

[ EL PROYECTO FEED FOR PIG HEALTH ]

## Alternativas a los antibióticos promotores del crecimiento en porcino

### Ácido Benzóico, extracto de canela y extracto de pomelo

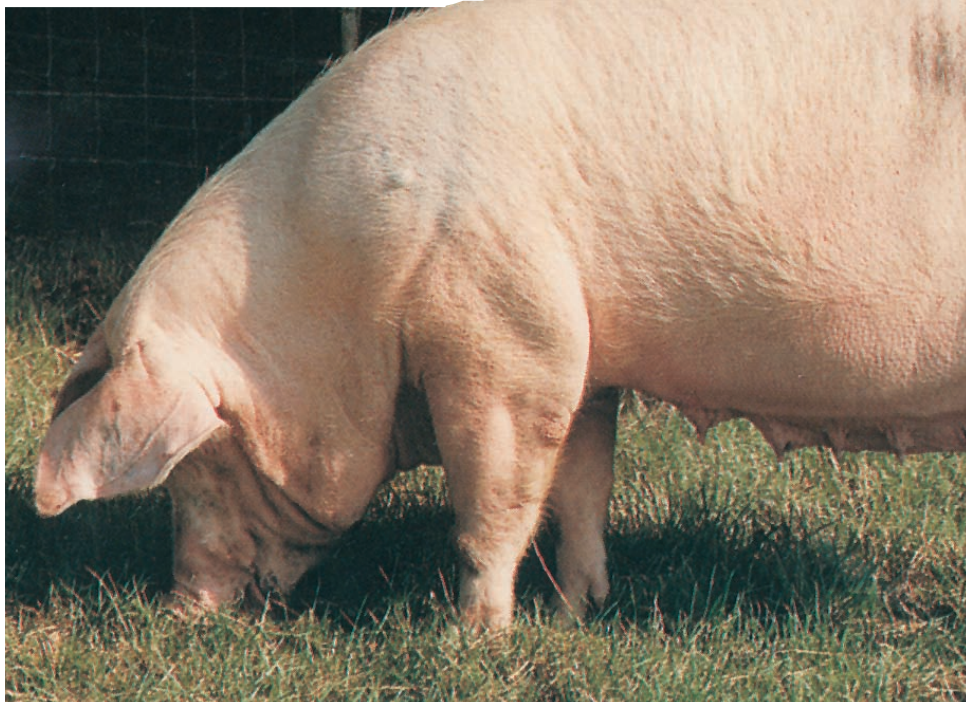
**Núria Andrés Elias**

Veterinaria

El uso de aditivos antibióticos, también conocidos como antibióticos promotores del crecimiento (APC) es una práctica prohibida en alimentación animal desde el 1 de enero de 2006, según dispone el Reglamento (CE) nº 1831/2003. Desde el anuncio de la prohibición de su uso, la búsqueda de sustancias que mimeticen sus efectos a través de distintos modos de acción ha marcado una línea a seguir en el campo de la investigación en alimentación animal.

El presente documento es el resumen de un experimento llevado a cabo en el marco del proyecto europeo FOODCT-2004-506144, llamado “Feed for pig health” ([www.feedforpighealth.org/](http://www.feedforpighealth.org/)). Se trata de un proyecto coordinado por la universidad de Bristol (UK) en el que participan 13 grupos pertenecientes a 7 países europeos. IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) es el representante español. El proyecto FFPH se estructura alrededor de cinco objetivos. El primero de ellos consiste en seleccionar extractos de plantas y otras sustancias naturales (el acrónimo inglés es “PENS, Plant Extracts and Natural Substances”) en base a su efecto “in vitro” sobre el contenido gastrointestinal y las

células epiteliales intestinales. Un segundo objetivo sería el de evaluar los efectos “in vivo” de los PENS seleccionados según criterios preestablecidos de salud intestinal (fisiológicos, microbiológicos e inmunológicos). El tercer objetivo es determinar el mecanismo por el cual los PENS modifican el sistema inmunológico del hospedador. El cuarto objetivo incluye experimentos de “desafío” en los que se evaluarían las sustancias según su capacidad para alterar la susceptibilidad del lechón a sufrir una infección provocada experimentalmente. El quinto y último objetivo consistiría en la evaluación de los PENS seleccionados en experimentos de producción a gran escala. Su homólogo en alimentación de aves sería el proyecto Poultryflorgut .



## El periodo del destete

### Cambios fisiológicos

El lechón destetado en condiciones comerciales sufre un conjunto de cambios con respecto a la etapa de lactancia que tienen una repercusión negativa sobre el funcionamiento de su aparato digestivo. El destete de un cerdo en condiciones naturales tiene lugar entre las 12 y las 16 semanas de vida, lo que se considera la edad natural de destete. Durante este tiempo, el cerdo desarrolla la capacidad de digerir alimento sólido y va disminuyendo gradualmente el consumo de leche. En condiciones comerciales esto ocurre a las 3 - 4 semanas. Así, el destete brusco de los animales a una edad muy temprana en comparación a lo que sucede en condiciones naturales supone, de entrada, una falta de preparación del aparato digestivo del animal para aprovechar el alimento que se le ofrece. A la falta de madurez del tracto gastrointestinal (TGI) para afrontar el cambio nutricional que supone el destete, hay que sumarle los cambios ambientales y sociales que se producen en ese momento. Los cerdos de distintas camadas son mezclados y deben establecer la jerarquía social, además de adaptarse a unas nuevas instalaciones con distintas condiciones de temperatura, suministro de agua y alimento. A consecuencia de esto, durante el proceso de adaptación y aprendizaje hay una disminución de la ingesta de alimento. Esta disminución en sí misma tiene un efecto negativo sobre la integridad del epitelio intestinal, esto es, un efecto negativo sobre su función de "barrera" contra antígenos y bacterias. A esto hay que sumarle la inmadurez del sistema inmunitario durante el destete, lo que también favorecerá el que microorganismos comensales y/o ambientales patógenos puedan colonizar el intestino y causar enfermedad, contribuyendo a la pérdida de integridad del epitelio y agravando así lo que la anorexia post-destete había desencadenado.

Entre los indicadores de integridad del intestino delgado más comúnmente utilizados se encuentran:



### Algunos de los efectos beneficiosos de la microbiota comensal son los de ofrecer resistencia a la colonización por parte de bacterias patógenas, generar nutrientes, y estimular el desarrollo de las defensas intestinales

- Las medidas histológicas de altura de vellosidades y profundidad de criptas. El destete causa una reducción de la altura de las vellosidades y un incremento de la profundidad de las criptas (Pluske y col., 1996a, 1996b). Esto supone una disminución de la capacidad digestiva y absorbente del intestino.
- La producción de mucus. Aunque la secreción real de mucus no se puede medir, un incremento en el número de células caliciformes, que son las que lo producen y almacenan indicaría un aumento en su producción. De todas maneras, la importancia del número de células de Goblet como indicador de integridad intestinal es limitada por la inconsistencia de las respuestas observadas en el periodo post-destete.
- Permeabilidad transepitelial a compuestos marcados de distinto peso molecular como el manitol, la lactulosa o la ovo-albúmina. Un incremento del transporte paracelular de marcadores sería indicativo de que la integridad de la mucosa ha disminuido y los patógenos y toxinas pueden cruzar la barrera epitelial.
- El grado de inflamación. El seguimiento de distintas poblaciones de células inflamatorias y moléculas relacionadas con la inflamación también es indicativo del grado de integridad epitelial, ya que cuando los agentes patógenos cruzan la primera línea de defensa sus metabolitos o los mediadores liberados por las células epiteliales pueden producir una respuesta inflamatoria (Gaskins, 1997).
- Actividad enzimática del borde en cepillo. Esta aumentaría en dirección apical desde la base de las criptas intestinales al ápice de las vellosidades (Miller y col., 1986; Fan y

col., 2001), lo cual estaría relacionado con un mayor grado de diferenciación de los enterocitos. Crecimiento del animal. La ganancia de peso media diaria, la longitud y peso del intestino delgado, el peso de los órganos digestivos y el estado de salud son indicadores del grado de desarrollo intestinal y su capacidad digestiva y, por tanto, del grado de integridad intestinal.

### Microbiología intestinal

El tracto gastrointestinal porcino es un ecosistema dinámico que contiene una comunidad compleja de bacterias micro-aerófilas y anaerobias (Konstantinov y col., 2004). Las bacterias del TGI están implicadas en la fermentación del alimento ingerido y los componentes secretados por el hospedador en el tracto gastrointestinal (TGI).

Según Richards et al. (2005), entre los efectos beneficiosos de la microbiota comensal se encuentran los de ofrecer resistencia a la colonización por parte de bacterias patógenas, generar nutrientes disponibles para el hospedador (ácidos grasos volátiles de cadena corta, aminoácidos y vitaminas B y K), y estimular el desarrollo de las defensas intestinales del hospedador. Por otro lado, la presencia de la microbiota comensal también tiene efectos perjudiciales, entre los que se encuentran la estimulación crónica del sistema inmunitario, la competencia por los nutrientes, la disminución de la digestibilidad de las grasas por desconjugar los ácidos biliares (Gaskins, 2001), la alteración de la arquitectura y tamaño del intestino, y la alteración de los ritmos de recambio celular y la secreción de mucus (Gaskins, 2001).



**Las sustancias susceptibles de suplir a los antibióticos (o a otras sustancias de uso prohibido), despiertan un gran interés en la industria de la alimentación animal**

Llegados a este punto, lo siguiente es preguntarse si los efectos beneficiosos de mantener a una microbiota en el TGI prevalecen o no sobre los perjudiciales. Lo cierto es que en condiciones comerciales (no esterilidad) y sin la microbiota, el TGI sería colonizado por especies patógenas y esto tendría unos efectos devastadores. No obstante, lo interesante es poder intervenir en su composición para maximizar los efectos beneficiosos y minimizar los perjudiciales. Según Richards y col. (2005), dos de los grandes retos y oportunidades en agricultura animal son:

- determinar la microbiota óptima para la salud y desarrollo del animal bajo condiciones comerciales, lo que implica descubrir la microbiota que maximiza los beneficios y minimiza los costes.
- desarrollar intervenciones dietarias y otras intervenciones para que se establezca dicha microbiota.

## [ Prohibición del uso de APC

El uso de antibióticos como promotores de crecimiento, esto es, a dosis subterapéuticas o profilácticas, empieza en los años 50, cuando se reconoce la existencia de respuestas positivas en el crecimiento tras la inclusión de antibióticos en la dieta de cerdos y pollos. Esto ocurre en un momento de post-guerra en el que hay un aumento de la demanda de alimento y también en un momento en el que la producción está sufriendo un cambio hacia la intensificación. Este conjunto de eventos hace que los APC sean muy bienvenidos en el ámbito de la producción y comience su uso sin restricción alguna hasta 1969. La actual prohibición del uso de APC está basada en los siguientes puntos:

- el conocimiento científico sobre el efecto de los antibióticos en el desarrollo de cepas bacterianas resistentes.
- la seguridad en la producción de alimento de origen animal y la creación de una buena imagen para la producción animal.

Desde el punto de vista de la industria, la prohibición pertenece a un cesto de buenas medidas de manejo y es posible desarrollar programas de alimentación que funcionen bien sin APC. Aunque la eficiencia de producción puede decrecer en parte, es posible compensar el decrecimiento en la eficiencia a través de nuevas fórmulas de alimentación y nuevos ingredientes o aditivos (Haarasilta, 2005). Dentro del grupo de los aditivos se pueden encontrar, entre otros, prebióticos, probióticos, enzimas, extractos de plantas, ácidos orgánicos...

## [ Objetivos e hipótesis de trabajo

El presente documento es un ejemplo de evaluación, a distintos niveles, de los efectos de la inclusión de un ácido orgánico (ácido benzoico) y dos extractos de plantas (cinamaldehído y naringina) en la dieta de lechones destetados y en ausencia de APC. Así, el trabajo se encuentra enmarcado dentro del segundo objetivo del proyecto FFPH (evaluación de los efectos “in vivo” de las sustancias alternativas), y trata de probar el efecto de estos tres productos sobre distintos parámetros indicadores de salud intestinal y sobre el crecimiento de lechones destetados y en ausencia de antibióticos promotores del crecimiento (APC). Los tres productos se probaron bajo la hipótesis de que sus propiedades antimicrobianas, demostradas en experimentos “in vitro” también se manifestarían al ser utilizados como aditivos en dietas para lechones destetados, observándose efectos sobre distintos parámetros productivos e indicadores de salud intestinal.



**A las ya de por sí exigentes condiciones de producción y sanidad, hay que añadir la dificultad de las continuas restricciones y prohibiciones que caen sobre las materias primas usadas en la formulación de raciones**

## [ Material y métodos

### Animales

Se utilizó un total de 132 cerdos con un peso medio al destete de 6.3kg. Los cerdos fueron destetados a los 28±2 días de edad y no habían recibido “creep feed” durante la lactación. Los animales fueron divididos en dos grupos. El grupo 1 estaba compuesto por 72 animales y se utilizó para medir variables de productividad. El grupo 2 estaba compuesto por 60 animales y se utilizó para obtener muestras y realizar análisis histológicos y microbiológicos. Los lechones de ambos grupos fueron asignados a uno de los cuatro tratamientos.

### Dietas

Se asignaron los animales a uno de los 4 tratamientos: dieta control (CO), cinamaldehído (CI), ácido benzoico (B) y naringina (NA) y las dietas fueron suministradas “ad libitum”. Las dos primeras semanas post-destete se utilizó una dieta base estándar para lechones destetados. Las semanas 3 y 4 post-destete, los animales recibieron una dieta estándar de iniciación. El cinamaldehído, extracto de canela con una pureza del 35%, se añadió a la dieta a una concentración de 500 ppm, el ácido benzoico se añadió al 0.5% y la naringina, un complejo de bioflavonoides con una riqueza en este compuesto superior al 40%, se añadió a una concentración de 125 ppm.

### Variables medidas

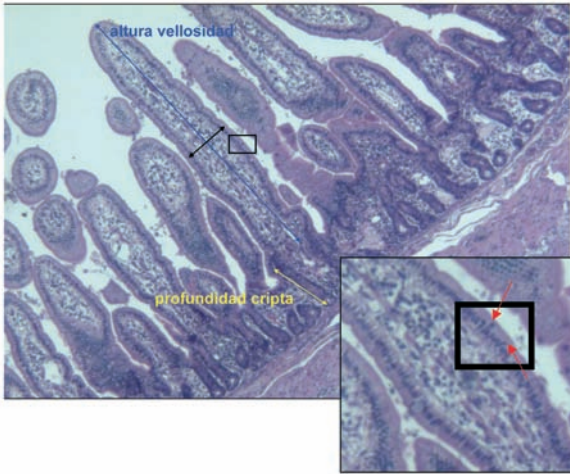
#### • Parámetros productivos

El primer grupo de 72 animales se utilizó para medir la ganancia de peso media diaria (GMD), la ingestión de alimento media diaria (IMD) y la eficiencia de transformación. Se pesaron los animales individualmente los días 0, 1, 2, 6, 14, 21 y 28 post-destete. Los mismos días se pesaron los restos de alimento correspondientes a cada corral.

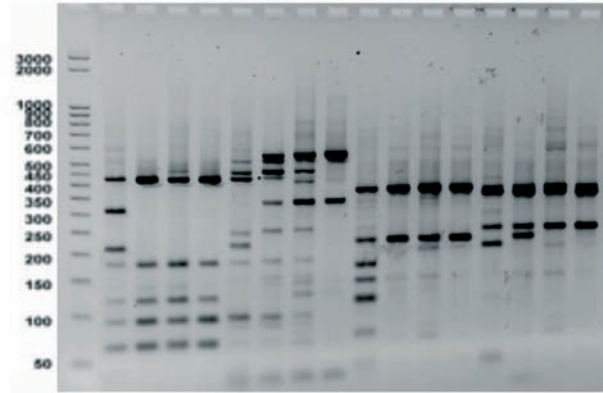
#### • Parámetros de salud intestinal

Del grupo de 60 animales, se sacrificó a un animal de cada corral los días 0, 1, 2, 6 y 14 post-destete para obtener muestras de tejido de intestino delgado (yeyuno) y contenido intestinal (íleo y ciego) y realizar los análisis

**Figura 1:** Medida de la altura de las vellosidades y profundidad de las criptas y recuento de linfocitos intraepiteliales (LIE) en cortes de yeyuno



**Figura 2:** Imagen de los fragmentos de restricción tras la electroforesis en gel de agarosa de alta resolución

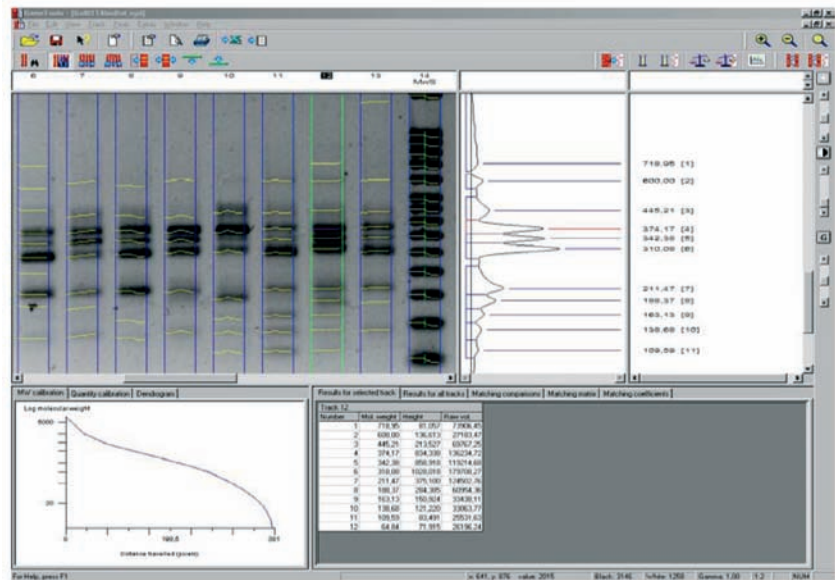


histológicos y microbiológicos respectivos. Se hicieron las siguientes determinaciones:

- Altura de las vellosidades y profundidad de las criptas intestinales (**Figura 1**).
- Recuento de linfocitos intraepiteliales (**Figura 1**).

• Obtención de los perfiles de la microbiota ileal y cecal de cada animal a través de la técnica molecular de RFLP (acrónimo en inglés para el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción). Tras la obtención de dichos perfiles (previa extracción del ADN bacteriano, amplificación con PCR, corte con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa), se estudiaron el grado de biodiversidad y los grados de similitud de la microbiota intestinal (**Figuras 2 y 3**). La biodiversidad se evaluó mediante el cálculo del número de perfiles compatibles con los depositados en la base de datos del Ribosomal Database Project (Maidak y col., 1997). En cuanto a los valores de similitud, se calculó el grado de similitud intra-tratamiento mediante la comparación de los perfiles de la microbiota de los animales de un mismo tratamiento entre ellos. Esto se hizo para cada día de sacrificio (días 1, 2, 6 y 14 post-destete). Los valores obtenidos y su evolución dan idea del grado de homogeneidad de la microbiota intestinal a lo largo del tiempo según la dieta administrada. En principio, un mayor grado

**Figura 3:** Imagen del tratamiento de la imagen con los fragmentos de restricción



de homogeneidad es algo deseable ya que, a todos los efectos, en producción animal intensiva interesa tener lotes de animales lo más parecidos posible entre sí.

### Análisis estadístico

Los datos correspondientes a los parámetros productivos se analizaron de acuerdo con un diseño de bloques al azar con 4 tratamientos y 6 bloques (según peso inicial). Para el análisis de los parámetros de salud intestinal, se consideraron efectos principales el

tratamiento, el día post-destete y la interacción entre los dos factores. Los resultados se obtuvieron por ANOVA utilizando el procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS (SAS\_Institute\_Inc., 1999).

## Resultados

### Parámetros productivos

La **Tabla 1** resume los resultados productivos obtenidos con la inclusión de cinamaldehído, ácido benzoico y naringina. Los animales alimen-

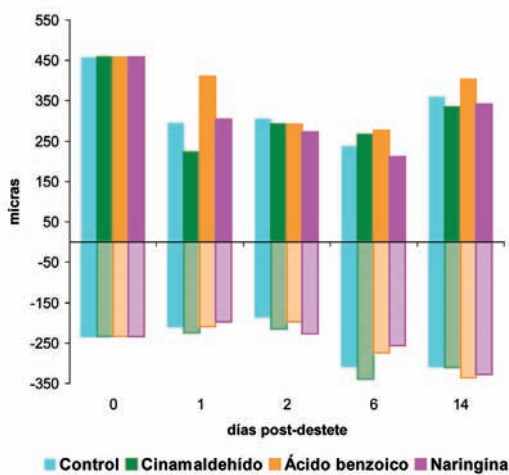
**Tabla 1:**

Efecto del cinamaldehído, el ácido benzoico y la naringina sobre parámetros productivos de los lechones destetados. Las medias de las filas con letras distintas difieren significativamente ( $P < 0,05$ ).

	días	Dieta Control (CO)	Cinamaldehído (CI)	Ácido benzoico (B)	Naringina (NA)	Error estándar conjunto
Peso vivo (kg)	0	6,3	6,3	6,3	6,4	0,04
	14	7,3ab	7,6b	7,9a	7,5b	0,67
	28	11,9ab	11,7b	13,0a	11,3b	0,99
GMD (g/d)	0-14	72	94	112	77	21,5
	14-28	332ab	289b	361a	274b	20,6
	0-28	202ab	191b	236a	176b	14,3
IMD (g/d)	0-14	201	205	217	197	18,7
	14-28	467ab	460b	550a	446b	29,4
	0-28	334	333	384	323	22,0
Eficiencia de transformación	0-14	0,30	0,43	0,42	0,40	0,091
	14-28	0,72a	0,62ab	0,65ab	0,59b	0,041
	0-28	0,59a	0,57ab	0,60a	0,53b	0,019

**Gráfico 1:**

Altura de las vellosidades (barras en la parte superior) y profundidad de las criptas intestinales (barras en la parte inferior)



tados con ácido benzoico mostraron unos valores de GMD e IMD numéricamente superiores a los que mostraron los animales alimentados con cinamaldehído y naringina, aunque las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) sólo para el periodo 14-28 y también para el periodo global en el caso de la GMD. En cuanto a la eficiencia de transformación, los animales alimentados con B mostraron valores numéricamente superiores al tener en cuenta el periodo global, aunque no estadísticamente distintos a los mostrados por los animales CO. Durante las dos primeras semanas post-destete, los animales CO mostraron una peor eficiencia de transformación, aunque las di-

ferencias con respecto al resto de tratamientos no fueron estadísticamente significativas.

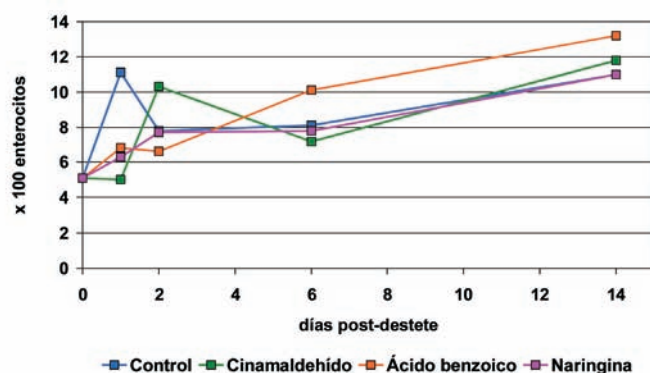
## Parámetros de salud intestinal

Los resultados correspondientes a los parámetros de salud intestinal mostraron un efecto significativo del tratamiento sobre la altura de las vellosidades (**Gráfico 1**), siendo estas más largas en los cerdos alimentados con ácido benzoico ( $P = 0,06$ ,  $SE = 36,6$ ). El tratamiento no tuvo efecto sobre la profundidad de las criptas (**Gráfico 1**,  $P > 0,05$ ,  $SE = 21,5$ ) o el número de linfocitos intraepiteliales (**Gráfico 2**,  $P > 0,05$ ,  $SE = 1,83$ )

En cuanto al grado de diversidad de la microbiota a nivel ileal, los cerdos alimentados con B y NA mostraron valores superiores a los de los cerdos alimentados con las dietas CO y CI (**Gráfico 3**,  $P = 0,01$ ,  $SE = 461,3$ ). En el ciego, la dieta B mostró una tendencia a presentar valores más altos de biodiversidad que el resto de dietas (**Gráfico 4**,  $P = 0,15$ ,  $SE = 517,8$ ). Los resultados referentes al grado de similitud ileal intra-tratamiento (**Gráfico 5**,  $P < 0,01$ ,  $SE = 4,8$ ) muestran que los valores más altos para este parámetro corresponden al tratamiento B (estadísticamente significativo a día 6,  $P < 0,05$ ). En cuanto al ciego (**Gráfico 6**,  $P < 0,05$ ,  $SE = 4,7$ ) se observó, a día 6, que los valores inferiores de similitud estaban asociados a la dieta con CI, mientras que a día 14 esta misma dieta mostraba los valores superiores ( $P < 0,05$ ).

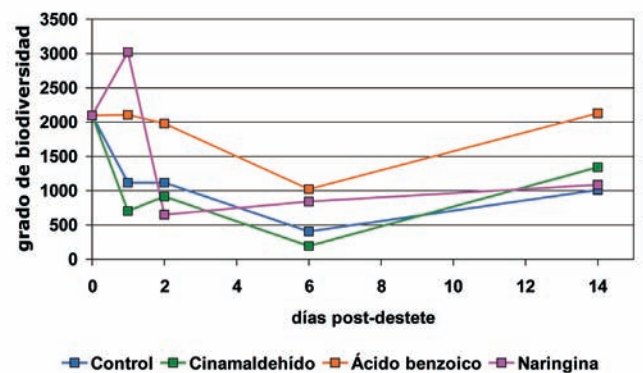
**Gráfico 2:**

Número de linfocitos intraepiteliales por 100 enterocitos



**Gráfico 3:**

Evolución de la biodiversidad ileal



## Conclusiones

En las condiciones de realización del experimento y según los resultados obtenidos se puede concluir que la adición de cinamaldehído, ácido benzoico o naringina en las dietas para lechones y en ausencia de APC tiene un efecto sobre la integridad del epitelio intestinal y que estos productos tienen capacidad de modular la microbiota a nivel ileal y cecal. En el caso del ácido benzoico, su adición podría preservar la integridad del epitelio intestinal y promover un mayor grado de diversidad de la microbiota ileal y cecal así como un mayor grado de homogeneidad de la microbiota de los animales alimentados con este producto. Esto, en algunos casos, se traduce en unos mejores resultados productivos. De todos modos, el efecto encontrado de estos tres productos sobre algunos parámetros de salud intestinal y sobre la microbiota ileal y

cecal unido a la falta de efecto sobre los parámetros productivos, hace pensar que son necesarios más estudios relacionados con su utilización para determinar su modo de acción y considerar su uso como promotores del crecimiento en la alimentación de lechones destetados.

## Bibliografía

Fan, M. Z., B. Stoll, R. Jiang, y D. G. Burrin. 2001. Enterocyte digestive enzyme activity along the crypt-villus and longitudinal axes in the neonatal pig small intestine. *J. Anim. Sci.* 79: 371-381.

Gaskins, H. R. 1997. Immunological aspects of host/microbiota interactions at the intestinal epithelium. In: R. L. Mackie, B. A. White y e. R. E. Isaacson (eds.) *Gastrointestinal Microbiology: Volume 2, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*. p 537-587. Chapman and Hall, New York, USA.

Gaskins, H. R. 2001. Intestinal bacteria and their influence on swine growth. In: A. J. Lewis, L. L. Southern (eds.) *Swine nutrition*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Haarasilta, A. 2005. En: Abstracts of lectures and posters of Antimicrobial Growth Promoters: Worldwide

Ban on the Horizon? The International Debate Conference for the Feed and Food Chain. 31 January-1 February 2005.

Konstantinov, S. R., C. F. Favier, W. Y. Zhu, B. A. Williams, J. Kluss, W. B. Souffrant, W. M. de Vos, A. D. L. Akkermans, y H. Smidt. 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Animal Research* 53: 317-324.

Maidak, B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey, y C. R. Woese. 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*. 25: 109-110.

Miller, B. G., P. S. James, S. M. W., y F. J. Bourne. 1986. Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients. *J. Agric. Sci. Camb.* 107: 579-589.

Pluske, J. R., I. H. Williams, y F. X. Aherne. 1996a. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. *Animal Science*. 62: 131-144.

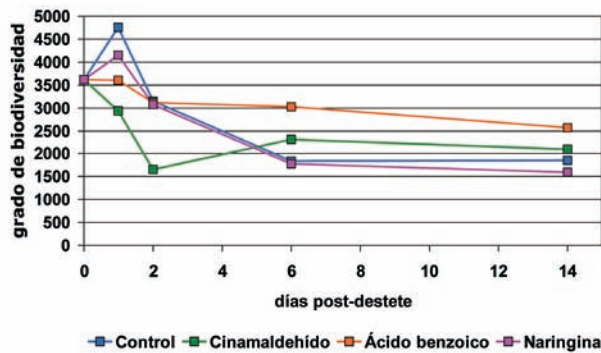
Pluske, J. R., I. H. Williams, y F. X. Aherne. 1996b. Villous height and crypt depth in piglets in response to increases in the intake of cows' milk after weaning. *Animal Science*. 62: 145-158.

Richards, J. D., J. Gong, y C. F. M. de Lange. 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.

SAS\_Institute\_Inc. 1999. *Sas/stat user's guide: Release 8.2 edition*. Statistical Analysis Systems Institute Inc., Cary, NC. •

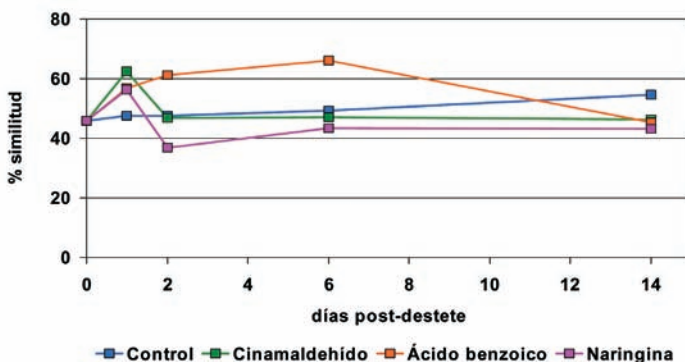
### Gráfico 4:

Evolución de la biodiversidad cecal



### Gráfico 5:

Evolución de la similitud dentro de cada tratamiento a nivel ileal



### Gráfico 6:

Evolución de la similitud dentro de cada tratamiento a nivel cecal

