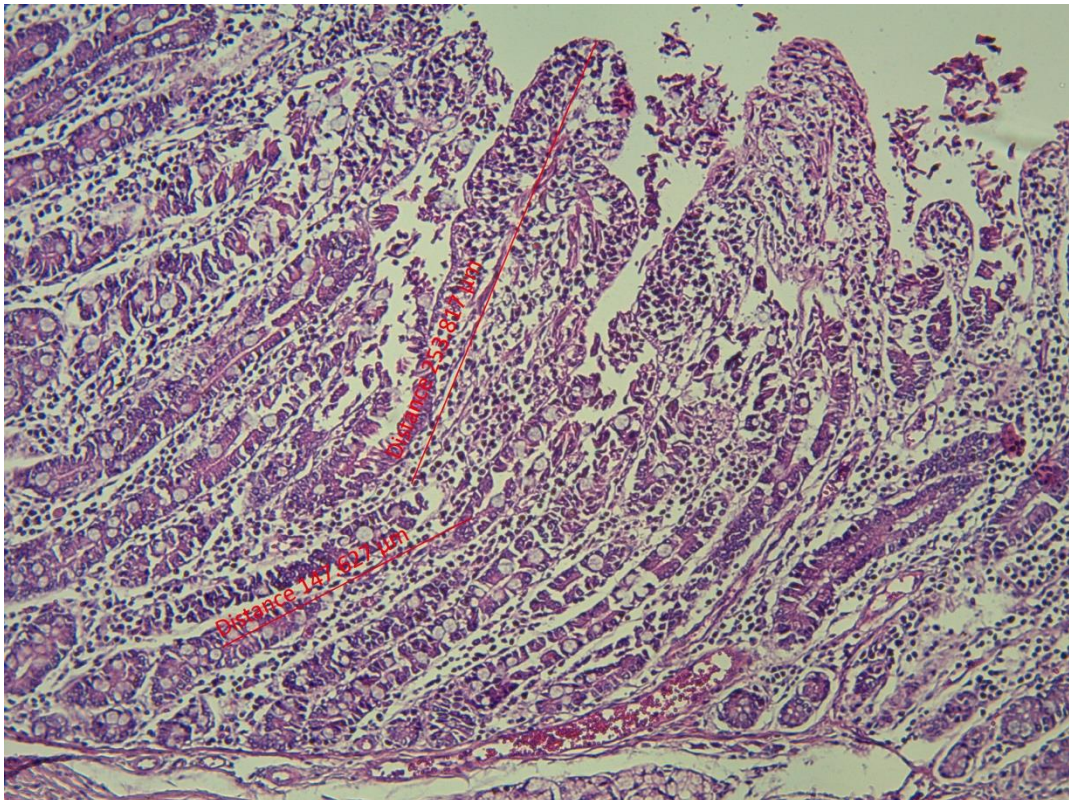


**Figura 5. Fotografía del epitelio intestinal interno del duodeno de un cerdo que no recibió fitobióticos y de la categoría de mayor peso al inicio del ensayo**

Dado que la apreciación visual de las fotografías de los epitelios no indicó deterioro patológico se incluyen en este documento sólo tres de dichas fotografías, una para cada una de las proporciones del fitobiótico y de la mayor categoría de peso corporal al inicio del ensayo. Sin embargo, tratándose de un trabajo de investigación el resto de fotografías se incluyeron en el apéndice, con la finalidad de que puedan ser analizadas por otros investigadores que deseen emplear esta técnica para diferentes estudios con cerdos u otras especies animales de interés zootécnico.



**Figura 6.** Fotografía del epitelio intestinal interno del duodeno de un cerdo que recibió 0.1% de fitobióticos y de la categoría de mayor peso al inicio del ensayo



**Figura 7.** Fotografía del epitelio intestinal interno del duodeno de un cerdo que recibió 0.2% de fitobióticos y de la categoría de mayor peso al inicio del ensayo

### 3.3. Análisis microbiológico

#### *Conteo de ufc de Clostridium perfringens*

Los resultados referidos al conteo de unidades formadoras de colonias (ufc) del contenido del intestino grueso de lechones recién destetados que recibieron un producto comercial fitobiótico, proveedor de tomillo y semillas de algarrobo europeo se presentan en la Tabla 8.

**Tabla 8. Conteo de ufc de *Clostridium perfringens* en el contenido del intestino grueso de lechones destetados que recibieron un producto proveedor de extractos de tomillo y semillas de algarrobo europeo**

	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>3</sub></b>
Lechones sacrificados	03	03	03
Edad de destete, días	23	23	23
Días experimentales	33	33	33
Edad de sacrificio, días	56	56	56
% del producto	0	0.1	0.2
Conteo de ufc	526500 <sup>a</sup>	757000 <sup>a</sup>	691000 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Letras iguales sobre los promedios indican diferencias no significativas entre tratamientos (P>0.05).



## IV. DISCUSIÓN

### 4.1. Aspectos Productivos

#### *Consumo de alimento*

El consumo de alimento entre los tratamientos fue muy parecido dentro de cada una de las fases, aun cuando dentro del Crecimiento I los tratamientos con el producto tendieron a consumir menos; sin embargo, al considerar el consumo acumulado se apreció que las diferencias fueron relativamente pequeñas, el consumo diario promedio acumulado por animal fue de 670, 650 y 650 gramos respectivamente para los tratamientos 1, 2 y 3, una diferencia de 20 gramos.

No obstante, las diferencias fueron mayores y considerables entre las repeticiones; dado que, como se indicó anteriormente, la primera repetición (dentro de cada tratamiento) estuvo constituida por los lechones (machos y hembras) más pesados al destete (más de 7 kilos), la segunda repetición por la siguiente menor categoría de peso (entre 6 y 7 kilos) y la tercera repetición por la más ligera (menor de 6 kilos); las repeticiones 2 y 3 comieron menos que la repetición 1.

El comportamiento descrito en la Figura 1 muestra que sólo en el Pre-Inicio las repeticiones 2 y 3 se aproximaron a la 1; como se esperaba, esto indica que el consumo de alimento guarda una relación directa con el peso corporal, a mayor peso corporal mayor consumo de alimento. Conforme se avanzó en edad las repeticiones 2 y 3 se alejaron más de la repetición 1 y en el Crecimiento I, prácticamente, se igualaron. Al parecer, inmediatamente después del destete los lechones trataron de compensar su menor peso vivo procurando alcanzar el mayor consumo posible en función de la menor capacidad de su tracto gastrointestinal.

Se puede asumir, entonces, que el consumo de alimento no fue afectado negativamente por la presencia del producto y que si es afectado por el tamaño de los lechones. Aún cuando Tabasum *et al.* (2016), al evaluar diferentes combinaciones de hierbas, reportaron disminución en el consumo de alimento. También algunos investigadores indicaron que los EP mejoraron el consumo, es el caso de Simonson (2004) quien investigó sobre el efecto de la mostaza y de la casia; así mismo, Cullen *et al.* (2005) y Jam *et al.* (2007) determinaron incrementos en la cantidad de alimento consumido al evaluar la inclusión de ajo en la alimentación de cerdos en crecimiento-acabado. También existe información que indica que la presencia de los EP no tiene efecto alguno sobre el consumo de alimento, como es el caso de Sulabo *et al.* (2007).

Según Jacela *et al.* (2010), bajo las condiciones de la producción porcina moderna, los cerdos deben alimentarse con una dieta balanceada que satisfaga sus requerimientos nutricionales diarios para mantenimiento, crecimiento y reproducción. Sin embargo, la ingesta de nutrientes está determinada en gran medida por el consumo voluntario de alimento, que está muy influenciado por los sentidos químicos del olfato y el gusto. Por lo tanto, es esencial asegurarse de que las dietas que se ofrecen a los cerdos sean altamente apetecibles para garantizar un alto consumo de alimento. Esto es especialmente importante cuando los cerdos tienen menos apetito, como los primeros días después del destete. Por lo tanto, se cree que la mejora del sabor o el olor a través del uso de saborizantes puede ayudar a mejorar la palatabilidad de las dietas y, en consecuencia, la ingesta de alimento.

Los mismos autores (Jacela *et al.*, op. cit.) consideran que se han identificado varios factores que afectan el consumo de alimento en los cerdos. En la mayoría de los casos, indican, la ingesta de alimento está influenciada por la interacción entre algunos o todos estos factores, que incluyen el ambiente térmico, factores sociales (Ej., densidad

animal), factores animales (Ej., Genotipo) y factores dietéticos (Ej., densidad energética y palatabilidad). La palatabilidad de una dieta se refiere a sus características de aceptabilidad, incluido el sabor, el olor y la textura, que captan los sentidos de los cerdos antes de comer. Algunos EP pueden estimular el consumo, precisamente por que impresionan los sentidos odoríficos y gustativos de los animales; aunque también existen algunos que podrían ocasionar acción contraria, pero lo importante es que el consumo de alimento no se vea deteriorado; es decir, si no se promociona tampoco que se disminuya.

No obstante, las cifras de consumo de alimento deben analizarse con la eficiencia de utilización del alimento para ser más precisos en las posibles inferencias.

### ***Incremento de peso vivo***

Aún cuando los pesos promedio por tratamiento al inicio del ensayo fueron aleatorizados al representar cada una de las repeticiones a una de las categorías de peso al destete se apreció que el tratamiento 3 fue desfavorecido en comparación a los tratamientos 1 y 2, estos estuvieron alrededor de los 7 kilos pero el tratamiento 3 estuvo próximo a los 6 kilos. Sin embargo, en cada una de las fases se aplicó el test de Bartlett para determinar si las varianzas estuvieron distribuidas homogéneamente y los resultados indicaron la presencia de homocedasticidad (Tablas 9A, 11A, 13A, 15A) por lo que se pudo asumir la ausencia de efectos multiplicativos. Al realizar el análisis de covarianza entre el peso inicial y los incrementos totales de peso (Tabla 17A), los resultados mostraron que después de corregir por covarianza las diferencias entre tratamientos se mantuvieron no significativas ( $P > 0.05$ ), aun cuando la regresión fue altamente significativa ( $P \leq 0.0001$ ). Los incrementos de peso acumulados corregidos por covarianza, promedio por tratamiento, fueron de 15.66, 14.91 y 15.14 kilos/

lechón, respectivamente para los tratamientos del primero al tercero; se apreció el efecto de compensación sobre el tratamiento 3.

Se determinó que el incremento total de peso observado del tratamiento testigo 2.35 veces el peso inicial de este tratamiento, en el tratamiento 2 representó 2.13 veces y en el tratamiento 3 representó 2.46 veces; evidenciándose que una mejor respuesta a través de esta variable productiva se logró con el tratamiento que incluyó la proporción mayor del producto fitobiótico evaluado y que, aparentemente, habría permitido un mejor efecto compensatorio.

Al analizar el efecto de la categoría de peso al destete se observó efecto de compensación en los lechones de menor peso (repeticiones 2 y 3) durante el período de Pre-Inicio, la Repetición 2 superó a la Repetición 1 en 8.7% y la Repetición 3 fue, prácticamente, similar. Este comportamiento no concuerda con el del consumo de alimento, ya que la Repetición 1 superó a la 2 y a la 3; lo que indicaría una mayor eficiencia en la utilización del alimento consumido para incrementar peso vivo.

En el incremento de peso acumulado (total de todo el ensayo) se neutralizó el efecto compensatorio de las repeticiones 2 y 3 en el Pre-Inicio con los menores incrementos de estas repeticiones en el Inicio y Crecimiento 1.

El análisis de covarianza, entre el peso inicial (X) y los incrementos totales de peso (Y), Tabla 17A, indicó que después de corregir por efecto del peso inicial los incrementos totales de peso continuaron mostrando diferencias no significativas entre tratamientos; aún cuando el valor de F para la regresión si fue significativo, por lo que se estimó los incrementos de peso corregidos por covarianza; los incrementos totales de peso corregidos para los tratamientos 1, 2 y 3 fueron 15.66, 14.91 y 15.14 kilos por cerdo, respectivamente. Se manifestó una compensación en el tratamiento 3 que fue el

que empezó con menos peso corporal; y una descompensación en el tratamiento 2 que fue el que empezó con mayor peso.

Analizada la información de los pesos logrados al finalizar cada uno de los períodos se determinó que en todos los períodos el tratamiento 2 logró los mayores pesos corporal (Tablas 18A, 19A, 20A) y que siempre los animales de la categoría inicial más alta de peso vivo logró los mayores pesos en cada uno de los períodos. Estos resultados con el peso vivo están influenciados, en buena medida, por el peso promedio con el que cada uno de los tratamientos inició el ensayo; como se indicó el mayor peso inicial correspondió al tratamiento 2, seguido del tratamiento 1 y el menos pesado fue el tratamiento 3.

La finalidad de evaluar los pesos respondió al hecho de que los productores reconocen más fácilmente a esta variable, lo que no es muy técnico; fuese adecuado si todos los tratamientos empezaran casi con el mismo peso, pero dada la influencia del peso inicial resulta más conveniente la utilización del incremento de peso para evaluar el efecto de los tratamientos, ya que de esta manera se tiende a neutralizar el efecto del peso inicial. No obstante, como en muchas de las especies de mamíferos, los animales de mayor peso al inicio del ensayo tienden a ganar más peso.

El incremento de peso vivo es la razón de ser de la producción porcina; aún cuando el cerdo es, por naturaleza, un eficiente acumulador de grasa, el negocio porcino actual se sustenta en la obtención de incrementos de peso magros. Es decir, se busca que en los incrementos de peso del cerdo predomine el músculo y no la grasa, lo que se denomina “incrementos de magro”. La magrura es un buen negocio para productor, toda vez que el incremento de una unidad de peso en forma músculo necesita de menos de la mitad de energía que el incremento de la misma unidad en forma de grasa; así, el

incremento de magro es más barato y, en consecuencia, más económico. Por otro lado, el exceso de grasa ingerida ha sido vinculado con problemas del tipo cardio-vascular; el empleo de extractos de plantas en la alimentación de los cerdos, como alimentos funcionales, ha sido vinculado con la obtención de incrementos de peso magro y con otras propiedades interesantes (McDonald *et al.*, 2013); en consecuencia, mejorándose la economía de la empresa porcina y velando por la salud de los consumidores.

Como en el caso del efecto sobre el consumo de alimento, se ha obtenido resultados de tipo contradictorio al evaluar el efecto de los EP sobre los incrementos de peso; en el sentido de que para algunos su uso ha sido positivo y para otros no se evidenció tipo alguno de efecto. Efectos promotores sobre los incrementos de peso han sido reportados por Grela *et al.* (1998) al emplear una combinación de hierbas en la alimentación porcina. En tanto que Ilsey *et al.* (2002), Allan y Bilkei (2005), Ariza-Nieto *et al.* (2011) lograron obtener mayores incrementos de peso en lechones destetados al incluir orégano y cinnamaldehído en la alimentación de las madres. También mayores incrementos de peso se reportaron por Dunshea *et al.* (2003) al emplear un análogo de la capsaicina; por Simonson (2004) empleando mostaza y casia; por Cullen *et al.* (2005) y Jans *et al.* (2007) al utilizar extracto de ajo.

El timol y el carvacrol, constituyentes del orégano y del tomillo, se emplearon por Walter y Bilkey (2004) y reportaron mayores incrementos de peso. En tanto que Kotrotsios *et al.* (2012) emplearon harina de vainas de *Ceratonia siliqua* en cantidades pequeñas y determinaron mejores incrementos de peso.

Aún cuando, en el presente estudio, las diferencias en los incrementos de peso no alcanzaron significación estadística, al determinar la relación entre el incremento total de peso y el peso inicial se determinó que en el tratamiento 1 (testigo, sin el producto

comercial fitobiótico) el incremento total de peso representó 2.35 veces el peso inicial; en el tratamiento 2 (0.1% del producto fitobiótico) representó 2.13 veces, y en el tratamiento 3 (0.2% del producto) representó 2.46 veces el peso inicial. Esta simple relación indicó que el producto sí ejerció un efecto benéfico sobre los incrementos de peso. La interrogante se centra en las propiedades que tienen los principios fitobióticos empleados para poder promocionar los incrementos de peso.

Cómo se ha indicado, los principios contenidos en los fitobióticos realizan una serie de acciones que no sólo tienen que ver con los incrementos de peso, sino también con la eficiencia de utilización del alimento para ganar peso, la menor acumulación de grasa en los incrementos de peso, la salud del epitelio intestinal, etc. En consecuencia no se puede discutir sobre una acción aislada, ya que la acción que realizan es compleja (varias acciones vinculadas). Se ha resaltao particularmente la acción de control de bacterias de tipo patógeno a nivel del tracto gastrointestinal, la acción atrapadora de radicales libres (acción anti-oxidante) y la anti-inflamatoria.

Diferentes investigadores (Bishop, 1995; Hammer *et al.*, 1999; Dorman y Deans, 2000; Pandey *et al.*, 2000; Ultee y Smid, 2001; Pessoa *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006; Abed, 2007; Wong *et al.*, 2008; Garozzo *et al.*, 2009) han determinado que los EP tienen anti-fúngica, anti-parasitaria, anti-vírica y anti-toxigénica. Todos estos tipos de acciones son necesarias en el tracto gastrointestinal, debido a que existe en él toda una micro-biota que está constituida por especies benéficas y patógenas, el éxito de la producción porcina estriba en mantener controlada a la micro-biota patógena y permitir que prospere la benéfica, acción en la que los EP tienen un rol importante. Así, los nutrientes proveídos por el alimento se destinarían a funciones productivas antes que estar alimentando a flora y fauna de tipo patógeno.

Lo más importante de esta acción en contra de bacterias, hongos, etc., es que no generan resistencia que podría afectar al consumidor y a los mismos animales.

Como se indicó, en los sistemas de producción animal se dan las condiciones para que los animales (principalmente cerdos y aves) sufran procesos estresantes que generen la aparición de radicales libres. Estas estructuras dañan al tejido epitelial intestinal y el organismo tiene que destinar una gran cantidad de nutrientes para su reparación; en consecuencia, es importante disponer de anti-oxidantes, de preferencia naturales, que puedan atrapar a los radicales libres. Muchos principios contenidos en los EP han probado esta acción anti-oxidante como ha sido corroborado por diferentes investigadores (Economou *et al.*, 1991; Botsoglou *et al.*, 2002; Gülçin *et al.*, 2004; Oboh *et al.*, 2007; Slamenova *et al.*, 2008; Frankič *et al.*, 2010).

En las granjas de explotación porcinas se producen una serie de acciones interactivas entre los animales, entre los animales y el ambiente, y entre los animales y el hombre, que tienden a producir procesos inflamatorios que deterioran la salud de los animales y que pueden producir la muerte; muchas veces los procesos se desarrollan de forma sub-clínica (sin síntomas visibles) y pasan desapercibidos, las alteraciones sub-clínicas de la salud son las que más cuestan al productor de porcinos, ya que los animales merman considerablemente su rendimiento y se vuelven ineficientes en la utilización del alimento para producir. El rol de los principios anti-inflamatorios naturales es de importancia para lograr eficiencia económica en la producción porcina. La presencia de estos principios en los EP ha sido reportada por diferentes investigadores (MacMicking *et al.*, 1997; Dinarello, 2000; Hart *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Aggarwal y Shishodia, 2004; Lang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005, 2007; Li *et al.*, 2006; Tung *et al.*, 2008; Dung *et al.*, 2009; Landa *et al.*, 2009).



Se ha determinado la presencia de estos principios en el extracto de tomillo (Suzuki y Furuta, 1988; Aeschbach *et al.*, 1994; Essawi y Srour, 2000; Hudaib *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2002; Soliman y Badlaa, 2002; Venturini *et al.*, 2002; Braga *et al.*, 2006) y en el del algarrobo europeo (Hsouna *et al.*, 2011; Kotrotsios *et al.*, 2012; Roseiro *et al.*, 2013; Durazzo *et al.*, 2014), que podrían explicar la respuesta en el incremento de peso del tratamiento con 0.2% del producto fitobiótico en el presente experimento.

### ***Conversión alimenticia***

Realizada la evaluación estadística se pudo determinar que la componente residual de varianzas estuvo uniformemente distribuida entre los grupos de tratamientos en cada una de las fases (Tablas 21A, 23A, 25A y 27A) y al aplicar el análisis de la varianza (Tablas 22A, 24A, 26A, 28A) se apreció que las diferencias entre los tratamientos no alcanzaron significación estadística sólo en la fase de Pre-Inicio; pero sí en el Inicio, Crecimiento I y en el valor acumulado, en los que el tratamiento 3 fue el menos eficiente.

Se observó, así mismo, que los valores de CA tendieron a incrementarse (menos eficiencia) con la edad, lo que es normal; pero debido a un marcada efecto compensatorio en animales recién destetados la conversión alimenticia reflejó mayor eficiencia aún, lo que se puede apreciar en la fase de Pre-Inicio, sobre todo con el tratamiento 2, cuya conversión alimenticia fue 2.5% más eficiente que la del testigo.

La tendencia normal en los animales de interés zootécnico es que conforme van incrementando la edad la eficiencia de utilización del alimento vaya disminuyendo; lo que se debe al cambio en el tipo de tejido que se acumula en el cuerpo, aquí la grasa tiene un rol importante ya que se necesita más del doble de energía para incrementar un gramo de grasa que uno de músculo. Sin embargo, una elevada eficiencia de

utilización del alimento en el Pre-Inicio indicaría la presencia de un marcado efecto compensatorio, sobre todo en los lechones de las repeticiones 2 y 3.

Lo que explicaría la mejor conversión lograda en el Crecimiento I en comparación al Inicio es la edad bastante joven, aún, de los cerditos; permitiendo incrementos de peso en base a músculo más que en base a grasa.

Aún cuando las diferencias entre los tratamientos no alcanzaron significación estadística, se apreció que el tratamiento 2 mostró mayor eficiencia en la utilización del alimento, sobre todo en el Pre-Inicio e Inicio.

Se asumió que el contenido de principios anti-bacterianos, anti-oxidantes y estimuladores de la inmuno-competencia permitirían conservar la integridad del epitelio intestinal y, de esta manera, permitir mejor eficiencia en la utilización del alimento y mayor eficiencia en el rendimiento (Suzuki y Furuta, 1988; Aeschbach *et al.*, 1994; Essawi y Srour, 2000; Hudaib *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2002; Soliman y Badlaa, 2002; Venturini *et al.*, 2002; Braga *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2016).

Además, las semillas de algarrobo europeo son portadoras también de principios prebióticos que permiten el desarrollo y establecimiento de flora benéfica en el intestino permitiendo mejores condiciones nutricionales para los animales, sobre todo tratándose de animales muy jóvenes.

Se pudo apreciar que, con excepción del Inicio, en el resto de fases y en la CA acumulada los animales de las repeticiones de menor peso exhibieron mayor eficiencia en la utilización del alimento, lo que se atribuyó al efecto compensatorio.

La eficiencia en la utilización del alimento, en este caso para incrementar peso vivo, expresada como los valores menores de conversión alimenticia (menor cantidad de

alimento para incrementar una unidad de peso vivo) es uno de los indicadores más importantes en la producción de animales de interés zootécnico, toda vez que se vincula con menores gastos en alimentación y, en consecuencia, menor costo de producción (la inversión en alimentación representa entre el 60 y 70% del costo total de producción), por esta razón cualquier mejora en la eficiencia se refleja en menor costo. En la producción porcícola y avícola, por la elevada densidad de animales que se explota, márgenes de 1% o superiores en la eficiencia de utilización del alimento representan importantes márgenes de rentabilidad. En la Tabla 3 se aprecia que la conversión alimenticia del tratamiento 2 (0.1% del producto en la dieta) fue más eficiente que la lograda por el tratamiento control en 2.5 y 1.3% respectivamente para las fases de Pre-Inicio e Inicio, precisamente las fases más delicadas para los lechones después del destete. Esto indica que el producto ensayado es proveedor de principios que permiten mejor absorción de nutrientes y, consecuentemente, de mejor rendimiento en vivo de los cerdos en estas delicadas fases de su vida productiva.

La importancia de lograr mayor eficiencia en la utilización del alimento radica en que se relaciona muy bien con mejor economía del proceso productivo.

### ***Mérito económico***

Los valores del mérito económico fueron muy altos en el Pre-Inicio y el Inicio, lo que se debió al costo del alimento empleado en esos períodos. La ración de Pre-Inicio tuvo un costo de 15.84 soles por kilo (US\$ 4.875), la de Inicio de 11.78 soles por kilo (US\$ 3.625); en tanto que la local (preparada en la granja) empleada en el período de Crecimiento I de 1.84 soles por kilo (US\$ 0.566). Dada la importancia del destete en el proceso productivo total del cerdo, la empresa ha establecido por norma adquirir alimento de una empresa proveedora para los dos primeros períodos; el proveedor le

asegura que tales reciones han sido preparadas bajo las más altas normas de higiene y de calidad de insumos para los cerdos recién destetados y de esa manera busca asegurar que los cerdos puedan alcanzar los más altos pesos y en forma rápida y eficiente al momento de la saca al mercado.

Toda empresa pecuaria, como en las empresas de cualquier rubro, busca obtener rentabilidad; es decir, económicamente busca márgenes positivos que le permitan mantenerse dentro del negocio. La rentabilidad implica que los ingresos estén por encima de los egresos; en éstos últimos, los costos juegan un rol muy importante. Por ejemplo, dependiendo de la madurez de la unidad productiva porcina, el costo de alimentación puede representar entre 60 y 70% del costo total de producción; esto implica que cualquier desbalance en este rubro puede llevar a la quiebra al negocio, por lo que debe buscarse siempre eficiencia. La eficiencia implica que se gaste menos dinero en alimento por cada kilo de peso incrementado, indicando mejor mérito económico.

Los valores de mérito económico tienden a manifestar una tendencia muy parecida a los de conversión alimenticia, la asociación entre estas dos variables es alta; sin embargo, en determinadas circunstancias puede lograrse excelentes conversiones alimenticias utilizando un producto muy caro y que se emplea en proporciones altas, ocasionando valores de mérito económico ineficientes. No es una situación que se haya dado en el presente ensayo, se puede apreciar que con el tratamiento que incluyó 0.1% del producto evaluado el mérito económico es similar al obtenido con el testigo, resultado que indicó que puede emplearse el producto en lugar de APC.

Si bien podría objetarse que el producto no ha ocasionado ventajas en el mérito económico en comparación al tratamiento testigo, habría que tener en consideración

que varias de las ventajas potenciales de los fitobióticos no entran en la estimación del valor del mérito económico. Por ejemplo, la disminución del riesgo de antibiótico resistencia, la mejora en la durabilidad de la carne, mejor calidad de la carcasa, etc., son características que mejoran considerablemente la capacidad del negocio porcino.

Las propiedades, reportadas por diferentes investigadores, antibacterianas (Bishop, 1995; Hammer *et al.*, 1999; Dorman y Deans, 2000; Pandey *et al.*, 2000; Ultee y Smid, 2001; Pessoa *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006; Abed, 2007; Wong *et al.*, 2008; Garozzo *et al.*, 2009), antioxidantes (Economou *et al.*, 1991; Botsoglou *et al.*, 2002; Gülçin *et al.*, 2004; Oboh *et al.*, 2007; Slamenova *et al.*, 2008; Frankič *et al.*, 2010) y antiinflamatorias (MacMicking *et al.*, 1997; Dinarello, 2000; Hart *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Aggarwal y Shishodia, 2004; Lang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005, 2007; Li *et al.*, 2006; Tung *et al.*, 2008; Dung *et al.*, 2009; Landa *et al.*, 2009), entre otras, sustentan el hecho de la conveniencia económica del empleo de fitobióticos sobre los APC, cuya acción no tiene un amplio abanico de posibilidades. Sin embargo, es necesario realizar investigación complementaria al respecto.

### ***Rendimiento de carcasa***

El análisis estadístico indicó que las componente residual de varianza estuvo uniformemente distribuida entre los tratamientos (Tabla 29A) y cuando de aplicó el análisis de la varianza (Tabla 30A) se determinó que las diferencias entre tratamientos no alcanzaron significación estadística.

Debe tenerse en consideración que los cerdos comerciales no se explotan para ser sacrificados a los 56 días de edad, cuando su peso vivo recién se encuentra ligeramente por encima de los 20 kilos, sino cuando alcanzan entre los 90 y 100 kilos. Teniendo en cuenta ese aspecto, los rendimientos variarán debido a que los componentes de la

carcasa (músculos, grasa, hueso) y los que no lo son (órganos internos e intestinos) modificarán su proporción conforme avanza la edad, por lo que las cifras reportadas en el presente estudio son referenciales.

Como ya se ha indicado, La finalidad de sacrificar animales a edad joven fue poder obtener muestras de tejido intestinal para determinar el efecto del producto sobre los epitelios; sin embargo, dado que existe mercado para la carne de animales jóvenes se aprovechó la oportunidad para poder estimar el rendimiento en carcasa a esta edad y disponer de información que permita hacer futuros cálculos de precios y rentabilidad.

Aún cuando el análisis estadístico mostró que no hubo diferencias significativas entre tratamientos para rendimiento de carcasa. Lo interesante aquí es tener en consideración que uno de los problemas más importantes vinculados a la producción de carne de cerdo se centra en la presentación del síndrome PSE (por las siglas en inglés para Pálido – Blando – Exudativo) que representa grandes mermas en el peso de la carcasa o el rechazo de carcasas completas; la presentación del síndrome es de mayor incidencia en los cerdos debido a la mayor susceptibilidad de la especie al estrés. Se ha determinado que los atrapadores de radicales libres (antioxidantes) permitirían mayor viabilidad de las células musculares después del sacrificio y podrían mitigar o evitar la presentación del síndrome.

Diferentes trabajos de investigación han mostrado que las especias o diferentes hierbas son portadoras de atrapadores de radicales libres (Economou *et al.*, 1991; Botsoglou *et al.*, 2002; Gülçin *et al.*, 2004; Oboh *et al.*, 2007; Slamenova *et al.*, 2008; Frankič *et al.*, 2010); además de principios que dan mayor consistencia y sabor a la carne. Resaltando en esta acción la importancia de los aceites esenciales como el timol, carvacrol, etc.

Como se podrá deducir, estos aspectos son de gran importancia en el proceso de comercialización de la carne de cerdo; en países, como el nuestro, en el que la carne de cerdo ha empezado a desplazar a la de otras especies, es importante que goce de la aceptación del consumidor, ya que además del sabor y aroma sería una carne más sana ya que podría producirse sin el empleo de antibióticos promotores del crecimiento (APC), que se empezaron a utilizar en las dietas de los animales de interés zootécnico con la finalidad de controlar bacterias intestinales; inicialmente se les consideró como una maravilla, pero en la actualidad existe gran cantidad de evidencia que los vincula a la antibiótico-resistencia en humanos.

#### **4.2. Aspectos del Epitelio Intestinal**

##### ***Longitud de vellosidades intestinales, profundidad de criptas intestinales y relación***

##### ***longitud: profundidad***

Realizado el análisis estadístico se pudo determinar que no hubo diferencias significativas entre proporciones del fitobióticos, tanto para la longitud, profundidad de las criptas y relación longitud: profundidad. Para las tres categorías de peso sobre las que se conformaron las repeticiones las diferencias no fueron significativas para la relación longitud: profundidad; sin embargo, tanto para longitud como para profundidad las diferencias si alcanzaron significación estadística. Así mismo, la interacción % de fitobiótico x categoría de peso inicial fue significativa para profundidad de cripta como para la relación longitud: profundidad. Los análisis de presentan en las Tablas 31A, 32A y 33A.

A nivel microscópico, la pared intestinal del cerdo sigue la estructura general encontrada en el *Tubus alimentarius* de todos los mamíferos domésticos. Consta de las siguientes capas (de adentro hacia afuera): *Tunica mucosa*, que consiste en *Epitelio*

*mucoso, Lamina propria mucosa y Lamina muscularis mucosae; Tela submucosa; Tunica muscularis* - que consiste en *Stratum circulare* y *Stratum longitudinale*; *Tela subserosa* y *Tunica serosa*, que consisten en *Lamina propria serosae* y *Epithelium serosae* (Weyrauch *et al.*, 2009).

Hay varias características estructurales de la mucosa y la submucosa que agrandan la superficie de absorción del intestino delgado. Las plicas circulares son una serie de pliegues circulares, revestidos por protuberancias en forma de dedos: las vellosidades. Las vellosidades están cubiertas por los enterocitos, que a su vez tienen extensiones de la membrana epitelial: las micro-vellosidades. El epitelio de cada vellosidad continúa en las glándulas tubulares, las criptas de Lieberkühn (Mescher, 2009).

El epitelio de una sola capa en el tracto intestinal consiste principalmente en cuatro tipos de células, todas descendientes de células madre que residen en la base de las criptas, lo que permite un recambio celular continuo: más de 80% células de absorción en forma de columna, ~ 4 (duodeno) - 16% (colon) de mucosa que produce células caliciformes, menos de 1% de péptidos antimicrobianos que producen células de Paneth (la existencia de esta población celular está en discusión para el cerdo (Myer, 1982; van Es y Clevers, 2014)) y ~ 1% de hormona productora células enteroendocrinas (van der Flier y Clevers, 2009).

La lámina propia forma la capa de soporte del epitelio, que consiste en tejido conectivo y vasos de suministro, y está poblada por células productoras de matriz extracelular, neuronas, fibras de músculo liso y una gran cantidad de células inmunitarias (Liebich, 2010).

La mucosa *muscularis* asegura el movimiento local de vellosidades y pliegues circulares. En la submucosa, los vasos y los plexos nerviosos forman una red de



suministro para las estructuras supra yacentes. En la submucosa del duodeno, se pueden encontrar glándulas (glándulas de Brunner), secretando moco alcalino en la luz, y en el yeyuno e íleon, se encuentran agregados de nódulos linfoides (parches de Peyer), que se extienden desde la submucosa hasta el lámina propia. La capa muscular es importante para el peristaltismo, contiene plexos nerviosos y está cubierta por la serosa, que también forma el mesenterio de soporte y contiene el tejido conectivo, los vasos grandes, los nervios y los ganglios linfáticos (Mescher, 2009; Liebich, 2010).

Existe evidencia clara en la literatura de que el destete causa cambios estructurales enormes en el intestino del cerdo. Como se ha indicado, el revestimiento epitelial del intestino delgado tiene proyecciones en forma de dedo conocidas como vellosidades, que ayudan a aumentar su superficie para los procesos de digestión y absorción. Además, la superficie de la mucosa del intestino delgado tiene glándulas tubulares que se abren hacia el lumen intestinal en la base de las vellosidades conocidas como criptas. Las criptas contienen células madre epiteliales necesarias para la repoblación de células epiteliales. Para una función óptima del intestino delgado, las vellosidades largas son deseables. Sin embargo, existe un período de atrofia vellosa transitoria e hiperplasia de criptas después del destete, y se ha sugerido que la anorexia post destete es el principal factor etiológico de estos cambios, ya que la ingesta de energía después del destete se relaciona positivamente con la arquitectura del intestino delgado. Del mismo modo, se ha informado que la anorexia del destete se correlacionó con la hipertrofia de las criptas y las respuestas inflamatorias locales: la ingesta reducida de alimento pero no la composición de la dieta comprometió la arquitectura epitelial en yeyuno de cerdos alimentados con una dieta basada en harina de soja en comparación con aquellos alimentados con un sustituto de leche (Hampson, 1986; Pluske *et al.*, 1997; McCracken *et al.*, 1999; Zhang y Xu, 2003; Llyod y Gabe, 2008).

Además de una reducción en el consumo de alimento después del destete, otros factores pueden ser en parte responsables de la atrofia de las vellosidades. Por ejemplo, se ha informado una reducción en la altura de las vellosidades (VH) y un aumento en la profundidad de las criptas (CD) dentro de los primeros 3 días después del destete en cerdos alimentados en forma continuada a través de intubación gástrica. Se sugirió que los cambios morfológicos en la arquitectura intestinal se producen después del destete incluso en presencia de un suministro continuo de nutrientes. Aunque no se presentó ningún mecanismo subyacente particular para estos cambios, puede asociarse con tensiones del destete. Por ejemplo, la concentración de glucagón en sangre, una hormona asociada al estrés, se elevó entre los días 2 y 5 después del destete en lechones. Debido a que el glucagón es una hormona catabólica que ayuda a movilizar sustratos de energía almacenada y su posterior conversión a glucosa, se ha mencionado que el estrés asociado con la separación de los lechones de la marrana y su transporte a los corrales contribuyó en parte a la alteración de la arquitectura intestinal después del destete. Los investigadores indican que es bastante difícil comparar los datos sobre la morfología intestinal de diferentes experimentos debido a las diferencias en la edad, raza, dietas y condiciones experimentales y también porque no hay estándares conocidos para mediciones de VH y CD (Kelly *et al.*, 1991b; van Beers-Schreurs *et al.*, 1998).

Colectivamente, es evidente que mantener la ingesta de energía y reducir las tensiones de destete son factores importantes para mantener la integridad de la estructura del intestino delgado inmediatamente después del destete (Pluske *et al.*, 1996; van Beers-Schreurs *et al.*, 1998; Moeser *et al.* 2007).

La superficie del borde de cepillo de los enterocitos realiza acciones digestivas en el intestino delgado. Los enterocitos representan aproximadamente el 90 y el 95% de las

células epiteliales en la cripta y en las vellosidades, respectivamente, y son responsables de la liberación de las enzimas digestivas. Estas enzimas se basan principalmente en la mucosa y se pueden distinguir fácilmente de las enzimas pancreáticas que actúan principalmente sobre el contenido luminal del intestino. Las actividades de las enzimas de borde en cepillo en cerdos destetados se han utilizado como indicadores de la maduración y la capacidad digestiva del intestino delgado (Cheng y Leblond, 1974; Henning, 1985; Hampson y Kidder, 1986; Adeola y King, 2006).

Varios investigadores indican que habitualmente se observa una reducción en la actividad de lactasa después del destete, y esto está relacionado en parte con la disminución ontogénica de la actividad de lactasa en el borde de cepillo. Sin embargo, se menciona, la existencia de falta de consistencia en la literatura sobre el efecto del destete en las actividades de otras disacaridasas en el borde de cepillo. Por ejemplo, el destete provocó un aumento en la actividad de sacarasa, maltasa y glucoamilasa durante la primera semana después del destete en algunos estudios mientras que otros informaron una disminución en las actividades de sacarasa y maltasa. Las discrepancias entre los estudios son probablemente el resultado de múltiples variaciones, como el diseño experimental, las dietas experimentales, la edad de los animales, las metodologías analíticas y estadísticas y los días posteriores al destete en los que se tomaron las medidas (Montgomery *et al.*, 1981; Miller *et al.*, 1986; Kelly *et al.*, 1991a, b; Motohashi *et al.*, 1997; Hedemann y Jensen, 2004).

Se reporta que en algunos estudios se ha observado una disminución en las actividades de dipeptidilpeptidasa IV, aminopeptidasa N y fosfatasa alcalina 3 días después del destete, pero esto no se observó en otros estudios. Esta observación tiene poca o ninguna importancia práctica porque los lechones rara vez se destetan a menos de 2

semanas de edad. El destete no tuvo efecto sobre las tripeptidasas. La inanición debida a la anorexia y la presencia de enterocitos inmaduros debido a la atrofia de las vellosidades podrían desempeñar un papel en la disminución de las actividades de peptidasa en el borde de cepillo alrededor del destete (Kim *et al.*, 1973; Collington *et al.*, 1990; Tang *et al.*, 1999; Hedemann *et al.*, 2003; Marion *et al.*, 2005).

Se menciona que en estudios donde se han reportado reducciones transitorias en las actividades enzimáticas del borde de cepillo, las actividades enzimáticas usualmente alcanzan niveles mínimos entre 3 y 5 días después del destete y aumentan gradualmente después. El aumento de las actividades enzimáticas en el borde de cepillo después de los primeros 5 días posteriores al destete probablemente se deba a un aumento en la disponibilidad del sustrato a medida que aumenta el consumo diario de alimento. Se indica que, por ejemplo, las actividades de maltasa y glucoamilasa fueron mayores en los cerdos que recibieron un suministro continuo en comparación con aquellos que recibieron un suministro restringido de nutrientes (Hampson y Kidder, 1986; Kelly *et al.*, 1991b; Pluske *et al.*, 1997).

Según varios investigadores, la secreción de fluidos y electrólitos desde las células de las criptas y la absorción de nutrientes desde la luz intestinal son parte de las funciones primarias del intestino delgado. La secreción del intestino delgado es un fenómeno fisiológico natural y es esencial para la digestión y absorción de nutrientes; sin embargo, una condición secretoria neta ocurre cuando la afluencia de fluidos y electrolitos a la luz intestinal excede su efluvio a la sangre, y esto puede servir como un factor predisponente para la diarrea secretoria. El destete resulta en una reducción en la absorción neta de líquidos y electrolitos, y una mala absorción de nutrientes en el intestino delgado de los lechones (Nabuurs *et al.*, 1994; Kaunitz *et al.*, 1995; Miller y Skadhauge, 1997; Pácha, 2000; Wapnir y Teichberg, 2002; Xu, 2003).

En el presente estudio, las diferencias no significativas entre longitud de las vellosidades, profundidad de la cripta y en la relación longitud: profundidad, en función de las proporciones de fitobiótico empleadas, pueden deberse a que los cerdos recibieron un aporte adecuado de energía a través de la ración; en tanto que la menor longitud de las vellosidades y profundidad de criptas que se determinaron en función de los animales menos pesados al inicio del ensayo se podrían atribuir a que su menor condición corporal, acompañada de varios factores mencionados por los diferentes investigadores, propiciarían un acortamiento de las vellosidades y menor profundidad de criptas que se mantendría hasta la finalización del Crecimiento 1. Sin embargo, al parecer no se afectó la capacidad de nutrientes, toda vez que estas categorías de animales presentaron las mayores ganancias de peso compensatorias inmediatamente después del destete.

#### **4.3. Análisis microbiológico**

##### ***Conteo de ufc de Clostridium perfringens***

Debido a los valores considerablemente altos y a la alta variabilidad en los resultados, típico del conteo de bacterias, se procedió a codificar los datos dividiendo todos los valores entre 1000 y transformados a base logarítmica ( $\log_{10}$ ) para aplicar el análisis de la varianza, el resultado indicó que las diferencias no alcanzaron significación estadística (Tabla 34A).

Este resultado es congruente con el hecho de que los cerdos empleados en el presente trabajo de investigación no fueron desafiados sanitariamente con un ataque bacteriano y, si bien, la densidad, la acumulación de calor y humedad relativa, entre otros, constituyen factores que pueden ocasionar desafío sanitario el organismo de los cerdos

desarrolla procesos fisiológicos para tratar de neutralizarlos. Por lo que el conteo de la bacteria *C. perfringens* no se consideró como desafío sanitario.

El conteo bacteriano es altamente variable en todo tipo de análisis, el conteo de *C. perfringens* en el contenido del intestino grueso de los cerdos no fue la excepción. La alta variación no permitió que se exhibiera una tendencia definida. Debe tenerse en consideración que la especie analizada es una comensal típica del intestino grueso de los animales y que los valores reportados se encuentran por debajo de los valores reportados para cerdos del Crecimiento I. Así mismo, el hecho de co-habitación hace que la micro-biota sea parecida en la de los cerdos del presente estudio, los que si bien estuvieron en corrales diferentes, todos los corrales pertenecieron a la misma nave de producción; el efecto de co-habitación ha sido indicado por Thompson *et al.* (2008).

Por otro lado, los reportes de Savage (1975, 1977) y de Mackie *et al.* (1999) indicaron que en la parte posterior del TGI existen entre  $10^{10}$  y  $10^{11}$  UFC por gramo de contenido, y considerando que *C. perfringens* es una de las bacterias dominantes del intestino grueso, los valores hallados en el presente estudio pueden considerarse normales. Respectivamente para los tratamientos del primero al tercero los valores fueron de  $5.265 \times 10^5$ ,  $7.57 \times 10^5$  y  $6.91 \times 10^5$  UFC. Así mismo, la presencia de la bacteria en el intestino grueso no, necesariamente, implica su presencia en el intestino delgado y si la hubiera sería en cantidades menores, debido al efecto barrera entre ambas estructuras. El buen estado de salud mostrado en los cerdos del presente estudio indica que no hubo problemas vinculados a esta bacteria, en el intestino delgado.

Aunque *Clostridium* ha sido descrito como dañino, este representaría principalmente el clúster I proteolítico de *Clostridium* con su representante comensal predominante *Clostridium perfringens*. La investigación en cerdos y humanos ha indicado que los

cluster IV y XIVa de *Clostridium* que degradan las fibras son beneficiosos para el hospedero; se ha determinado que la micro-biota intestinal fibrolítica, como los mencionados clúster IV y XIVa de *Clostridium*, producen butirato a partir de fibra digestiva en el intestino grueso de los mamíferos, estando directamente involucrado en una vía epigenética bien descrita: la acetilación de histonas. Así, se ha determinado que la producción de butirato por la micro-biota intestinal en el ciego de los cerdos tiene un impacto directo sobre la proliferación de células de las criptas, a través de la inhibición de los complejos enzimáticos histona deacetilasa que reducen la transcripción (Boffa *et al.*, 1978; Bergey y Holt, 1994; Barcenilla *et al.*, 2000; Waterland, 2006; Castillo *et al.*, 2007; Kien *et al.*, 2006, 2008a, b). Por lo que la presencia de *Clostridium perfringens* en el contenido del intestino grueso de los cerdos evaluados en el presente estudio no tendría por qué ser, necesariamente, perjudicial.

Así mismo debe considerarse que los animales no fueron desafiados sanitariamente, ya que se mantuvieron bajo condiciones comerciales, que si bien puede darse algún tipo de desafío sanitario no implica el desarrollo de enfermedad.

Timol y carvacrol, constituyentes típicos del tomillo, además de los principios contenidos en el algarrobo europeo han mostrado capacidad para controlar poblaciones bacterianas de tipo patógeno, sin llegar a desaparecerlas (Frag *et al.*, 1989; Bowles y Miller, 1993; Helander *et al.*, 1998; Dorman y Deans, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Burt, 2004).

Debe tenerse presente que la microbiota del TGI es de suma importancia para un mamífero, como ha sido indicado por las investigaciones de Gibson y Roberfroid (1995), los animales y el ser humano no podrían ser lo que son sin la micro-biota que le permite desarrollar su aparato inmunológico y facilitarle los procesos de nutrición.

## V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se realizó el presente trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La presencia de producto fitobiótico no manifestó efecto sobre el consumo de alimento de los cerdos.
2. Los incrementos de peso no difirieron significativamente entre las diferentes proporciones del fitobiótico; sin embargo, con 0.2% del producto en el alimento los cerdos incrementaron 2.46 veces el peso que registraron al inicio del ensayo.
3. La conversión alimenticia tendió a presentar mayor eficiencia con 0.1% del producto, principalmente en las fases de Pre-Inicio e Inicio; los cerdos de las repeticiones menos pesadas presentaron efecto de compensación que se manifestó con mayor eficiencia en la utilización del alimento para incrementar peso vivo.
4. Los rendimientos de carcasa fueron de alrededor de 72%, sin diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.
5. No hubo diferencias significativa entre las longitudes de las vellosidades intestinales, profundidades de las criptas y la relación longitud: vellosidad; no se mostró daño patológico en el epitelio yeyunal interno en ninguno de los tratamientos.
6. El conteo de ufc de *Clostridium perfringens* fue estadísticamente similar entre todos los tratamientos.
7. El fitobiótico ensayado puede reemplazar al antibiótico promotor del crecimiento (amoxicilina) permitiendo un adecuado rendimiento en los cerdos en los 33 días post-destete.



## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Emplear el producto fitobiótico por cuanto puede reemplazar al antibiótico promotor del crecimiento y se manifiesta con más eficiente utilización del alimento para incrementar peso vivo.
2. Implementar trabajos de investigación con cerdos de diferentes fases productivas y con otras especies para caracterizar el completo accionar del fitobiótico en el organismo animal.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abed, L. F. (2007). Antimicrobial activity of essential oils of some medicinal plants from Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* 14:53-60.
- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid Interface Science* ,14: 3-15.
- Adeola, O., y King, D. E. (2006). Developmental changes in morphometry of the small intestine and jejunal sucrase activity during the first nine weeks of postnatal growth in pigs. *Journal of Animal Science*, 84: 112–118.
- Adlerberth, I. (1999). Establishment of a normal intestinal microflora in the newborn infant. In: Probiotics, other nutritional factors and intestinal microflora. (Eds. Hanson, L.A. and Yolken, R.H.) Philadelphia: Lippincott-Raven. Pp.63-78.
- Aeschbach, R., Ölinger, J. L., y Scott, B. C. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32 (1): 31–36.
- Aggarwal, B. B., y Shishodia, S. (2004). Suppression of nuclear factor-kappa B activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1030:434-441.
- Alexander, M. (1971). Biochemical ecology of microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 25: 361-392.
- Allan, P., y Bilei, G. (2005). Oregano improves reproductive performance of sows. *Theriogenology*. 63:716-721.
- Allen, A., Hutton, D. A., Leonard, A. J., Pearson, J. P., y Sellers, L. A. (1986). The role of mucus in the protection of the gastroduodenal mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 21: 71- 78.
- Allen, A., Hutton, D. A., y Pearson, J. P. (1998). The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30: 797-801.
- Ankri, S., y Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 2:125-129.
- Apajalahti, J. H. A., Kettunen, A., Bedford, M. R., y Holben, W. E. (2001). Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5656-5667.
- Ariza-Nieto, C., Bandrick, M., Baidoo, S. K., Anil, L., Molitor, T. W., y Hathaway, M. R. (2011). Effect of dietary supplementation of oregano essential oils to sows on colostrum and milk composition, growth pattern and immune status of suckling pigs. *J. Anim. Sci.* 89:1079- 1089.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., y Holm, L. (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280: G922-G929.
- Audus, K.L., Bartel, R. L., Hidalgo, I. J., y Borchardt, R. T. (1990). The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharmaceutical Research*, 7: 435- 451.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46:446-475.<sup>[L]  
[SEP]</sup>
- Barcenilla, A., Pryde, S. E., Martin, J. C., Duncan, S. H., Stewart, C. S., Henderson, C., y Flint, H. J. (2000). Phylogenetic relationships of butyrate-producing

- bacteria from the human gut. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 1654-1661.
- Bauer, E., Williams, B. A., Smidt, H., Verstegen, M. W., y Mosenthin, R. (2006). Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Current Issues of Intestinal Microbiology*, 7: 35-51.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., y Karadoğan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*. 15:169-172.
- Bell, A. E., Allen, A., Morris, E. R., y Ross-Murphy, S. B. (1984). Functional interactions of gastric mucus glycoprotein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 6: 309-315.
- Berer, K., Mues, M., Koutoulos, M., Al Rasby, Z., Boziki, M., Johner, C.,... Kirshnamoorthy, G. (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, 479: 538-542.
- Bergey, D. H., y Holt, J. G. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Bishop, C. D. (1995). Anti-viral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Essential Oil Res.* 7:641-644.
- Björkstén, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T., y Mikelsaar, M. (2001). Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108: 516-520.
- Boffa, L. C., Vidali, G., Mann, R. S., y Allfrey, V. G. (1978). Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *Journal of Biological Chemistry*, 253: 3364-3366.
- Botsoglou, N. A., Florou-Paner, P., Christaki, E., Fletouris, D. J., y Spais, A. B. (2002). Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *Br. Poult. Sci.* 43:223-230.
- Bouret, S. G., Draper, S. J., y Simerly, R. B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*, 304: 108-110.
- Bowles, B. L., y Miller, A. J. (1993). Antibotulinal properties of selected aromatic and aliphatic aldehydes. *J. Food Prot.* 56:788-794.
- Braga, P. C., Dal Sasso, M., Culici, M., Bianchi, T., Bordoni, L., y Marabini, L. (2006). Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacology*, 77 (3): 130-136.
- Brandtzaeg, P. (2010). Homeostatic impact of indigenous microbiota and secretory immunity. *Beneficial Microbes*, 1(3): 211-227.
- Buddington, R. K. and Malo, C. (1996). Intestinal brush-border membrane enzyme activities and transport functions during prenatal development of pigs. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 23: 51-64.
- Buddington, R. K. (2003). Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 64: 646-651.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94:223-253.
- Burt, S. A., van der Zee, R., Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., Gaastra, W.,... Veldhuizen, E. J. A. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Env. Microbiol.* 73:4484-4490.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., y Ferret, A. (2007).

- Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90:2580-2595.
- Cario, E., Brown, D., McKee, M., Lynch-Devaney, K., Gerken, G., y Podolsky, D. K. (2002). Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *American Journal of Pathology*, 160: 165-173.
- Carson, C. F., Mee, B. J., y Roley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Ch.* 46:1914-1920.
- Castillo, M., Skene, G., Roca, M., Anguita, M., Badiola, I., Duncan, S. H., Flint, H. J., y Martín-Orúe, S. M. (2007). Application of 16S rRNA gene-targetted fluorescence *in situ* hybridization and restriction fragment length polymorphism to study porcine microbiota along the gastrointestinal tract in response to different sources of dietary fibre. *FEMS Microbiology Ecology*, 59: 138-146.
- Chen, C.-C., Louie, S., Shi, H. N., y Walker, W. A. (2005). Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. *Pediatric Research*, 58: 1185-1191.
- Cheng, H. y Leblond, C. P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *American Journal of Anatomy*, 141: 461-479.
- Choi, C. Y., Park, K., Lee, J., Jeon, Y. J., Liu, K., Oh, S., Kim, D., y Yea, S. S. (2007). Isoeugenol suppression of inducible nitric oxide synthase expression is mediated by down-regulation of NF- $\kappa$ B, ERK1/2, and p38 kinase. *Eur. J. Pharmacol.* 576:151-159.
- Chowdhury, S. R., King, D. E., Willing, B. P., Band, M. R., Beever, J. E., Lane, A. B.,...Gaskins, H. R. (2007). Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BMC genomics*, 8: 215.
- Cochran, W. G. y Cox, G. M. (2008). Diseños Experimentales. 2da ed. Trillas. México. 661 pp.
- Cohen, I. T., Nelson, S. D., Moxley, R. A., Hirsh, M. P., Counihan, T. C., y Martin, R. F. (1991). Necrotizing enterocolitis in a neonatal piglet model. *Journal of Pediatric Surgery*, 26: 598-601.
- Collington, G. K., Parker, D. S., y Armstrong, D. G. (1990). The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig. *British Journal of Nutrition*, 64: 59-70.
- Conway, P. L. (1996). Development of intestinal microbiota. In: *Gastrointestinal microbiology* (eds. Mackie, R.I. White, B.A. and Isaacson, R.E.). New York: Chapman & Hall. pp. 3-38.
- Crabbé, P. A., Nash, D. R., Bazin, H., Eyssen, H., y Heremans J. F. (1970). Immunohistochemical observations on lymphoid tissues on lymphoid tissues from conventional and germ-free mice. *Laboratory Investigations*, 22: 448-457.
- Cranwell, P. D. y Moughan, P. J. (1989). Biological limitations imposed by the digestive system to the growth performance of weaned pigs. In: *Manipulating pig production II: proceedings of the second biennial Conference of the Australasian Pig Science Association (APSA)* ed. Batterham, E.S. Attwood, Vic. Australia: The Association.
- Cranwell, P. D. (1995). Development of the neonatal gut and enzyme systems. In: *The neonatal pig: development and survival* ed. Varley, M.A. Wallingford: CAB International.

- Cullen, S. P., Monahan, F. J., Callan, J. J., y O'Doherty, J. V. (2005). The effect of dietary garlic and rosemary on grower-finisher pig performance and sensory characteristics of porl. *Irish J. Agr. Food Res.* 44:57-67.
- Danielsen, M., Hornshøj, H., Siggers, R. H., Jensen, B. B., van Kessel, A. G., y Bendixen, E. (2007). Effects of bacterial colonization on the porcine intestinal proteome. *Journal of Proteome Research*, 6: 2596-2604.
- De Almeida, A. M., y Bendixen, E. (2012). Pig proteomics: A review of a species in the crossroad between biomedical and food sciences. *J. Proteomics*, 75: 4296–4314, doi:10.1016/j.jprot.2012.04.010.
- De Groot, J., Ruis, M. A., Scholten, J. W., Koolhaas, J. M., y Boersma, W. J. (2001). Long-term effects of social stress on antiviral immunity in pigs. *Physiol. Behav.*, 73: 145–158.
- Deplancke, B., Hristova, K. R., Oakley, H. A., McCracken, V. J., Aminov, R., Mackie, R. I., y Gaskins, H. R. (2000). Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2166-2174.
- Dinan, T. G., Cryan, J., Shanahan, F., Keeling, P. W. N., y Quigley, E. M. M. (2010). IBS: an epigenetic perspective. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 7: 465-471.
- Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*. 118:503-508.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., y Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97:654-660.
- Dorman, H. J. D. y Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-316.
- Dubos, R., Savage, D., y Schaedler, R. (1966). Biological freudianism: lasting effects of early environmental influences. *Pediatrics*, 38: 789-800.
- Duke, J. A. (1986). CRC handbook of medicinal herbs. CRC press, Florida. [SEP]
- Dundar, E., Olgun, E. G., Isiksoy, S., Kurkcuoglu, M., Baser, K. H. C., y Bal, C. (2008). The effects of intra-rectal and intra-peritoneal application of *Origanum onites* L. essential oil on 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. *Exp. Toxicol. Pathol.* 59:399-408.
- Dung, N. T., Bajpai, V. K., Yoon, J. I., y Kang, S. C. (2009). Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. *Food Chem. Toxicol.* 47:449-453.
- Dunsha, F. R., Suster, D., Kerton, D. J., y Leury, B. J. (2003). A capsaicin analogue improves growth and dressing rate in pigs, particularly gilts. In J. E. Paterson (Ed.). *Manipulating pig production* (Vol. IX, pp. 26). Werribee, Australia: *Australasian Pig Science Association Inc.*
- Durazzo, A., Turfani, V., Narducci, V., Azzini, E., Maiani, G, y Carcea, M. (2014). Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours. *Food Chemistry*, 153: 109-113.
- Economou, K. D., Oreopoulou, V., y Thomopoulos, C. D. (1991). Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66:792-799.
- Essawi, T. y Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70 (3): 343–349.
- Falk, P. G., Hooper, L. V., Midtvedt, T., y Gordon, J. I. (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1157-1170.

- Fan, M. Z., Stoll, B., Jiang, R., y Burrin, D. G. (2001). Enterocyte digestive enzyme activity along the crypt-villus and longitudinal axes in the neonatal pig small intestine. *Journal of Animal Science*, 79: 371-381.
- Fan, M. Z. (2003). Growth and ontogeny of the gastrointestinal tract. In: *Gastrointestinal Physiology and Nutrition of Neonatal Pigs* (eds. Xu, R.J. and Cranwell, P.D.) Leicestershire, U.K.: Nottingham University Press.
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., y Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica*, 92: 48-55.
- Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewed, F. M., y El-Baroty, G. S. A. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Protec.* 52:665-667.
- Frankič, T., Levart, A., y Salobir, J. (2010). The effect of vitamin E and plant extract mixture composed of carvacrol, cinnamaldehyde and capsaicin on oxidative stress induced by high PUFA load in young pigs. *Animal*. 4:572-578.
- Freter, R. (1974). Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 27: 1409-1416.
- Garozzo, A., Timpanaro, R., Bisignano, B., Furneri, P. M., Bisignano, G., y Castro, A. (2009). In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 49:806-808.
- Ghosh, S., Mary, M. J., y Kopp, E. B. (1998). NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225-260.
- Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412.
- Gluckman, P. D., Lillycrop, K. A., Vickers, M. H., Pleasants, A. B., Phillips, E. S., Beedle, A.S.,...Hanson, M. A. (2007). Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 12796-12800.
- Gordon, H. A., Bruckner-Kardoss, E., Staley, T. E., Wagner, M. y Wostmann, B. S. (1966). Characteristics of germfree rat. *Cells Tissues Organs*, 64: 367-389.
- Gordon, H. A. y Pesti, L. (1971). The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriology Reviews*, 35: 390-429.
- Gracey, M. (1982). Intestinal microflora and bacterial overgrowth in early life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1: 13-22.
- Grela, E. R., Krusiński, R., y Matras, J. (1998). Efficacy of diets with antibiotic and herb mixture additives in feeding of growing-finishing pigs. *J. Anim. Feed Sci.* 7:171-175.
- Grönlund, M.-M., Lehtonen, O. P., Eerola, E., y Kero, P. (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 28: 19-25.
- Gülçin, İ., Şat, İ. G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., y Küfrevioğlu, Ö. I. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chem.* 87:393-400.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., y Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86:985-990.
- Hampson, D. J. (1986). Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in Veterinary Science*, 40: 32-40.
- Hampson, D. J., y Kidder, D. E. (1986). Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. *Research in Veterinary Science*, 40: 24-31. [SEP]

- Harmsen, H. J. M., Wildeboer-Veloo, A. C. M., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijjn, N., Bindels J. G., y Welling, G. W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30: 61-67.
- Hart, P. H., Brand, C., Carson, C. F., Riley, T. V., Prager, R. H., y Finlay-Jones, J. J. (2000). Terpinen-4-ol the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm. Res.* 49:619-626.
- Hecht, G. (1999). Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *American Journal of Physiology & Cell Physiology*, 277: C351-C358.
- Hedemann, M. S., Højsgaard, S., y Jensen, B. B. (2003). Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 87: 32–41.
- Hedemann, M. S., y Jensen, B. B. (2004). Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. *Archives of Animal Nutrition*, 58: 47–59.
- Helander, I. M., Alakomi, H. –L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J.,... Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agr. Food Chem.* 46:3590-3595.
- Henning, S. J. (1985). Ontogeny of enzymes in the small intestine. *Annual Review of Physiology*, 47: 231–245.
- Hernández S. R., Fernández C., y Baptista, L. P. (2010). Metodología de la Investigación. 5<sup>ta</sup> edición. McGraw-Hill/ Interamericana Editores S.A. de C.V. Impreso en Chile. 613 pp.
- Herrmann, K. M. y Weaver, L. M. (1999). The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 473-503.
- Hill, J. E., Seipp, R. P., Betts, M., Hawkins, L., Van Kessel, A. G., Crosby, W. L., y Hemmingsen, S. M. (2002). Extensive profiling of a complex microbial community by high-throughput sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3055-3066.
- Hill, J. E., Penny, S. L., Crowell, K. G., Goh, S. H., y Hemmingsen, S. M. (2004). cpnDB: A chaperonin sequence database. *Genome Research*, 14: 1669-1675.
- Hill, J. E., Goh, S. H., Money, D. M., Doyle, M., Li, A., Crosby, W. L., Links, M., Leung, A., Chan, D., y Hemmingsen, S. M. (2005a). Characterization of vaginal microflora of healthy, nonpregnant women by chaperonin-60 sequence-based methods. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 193: 682-692.
- Hill, J. E., Hemmingsen, S. M., Goldade, B. G., Dumonceaux, T. J., Klassen, R. T., Zijlstra, R. T.,... Van Kessel, A. G. (2005b). Comparison of ileum microflora of pigs fed corn-, wheat-, or barley-based diets by Chaperonin-60 sequencing and quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 867-875.
- Hiscott, J., Marois, J., Garoufalos, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I.,... Fenton, M. (1993). Characterization of a functional NF- $\kappa$ B site in the human interleukin 1 $\beta$  promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol. Cell. Biol.* 13:6231-6240.
- Hoffmann, M., Rath, E., Hölzlwimmer, G., Quintanilla-Martinez, L., Loach, D., Tannock, D., y Haller, D. (2008). *Lactobacillus reuteri* 100-23 transiently activates intestinal epithelial cells of mice that have a complex microbiota during early stages of colonization. *Journal of Nutrition*, 138: 1684–1691.
- Hooper, L. V. y Gordon, J. I. (2001a). Commensal Host-Bacterial Relationships in the

- Gut. *Science*, 292: 1115-1118.
- Hooper, L. V. y Gordon, J. I. (2001b). Glycans as legislators of host–microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology*, 11: 1R-10R.
- Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., y Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291: 881-884.
- Hoyos, A. B. (1999). Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *International Journal of Infectious Diseases*, 3: 197-202.
- Hsouna, A. B., Saoudi, M., Trigui, M., Jamoussi, K., Boudawara, T, Jaoua, S., y El Feki, E. (2011). Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of *Ceratonia siliqua* leaf extracts against CCl<sub>4</sub> induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 3183-3191.
- Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., y Cavrini, V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29 (4): 691–700.
- Hudault, S., Guignot, J., y Servin, A. L. (2001). *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut*, 49: 47-55.
- Illesley, S., Miller, H., Greathead, H., y Kamel, C. (2002). Herbal sow diets boost preweaning growth. *Feed Mix*. 10:24-25.
- Jacela, J. Y., DeRouchey, J. M., Tokach, M. D, Goodband, R. D, Nelssen, J. L., Renter, D. G., y Dritz, S. S. (2010). Feed additives for swine: Fact sheets-flavors and mold inhibitors, mycotoxin binders, and antioxidants. *Journal of Swine Health and Production*, 18(1): 27-32.
- Janczyk, P., Pieper, R., Smidt, H., y Souffrant, W. B. (2007). Changes in the diversity of pig ileal lactobacilli around weaning determined by means of 16S rRNA gene amplification and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Ecology*, 61: 132-140.
- Janz, J. A. M., Morel, P. C. H., Wilkinson, B. H. P., y Purchas, R. W. (2007). Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. *Meat Sci*. 75:350-355.
- Ji, H., Ren, J., Yan, X., Huang, X., Zhang, B., Zhang, Z., y Huang, L. (2011). The porcine MUC20 gene: molecular characterization and its association with susceptibility to enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ab/ac. *Molecular Biology Reports*, 38: 1593-1601.
- Jobin, C., Bradham, C. A., Russo, M. P., Juma, B., Narula, A.S., Brenner, D.A., y Sartor, R. B. (1999). Curcumin blocks cytokine-mediated NF-κB activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory actor I-κB kinase activity. *J. Immunol*. 163:3474-3483.
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., y Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol*. 76:626-631.
- Kaunitz, J. D., Barrett, K. E., y McRoberts, J. A. (1995). Electrolyte secretion and absorption: small intestine and colon. In: T. Yamada, J. B. Lippincott (eds), *Gastroenterology*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 326.
- Kasakura, K., Takahashi, K., Aizawa, T., Hosono, A., y Kaminogawa, S. (2009). A



- TLR2 ligand suppresses allergic inflammatory reactions by acting directly on mast cells. *International Archives Allergy and Immunology*, 150 (4): 359-369.
- Kelly, A. P., Jones, R. T., Gillick, J. C., y Sims, L. D. (1984). Outbreak of botulism in horses. *Equine Veterinary Journal*, 16: 519-521.
- Kelly, D. (1998). Probiotics in young and newborn animals. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 7: 15-23.
- Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G. P.,... Conway, S. (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-[gamma] and RelA. *Nature Immunology*, 5: 104-112.
- Kelly, D., King, T., y Aminov, R. (2007). Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 622: 58-69.
- Kelly, D., King, T. P., Mcfadyen, M., y Travis, A. J. (1991a). Effect of lactation on the decline of brush-border lactase activity in neonatal pigs. *Gut*, 32: 386-392.
- Kelly, D., Smyth, J. A., y McCracken, K. J. (1991b). Digestive development of the early-weaned pig. II, Effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. *British Journal of Nutrition*, 65: 181-188.
- Kerrola, K. (1995). Literature review: Isolation of essential oils and flavor compounds by dense carbon dioxide. *Food Rev. Int.*, 11:547-573.
- Khafipour, E., Munyaka, P. M., Nyachoti, C. M., Krause, D. O., y Rodriguez-Lecompte J. C. (2014). Effect of crowding stress and K88 challenge in nursery pigs supplemented with anti-K88 probiotics. *J. Anim. Sci.*, 92: 2017-2029, doi:10.2527/jas.2013-7043.
- Kien, C. L., Schmitz-Brown, M., Solley, T., Sun, D, y Frankel, W. L. (2006). Increased colonic luminal synthesis of butyric acid is associated with lowered colonic cell proliferation in piglets. *The Journal of Nutrition*, 136: 64-69.
- Kien, C. L., Peltier, C. P., Mandal, S., Davie, J. R., y Blauwiekel, R. (2008a). Effects of the *in vivo* supply of butyrate on histone acetylation of cecum in piglets. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 32: 51-56.
- Kien, C. L. y Blauwiekel, R. (2008b). Cecal infusion of butyrate does not alter cecal concentration of butyrate in piglets fed inulin. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 32: 439-442.
- Kim, Y. S., McCarthy, D. M., Lane, W, y Fong, W. (1973). Alterations in the levels of peptide hydrolases and other enzymes in brush-border and soluble fractions of rat small intestinal mucosa during starvation and refeeding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 321: 262-273.
- Kim, S. S., Oh, O., Min H., Park, E., Kim, Y., Park, H. J.,...Lee, S. K. (2003). Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Sci.* 73:337-348.
- King, D. E. (2003). Gastrointestinal disorders in pigs. In: *The neonatal pig*. (eds. Xu, R.-J. and Cranwell, P.D.). Nottingham: Nottingham University Press.
- Kittawornrat, A., y Zimmerman, J. J. (2011). Toward a better understanding of pig behavior and pig welfare. *Anim. Health Res. Rev.*, 12: 25-32, doi: 10.1017/S1466252310000174.
- Knobloch, K., Pauli, A., Ibertl, B., Weigand, H., y Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essential Oil Res.* 1:119-128.
- Konstantinov, S. R., Awati, A., Smidt, H., Williams, B. A., Akkermans, A. D. L., y de

- Vos, W. M. (2004). Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary Prebiotics in the guts of weaning piglets. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3821-3830.
- Konstantinov, S. R., Awati, A. A., Williams, B. A., Miller, B. G., Jones, P., Stokes, C. R., Akkermans, A. D. L., Smidt, H., y De Vos, W. M. (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental Microbiology*, 8: 1191-1199.
- Kotrotsios, N. V., Christaki, E., Bonos, E., y Floru-Paneri, P. (2012). Dietary carob pods on growth performance and meat quality of fattening pigs. *Asian Australian Journal Animal Science*, 6: 880-885.
- Kukkonen, K., Kuitunen, M., Haahtela, T., Korpela, R., Poussa, T, y Savilahti, E. (2010). High intestinal IgA associates with reduced risk of IgE-associated allergic diseases. *Pediatric Allergy and Immunology*, 21: 67-73.
- Kunz, C. y Rudloff, S. (1993). Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatrica*, 82: 903-912.
- Lackeyram, D. (2003). Visceral organ growth and threonine utilisation and requirement in the segregated early-weaned piglet. In: *Animal Science*. Guelph: University of Guelph, Ontario.
- Lallès, J. P., Bosi, P. H. S., y Stokes, C. R. (2007). Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings Nutrition Society*, 66: 260-268.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., y Nychas, G. -J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91:453-462.
- Landa, P., Kokoska, L., Pribylova, M., Vanek, T., y Marsik, P. (2009). In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis. *Arch. Pharm. Res.* 32:75-78.
- Lang, A., Lahav, M., Sakhnini, E., Barshack, I., Fidder, H. H., Avidan, B., Bardan, E., Hershkoviz, R., Bar-Meir, S., y Chowers, Y. (2004). Allicin inhibits spontaneous and TNF- $\alpha$  induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines from intestinal epithelial cells. *Clin. Nutr.* 23:1199-1208.
- Laux, D. C., Cohen, P. S., y Conway, T. (2005). Role of the mucus layer in bacterial colonization of the intestine. In: *Colonization of mucosal surfaces*. (ed. Nataro, J.P.). Washington, D.C.: ASM Press.
- Lawrence, B. M. y Reynolds, R. J. (1984). Progress in essential oils. *Perfumer and Flavorist*. 9:23-31.
- Lecce, J. G., Armstrong, W. D., Crawford, P. C., y Ducharme, G. A. (1979). Nutrition and Management of Early Weaned Piglets: Liquid vs Dry Feeding. *Journal of Animal Science*, 48: 1007-1014.
- Lee, K. -W., H. Events, and A. C. Beynen. 2004. Essential oils in broiler nutrition. *Int. J. Poult. Sci.* 3:738-752.
- Lee, S. H., Lee, S. Y., Son, D. J., Lee, H., Yoo, H. S., Song, S., Oh, K. W., Han, D. C., B. M. K, y Hong, J. T. (2005). Inhibitory effect of 2'-hydroxycinnamaldehyde on nitric oxide production through inhibition of NF- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 69:791-799.
- Lens-Lisbonne, C., Cremieux, A., Maillard, C., and Balansard, G. (1987). Methods for evaluation of antibacterial activity of essential oils: application to essences of thyme and cinnamon. *J. Pharm. Belg.* 42:297-302.
- Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M, and Møller, K. (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria: The pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 673-

- Li, W., Tsubouchi, R., Qiao, S., Haneda, M, Murakami, K, and Yoshino, M. (2006). Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages. *Biomed. Res.* 27:69-74.
- Liebich, H-G. (2010). Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel (Stuttgart: Schattauer Verlag).
- Livingston, M., Loach, D., Wilson, M., Tannock, G. W., and Baird, M. (2010). Gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23 stimulates an immunoregulatory response. *Immunology and Cell Biology*, 88: 99–102.
- Llyod, D. A. J. and Gabe, S. M., (2008): Intestinal morphology, intestinal regeneration and the promise of tissue engineering. In: A. N. Langnas, O. Goulet, E. M. M. Quigley, K. A. Tappenden (eds), Intestinal Failure: Diagnosis, Management and Transplantation. Wiley-Blackwell, Maiden, MA, USA, pp. 13.
- Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., y Hollingsworth, M. A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 276: G941-G950.
- Mack, D. R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., y Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut*, 52: 827-833.
- Mackie, R. I., Sghir, A., y Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 1035S-1045S.
- MacMicking, J., Xie, Q., y Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:323-350.
- Manzanilla, E. G., Perez, J. F., Martin, M., Kramel, C., Baucells, F., y Gasa, J. (2004). Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 82:3210-3218.
- Marion, J., Petersen, Y. M., Romé, V., Thomas, F., Sangild, P. T., Dividich, J. L., y Huërou-Luron, I. L. (2005): Early weaning stimulates intestinal brush border enzyme activities in piglets, mainly at the posttranscriptional level. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 41: 401–410.
- Martens, J. H., Barg, H., Warren, M. J., y Jahn, D. (2005). Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58(3): 275-285.
- Martineau, G. P., Vaillancourt, J. P., y Broes, A. (1995). Principle neonatal diseases In: The neonatal pig: development and survival. (Ed. Varley, M.A.). Wallingford: CAB International.
- Mattar, A. M., Teitelbaum, D., Drongowski R. D., Yongyi, F.Y., Harmon, C.H., y Coran, A. C. (2002). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery International*, 18: 586-590.
- Maxwell, C. V. y Carter, S. D. (2001). Feeding the weaned pig. In: Swine Nutrition (Eds. Lewis, A.J. and Southern, L.L.). Hoboken: CRC Press.
- Mazmanian, S. K. y Kasper, D. L. (2006). The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. *Nature Review Immunology*, 6: 849-858.
- McCall, M. R. y Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biol. Med.* 26:1034-1053.
- McCormick, B. A. (2005). Signal transduction in the intestinal mucosa. In: Colonization of mucosal surfaces. (Eds. Nataro, J.P., Cohen, P.S., Mobley, H.L.T and Weiser, J.N.). Washington, D.C.: ASM Press.

- McCracken, B. A., Spurlock, M. E., Roos, M. A., Zuckermann, F. A., y Gaskins, H. R. (1999). Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *Journal of Nutrition*, 129: 613–619.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalg, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., y R. G. Wilkinson. (2013). *Nutrición Animal*. Séptima edición. Acribia. Zaragoza, España. 653 pp.
- McKay, E., y Thom, H. (1969). Observations on neonatal tears. *The Journal of Pediatrics*, 75(6): 1245-1256.
- Ménard, S., Candalh, C., Bambou, J. C., Terpend, K., Cerf-Bensussan, N., y Heyman, M. (2004). Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut*, 53(6): 821-828.
- Menzi, H., Oenema, O., Burton, C., Shipin, O., Gerber, P., Robinson, T., and Franceschini, G. (2010). Impacts of intensive livestock production and manure management on the environment. In: *Livestock in a Changing Landscape, Volume 1: Drivers, Consequences, and Responses*, (Washington, Covelo, London: Island Press), pp. 139–163.
- Mescher, A. (2009). *Junqueira's Basic Histology*, 12th Edition (New York: McGraw Hill Professional).
- Michiels, J., Missotten, J., Van Hoorick, A., Obyn, A., Fremaut, D., De Smet, D, y Dierick, N. (2010). Effects of dose and formulation of carvacrol and thymol on bacteria and some functional traits of the gut in piglets after weaning. *Arch. Ani. Nutr.* 64:136-154.
- Miladi H., Zmantar, T., Chaabouni, Y., Fedhila, K., Bakhrouf, A., Mahdouani, K., y Chaieb, K. (2016). Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. *Microbial Pathogenesis* (2016), doi: 10.1016/j.micpath.2016.08.008.
- Miller, B. G. y Skadhauge, E. (1997). Effect of weaning in the pig on ileal Ion transport measured in vitro. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 44: 289–299.
- Miller, B. G., James, P. S., Smith, M. W., y Bourne, F. J. (1986): Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients. *The Journal of Agricultural Science*, 107: 579–590.
- Miura, K., Kikuzaki, H., y Nakatani, N. (2002). Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (7): 1845–1851.
- Mizioroko, H. M. (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 505:131-143.
- Moeser, A. J., Ryan, K. A., Nighot, P. K., y Blikslager, A. T. (2007). Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293:G413-G421.
- Mondal, S., Das, Y. B., y Chatterjee, S. P. (1996). Methionine production by microorganisms. *Folia microbiologica*, 41(6): 465-472.
- Montgomery, R. K., Sybicki, M. A., y Grand, R. J. (1981). Autonomous biochemical and morphological differentiation in fetal rat intestine transplanted at 17 and <sup>SEP</sup>20 days of gestation. *Developmental Biology*, 87: 76–84.
- Moon, T., Wilkinson, J. M., y Cavanagh, H. M. A. (2006). Antiparasitic activity of two Lavandula essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitol. Res.* 99:722-728.
- Moore, W. E., Cato, E. P., y Holdeman, L. V. (1978). Some current concepts in

- intestinal bacteriology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 31: S33-42.
- Motohashi, Y., Fukushima, A., Kondo, T., y Sakuma, K. (1997). Lactase decline in weaning rats is regulated at the transcriptional level and not caused by termination of milk ingestion. *Journal of Nutrition*, 127: 1737– 1743.
- Murray, C. S., Tannock, G. W., Simon M. A., Harmsen, H. J., Welling, G. W., Custovic, A., y Woodcock, A. (2005). Fecal microbiota in sensitized wheezy and non-sensitized non-wheezy children: a nested case-control study. *Clinical and Experimental Allergy*, 35: 741-745.
- Nabuurs, M. J., Hoogendoorn, A., y van Zijderveld, F. G. (1994). Effects of weaning and enterotoxigenic *Escherichia coli* on net absorption in the small intestine of pigs. *Research in Veterinary Science*, 56: 379–385.
- Nafee, T. M., Farrell, W. E., Carroll, W. D., Fryer, A. A., y Ismail, K. M. K. (2008). Review article: Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 115: 158-168.
- Nahmias, A., Stoll, B, Hale, E., Ibegbu, C., Keyserling, H., Innis-Whitehouse, W., Holmes, R., Spira, T., Czerkinsky, C, y Lee, F. (1991). IgA-secreting cells in the blood of premature and term infants: normal development and effect of intrauterine infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 310: 59-69.
- National Animal Health Monitoring System (NAHMS), USDA. (2008). Swine 2006, Part IV: Changes in the U.S. Pork Industry, 1990-2006. Pages 31-45 in Section III. Management Changes in the U.S. Pork Industry, NAHMS Population Estimates –1990, 1995, 2000, and 2006. [http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ncahs/nahms/swine2006/Swine2006\\_PartI\\_V.pdf](http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ncahs/nahms/swine2006/Swine2006_PartI_V.pdf) Accessed Nov. 12, 2009.
- Neill, C. R., Nelssen, J. L., Tokach, M. D., Goodband, R. D., DeRouchey, J. M., Dritz, S. S., Groesbeck, C. N., y Brown, R. B. (2006). Effects of oregano oil on growth performance of nursery pigs. *J. Swine Health Prod.* 14:312-316.
- Nofrarías, M., E. G. Manzanilla, J. Pujols, X. Gibert, N. Majó, J. Segalés, and J. Gasa. 2006. Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 84:2735-2742.
- Oboh, G., Puntel, R. L., y Rocha, J. B. T. (2007). Hot pepper (*Capsicum annum*, Tepin and *Capsicum chinese*, Habanero) prevent Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in brain – in vitro. *Food Chem.* 102:178-185.
- Olszak, T. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*, 336(6080): 489-493.
- Ott, S. J. y Schreiber, S. (2006). Reduced microbial diversity in inflammatory bowel diseases. *Gut*, 55: 1207.
- Ouellette, A. y Selsted, M. (1996). Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *The FASEB Journal*, 10: 1280-1289.
- Pácha, J. (2000). Development of intestinal transport function in mammals. *Physiological Reviews*, 80: 1633–1667.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., y Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.*, 5: e177.
- Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Methrotra, N., Singh, H. N., y Kumar, S. (2000). Essential oils as potent sources of nematicidal compounds. *J. Phytopathology*. 148:501-502.
- Pearson, J. P. y Brownlee, I. A. (2005). Structure and function of mucosal surfaces. In: Colonization of mucosal surfaces (Ed. Nataro, J.P.). Washington, D.C.: ASM

- Press.
- Pessoa, L. M., Morais, S. M., Bevilaqua, C. M. L., y Luciano, J. H. S. (2002). Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 109:59-63. [SEP]
- Pettigrew, J. E. (2006). Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 1. *Anim. Biotechnol.* 17:207-215.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M. J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A., y Martinez-de-Oliveira, J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.* 55:1367-1373.
- Pluske, J. R., Hampson, D. J. y Williams, I. H. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest. Prod. Sci.* 51:215-236.
- Pluske, J. R., Williams, I. H., y 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, 145–158.
- Powell, R. W., Dyess, D. L., Collins, J. N., Roberts, W. S., Tacchi, E. J., Swafford Jr, A. N., Ferrara, J. J., y Ardell, J. L. (1999). Regional blood flow response to hypothermia in premature, newborn, and neonatal piglets. *Journal of Pediatric Surgery*, 34: 193-198.
- Puchal, A. A. y Buddington, R. K. (1992). Postnatal development of monosaccharide transport in pig intestine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 262: G895-G902.
- Rawls, J. F., Mahowald, M. A., Ley, R. E., y Gordon, J. I. (2006). Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell*, 127: 423-433.
- Rice, N. R. y Ernst, M. K. (1993). In vivo control of NF- $\kappa$ B activation by I $\kappa$ B $\alpha$ . *The EMBO Journal*. 12:4685-4695.
- Richards, J. D., Gong, J., y de Lange, C. F. M. (2005). The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: Current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Canadian Journal of Animal Science*, 85: 421-435.
- Roseiro, L. B., Tavares, C. S., Roseiro, J. C., y Rauter, A. P. (2013). Antioxidants from aqueous decoction of carob pods biomass (*Ceretonia siliqua* L.): Optimisation using response surface methodology and phenolic profile by capillary electrophoresis. *Industrial Crops and Products*, 44: 119-126.
- Rueda, R., Sabatel, J. L., Maldonado, J., Molina-Font, J. A., y Gil, A. (1998). Addition of gangliosides to an adapted milk formula modifies levels of fecal *Escherichia coli* in preterm newborn infants. *The Journal of Pediatrics*, 133: 90-94.
- Sads, O. R. y Bilkei, G. (2003). The effect of oregano and vaccination against Glasser's disease and pathogenic *Escherichia coli* on postweaning performance of pigs. *Irish Vet. J.* 56:611-615.
- Sangild, P. T. (2001). Transitions in the life of the gut at birth. In: Symposium on Digestive Physiology in Pigs (Eds. Lindberg, J.E. and Ogle, B.). New York: CABI Pub.
- Savage, D. C., R. Dubos, and Schaedler, R. W. (1968). The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora. *Journal of Experimental Medicine*, 127: 67-76.
- Savage, D. C. (1975). Microbiology -1975. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

- Savage, D. C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*, 31: 107-133.
- Schaedler, R. W., R. Dubos, y Costello, R. (1965). The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *Journal of Experimental Medicine*, 122: 59-66.
- Scheiner, S. M. (1993). Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review Ecology Syst.*, 24: 35-68.
- Segain, J. P., De La Blétière, D. R., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottière, H. M., y Galmiche, J. P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 47(3): 397-403.
- Seigler, D. S. (1998). Phenylpropanoids. In: Plant secondary metabolism. D. S. Seigler. Ed. Kluwer Academic Publishers, Boston. pp. 106-129.
- Shimizu, S. (2008). Vitamins and Related Compounds: Microbial Production. In: Biotechnology, Volume 10 - Special processes, Second Edition (Eds H.-J. Rehm and G. Reed), Section IV - Special Substances, chapter 11, pp. 318-340, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
- Shirkey, T. W., Siggers, R. H., Goldade, B. G., Marshall, J. K., Drew, M. D., Laarveld, B., y Van Kessel, A. G. (2006). Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Experimental Biology and Medicine*, 231: 1333-1345.
- Simonson, R. R. (2004). Antimicrobial properties of herbs and spices and their potential use in diets for pigs. Newport Laboratories, Inc. submitted to CRIS.
- Slamenova, D., Horvathova, E., Marsalkova, L., y Wsolova, L. (2008). Carvacrol given to rats in drinking water reduces the level of DNA lesions induced in freshly isolated hepatocytes and testicular cells by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Neoplasma*. 55:394-399.
- Smith, H. W. (1961). The development of the bacterial flora of the faeces of animals and man: the changes that occur during ageing. *Journal of Applied Microbiology*, 24: 235-241.
- Smith, H. W. (1965). The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 90: 495-513.
- Sökmen, M., Serkedjieva, J., Daferera, D., Gulluce, M., Polissiou, M., Tepe, B., Akpulat, H. A., Sahin, F, y Sokmen, A. (2004). In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *J. Agric. Food Chem.* 52:3309-3312.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J. J.,...Langella, P. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings National Academy of Science*, 105(43): 16731-16736.
- Soliman, K. M. y Badaea, R. I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (11): 1669–1675. <sup>[L]</sup><sub>[SEP]</sub>
- Songer, J. G., Post, K. W., Larson, D. J., Jost, B. H., y Glock, R. D. (2000). Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Swine Health and Production*, 8: 185-189.
- Songer J. G. y Taylor, D. J. (2006). Clostridial infections. In: Diseases of Swine, 9th edition. (Eds. Straw, B.E. Zimmerman, J.J. D'Allaire, S. and Taylor, D.J.). pp.

- 613 - 628. Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Sosa, S., Altinier, G., Politi, M., Braca, A., Morelli, I., y Loggia, R. D. (2005). Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, 12:271-277.
- Sougioultzis, S., Simeonidis, S., Bhaskar, K. R., Chen, X., Anton, P. M., Keates, S., Pothoulakis, C., y Kelly, C. P. (2006). *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- $\kappa$ B-mediated IL-8 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343: 69-76.
- Spor, A., O. Koren, y Ley, R. (2011). Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 279-290.
- Stein, H. H. y Kil, D. Y. (2006). Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling piglets: dietary tools, part 2. *Anim. Biotech.* 17:217-231.
- Stoll, B. J., Lee, F. K., Hale, E., Schwartz, D., Holmes, R., Ashby, R., Czerkinsky, C. y Nahmias, A. J. (1993). Immunoglobulin secretion by the normal and the infected newborn infant. *The Journal of Pediatrics*, 122: 780-786.
- Surburg, H. y Panten, J. (2006). Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. Wiley-VCH, Weinheim, p 289-303.
- Suzuki, K., Ha, S. A., Tsuji, M., y Fagarasan, S. (2007). Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Seminars in Immunology*, 19: 127-135.
- Suzuki, Y. y Furuta, H. (1988). Stimulation of guinea pig neutrophil superoxide anion-producing system with thymol. *Inflammation*, 12 (6): 575-584.
- Swords, W. E., Wu, C. C., Champlin, F. R., y Buddington, R. K. (1993). Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Neonatology*, 63: 191-200.
- Tabasum, S., Mun, H-S., Manirul, Md., Ko, S-Y., y Yang, C-J. (2016). Effects of dietary natural and fermented herb combination on growth performance, carcass traits and meat quality in grower-finisher pigs. *Meat Science*, 122: 7-15.
- Takahashi, K., Sugi, Y., Hosono, A., y Kaminogawa, S. (2009). Epigenetic regulation of TLR4 gene expression in intestinal epithelial cells for the maintenance of intestinal homeostasis. *Journal of Immunology*, 183: 6522-6529.
- Takahashi, K., Sugi, Y., Nakano, K., Tsuda, M., Kurihara, K., Hosono, A., y Kaminogawa, A. (2011). Epigenetic control of the host gene by commensal bacteria in large intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41): 35755-35762.
- Tang, M., Laarveld, B., Van Kessel, A. G., Hamilton, D. L., Estrada, A., y Patience, J. F. (1999). Effect of segregated early weaning on post-weaning small intestinal development in pigs. *Journal of Animal Science*, 77: 3191-3200.
- Tanida, M., Yamano, T., Maeda, K., Okumura, N., Fukushima, Y., y Nagai, K. (2005). Effects of intraduodenal injection of *Lactobacillus johnsonii* La1 on renal sympathetic nerve activity and blood pressure in urethane-anesthetized rats. *Neuroscience Letters*, 389: 109-114.
- Tannock, G. W. y Smith, J. M. B. (1970). The microflora of the pig stomach and its possible relationship to ulceration of the pars oesophagea. *Journal of Comparative Pathology*, 80: 359-367.
- Tannock, G. W., Fuller, R., y Pedersen, K. (1990). *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1310-1316.



- Teissedre, P. L. y Waterhouse, A. L. (2000). Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *J. Agric. Food Chem.* 48:3801-3805.
- Thacker, P. A. (2013). Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4: 35, doi: 10.1186/2049-1891-4-35.
- Thompson, C. L., Wang, B., y Holmes, A. J. (2008). The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *ISME Journal*, 2: 739- 748.
- Thomson, J. R. (2006). Diseases of the digestive system. In: Diseases of swine. (Eds. Straw, B.E. Zimmerman, J.J. D'Allaire, S. and Taylor, D.J.). pp. 37-56. Ames, Iowa: Balckwell Publishing.
- Tung, Y., Chua, M., Wang, S., y Chang, S. (2008). Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource Technol.* 99:3908-3913.
- Turck, D., Feste, A. S., y Lifschitz, C. H. (1993). Age and diet affect the composition of porcine colonic mucins. *Pediatric Research*, 33: 564-564.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E.,...Gordon, I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457: 480-484.
- Ultee, A. y Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 64:373-383.
- Van Beers-Schreurs, H. M., Nabuurs, M. J., Vellenga, L., Kalsbeek-van der Valk, H. J., Wensing, T, y Breukink, H. J. (1998). Weaning and the weanling diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *Journal of Nutrition*, 128, 947–953.
- Van der Flier, L. G. y Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.*, 71: 241-260.
- Van den Veyver, I. B. (2002). Genetic effects of methylation diets. *Annual Review of Nutrition*, 22: 255-282.
- Van der Wielen, P. W. J. J., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B. A. P., y van Knapen, F. (2000). Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2536-2540.
- Venturini, M. E., Blanco, D., y Oria, R. (2002). In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*, 65 (5): 834–839. <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub>
- Walter, B. M. y Bilkei, G. (2004). Immunostimulatory effect of dietary oregano etheric oils on lymphocytes from growth-retarded, low-weight growing-finishing pigs and productivity. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*. 129:178-181.
- Wang, T. y Xu, R. J. (1996). Effects of colostrum feeding on intestinal development in newborn pigs. *Biology of the Neonate*, 70: 339-348.
- Wapnir, R. A. y Teichberg, S. (2002). Regulation mechanisms of intestinal secretion: implications in nutrient absorption. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 190–199.
- Waterland, R. A. (2006). Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *The Journal of Pediatrics*, 149: S137-S142.
- Wei, B., Wingender, G., Fujiwara, D., Chen, D. Y., McPherson, M., Brewer, S.,...Braun, J. (2010). Commensal microbiota and CD8+ T cells shape the

- formation of invariant NKT cells. *Journal of Immunology*, 184: 1218-1226.
- Weimer, P., Stevenson, D., Mantovani, H., y Man, S. (2010). Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. *Journal of Dairy Science*, 93: 5902-5912.
- Wen, L., Ley, R. E., Volchkov, P. Y., Stranges, P. B., Avanesyan, L., Stonebraker, A. C.,...Chervonsky, A. V. (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the development of type 1 diabetes. *Nature*, 455: 1109- 1113.
- Weyrauch, K. D., Smollich, A., y Plendl, J. (2009). Histologie-Kurs für Veterinärmediziner (Stuttgart: Enke Verlag).
- Wharton, B. A., Balmer, S. E., y Scott, P. H. (1994). Sorrento studies of diet and fecal flora in the newborn. *Pediatrics International*, 36: 579-584.
- Widdowson, E. M., Colombo, V. E., y Artavanis, C. A. (1976). Changes in the organs of pigs in response to feeding for the first 24 h after birth. II. The digestive tract. *Biology of the Neonate*, 28: 272-281.
- Willing, B. P. y Van Kessel, A. G. (2007). Enterocyte proliferation and apoptosis in the caudal small intestine is influenced by the composition of colonizing commensal bacteria in the neonatal gnotobiotic pig. *Journal of Animal Science*, 85: 3256-3266.
- Wilson, D. J., Patton, S., Florova, G., Hale, V., y Reynolds, K. A. (1998). The shikimic acid pathway and polyketide biosynthesis. *J. In. Microbiol. Biotech.* 20:299-303.
- Wong, S. Y. Y., Grant, I. R., Friedman, M., Elliott, C. T., y Situ, C. (2008). Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Appl. Env. Microbiol.* 74:5986-5990.
- Wostmann, B. S. (1981). The germfree animal in nutritional studies. *Annual Review of Nutrition*, 1: 257-279.
- Xie, Q., Kashiwabara, Y., y Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269:4705-4708.
- Xu, R. J., (2003): Gastrointestinal secretory function. In: R. J. Xu, P. D. Cranwell (eds), *The Neonatal Pig: Gastrointestinal Physiology and Nutrition*. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, pp. 117.
- Xu, R. J., Mellor, D. J., Tungthanathanich, P., Birtles, M. J., Reynolds, G. W., y Simpson, H. V. (1992). Growth and morphological changes in the small and the large intestine in piglets during the first three days after birth. *Journal of Developmental Physiology*, 18: 161-172.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B. -P., Pei, R. -S., y Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47:174-179.
- Zhang, H., Malo, C., y Buddington, R. K. (1997). Suckling induces rapid intestinal growth and changes in brush border digestive functions of newborn pigs. *The Journal of Nutrition*, 127: 418- 426.
- Zhang, Y., y Xu, R. J. (2003). Anatomy and histology of the gastrointestinal tract. In: Xu, R. J., Cranwell P. D. (eds), *The Neonatal Pig: Gastrointestinal Physiology and Nutrition*. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, UK, pp. 1.
- Zou, Y., Xiang, Q., Wang, J., Wei, H., y Peng, J. (2016). Effects of oregano essential oil or quercetin supplementation on body weight loss, carcass characteristics, meat quality and antioxidant status in finishing pigs under transport stress. *Livestock Science*, 192: 33–38.

## VIII. ANEXOS

Tabla 1A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con el consumo de alimento en el período de Pre-Inicio

Muestra	SC <sub>i</sub>	GL	S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	GL x log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>
1	4.5768	2	2.2884	0.3595	0.7191
2	4.3255	2	2.1628	0.3350	0.6700
3	46.5315	2	23.2658	1.3667	2.7334
Suma	55.4338	6	-----	-----	4.1225

$S^2=9.2390$   
 $B=5.7937$   
 $\chi^2=3.85^{NS}$

Tabla 2A. Análisis de la varianza con el consumo de alimento en el período de Pre-Inicio

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	25306.45	1	----		
Blocks	32.43	2	16.22	2.82	NS
Tratamientos	34.61	2	17.31	3.01	NS
Residual	23.00	4	5.75		
Total	25396.49	9			

CV=4.5%

Tabla 3A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con el consumo de alimento en el período de Inicio

Muestra	SC <sub>i</sub>	GL	S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	GL x log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>
1	448.9975	2	224.4988	2.3512	4.7024
2	507.0679	2	253.5339	2.4040	4.8081
3	949.1572	2	474.5786	2.6763	5.3526
Suma	1905.2226	6	-----	-----	14.8631

$S^2=317.5371$   
 $B=15.0108$   
 $\chi^2=0.34^{NS}$

Tabla 4A. Análisis de la varianza con el consumo de alimento en el período de Inicio

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	372116.27	1	----		
Blocks	1642.21	2	821.11	12.5	* (P≤0.05)
Tratamientos	32.60	2	16.30	3.01	NS
Residual	263.01	4	65.75		
Total	374054.09	9			

CV=4%

Tabla 5A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con el consumo de alimento en el período de Crecimiento I

Muestra	SC <sub>i</sub>	GL	S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	GL x log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>
1	1143.3132	2	571.6566	2.7571	5.5143
2	1029.9515	2	514.9758	2.7118	5.4236
3	1445.6839	2	722.8420	2.8590	5.7181
Suma	1905.2226	6	-----	-----	16.6560

$S^2=603.1581$   
 $B=16.6825$   
 $\chi^2=0.06^{NS}$

Tabla 6A. Análisis de la varianza con el consumo de alimento en el período de Crecimiento I

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	284060.57	1	----		
Blocks	3380.44	2	1690.22	28.4	** (P≤0.01)
Tratamientos	227.16	2	113.58	1.9	NS
Residual	238.51	4	59.63		
Total	287906.68	9			

CV=4.35%

Tabla 7A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con el consumo de alimento acumulado

Muestra	SC <sub>i</sub>	GL	S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	GL x log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>
1	3182.6735	2	1591.3368	3.2018	6.4035
2	2932.4659	2	1466.2330	3.1662	6.3224
3	5648.7615	2	2824.3808	3.4509	6.9019
Suma	11763.9009	6	-----	-----	19.6378

$S^2=1960.6502$   
 $B=19.7544$   
 $\chi^2=0.27^{NS}$

Tabla 8A. Análisis de la varianza con el consumo de alimento acumulado

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	1695377.60	1	----		
Blocks	10640.30	2	5320.2	18.9	** (P≤0.01)
Tratamientos	506.90	2	253.5	<1	NS
Residual	1123.58	4	280.9		
Total	1707648.38	9			

CV=3.9%

Tabla 9A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Pre-Inicio

Muestra	SC <sub>i</sub>	GL	S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	GL x log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>
1	45.2375	2	22.6168	1.3545	2.7089
2	10.2667	2	05.1334	0.7104	1.4208
3	06.4932	2	03.2466	0.5114	1.0229
Suma	61.9974	6	-----	-----	5.1526

S<sup>2</sup>=10.3329  
 B=6.0853  
 χ<sup>2</sup>=2.15<sup>NS</sup>

Tabla 10A. Análisis de la varianza con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Pre-Inicio

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	18032.91	1	----		
Blocks	35.02	2	17.51	2.59	NS
Tratamientos	13.94	2	6.97	1.03	NS
Residual	26.98	4	6.75		
Total	18108.85	9			

CV=5.8%

Tabla 11A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Inicio

Muestra	SC <sub>i</sub>	GL	S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	GL x log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>
1	314.3073	2	157.1537	2.1963	4.3927
2	444.0067	2	222.0034	2.3464	4.6927
3	439.4334	2	219.7170	2.3419	4.6837
Suma	1197.7479	6	-----	-----	13.7691

S<sup>2</sup>=199.6247  
 B=13.8013  
 χ<sup>2</sup>=0.07<sup>NS</sup>

Tabla 12A. Análisis de la varianza con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Inicio

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	153645.71	1	----		
Blocks	1122.17	2	561.09	29.7	** (P≤0.01)
Tratamientos	116.70	2	58.35	3.1	NS
Residual	75.58	4	18.90		
Total	154960.16	9			

CV=3.33%

Tabla 13A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Crecimiento I

Muestra	SC <sub>i</sub>	GL	S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	GL x log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>
1	281.5625	2	140.7813	2.1485	4.2971
2	221.5467	2	110.7734	2.0444	4.0889
3	355.3795	2	177.6898	2.2497	4.4993
Suma	858.4887	6	-----	-----	12.8853

S<sup>2</sup>=143.0815  
 B=12.9335  
 χ<sup>2</sup>=0.11<sup>NS</sup>

Tabla 14A. Análisis de la varianza con los incrementos de peso vivo, según repeticiones, en el Crecimiento I

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	150468.99	1	----		
Blocks	719.10	2	359.55	10.3	* (P≤0.05)
Tratamientos	226.19	2	113.10	3.2	NS
Residual	139.39	4	34.85		
Total	151553.67	9			

CV=4.6%

Tabla 15A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con los incrementos acumulados de peso vivo, según repeticiones

Muestra	SC <sub>i</sub>	GL	S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	GL x log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>
1	933.5467	2	466.7734	2.6691	5.3382
2	1107.1667	2	553.5834	2.7432	5.4864
3	1776.6200	2	888.3100	2.9486	5.8971
Suma	3817.3334	6	-----	-----	16.7217

S<sup>2</sup>=636.2222  
 B=16.8217  
 χ<sup>2</sup>=0.23<sup>NS</sup>

Tabla 16A. Análisis de la varianza con los incrementos acumulados de peso vivo, según repeticiones

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	835700.69	1	----		
Blocks	3433.29	2	1716.65	17.9	* (P≤0.05)
Tratamientos	623.05	2	311.53	3.2	NS
Residual	384.04	4	96.01		
Total	840141.07	9			

CV=3.22%

Tabla 17A. Análisis de covarianza entre peso inicial (X) y los incrementos acumulados de peso

Fuente de Variación	GL	Suma de cuad. y product.			Desv. respecto a regresión		
		$\Sigma x^2$	$\Sigma xy$	$\Sigma y^2$	$\Sigma y^2 - \Sigma xy / \Sigma x^2$	GL	CM
Tratam.	2	876.54	497.15	623.05			
Residual	6	6993.15	4929.32	3817.33	342.76	5	68.55
Total	8	7869.69	5426.47	4440.38	698.61	7	-----
Diferencias para probar entre medias ajustadas de Tratamientos					355.85	3	177.93

$$F_{COV.} = 2.6^{NS}$$

$$F_{REG.} = 50.7^{**}$$

**Correcciones por covarianza con el peso inicial**

Promedio general de X = 131.99

$b_{Y/X} = 0.7049$

	Tratamientos		
	1	2	3
Promedio $X_i$	133.3	143.4	119.3
Diferencia con media general de X	1.31	11.41	-12.69
$b_{Y/X}$ por diferencia	0.923	8.043	-8.945
Promedio $Y_i$	314.3	306.13	293.9
Promedio $Y_i$ correg. por repetición	313.21	298.09	302.85
Promedio $Y_i$ por cerdo	15.66	14.91	15.14
% de T1	100	95.2	96.7

Tabla 18A. Análisis de la varianza con el peso vivo al finalizar el Pre-Inicio

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	14050.30	1	----		
Tratamientos	374.10	8			
A	37.31	2	18.66	23.5	** (P≤0.01)
B	332.68	2	166.34	209.1	** (P≤0.01)
AB	4.11	4	1.03	<1	NS
Residual	136.01	171	0.7954		
Total	14560.41	180			

CV=10.1%

Tabla 19A. Análisis de la varianza con el peso vivo al finalizar el Inicio

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	42525.72	1	----		
Tratamientos	742.80	8			
A	73.92	2	36.96	13.4	** (P≤0.01)
B	657.76	2	328.88	119.6	** (P≤0.01)
AB	11.12	4	2.78	1.0	NS
Residual	470.36	171	2.75		
Total	43738.88	180			

CV=10.8%

Tabla 20A. Análisis de la varianza con el peso vivo al finalizar el Crecimiento I

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	85822.47	1	----		
Tratamientos	1158.19	8			
A	124.69	2	62.35	9.6	** $(P \leq 0.01)$
B	997.29	2	498.65	82.4	** $(P \leq 0.01)$
AB	36.21	4	9.05	1.5	NS
Residual	1034.14	171	6.05		
Total	88014.80	180			

CV=11.3%

Tabla 21A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Pre-Inicio

Muestra	$SC_i$	GL	$S^2_i$	$\log_{10}S^2_i$	$GL \times \log_{10}S^2_i$
1	0.0308	2	0.0154	-1.8125	-3.6250
2	0.0035	2	0.0018	-2.7570	-5.5139
3	0.0075	2	0.0038	-2.4260	-4.8519
Suma	0.0418	6	-----	-----	-13.9908

$$S^2=0.00697$$

$$B=-12.9418$$

$$\chi^2=2.42^{NS}$$

Tabla 22A. Análisis de la varianza con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Pre-Inicio

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	12.6784	1	----		
Blocks	0.0316	2	0.0158	6.24	NS
Tratamientos	0.001581	2	0.0007905	<1	NS
Residual	0.01012	4	0.00253		
Total	12.7217	9			

CV=4.24%

Tabla 23A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Inicio

Muestra	$SC_i$	GL	$S^2_i$	$\log_{10}S^2_i$	$GL \times \log_{10}S^2_i$
1	0.002144	2	0.001072	-2.9698	-5.9396
2	0.005199	2	0.002599	-2.5851	-5.1702
3	0.002100	2	0.001050	-2.9788	-5.9576
Suma	0.009443	6	-----	-----	-17.0674

$$S^2=0.001574$$

$$B=-16.8182$$

$$\chi^2=1.97^{NS}$$



Tabla 24A. Análisis de la varianza con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Inicio

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	21.8837	1	----		
Blocks	0.008105	2	0.004053	12.13	* (P≤0.05)
Tratamientos	0.007558	2	0.003779	11.31	* (P≤0.05)
Residual	0.001337	4	0.0003342		
Total	21.9007	9			

CV=4.24%

Tabla 25A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Crecimiento I

Muestra	SC <sub>i</sub>	GL	S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	GL x log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>
1	0.006075	2	0.003038	-2.5175	-5.0350
2	0.008159	2	0.004080	-2.3894	-4.7788
3	0.012180	2	0.006090	-2.2154	-4.4308
Suma	0.026416	6	-----	-----	-14.2446

$$S^2=0.004402$$

$$B=-14.1379$$

$$\chi^2=0.25^{NS}$$

Tabla 26A. Análisis de la varianza con la conversión alimenticia, según repeticiones en el Crecimiento I

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	16.9168	1	----		
Blocks	0.0259	2	0.01295	100.9	** (P≤0.01)
Tratamientos	0.002287	2	0.001144	8.9	* (P≤0.05)
Residual	0.000513	4	0.0001283		
Total	16.9455	9			

CV=0.83%

Tabla 27A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con la conversión alimenticia acumulada, según repeticiones

Muestra	SC <sub>i</sub>	GL	S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	GL x log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>
1	0.002193	2	0.001965	-2.9600	-5.9200
2	0.000624	2	0.000312	-3.5059	-7.0117
3	0.002299	2	0.001150	-2.9395	-5.8790
Suma	0.005116	6	-----	-----	-18.8107

$$S^2=0.000853$$

$$B=-18.4153$$

$$\chi^2=0.91^{NS}$$

Tabla 28A. Análisis de la varianza con la conversión alimenticia acumulada, según repeticiones

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	18.2329	1	----		
Blocks	0.004281	2	0.002141	10.3	* (P≤0.05)
Tratamientos	0.003085	2	0.001543	7.4	* (P≤0.05)
Residual	0.000834	4	0.0002085		
Total	18.2411	9			

CV=1.02%

Tabla 29A. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett con el rendimiento de carcasa de los animales sacrificados

Muestra	SC <sub>i</sub>	GL	S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>	GL x log <sub>10</sub> S <sup>2</sup> <sub>i</sub>
1	0.2767	2	0.1383	-0.8590	-1.7180
2	2.4719	2	1.2360	0.0920	0.1840
3	14.8060	2	7.40300	0.8694	1.7388
Suma	17.5546	6	-----	-----	0.2048

S<sup>2</sup>=2.9258  
B=2.7979  
χ<sup>2</sup>=5.97<sup>NS</sup>

Tabla 30A. Análisis de la varianza con el rendimiento de carcasa de los animales sacrificados

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	30267.88	1	----		
Tratamientos	0.07	2	0.035	<1	NS
Residual	17.56	6	2.927		
Total	30285.50	9			

CV=2.95%

Tabla 31A. Análisis de la varianza con la altura de las vellosidades intestinales

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	5788858.70	1	----		
Tratamientos	37710.44	8			
A	5978.42	2	2989.21	1.6	NS
B	20151.54	2	10075.77	5.3	** (P≤0.01)
AB	11580.48	4	2895.12	1.5	NS
Residual	234744.52	124	1893.10		
Total	6061313.66	133			

CV=20.9%

Tabla 32A. Análisis de la varianza con la profundidad de las criptas de Lieberkühn

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	1203807.81	1	----		
Tratamientos	24221.64	8			
A	194.90	2	97.45	<1	NS
B	8808.11	2	4404.06	6.99	** $(P \leq 0.01)$
AB	15218.63	4	3804.66	6.04	** $(P \leq 0.01)$
Residual	79412.00	126	630.26		
Total	1307441.45	135			

CV=26.6%

Tabla 33A. Análisis de la varianza con la relación entre altura de las vellosidades: profundidad de las criptas de Lieberkühn

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	751.05	1	----		
Tratamientos	5.10	8			
A	0.71	2	0.360	1.47	NS
B	0.07	2	0.035	<1	NS
AB	4.32	4	1.080	4.37	* $(P \leq 0.05)$
Residual	31.08	126	0.247		
Total	787.2345	135			

CV=26.6%

Tabla 34A. Análisis de la varianza con el conteo de ufc de *Clostridium perfringens* en el contenido del intestino grueso

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Signif.
Media	43.2341	1	----		
Tratamientos	0.1061	2	0.0531	<1	NS
Residual	1.2524	6	0.2087		
Total	44.5926	9			

CV=20.8%

## ANEXO 1.

### FUNDAMENTOS GENERALES PARA EL PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LOS TEJIDOS<sup>1</sup>

Una técnica histológica es un conjunto de operaciones a las que se somete una muestra biológica a fin de posibilitar su estudio al microscopio. El examen al microscopio óptico se hace generalmente por luz transmitida, lo que significa que la luz debe "atravesar" el objeto a examinar para llegar a impresionar nuestro órgano visual, después de haber pasado por las distintas lentes del aparato. Por esa causa, el material de estudio debe ser reducido a láminas muy delgadas y transparentes mediante una serie de operaciones que se describirán a continuación.

El proceso abarca desde el momento en que se toma el material hasta que el preparado puede observarse.

#### PASOS:

- 1.- Toma de material.
- 2.- Fijación
- 3.- Deshidratación
- 4.- Preparación para la inclusión
- 5.- Inclusión
- 6.- Modelado del bloque – catalogación
- 7.- sección con el micrótopo extendido de los cortes – pegado
- 8.- Coloraciones: de rutina o especiales

#### Obtención de la Muestra

De acuerdo a la procedencia de los tejidos y la finalidad de su estudio es posible distinguir entre material histológico y material anatomo-patológico. Se denomina material histológico a toda muestra de tejidos obtenida de un individuo o animal sano (o experimentalmente sometido a un determinado tratamiento) con la finalidad de investigar su estructura normal y/o los cambios producidos en la morfología como consecuencia de algún tratamiento. El material anatomo-patológico está constituido por muestras procedentes de individuos o animales enfermos utilizadas para el diagnóstico y/o la investigación etiológica (origen-causa) de la enfermedad.

Los tejidos para estudio histológico se obtienen habitualmente a partir de:

**a- autopsias:** en medicina el término se aplica al conocimiento de la causa de la muerte. Mediante el procedimiento de autopsia se realizan manipulaciones instrumentales sobre el cadáver con el propósito de obtener muestras de órganos y tejidos e investigar la causa del fallecimiento. Este método también recibe la denominación de necropsia.

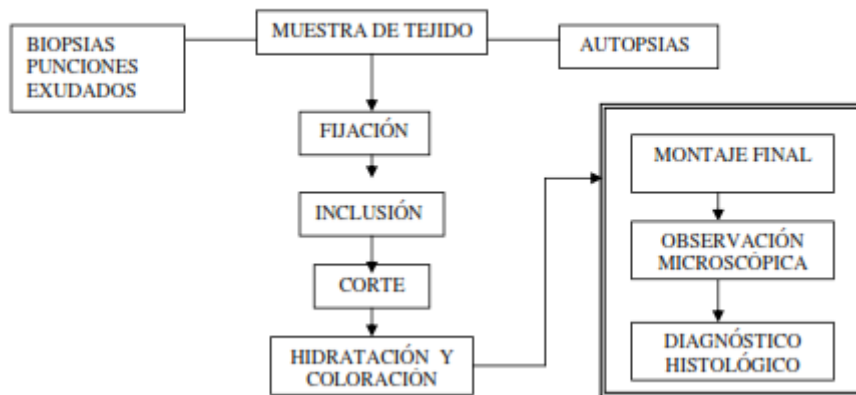
**b- biopsias:** es una porción de tejido obtenida de un individuo vivo para su estudio histológico o anatomo-patológico. Las biopsias tienen como objetivo fundamental el diagnóstico de una patología que no se ha podido diagnosticar por los métodos clínicos habituales.

**c- extendidos citológicos:** es un conjunto de células independientes procedentes de un tejido y extendidas sobre un portaobjeto formando una capa delgada y que permite su observación microscópica. Ejemplos: frotis de sangre, tejidos hematopoyéticos y exfoliación (o raspado) de mucosas.

---

<sup>1</sup> Celaya, G., Carranza, M. (2015). Histotecnología aplicada al procesamiento y diagnóstico de los tejidos animales. Universidad Nacional de Cordova.

#### PASOS PARA EL ESTUDIO DE LOS TEJIDOS AL MICROSCOPIO



#### Fases en la obtención de material animal:

En un estudio histológico descriptivo o experimental la muestra, generalmente, procede de un animal normal o control y de animales problemas, según los casos. Si es posible debe extraerse de un ejemplar vivo y anestesiado. En caso contrario, cuando el animal está muerto, el o los órganos deberán obtenerse lo más rápidamente posible después de la muerte.

Para la extracción de los órganos se requiere tener conocimientos anatómicos específicos que permitan establecer estrategias de disección, conservación y tratamiento posterior del tejido.

En la técnica histológica muchos componentes se pierden durante los sucesivos pasos. Aquellos que perduran son en su mayoría moléculas grandes que no se disuelven con facilidad en especial después de aplicar el fijador. Las macromoléculas que forman complejos con otras moléculas de gran tamaño, son las que mejor se conservan en un corte: Ej.: - Ácidos nucleicos asociados con una proteína (nucleoproteína).- Proteínas intracelulares del citoesqueleto que forman complejos con otras proteínas.- Proteínas extracelulares en grandes agregados insolubles asociados con otras moléculas vecinas similares, a través de enlaces cruzados (como sucede en las fibras colágenas) y los fosfolípidos de las membranas.

#### Muestreo:

En cuanto la sangre deja de llevar oxígeno y de extraer el anhídrido carbónico de los tejidos, las enzimas comienzan a actuar y producen la autólisis de las células que los componen.

Las propias estructuras moleculares son deformadas y es lo que precisamente se debe evitar.

Los tejidos y órganos se han de extraer considerando las siguientes prioridades:

- Las glándulas exocrinas y endocrinas lo más rápidamente posible.
- El páncreas y el riñón deben extraerse no más de 10 a 15 min. post-mortem.
- Otros órganos tales como intestino delgado y/o grueso, estómago, hígado, se deben extraer no más allá de los 30 min.
- Los músculos esqueléticos, huesos, piel, encéfalo, médula, ganglios nerviosos no deben extraerse más allá de 60 min. postmortem.

## Identificación del Material

Si se extraen varios órganos se debe tener cuidado en registrar cada trozo de órgano envolviéndolo en una gasa o bien pasando un hilo directamente por un extremo del órgano, mientras en el extremo opuesto se coloca un trozo de cartulina resistente donde se escribe con lápiz las indicaciones (órgano, porción, etc.) del caso. Esto es necesario cuando las muestras son numerosas, pues facilitará su reconocimiento.

Las muestras de órganos no deben exceder un volumen de  $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$  y se requiere efectuar secciones profundas, en lo posible no tangenciales, para incluir los constituyentes anatómicos normales como por ej. cápsula, corteza, médula, etc. La cantidad de líquido fijador en el que se embeba la pieza debe superar aproximadamente 10 a 20 veces el volumen de la muestra.

## FIJACIÓN

Consiste en la preservación del tejido del deterioro provocado por la autólisis y putrefacción derivada de la muerte celular.

La autólisis es el proceso en el cual, después de la muerte, se produce la autodigestión enzimática debido a la salida del contenido lisosómico de la célula. Se denomina putrefacción al efecto ejercido por determinadas toxinas y enzimas bacterianas sobre los tejidos. Los microorganismos que originan esta acción son de carácter saprófito y complementan el efecto lítico de la autólisis hasta conseguir la total destrucción celular. Ambos procesos están influidos tanto por la naturaleza del tejido considerado como por la temperatura existente en el medio donde se encuentra el tejido. Así, por ejemplo los tejidos ricos en enzimas digestivas (estómago, páncreas) o que contienen una importante flora bacteriana (intestino) sufren estos fenómenos con mayor intensidad.

Con la fijación del tejido, no sólo se interrumpen los procesos de degradación postmortem, sino que además se intenta conservar la arquitectura y composición tisular lo más próxima posible a como se encontraba en el organismo vivo.

El proceso de fijación es muy importante en histotecnología, ya que errores en el mismo, no pueden ser corregidos, generando artificios (desgarros, retracciones) que dificultan el diagnóstico.

### Tipos de fijación

En función de las características del estudio microscópico que se vaya a realizar, se distinguen dos tipos de fijación.

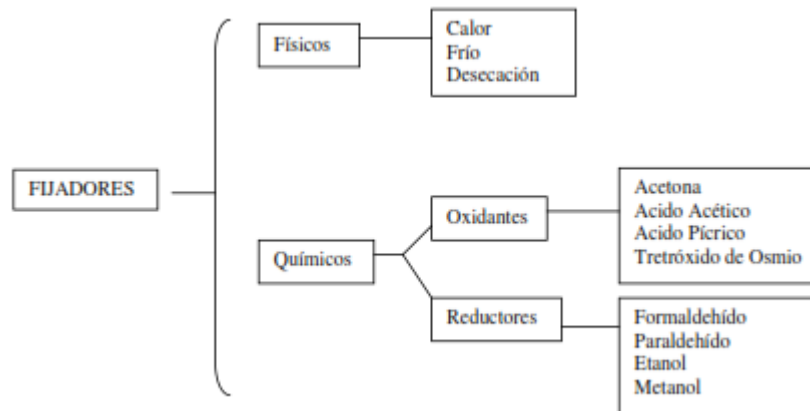
- a) fijación citológica o histológica. Intenta conservar la estructura de células y tejidos, sin considerar los cambios moleculares de los componentes bioquímicos.
- b) fijación histoquímica. Intenta conservar la composición molecular y bioquímica de los tejidos más que los detalles morfológicos de los mismos.

### Clasificación de los fijadores

De acuerdo a la acción que ejercen sobre los tejidos se clasifican en químicos y físicos.

Los fijadores químicos son los más empleados y dentro de estos, en la práctica rutinaria, el formaldehído, formalina o formol es el de uso más extendido ya que cumple con la mayor parte de las características que debe reunir un buen fijador. También es muy común el uso de mezclas fijadoras formadas por la combinación de dos o más sustancias con

compatibilidad química, cada uno de los cuales es por si solo insuficiente para dar una fijación que responda a todas las exigencias. Entre los más usados se halla el líquido de Bouin

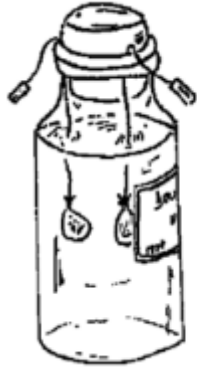


### Características fundamentales que debe poseer un fijador

- Capacidad para bloquear la autólisis. Este efecto del fijador depende principalmente de su poder para producir la desnaturalización de las proteínas, de modo que la actividad enzimática del tejido quede paralizada. Además debe tener un efecto antimicrobiano que impida la acción bacteriana desencadenante de la putrefacción.
- Penetrar rápidamente al tejido.
- No provocar sobre el tejido retracciones o distorsiones que determinen anomalías en su estructura. Es decir, evitar la difusión de elementos constitutivos del tejido durante y después de la fijación.
- Favorecer la inclusión, corte y coloración posteriores del material biológico.

### Reglas generales a considerar en el empleo de líquidos fijadores

- Para evitar la autólisis, el tejido debe ser colocado lo más rápidamente posible en el líquido fijador.
- La selección del fijador depende del tejido a estudiar, fundamentalmente de las fuerzas químicas que interactúan para mantener su estructura.
- El tejido debe estar seccionado en láminas de 0.5-1cm de espesor máximo.
- Asegurar la permanencia de las muestras en el nivel medio del volumen del fijador para que dicho reactivo actúe homogéneamente por todas las caras de la muestra (Figura 1)
- El volumen del fijador está dependiendo del volumen de la muestra. En general, la relación entre el volumen del fijador y el de la muestra de tejido es de 10:1 (el volumen del fijador es 10 veces mayor que el ocupado por la pieza).
- La presión osmótica del líquido fijador y la del tejido deben ser equivalentes.
- El pH del fijador debe aproximarse al pH fisiológico
- El tiempo de fijación es específico para cada fijador.



**FIGURA 1. Proceso de fijación.** Las muestras se colocan en bolsitas de gasa pendientes de un hilo, de este modo se asegura el contacto de la misma con el fijador.

### Técnicas de fijación

En la práctica existen básicamente dos modos para fijar un material dado.

- a) **Fijación por inmersión**, se realiza sumergiendo un pequeño trozo de tejido en el fijador inmediatamente después de haber sido extraído. (Figura 2)
- b) **Fijación por perfusión**. En este tipo de fijación el líquido fijador se inyecta a través del sistema circulatorio, mientras el animal permanece adormecido bajo efecto de narcóticos.



**FIGURA 2. Fijación por inmersión**

### Detención de la fijación

Una vez transcurrido el tiempo de fijación deseado es preciso detener la fijación rápidamente, ya que una acción muy prologada de estos agentes perjudica en general la coloración ulterior de los cortes y hasta podría alterar la estructura histológica.

El fijador que rodea la pieza puede ser eliminado por lavado en:

- a) agua corriente de 2 a 24 h.
- b) alcohol: Las piezas que han estado en alcohol, ácido pícrico o formol, se llevan directamente al alcohol 70 u 80° llevándose así a cabo el lavado y el inicio de la deshidratación.

### INCLUSION

La observación microscópica requiere en la mayoría de los casos que el material de estudio sea muy delgado con el objetivo que los elementos que lo constituyen se encuentren en un solo plano focal. Este método exige por un lado la realización de cortes delgados, de pocas micras de espesor y de grosor uniforme, para lo cual se emplean aparatos especiales llamados micrótomos. La forma de lograr que las muestras fijadas adquieran la consistencia más favorable y uniforme, consiste en incorporar al seno mismo del tejido, una sustancia sólida que sirva de sostén a los componentes histológicos y que permita obtener cortes aptos para su observación al microscopio. Estas sustancias se denominan **medios de inclusión**.



Diferentes sustancias han sido empleadas como medios de inclusión. La gelatina, el polietilenglicol empleadas en soluciones acuosas pueden penetrar muestras hidratadas. Otras, como la parafina y la celoidina que no son solubles en agua, requieren para poder penetrar una deshidratación previa de las piezas y un tratamiento posterior con un reactivo miscible de los medios de inclusión.

También, pueden emplearse como medios de inclusión resinas acrílicas o epoxídicas, que permiten obtener secciones mucho más delgadas que en parafina, con la posibilidad de distinguir detalles estructurales más finos. Generalmente son los medios de inclusión empleados en microscopía electrónica de transmisión y en el estudio de muestras óseas sin descalcificar de gran dureza (dientes).

### **Deshidratación**

Los tejidos contienen grandes cantidades de agua tanto intra como extracelular, la que debe ser eliminada y reemplazada por parafina. La deshidratación puede realizarse por métodos químicos o físicos (criodesecación). En el primer caso se emplea un reactivo anhidro ávido de agua como la acetona, el alcohol etílico, metílico, butílico, etc.

En los métodos de rutina el agente más utilizado es el alcohol etílico, el cual establece una unión lo suficientemente fuerte con las moléculas de agua para extraerlas del tejido. En la práctica y para evitar alteraciones provocadas por una deshidratación brusca, se aconseja proceder escalonadamente utilizando preferentemente, alcoholes de graduación creciente:

70°, 80°, 96° y 100° absoluto

Las piezas se envuelven en gasa a manera de bolsitas o se colocan en cassettes plásticos de deshidratación (Figura 3). Luego se introducen en frascos anchos y de cierre hermético, dejándolas suspendidas en el seno del líquido deshidratante cuyo volumen debe ser diez veces superior al de la muestra.



**FIGURA 3. Deshidratación en cassette**

Los tiempos de permanencia en cada alcohol dependerán del tamaño de la pieza. Se recomienda 1 hora en cada reactivo deshidratante si el espesor de la muestra es de 0.5- 1 cm.

Las condiciones esenciales de un buen agente deshidratante son:

- 1- No debe alterar la estructura tisular
- 2- Ser soluble en el reactivo intermediario
- 3- Actuar rápidamente
- 4- El endurecimiento de los tejidos debe ser mínimo

Una vez retirada la muestra del alcohol absoluto es necesario efectuar una **desalcoholización**. Es decir, el alcohol de los tejidos debe ser reemplazado por un líquido (solvente) que sea soluble en parafina con la que se impregnará el tejido. Los solventes utilizados son el xileno o xilol, benceno, tolueno y butilo. El más indicado es el xilol por su rápida acción, porque endurece poco los tejidos y se elimina fácilmente del medio de inclusión.

Además, tiene la particularidad de alterar el índice de refracción de la muestra y la torna ligeramente translúcida. A este paso de la técnica se la denomina aclaramiento o diafanización. Para realizarlo, las piezas se trasladan a un frasco con xilol que contenga un volumen aproximadamente 30 veces superior. Si al introducir las piezas en el solvente se observa que éste se vuelve opalino, significa que la deshidratación no ha sido incompleta. En ese caso, se recomienda volver al alcohol absoluto.

El aclaramiento concluye cuando las muestras se han vuelto diáfanos y transparentes, entonces, pueden pasarse a una solución mezcla de xilol-parafina. En la práctica, suelen utilizarse los siguientes baños de aproximadamente 1 hora de duración cada uno:

<b>Alcohol absoluto+ xilol (1:1) y dos baños de xilol puro.</b>
---

## **INCLUSION EN PARAFINA**

La parafina es una mezcla de hidrocarburos, sólida a temperatura ambiente y con escasa elasticidad. Para penetrar en los tejidos y ocupar todos sus intersticios debe estar fundida. En la práctica se utilizan dos tipos de parafinas de acuerdo a sus puntos de fusión: parafina blanda funde entre 42-46°C y parafina dura entre 56-58° C.

La parafina blanda se emplea durante la pre-impregnación de la muestra con la finalidad de que los tejidos comiencen a infiltrarse con un medio de inclusión de menor viscosidad. La parafina dura se usa para realizar el bloque que contiene a la muestra biológica y con suficiente grado de dureza para realizar cortes con el micrótopo.

El proceso de impregnación de la muestra se realiza mediante baños sucesivos en parafina fundida en estufa de inclusión (a 60°C). En la estufa el xilol u otros solventes se evaporan y los espacios ocupados por ellos son ahora reemplazados por la parafina (Figura 4 y 5).

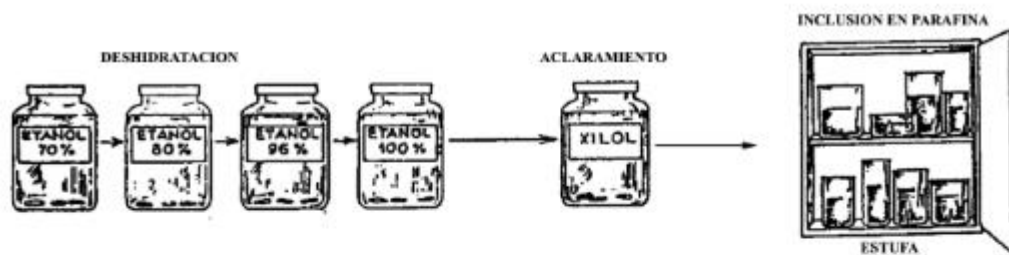


FIGURA 4. Pasos para la inclusión en parafina

#### Impregnación con parafina

De rutina, se realizan 3 baños.

- 1- Xilol + parafina blanda (1:1). 1 hora
- 2- Parafina blanda. 1 hora
- 3- Parafina Dura. 2 horas



FIGURA 5. Impregnación en estufa

#### Preparación del bloque

Luego que las muestras fueron incluidas en parafina durante el tiempo adecuado, se realiza la inclusión propiamente dicha que consiste en realizar un bloque de parafina dura con el material de estudio incorporado en su interior. El bloque puede armarse utilizando moldes de distinto tipo en los que se vierte la parafina fundida sobre la muestra y se deja solidificar a temperatura ambiente (Figura 6).



FIGURA 6. Formación del bloque en hormas de metal

Durante la inclusión, es importante tener en cuenta la orientación de la muestra. La cara de corte deberá estar ubicada en contacto con el fondo plano del molde.

## Moldes

Existen moldes de varias clases, entre ellos están las barras de Leukart, cajas de papel o de plástico y hormas de metal.

**Barras de Leukart:** Consisten en un par de barras de metal dispuestas en ángulo recto o en forma de L. Esta disposición permite que una barra se aplique contra la otra y como pueden deslizarse es posible agrandar o achicar el molde conforme a las necesidades.

**Cajas de papel:** Se construyen con una tira de cartulina delgada o con papel resistente. Son muy económicas con respecto a las barras dado que aquellas son costosas.

**Hormas de metal:** Se adquieren en comercios especializados o se pueden hacer de modo casero. Por ejemplo, cortando “rodajas” de caños de metal o de plástico o cortando láminas de aluminio o de hojalata que se doblan sobre un molde de madera, los extremos libres pueden soldarse. Ambos tipos de hormas carecen de piso, por lo que es necesario colocarlas sobre una superficie lisa al hacer la inclusión.

## Tallado y montaje del bloque

Una vez solidificada la parafina (entre 15 y 30 minutos) se extrae el bloque del molde, teniendo la precaución de marcar la cara o plano de corte. Los excedentes de parafina se recortan tallando el bloque en forma de pirámide cuadrangular truncada. Las caras opuestas de la pirámide han de resultar paralelas entre sí, lo mismo que las aristas. Este tipo de tallado reduce la superficie de corte porque deja un pequeño margen de parafina alrededor del material incluido y por otro lado, queda una base amplia para la adhesión del bloque a un taco de madera. Posteriormente, con ayuda de una espátula caliente se pega el bloque a un taco de madera adaptable al portatacos del micrótopo (Figura 7). En esta instancia es importante tener en cuenta dos aspectos: a) el material incluido debe quedar con la superficie de corte plana hacia arriba y, b) la catalogación: todos los datos del órgano o tejido del bloque deben estar correctamente indicados en el taco y además, en el cuaderno del protocolo.

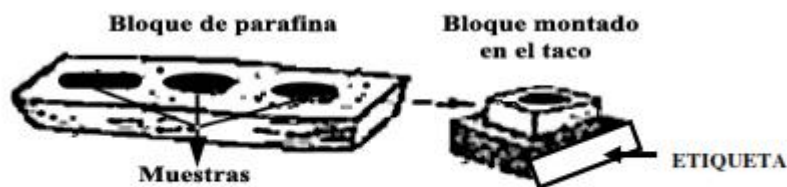


FIGURA 7 Preparación del taco

## CORTES

### MICROTOMOS Y NAVAJAS O CUCHILLAS

El objeto de la inclusión es posibilitar la reducción del tejido a láminas lo suficientemente delgadas como para permitir el paso de la luz para examinarlo al microscopio.

Los micrótopos son instrumentos de gran precisión que permiten obtener cortes delgados y uniformes. El espesor de los cortes puede variar de acuerdo al tipo de muestra. Los micrótopos tienen un dispositivo que permite seleccionar la cantidad de micras para el espesor del corte, siendo frecuente obtener cortes de 4 a 6 micras.

Existen diferentes tipos de micrótomos: el de deslizamiento, el tipo Minot, el de congelación, y el crióstato o criótomo.

- Tipo deslizamiento: en este caso la pieza queda fija mientras la cuchilla se desliza por unas guías especiales merced a un soporte al que se sujeta la cuchilla con unos tornillos. (Figura 8)

- Tipo Minot: en este caso la cuchilla queda fija y es la pieza la que se desliza sujeta a una platina, ésta se desliza verticalmente cuando se hace girar una manivela. Permite obtener cortes seriados en forma de cinta (Figura 9).

- Tipo congelación: se parece al de deslizamiento, pero la cuchilla o navaja, en lugar de deslizarse, gira sobre un eje. Por otra parte, el aparato se caracteriza por tener un sistema de congelación colocado debajo de la platina que utiliza la expansión brusca del anhídrido carbónico contenido en un cilindro con el cual se comunica.

- Crióstato: consta de un micrótomos tipo Minot incluido en una cámara de congelación. El volante de inercia que controla la realización del corte permanece en el exterior, mientras que la cuchilla y el mecanismo de avance están situados dentro de la cámara fría (normalmente a 20°C). Pese a la disposición horizontal de la cuchilla, la obtención de secciones seriadas es posible gracias a la existencia de un sistema anti-enrollamiento que obliga al corte a deslizarse sobre la superficie de la cuchilla. En los modelos más modernos es posible optar por el corte manual o motorizado, así como enfriar rápidamente la muestra a -60° C gracias a la existencia de una placa de congelación instantánea. Frente al micrótomos convencional de congelación, el crióstato posee la gran ventaja de permitir la obtención de cortes mucho más delgados (por lo general de 4 μm y, en manos experimentadas, hasta 2 μm).

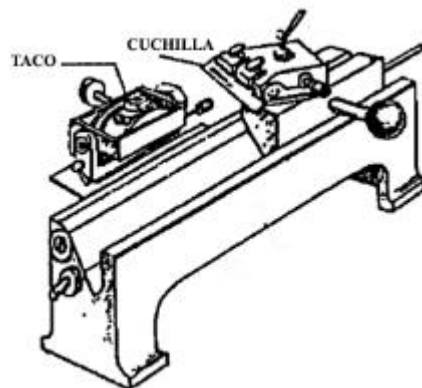


FIGURA 8. Micrótomos de deslizamiento



FIGURA 9. Micrótomos Tipo Minot

## Navajas y cuchillas

Las cuchillas son instrumentos generalmente de acero inoxidable que se adquieren en comercios especializados. Existen de diferentes formas y tamaños y su elección depende del tipo de muestras a cortar y del micrótopo que se empleara. Las cuchillas presentan dos extremos, una base un borde filoso y dos caras: planas o planoconcavas.

Hay distintos tipos:

- 1- Bicóncava en ambas caras, son para bloques de parafina blanda.
- 2- Planocóncavas se utiliza para bloques en el micrótopo de deslizamiento.
- 3- Biplana en cuña, se utiliza para cortar tejido congelado en el micrótopo de gas carbónico. El valor del ángulo óptimo es entre 27 y 31 grados.

Para lograr buenos cortes se necesita una cuchilla de acero con estructura y dureza de óptima calidad, con un filo y ángulo de inclinación apropiado.

## Mantenimiento de la cuchilla

**1- Afilado y desbastado de la cuchilla:** Consiste en el desgaste del acero del filo para eliminar sus porciones dañadas (principalmente, muescas o mellas). Dependiendo de la cantidad y calidad de los materiales seccionados, el afilado se puede realizar una o dos veces al año y puede realizarse manual o automáticamente. Como superficie de afilado se emplean diversas piedras naturales o sintéticas (carborundo) o incluso una placa de vidrio a la que se añaden diversos abrasivos en forma de pasta. El desbastado permite eliminar las pequeñas irregularidades y partículas de acero levantadas en el proceso de afilado. Para ello se usan abrasivos o piedras de menor granulometría.

**2- Asentado de la cuchilla:** Antes de cortar las muestras, se debe suavizar la cuchilla: para ello, se utiliza una cinta de cuero aceitada sobre la que pasamos varias veces la navaja.

## MONTAJE DE LOS CORTES

Una vez obtenido el corte se recoge con un pincel y se lo deposita en una cápsula o cubeta que contenga agua tibia a fin que se estire (Figura 10). La temperatura del agua debe estar controlada, ya que si está muy fría, los cortes no se estiran adecuadamente y si es demasiado caliente, la parafina se funde y el corte se desintegra.

Un buen corte se caracteriza por:

- Estar bien estirado.
- Conservarse entero
- No tener arrugas ni pliegues
- No tener burbujas de aire

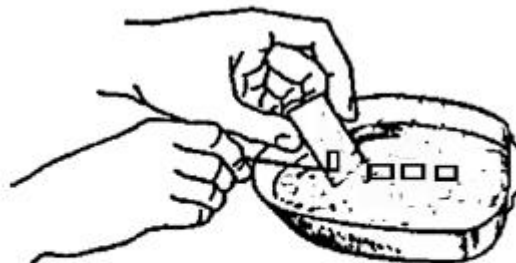


FIGURA 10. Montaje del corte sobre el portaobjetos

### **Pegado de los cortes:**

Para evitar que los cortes se desprendan del portaobjetos durante la coloración ulterior es conveniente colocar sobre el mismo una gota pequeña de albúmina, la cual se extiende con el borde externo del dedo meñique, formando una película sumamente delgada, casi invisible. Los portaobjetos albuminados se dejan secar en estufa para que la albúmina adquiera propiedades adhesivas. Luego se llevan al baño termostatzado sumergiéndolos de modo tal que su cara albuminada esté hacia arriba. Se coloca esta cara por debajo del corte, tratando de recogerlo y centrarlo en el porta (Figura 10). Una vez montados los cortes, los portaobjetos se colocan nuevamente en estufa a 60° C durante 20 minutos con la finalidad de evaporar el agua existente entre el corte y el vidrio.

### **HIDRATACION Y COLORACION**

En general, los tejidos animales a diferencia de los vegetales, son incoloros, excepto los que contienen pigmentos que adoptan el color que éste le confiere, como por ejemplo la melanina que le otorga una coloración parda a la epidermis, o la hemoglobina que le da la característica coloración roja a la sangre.

Los métodos de coloración tienen por finalidad aumentar el contraste entre las distintas estructuras constituyentes del tejido para así diferenciarlos.

El fundamento de cualquier método de tinción se basa en la propiedad de los tejidos de incorporar y fijar diversas sustancias coloreadas, denominadas colorantes. Un colorante se define como una sustancia que puesta en contacto con el soporte adecuado, se une a él de forma perdurable transmitiéndole su color. El color visible será el complemento de la radiación lumínica absorbida.

Previo a la coloración, es necesario retirar la parafina del corte (desparafinar) a fin de que penetre el colorante empleado. Además, generalmente los colorantes de rutina son soluciones acuosas, por lo tanto es necesario hidratar el corte. Para desparafinar los cortes se emplea el xilol, realizándose 2 baños de aproximadamente 30 minutos cada uno. En los pasos siguientes el xilol debe ser eliminado y para ello se utiliza el alcohol etílico (Figura 11).

<p><b>Xilol / alcohol 100° (1:1)</b> <b>Alcohol 100°</b></p>
--

Para hidratar el corte se realizan sucesivos lavados en alcohol de graduación descendente:

<p><b>96°, 80°, 70°</b></p>
-----------------------------

Una vez terminados los baños con alcohol se sumergen los cortes en un frasco que contenga agua destilada, durante dos o tres minutos. De esta forma se elimina cualquier resto de alcohol y el corte estará en condiciones para el proceso de coloración.

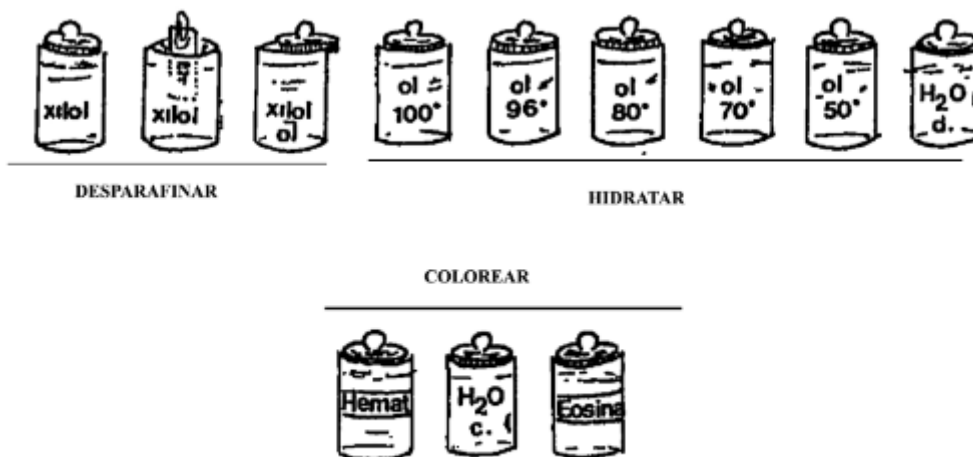


FIGURA 11. Pasos en la coloración

## COLORANTES

Se distinguen dos tipos de colorantes de acuerdo a su origen: **naturales** y **artificiales**. Los colorantes naturales son escasos y se obtienen a partir de extractos de ciertas plantas o insectos.

Los más utilizados en histotecnología son la hematoxilina y el carmín (colorantes básicos con afinidad por los compuestos ácidos: ej. cromatina), la safranina y la orceína (colorantes ácidos con afinidad por los compuestos básicos: ej. Componentes citoplasmáticos). Los colorantes artificiales son en su mayoría derivados de la anilina (del árbol an-nil: azul oscuro), se obtienen a partir del alquitrán de carbón. Actualmente se sintetizan en los laboratorios, razón por la cual se dispone de un amplio espectro de tonalidades.

La mayor parte de los colorantes naturales y la totalidad de los artificiales son anillos aromáticos derivados del benceno. Originalmente, el benceno es una sustancia incolora capaz de absorber radiación dentro del espectro de luz UV. Los dobles enlaces entre los átomos de carbono de estos anillos no son fijos y pueden ser reordenados mediante una reacción química, en este caso el derivado bencénico que se obtiene puede absorber radiación dentro del espectro de luz visible y mostrar color.

Los radicales químicos responsables de la modificación molecular a la que se debe la aparición del color reciben el nombre genérico de grupos cromóforos y se denomina cromógeno al conjunto formado por el grupo cromóforo más el anillo aromático. El cromógeno no es necesariamente el colorante, puesto que no siempre posee apetencia específica por los tejidos o no se fija fuertemente a ellos. La conversión de un cromógeno en colorante está asociada a la adición a la molécula aromática de grupos atómicos que le permiten disociarse electrolíticamente o formar sales con los tejidos. Estos radicales reciben la denominación de auxocromos o potenciadores de color.

### Clasificación de los colorantes según sus grupos auxocromos y apetencia tisular

Se distinguen cinco grupos fundamentales: colorantes ácidos, básicos, neutros, inespecíficos y metacromáticos.

**Colorantes básicos:** Están formados por la asociación de un cromógeno de baja intensidad y carácter débilmente ácido, con grupos auxocromos catiónicos fuertemente básicos que son los responsables de la carga global del colorante. Por ello, se utilizan para



colorear sustancias ácidas, principalmente contenidas en el núcleo, como los ácidos nucleicos (hematoxilina, fucsina básica, galocianina, etc).

**Colorantes ácidos:** Son producto de la unión de un cromógeno de baja intensidad y carácter débilmente básico, con grupos auxocromos ácidos que le confieren dicho carácter al colorante. Tiñen estructuras básicas contenidas en el citoplasma (eosina, fucsina ácida, pironina, etc).

**Colorantes neutros:** Se producen por la unión de carácter salino entre colorantes ácidos y básicos para formar un precipitado insoluble en agua y muy estable en disolución en alcohol. Su carga global es neutra y conservan la capacidad de colorear en forma conjunta o separada diversas estructuras (tinción Giemsa).

**Colorantes inespecíficos:** Son los que no poseen un carácter ácido, básico o salino definido, por lo que colorean los tejidos por un mecanismo de impregnación física.

**Colorantes metacromáticos:** En condiciones normales, los tejidos tienden a teñirse con una tonalidad semejante a la del colorante utilizado. Esta propiedad se denomina ortocromasia. Sin embargo, cuando se utilizan ciertos colorantes básicos derivados de la anilina, algunas estructuras tisulares se tiñen de tonos totalmente diferentes, este efecto se llama metacromasia (azul de toluidina). Los colorantes metacromáticos son sustancias químicamente puras y no salinas. La explicación más aceptada es que se produce una polimerización entre las moléculas del colorante adyacentes a la estructura que se va a teñir.

### **Métodos de coloración:**

- **Coloración directa:** existe una verdadera afinidad entre el colorante y el objeto.
- **Coloración indirecta:** requiere la intervención de intermediarios o mordientes para que la coloración tenga lugar.
- **Coloración progresiva:** se hace actuar el colorante hasta que llegue a su punto óptimo.
- **Coloración regresiva:** se realiza primero una sobrecoloración y luego se elimina el resto del colorante por medio de diferenciadores. A este proceso se lo denomina diferenciación.
- **Coloración simple:** se colorean solamente algunos elementos del preparado (núcleo, fibras elásticas, etc.).
- **Coloración combinada:** se tiñen los elementos nucleares y citoplasmáticos recurriéndose, generalmente, al empleo sucesivo de colores básicos y ácidos que contrastan por sus colores.
- **Coloración panóptica:** es una coloración combinada realizada sucesivamente por colorantes neutros (May-Grünwald-Giemsa).
- **Coloración pancrómica:** en un solo baño colorante actúan todos los colorantes neutros que se necesiten.

## **COLORACIONES**

### **Nucleares**

En la tinción del núcleo de la célula para definir su contorno y realzar su contenido cromático, se utilizan generalmente, colorantes básicos con apetencia por los grupos fosfóricos ácidos del ADN. El colorante nuclear por excelencia es la hematoxilina, colorante natural que se extrae del árbol Hematoxylon campechianum o palo de campeche o palo azul de Centroamérica. Comercialmente se expende en forma de cristales rosados o amarillentos solubles en agua o alcohol, preparada en solución es de color rojo vináceo.

Otros colorantes nucleares son la galocianina, fucsina ácida, el violeta de cresilo y la safranina.

### **Citoplasmáticos**

Los colorantes citoplasmáticos son menos específicos que los nucleares, pues también se fijan a los componentes de la MEC en forma simultánea. Los colorantes más empleados en forma rutinaria son distintos derivados xanténicos, entre los cuales está la eosina. Esta puede utilizarse en solución acuosa o alcohólica, siendo más soluble en agua.

### **Coloraciones Histológicas de Conjunto**

Existen múltiples técnicas de tinción que colorean en conjunto los tejidos, sin embargo, una de las más empleadas en los laboratorios de histología es la técnica Hematoxilina- Eosina (H-E), debido a la riqueza de matices rosados y rojos de la eosina y al excelente contraste que produce la hematoxilina. Este método consta de una fase inicial en la que se colorean los núcleos con la hematoxilina y luego, se realiza el contraste citoplasmático y extracelular con la eosina.

## **PROCEDIMIENTO TÉCNICO DE COLORACIÓN CON HEMATOXILINA- EOSINA**

Existen múltiples variantes, según se emplee un tipo u otro de eosina y de hematoxilina (generalmente se emplea la de Harris, aunque también se puede usar la de Mayer y la de Ehrlich). Por lo común, este método siempre consta de una etapa inicial en la que se colorean los núcleos celulares con la hematoxilina. A continuación, con la eosina se realiza el contraste citoplasmático y de los componentes extracelulares.

El tejido puede haber sido fijado en cualquier solución fijadora excepto en tetróxido de osmio. Se requiere seguir las siguientes instrucciones:

### **Preparación de las Soluciones**

- 1- Solución de hematoxilina de Harris
- 2- Etanol ácido al 1%
- 3- Solución de eosina (alcohólica o acuosa)

### **Modo de Operar**

Para colorear se emplea generalmente una batería de coloración.

- 1- Desparafinar e hidratar
- 2- Teñir con hematoxilina durante 2 minutos
- 3- Lavar en agua corriente hasta virar el color a tono violeta
- 4- Diferenciar en alcohol-ácido clorhídrico al 1% durante 5 a 30 segundos.
- 5- Lavar abundantemente en agua corriente
- 6- Colorear con eosina durante 2 minutos
- 7- Lavar en agua corriente (en caso de eosina alcohólica, lavar y diferenciar en alcohol 70%) hasta obtener la intensidad deseada.
- 8- Deshidratar, aclarar y montar.

### **Resultados Esperados**

Núcleos.....azul-negro  
Eritrocitos.....anaranjado  
Estructuras restantes.....rosado-rojo

## COLORACIONES ESPECIALES

Existen numerosos métodos de coloración que permiten evidenciar los diferentes componentes estructurales y/o químicos de los tejidos. Por ejemplo, coloraciones tricrómicas que permiten diferenciar los epitelios del tejido conectivo y muscular (Tricrómico de van Gieson, o de Gomori, de Masson, etc.), impregnaciones argénticas para identificar fibras reticulares o detectar depósitos de  $Ca^{++}$ , técnica de Nissl para neuronas, Sudán para lípidos, Acido Peryódico de Schiff (PAS) y Azul alcian para hidratos de carbono, etc. (Para más detalles ver anexo).

## MONTAJE FINAL DE LAS PREPARACIONES

Para la realización de un preparado permanente, en condiciones de ser observado, es necesario protegerlo del deterioro. Por ello, es conveniente luego de la coloración, deshidratar el corte, aclararlo y montarlo definitivamente (Figura 12).

### Deshidratación

Para la extracción del agua del tejido, se sumerge el corte en alcoholes de graduación ascendente (creciente):

70°; 80°; 96° y 100° absoluto

La aclaración se realiza con xilol, generalmente en 3 baños sucesivos. El objetivo de este paso es impregnar el corte con un solvente de las resinas a emplear posteriormente y al mismo tiempo conferirle un índice de refracción semejante al del vidrio.

Para el montaje final se emplean resinas o aceites hidrofóbicos. Los medios de montaje más difundidos son el Bálsamo de Canadá (de origen vegetal) y las resinas sintéticas (Entellán, Canadax, etc).

La técnica de montaje consiste en depositar sobre el portaobjetos una gota de resina en solución que solidifica ulteriormente por polimerización al evaporarse su solvente (xilol, benzol, toluol). Para no dañar el corte con el objetivo del MO se cubre el mismo con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas de aire. Se retira el exceso de bálsamo con una gasa húmeda en xilol y se deja secar unas horas a temperatura ambiente, antes de su observación al microscopio.

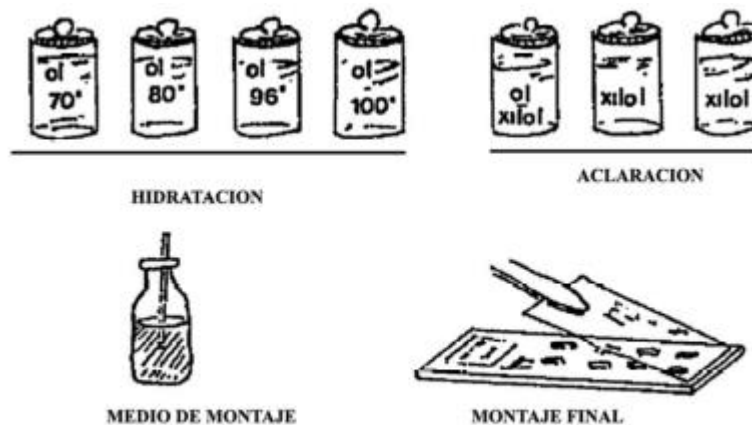


FIGURA 12. Montaje final

## **ANEXO 2.**

### **CUENTA EN PLACA DE BACTERIAS<sup>2</sup>**

#### **OBJETIVOS**

- Realizar adecuadamente la técnica de cuenta en placa para diversos grupos microbianos de importancia en alimentos.
- Interpretar adecuadamente los resultados de la cuenta en placa y sus implicaciones en la calidad del alimento.

#### **GENERALIDADES**

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa. Esta técnica no pretende detectar a todos los microorganismos presentes, pero el medio de cultivo, las condiciones de temperatura y la presencia de oxígeno, permiten seleccionar grupos de bacterias cuya presencia es importante en diferentes alimentos; por ejemplo, las bacterias mesofílicas aerobias, o mesófilos aerobios son un indicador general de la población que pueden estar presente en una muestra y, por lo tanto, de la higiene con que ha sido manejado el producto.

Este grupo en particular, se determina en la mayor parte de los alimentos, pero para algunos productos, también es importante determinar la presencia de bacterias termofílicas, psicofílicas y/o psicrotróficas para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento. La técnica básica es la misma, pero cambian las condiciones de incubación, medios de cultivo y algunos otros detalles, que se mencionan en la técnica. Si se modifican las condiciones de incubación o se somete la muestra a algún tratamiento previo, el método puede aplicarse también a la detección de otros grupos como anaerobios o esporulados, desde luego, con la adecuada selección de medios de cultivo.

El método permite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de diversos factores por lo que es muy importante apearse a la técnica y controlar cuidadosamente las condiciones.

#### **FUNDAMENTO**

La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las

---

<sup>2</sup> Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., y Velázquez, O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo; la técnica para realizar este procedimiento se describe en “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”.

## NOTAS

- El medio de cultivo no debe fundirse más de una vez, y debe mantenerse en baño de agua regulado a 45 °C, durante el tiempo suficiente para que alcance esta temperatura, y hasta su utilización.
- El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente, hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

## MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES

- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, con 90 mL de solución amortiguadora de fosfatos o agua peptonada <sup>a</sup>.
- 4 a 6 tubos de ensayo de 16 x 150 con tapón de rosca, con 9 mL de solución amortiguadora de fosfatos o agua peptonada <sup>a</sup>.
- 6 a 12 tubos de 22 x 175 con 20 mL c/u (o un matraz con 130 ó 250 mL) de agar triptona-glucosa-extracto de levadura (agar para cuenta estándar) fundido y mantenido en baño de agua a 45 ± 1.0 °C (para técnica de vertido en placa) <sup>a</sup>.
- 6 a 12 cajas de Petri con 20 mL c/u de agar triptona-glucosa-extracto de levadura (agar cuenta estándar) estériles o el medio requerido en la técnica <sup>a</sup>.

## MATERIAL Y EQUIPO

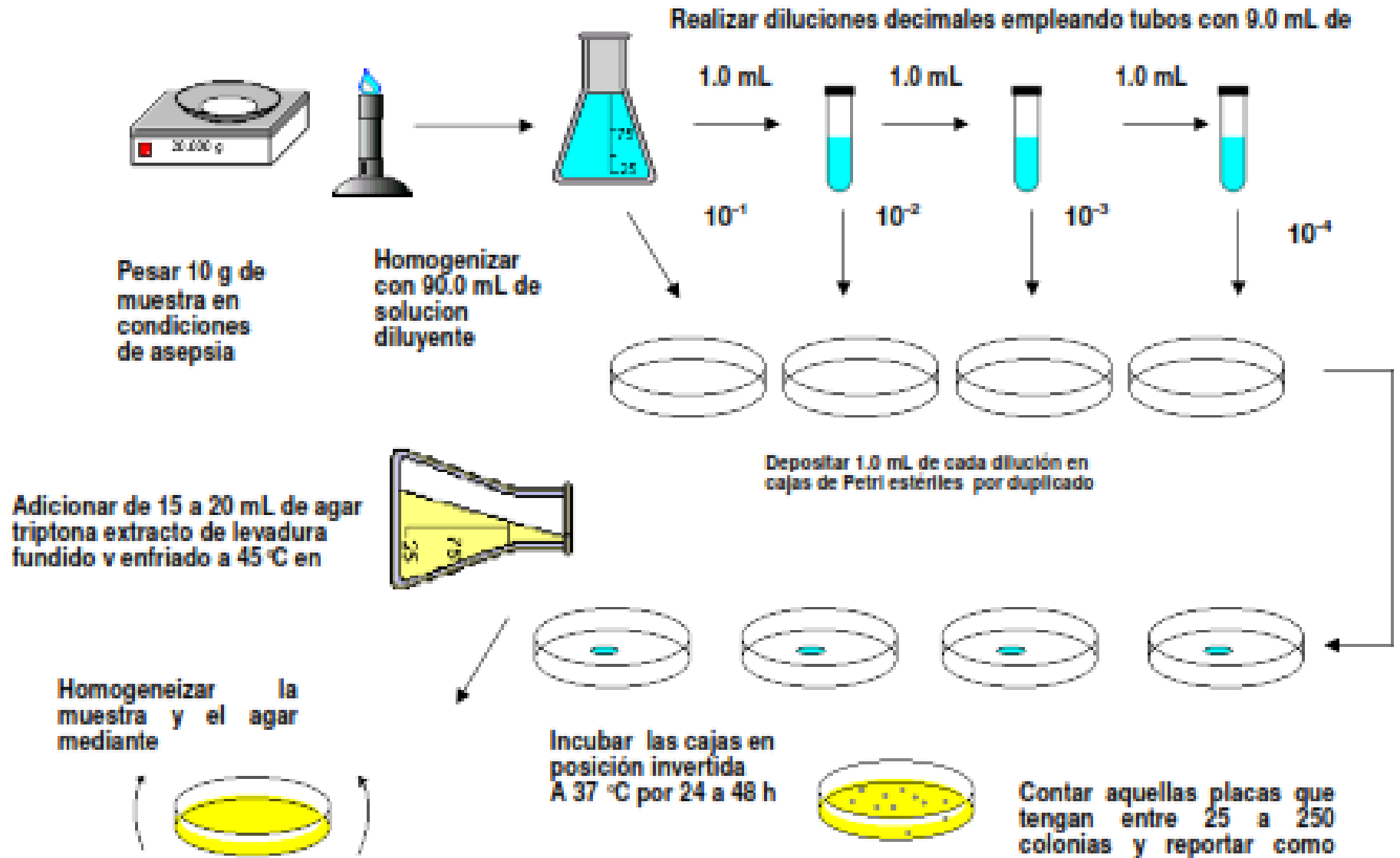
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de ± 1.0°C, provista con termómetro calibrado <sup>a</sup>.
- Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrada y lente amplificador <sup>b</sup>.
- Registrador mecánico o electrónico <sup>b</sup>.
- Microscopio óptico <sup>b</sup>.
- Baño de agua con termómetro, que mantenga la temperatura a 45 ± 1.0 °C <sup>a</sup>
- Utensilios estériles (cuchillo, tenedor, cuchara, pinzas) para tomar muestra <sup>a</sup>
- Pipetas bacteriológicas de 10 mL, estériles, con algodón en el extremo superior (las necesarias, de acuerdo con las diluciones) <sup>a</sup>.
- Pipetas bacteriológicas de 1 mL, estériles, con algodón en el extremo superior (las necesarias, de acuerdo con las diluciones) <sup>a</sup>.
- Varillas de vidrio estériles (en escuadra o “L”) <sup>a</sup>.
- Pipetas Pasteur estériles <sup>a</sup>.
- 8 a 12 cajas Petri estériles <sup>a</sup>.
- Stomacher (homogeneizador peristáltico) <sup>a</sup>
- Bolsas estériles para stomacher <sup>a</sup>

## NOTAS

<sup>a</sup>Material necesario al inicio de la práctica

<sup>b</sup>Material necesario a las 24 y 48 horas de iniciada la práctica

## CUENTA EN PLACA DE BACTERIAS



## **PROCEDIMIENTO**

1. Pesar la muestra y preparar las diluciones como lo establece la técnica de “Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico”.

### **2. Técnica de vertido en placa.**

1. Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación y la adición de medio de cultivo se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las bases de las cajas con los datos pertinentes antes de inocular.

2. Inocular por duplicado, 1 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta estéril. Agregar de 18 a 20 mL del medio fundido y mantenido a 45 °C. Para homogenizar, mezclar mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar. El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

3. Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

4. Incubar las cajas en posición invertida durante el tiempo y a la temperatura que se requiera, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, como se indica en el cuadro 1.

### **3. Técnica de extensión superficial en placa.**

1. Distribuir las cajas con el medio estéril en la mesa de trabajo de manera que la inoculación se pueda realizar cómoda y libremente. Marcar las bases de las cajas con los datos pertinentes antes de inocular.

2. Inocular por duplicado, 0.1 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta estéril. Para distribuir de manera homogénea, extender el inóculo utilizando una varilla de vidrio estéril (en forma de escuadra o “L”) haciendo movimientos giratorios de manera perpendicular al medio de cultivo, hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el inóculo se absorba antes de incubar (se recomienda un tiempo de espera aproximado de 10 minutos). El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se inocula en el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

3. Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

4. Incubar las cajas en posición invertida durante el tiempo y a la temperatura que se requiera, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, como se indica a continuación.

**CUADRO 1.**  
**Condiciones de incubación para cuenta en placa de diferentes grupos**

<b>Grupo Bacteriano</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo de Incubación</b>
Termofilicos	55 ± 2°C	48 ± 2 h
Mesofilicos	35 ± 2°C	48 ± 2 h
Psicrotróficos	20 ± 2°C	de 3 a 5 días
Psicrofilicos	5 ± 2°C	de 7 a 10 días

5. Después de la incubación, contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras; si se sospecha que es una colonia de este grupo de microorganismos, se recomienda confirmar por microscopía), incluyendo las colonias puntiformes. Si hay desarrollo extendido o un número de colonias superior al del rango de sensibilidad del método, aplicar las reglas indicadas en RESULTADOS. Realizar microscopía para resolver los casos en los que no se puedan distinguir las colonias de las partículas pequeñas de alimento. Utilizar el registrador para contar las colonias.

## **RESULTADOS**

La selección de las cajas que se toman en cuenta para los cálculos es muy importante para la confiabilidad de los resultados; a continuación se especifican las reglas generales para seleccionarlas, pero conviene enfatizar que la selección de cajas obedece a criterios:

- Lógicos (elegir las que están en rango),
- Estadísticos (considerar los duplicados y el mayor número posible de datos) y
- Funcionales (a falta de datos representativos, tomar los mejores disponibles).

### **Las reglas para seleccionar las cajas para los cálculos son las siguientes:**

1. Se consideran “representativas” las cajas que tienen un número de colonias dentro del rango de sensibilidad del método, en este caso, entre 25 y 250 UFC.
2. Una vez seleccionadas las cajas y hechos los promedios correspondientes, se aplica el factor de dilución, que es el inverso y se redondea el número a 2 cifras significativas (o dígitos) y potencias de 10. Cuando el tercer dígito del promedio es 4 o menor, se omite dejando el número de 2 cifras significativas. Por ejemplo, si en una caja se cuentan 312 UFC, se debe reportar como  $31 \times 10^1$ , porque el tercer dígito es 2 y se redondea al segundo dígito. Cuando el tercer dígito es 5 o superior, el segundo dígito se redondea al siguiente, por ejemplo si en una caja se cuantifican 199 UFC se reportará como  $20 \times 10^1$  UFC, porque el tercer dígito es superior a 5. En el ejemplo 5 del cuadro 2, el promedio es de 237.5 en la dilución  $10^{-3}$ , por lo que se reportará como  $24 \times 10^4$  UFC.
3. Cuando las 2 placas de una dilución contienen un número de colonias características dentro del rango de sensibilidad del método, se promedian los números y se multiplica por el inverso de



la dilución.

4. Cuando hay una placa con crecimiento extendido, no se consideran ésta ni su duplicado.
5. Cuando una de las 2 placas de una dilución es representativa y la otra no, se consideran ambas y se promedian.
6. Cuando hay placas representativas en 2 diluciones subsecuentes, se promedian cada una con su duplicado (aunque el duplicado no lo sea), se aplica el factor de dilución a cada una y luego se promedia nuevamente.
7. Si en las placas no hay colonias (o no son características del grupo en estudio), reportar el resultado como: menos de un (grupo) en 10 (la más baja utilizada), por ejemplo  $< 100 / \text{g}$  si la dilución más baja fue  $10^{-2}$  ó  $< 1 / \text{mL}$  si la muestra se sembró directamente, sin diluciones. Se agrega la leyenda:  
“valor estimado”.
8. Si no hay placas representativas pero hay alguna con un número menor de UFC., se consideran las de la menor dilución y se agrega “valor estimado”.
9. Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Agregar la leyenda "valor estimado".
10. Se cuentan como una sola colonia:
  - Cadenas o pequeños grupos no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias y que están separadas de otras colonias o cadenas.
  - Colonias extendidas como película entre el fondo de la caja y el agar y que se diferencian claramente de otras.
  - Colonias como película en las orillas de la caja, sobre la superficie del agar.
11. Se considera “crecimiento extendido” el que se presenta cuando las colonias abarcan más del 50 % de la superficie de la caja, con o sin inhibición de crecimiento; en ese caso, y/o cuando la inhibición exceda el 25 % de la superficie de la caja, se considera que las placas no son representativas y por lo tanto no se toman en cuenta.

El Cuadro 2, ejemplifica la aplicación de estos lineamientos; consultarlo para seleccionar las cajas a considerar en los cálculos

**CUADRO 2.**  
**Ejemplos para el cálculo de resultados de cuenta en placa, utilizando ensayos por duplicado.**  
(Rango de sensibilidad: 25 a 250 colonias)

Ejemplo	Serie duplic.	Diluciones			Resultado UFC. / g o mL	Observaciones
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>		
1	A	> 250	178	16	18 x 10 <sup>4</sup>	Si están dentro del rango, se promedian los datos de la dilución 10 <sup>-3</sup> (184 x 10 <sup>3</sup> se redondea a 18 x 10 <sup>4</sup> )
	B	> 250	190	17		
2	A	> 250	220	25	23 x 10 <sup>4</sup>	En este caso se promedian datos de diluc. 10 <sup>-3</sup> (= 179 x 10 <sup>3</sup> , pasa a 180 x 10 <sup>3</sup> ó 18 x 10 <sup>4</sup> ). Por otra parte se promedia datos de dilución 10 <sup>-4</sup> (= 27 x 10 <sup>4</sup> ). Finalmente se promedian los resultados de ambas diluciones y se redondea el resultado final
	B	> 250	138	28		
3	A	18	2	0	16 x 10 <sup>2</sup> valor estimado	Se promedian datos de diluc. 10 <sup>-2</sup> ; aunque están fuera de rango, son los más cercanos. Se anota "valor estimado"
	B	14	0	0		
4	A	> 250	> 250	512	50 x 10 <sup>5</sup> valor estimado	Se toma la más alta que se pueda contar, aunque sea en cuadrantes o cuadrícula y se anota "valor estimado".
	B	> 250	> 250	495		
5	A	> 250	240	34	24 x 10 <sup>4</sup>	Se ignora la dilución 10 <sup>-4</sup> por el crecimiento extendido; se promedian los datos de 10 <sup>-3</sup> , se redondea 237.5 a 240.
	B	> 250	235	Crecim extend.		
6	A	0	0	0	< 100 valor estimado	Se reporta como < 1 en la dilución más baja que se utilizó, en este caso 10 <sup>-2</sup> . Se registra como "sensibilidad del método".
	B	0	0	0		
7	A	> 250	240	24	25 x 10 <sup>4</sup>	Se promedia el único dato que está dentro del rango (240), con su duplicado, aunque éste salga del rango (268).
	B	> 250	268	19		
8	A	> 250	216	23	28 x 10 <sup>4</sup>	Se consideran las placas que están dentro del rango y se promedian con sus duplicados, aunque éstos salgan. Finalmente se promedian los resultados de ambas diluciones
	B	> 250	262	42		
9	A	> 250	215	20	23 x 10 <sup>4</sup>	Se promedian datos de 10 <sup>-3</sup> , se promedian datos de 10 <sup>-4</sup> se realizan los cálculos como en el ejemplo 2
	B	> 250	235	26		

Las cifras sombreadas son las que se consideran adecuadas para realizar los cálculos.

## **CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

Reportar como se indica a continuación, con dos cifras significativas y potencias de 10:

Bacterias mesofílicas aerobias en placa en agar tripton extracto de levadura incubadas por \_\_\_\_ h. a \_\_\_\_ °C: \_\_\_\_\_ UFC / g (ó / mL) de muestra.

Sustituir “mesofílicas” por termofílicas, psicofílicas ó psicrotróficas, según corresponda, anotando el tiempo y la temperatura correspondientes.

Si se analizó un alimento para el cual existe norma y existe especificación sobre el grupo estudiado, incluir en el reporte si el alimento cumple o no con la norma.

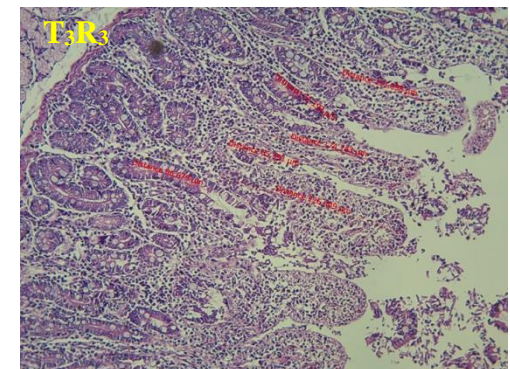
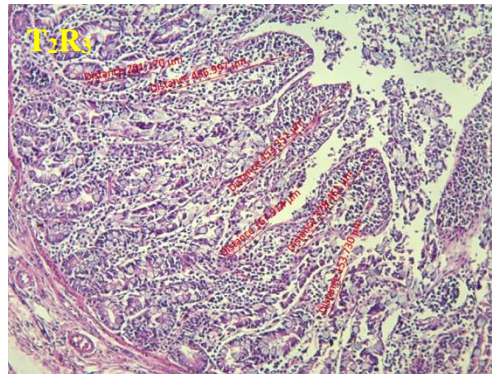
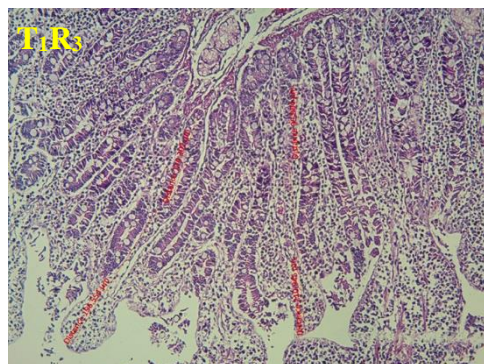
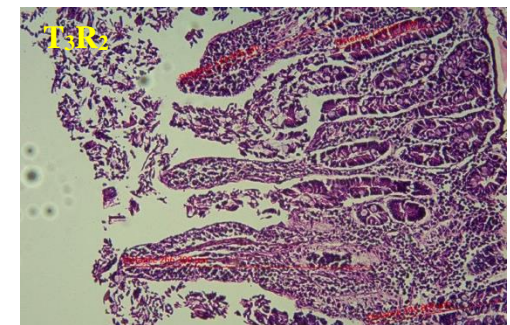
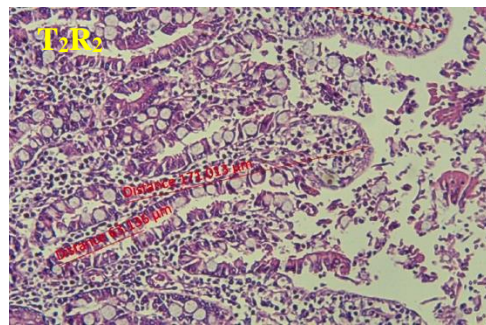
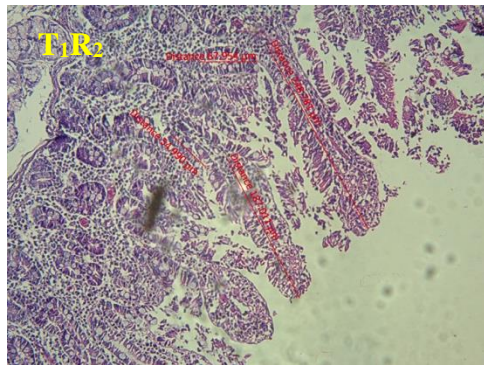
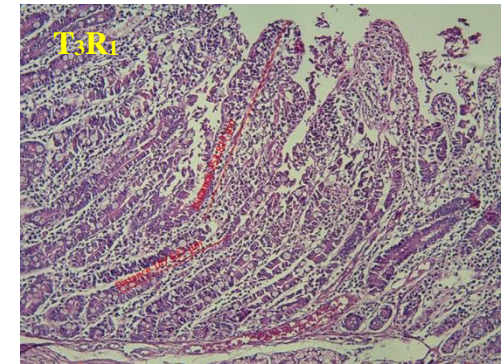
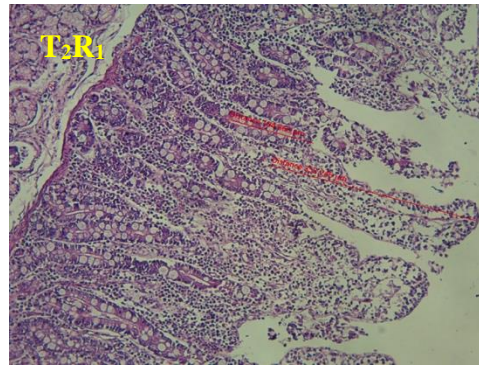
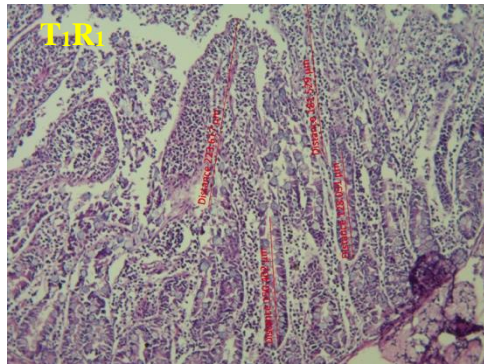


Figura 1A. Microfotografías del epitelio intestinal