

## Efecto de levaduras probióticas del género *Kluyveromyces* en el espesor de la capa de mucus intestinal de cerdos al destete

### Effect of probiotics yeast of the genus *Kluyveromyces* on intestinal mucus layer thickness in weaning piglets

Aurora Guadalupe Sánchez Croce<sup>1,2</sup>,  Martín Rumbo<sup>2</sup>  , Malena María Ferreyra<sup>2</sup>  , Graciela Liliana Garrote<sup>3</sup>  , María Alejandra Machuca<sup>1</sup> 

1. Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr Bernardo Epstein, LAPEVET (FCV - UNLP).

2. Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos, IIFP (UNLP-CONICET-Centro Asociado CICPBA).

3. Centro Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, CIDCA (CONICET-UNLP-CICPBA).

Correspondencia: Aurora Guadalupe Sánchez Croce. Email: sanchezcroceag@gmail.com

#### Resumen

El síndrome de estrés posdestete induce la disbiosis e inflamación intestinal, afectando negativamente la salud y productividad de los lechones. Como alternativa al uso de antibióticos como promotores del crecimiento, nuestro grupo viene evaluando la administración de levaduras probióticas de la especie *Kluyveromyces marxianus* para facilitar el establecimiento de una microbiota adecuada, resultando en menores tasas de diarreas y mejor conversión del alimento (Pendón et al., 2021). El objetivo de este trabajo fue comparar el espesor de la capa de mucus, la primera barrera de defensa del intestino, entre un grupo de cerdos suplementados (incluyendo suplementación materna) y un grupo control no suplementado. Para ello, se utilizaron técnicas histoquímicas como la tinción **Periodic Acid Schiff-Alcian Blue (PAS-AB)** y **lectinhistoquímica** con el uso de la lectina *Glycine Max* (SBA). Los resultados mostraron que los lechones suplementados presentaron una capa de mucus significativamente más gruesa (SBA: 4,56 µm; PAS-AB: 3,99 µm) que el grupo control (SBA: 3,12 µm; PAS-AB: 3,07 µm). Estos hallazgos indican una barrera intestinal más robusta en el grupo suplementado, lo que sugiere que *K. marxianus* impacta positivamente en la integridad intestinal y en la protección frente a patógenos durante el período crítico del posdestete

**Palabras claves:** probióticos, salud intestinal, lechones, lectinhistoquímica, PAS-AB.

#### Abstract

Post-weaning stress syndrome induces dysbiosis and intestinal inflammation, negatively affecting the health and productivity of piglets. As an alternative to the use of antibiotic growth promoters, our group has been evaluating the administration of probiotic yeasts of the species *Kluyveromyces marxianus* to induce the establishment of a balanced intestinal microbiota, resulting in lower diarrhea rates and improved feed conversion (Pendón et al., 2021). The objective of this study was to compare the thickness of the mucus layer—the first line of intestinal defense—between a group of supplemented pigs (including maternal supplementation) and an unsupplemented control group. Histochemical techniques, such as Periodic Acid Schiff–Alcian Blue (PAS-AB) staining, and lectin histochemistry using Glycine max (SBA) lectin were employed. Results showed that supplemented piglets exhibited a significantly thicker mucus layer (SBA: 4.56 µm; PAS-AB: 3.99 µm) compared to the control group (SBA: 3.12 µm; PAS-AB: 3.07

μm). These findings indicate a more robust intestinal barrier in the supplemented group, suggesting that *K. marxianus* positively impacts intestinal integrity and protection against pathogens during the critical post-weaning period.

**Keywords:** probiotics, intestinal health, piglets, lectinhistochemistry, PAS-AB.

## Introducción

En los sistemas de producción porcina intensiva, el síndrome de estrés posdestete ocurre especialmente cuando el destete se realiza a los 21 días de edad. Para los lechones, esta práctica implica una transición abrupta desde una dieta líquida (leche materna) a una dieta sólida, la separación de la madre y el rearmado de lotes, lo que genera un importante desafío fisiológico y conductual (Gresse et al., 2017). Además, durante los primeros 14 días posdestete, aumenta la susceptibilidad a infecciones entéricas, lo que favorece la disbiosis de la microbiota y la inflamación intestinal (Soares et al., 2022). Este momento de la recría coincide con la aparición de diarreas y la caída de la ganancia diaria de peso, resultando en importantes pérdidas económicas (Wang et al., 2023). El empleo de antibióticos en forma preventiva para contrarrestar las pérdidas por diarreas tiende a ser reemplazado debido a que contribuye a la resistencia a los antimicrobianos, siendo una amenaza para la salud humana y animal. Una alternativa a su uso, es la utilización de probióticos como promotores de crecimiento (Perfumo, 2019). En nuestro grupo venimos evaluando la administración de levaduras probióticas de la especie *Kluyveromyces marxianus* a lechones para inducir el establecimiento de una microbiota adecuada (Pendón et al., 2021b). La primera línea de defensa del intestino es la capa de mucus de la superficie epitelial, producida por células caliciformes, y está formada por una gran red polimérica de mucinas O-glicosiladas, entre ellas la N-acetil-galactosamina (Gal-NAc), capaz de ser aglutinada específicamente por la lectina Glycine Max (SBA). La técnica de Periodic Acid Schiff-Alcian Blue (PAS-AB) permite diferenciar mucinas neutras (rojas) de ácidas sialiladas (azul) en el mucus y en las células caliciformes, propiedad fisicoquímica que puede ser relevante en la adaptación al postdestete (Brown et al., 1988b; Baum et al., 2002). El objetivo de este trabajo fue comparar el espesor de la capa de mucus intestinal del intestino delgado entre un grupo de cinco cerdos

suplementados con levadura desde el destete hasta el sacrificio (a los 5 días posdestete) y a cuya madre se la había suplementado con levaduras durante los últimos 20 días de gestación y durante la lactancia (Grupo Km). Se utilizó en el estudio un grupo control de cinco cerdos no suplementados en ninguna condición (Grupo control). En la necropsia, se tomaron muestras de ileon, se fijaron en formol 10 % durante 48 hs y se realizó la inclusión en parafina. A partir de los bloques se realizaron cortes histológicos de 4 μm de espesor con micrótomo Leica Jung RM 2055, sobre los que se aplicaron las técnicas de PAS-AB y lectinhistoquímica. Se tomaron imágenes con objetivo 60x con máquina fotográfica digital Nikon DS-Fi1-U2 conectada a microscopio Nikon Eclipse 50i (Japón) y se analizaron con ImageJ 1.54g. En la técnica de lectinhistoquímica, los cortes se desparafinaron, rehidrataron y se les inhibió la enzima peroxidasa endógena. Se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas con solución de albúmina sérica bovina 1 % en PBS, se incubó cada portaobjetos con 30 μm/ml de la lectina SBA, en cámara húmeda, toda la noche a 4°C. Se incubaron con el complejo estreptavidina-peroxidasa, se revelaron con solución de DAB, se realizó una coloración de contraste con hematoxilina y se montaron los cortes. La reacción positiva fue reconocida por la presencia de una coloración pardo-dorada. En la técnica de PAS-AB se desparafinó, rehidrató y tiñó un corte de cada taco con AB pH 2,5, se colocó en solución de ácido peryódico 1 % 3 minutos y en solución reactivo de Schiff de Coleman 5 minutos. Se realizó la deshidratación en alcohol, aclaramiento en xilol, deshidratación y montaje.

## Objetivo

Se registró el espesor del mucus coloreado en cada técnica, considerando el promedio de 10 medidas tomadas desde la superficie epitelial hasta la superficie luminal, con objetivo 60x. En el grupo suplementado con levaduras probióticas, el promedio del espesor de la capa de mucus entre los 5 animales fue de 4,56 μm en

SBA y 3,99  $\mu\text{m}$  en PAS-AB. En el grupo control, el promedio del espesor de la capa de mucus entre los 5 animales fue de 3,12  $\mu\text{m}$  en SBA y 3,07  $\mu\text{m}$  en PAS-AB.

## Resultados

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron diferencias entre los grupos, siendo el espesor promedio de la capa de mucus en el ileón significativamente mayor en el grupo suplementado con levaduras probióticas de la especie *Kluyveromyces marxianus* en comparación con el grupo control no suplementado (Figura. 3) (Pendón et al., 2021). Este aumento se verificó en ambas técnicas histoquímicas: 4,56  $\mu\text{m}$  con SBA (Figura. 1) y 3,99  $\mu\text{m}$  con PAS-AB para el Grupo Km, frente a 3,12  $\mu\text{m}$  con SBA y 3,07  $\mu\text{m}$  con PAS-AB para el Grupo control (Figura. 2). El incremento en el espesor del mucus es un indicador clave de una barrera intestinal más robusta y sugiere que *K. marxianus* ejerce un efecto trófico o modulador directo/indirecto sobre el epitelio intestinal. Este fortalecimiento es de vital importancia, ya que una capa de mucus más gruesa ofrece una mejor protección física contra la invasión de patógenos y la acción de toxinas, mitigando así las alteraciones intestinales y el impacto negativo sobre el rendimiento productivo inducido por el estrés posdestete. El análisis mediante PAS-AB (que diferencia mucinas neutras de ácidas) y lectinhistoquímica con SBA (específica para N-acetil-galactosamina) permite inferir que la suplementación no solo incrementó la cantidad de mucus, sino que también estimuló la producción de una capa con mayor cantidad de mucinas SBA-reactivas, reforzando la red polimérica de defensa primaria. Un aspecto crucial de este trabajo es el diseño experimental, que incluye la suplementación dual (madre y lechón). La mayor robustez de la barrera intestinal observada a los 5 días posdestete podría ser el resultado de un efecto preparatorio o residual de la suplementación materna, ya sea por transferencia de metabolitos o por el establecimiento temprano de un microbiota beneficioso que hace al intestino del lechón más resiliente al desafío del destete.

## Conclusión

En resumen, estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la suplementación con *K. marxianus* es una estrategia eficaz para potenciar la integridad estructural y funcional del intestino

del lechón, un mecanismo que va más allá de la mera modulación de la microbiota, y se traduce en una mejora en la primera línea de defensa de la mucosa.



Figura 1. 60x. Lectinhistoquímica. Grupo Km.

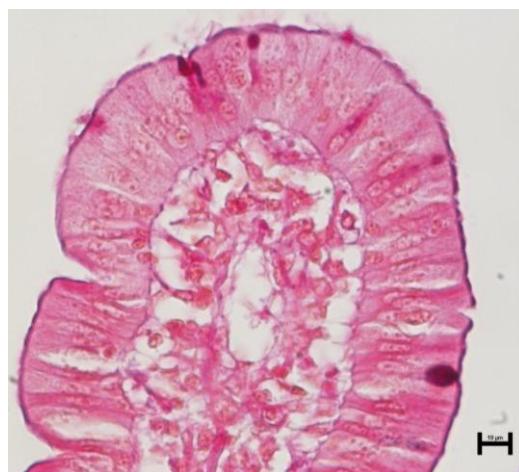


Figura 2. 60x. PAS-AB. Grupo control.

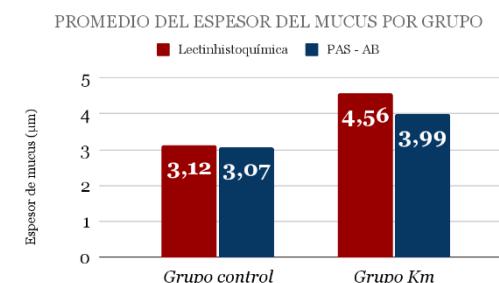


Figura 3. Cuadro comparativo entre el promedio del espesor del mucus en grupo Km y en grupo control.

## Bibliografía

1. Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Van de Wiele, T., Forano, E., & Blanquet-Diot, S. (2017). Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends in microbiology*, 25(10), 851–873. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.004>
2. Soares, I., Belote, B. L., Santin, E., Dal Pont, G. C., & Kogut, M. H. (2022). Morphological Assessment and Biomarkers of Low-Grade, Chronic Intestinal Inflammation in Production Animals. *Animals: an open access journal from MDPI*, 12(21), 3036. <https://doi.org/10.3390/ani12213036>
3. Wang, J., Liu, S., Ma, J., Dong, X., Long, S., & Piao, X. (2023). Growth performance, serum parameters, inflammatory responses, intestinal morphology and microbiota of weaned piglets fed 18% crude protein diets with different ratios of standardized ileal digestible isoleucine to lysine. *Animal Nutrition*, 16, 313-325. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.11.008>
4. Perfumo, C. J., Quiroga, M. A., & Machuca, M. A. (2019). Compendio de clínica y sanidad de los cerdos. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/80299>
5. Pendón, M. D., Madeira, J. V., Romanin, D. E., Rumbo, M., Gombert, A. K., & Garrote, G. L. (2021). A biorefinery concept for the production of fuel ethanol, probiotic yeast, and whey protein from a by-product of the cheese industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(9), 3859-3871. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11278-y>
6. Brown, P., Miller, B., Stokes, C., Blazquez, N., & Bourne, F. (1988). Histochemistry of mucins of pig intestinal secretory epithelial cells before and after weaning. *Journal of Comparative Pathology*, 98(3), 313-323. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(88\)90040-0](https://doi.org/10.1016/0021-9975(88)90040-0)
7. Baum, B., Liebler-Tenorio, E. M., Enss, M. L., Pohlenz, J. F., & Breves, G. (2002). *Saccharomyces boulardii* and *bacillus cereus* var. *Toyoii* influence the morphology and the mucins of the intestine of pigs. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, 40(5), 277–284. <https://doi.org/10.1055/s-2002-30116>.

