

Efecto de butirato sódico protegido con sales de ácidos grasos de cadena media sobre la microbiota y morfología gastrointestinal en pollos de carne

M. SADURNÍ^{1*}, A.C. BARROETA¹, R. SALA¹, C. SOL², M. PUYALTO² y L. CASTILLEJOS¹

¹Servicio de Nutrición y Bienestar Animal, Dpto. Ciencia Animal y de los Alimentos, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España; ² Norel S.A., 28007, Madrid, España.

*Autor corresponsal: meritxell.sadurni@uab.cat

El ácido butírico tiene asociada una actividad antimicrobiana y se caracteriza por desempeñar un papel importante en el desarrollo del epitelio intestinal. El uso de ácidos grasos de cadena media (AGCM) como protección del butirato sódico puede ampliar el espectro de acción para promover la salud gastrointestinal. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de butirato protegido con sales sódicas de AGCM procedentes de destilados de coco (BUT+) sobre la población microbiana y la morfología del yeyuno y el íleon en pollos de carne a los 10 y 39 d de edad. Un total de 192 pollos de carne hembra Ross 308 de un día de edad se distribuyeron aleatoriamente en 4 tratamientos experimentales (6 jaulas/tratamiento). Una dieta basal (CTR) se suplementó con niveles crecientes de BUT+: 0,5, 1 y 2 kg/t de BUT+. Las dietas se suministraron *ad libitum*: un pienso de inicio hasta el día 21 y un pienso de crecimiento-acabado del día 22 al 39 de edad. El consumo de pienso y el peso vivo se controlaron en cada periodo y durante todo el experimento. A los 10 y 39 d de edad, se recogió el contenido digestivo para analizar la población microbiana (bacterias lácticas (LAB) y *Enterobacteriaceae* (E) totales para calcular la relación LAB/E, y coliformes totales) mediante recuento tradicional. Para caracterizar la morfometría, se recogió tejido del yeyuno posterior y de la parte media del íleon. El análisis del íleon se llevó a cabo en ambas edades; los datos del yeyuno fueron sólo de los animales de 39 d. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía. Se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey para determinar si las medias eran significativamente diferentes ($P < 0,05$). No hubo diferencias significativas en los parámetros productivos ni en los recuentos de la microbiota del íleon. Sin embargo, en el contenido del yeyuno a los 39 d de edad, la dosis más alta (2 kg/t) tendió ($P = 0,082$) a aumentar las *Enterobacteriaceae*, por lo que la relación LAB/E se redujo significativamente en oposición a las otras dosis (0,5 y 1 kg/t) que tuvieron la relación más alta ($P = 0,025$). Centrándonos en los parámetros histológicos, la suplementación de BUT+ no modificó la altura de las vellosidades ni la profundidad de las criptas a ninguna edad. Sin embargo, los animales que recibieron la dosis más alta de BUT+ tuvieron un mayor recuento de mitosis en el yeyuno que los animales que recibieron la dieta no suplementada ($P = 0,027$). En el íleon, la dosis más alta de BUT+ tuvo el menor número de células caliciformes a los 10d ($P = 0,005$) y redujo las células caliciformes en comparación con BUT+ a 0,5 kg/t a los 39d ($P = 0,025$) que tuvo el mayor recuento de células caliciformes. Los resultados confirman la actividad potencial de este butirato protegido con sales sódicas de AGCM en la barrera intestinal que modula la microbiota del yeyuno y la mucosa ileal en pollos de carne de 39 días.

Butyric acid is associated with antimicrobial activity and plays an important role in the development of the intestinal epithelium. The use of medium-chain fatty acids (MCFA) as a

protection for sodium butyrate may widen the spectrum of action to promote gastrointestinal health. So, the aim of this study was to evaluate the effect of a protected butyrate with sodium salts of MCFA from coconut distillates (BUT+) on microbial population and morphology of jejunum and ileum in broilers at 10 and 39d of age. A total of 192 one-day-old female broilers Ross 308 were randomly distributed into 4 dietary treatments (6 cages / treatment). A basal diet (CTR) was supplemented with increasing levels of BUT+: 0.5, 1 and 2 kg/t of BUT+. Diets were provided *ad libitum*: a started feed until day 21 and a grower-finisher feed from day 22 to 39. Feed intake and live body weight were monitored for each period and during the whole experiment. At 10d and 39d of age, digestive content was collected to analyse microbiota population (lactic acid bacteria (LAB) and total *Enterobacteriaceae* (E) to calculate LAB/E ratio and total coliforms) by traditional count. To characterise histomorphometry, tissue from the posterior jejunum and the middle of ileum were removed. Ileum analysis was carried out at both ages; jejunum data were only from 39d animals. Data was analysed by one-way ANOVA. Tukey's multiple range test was performed to determine whether means were significantly different ($P < 0.05$). There were no significant differences on performance or in ileum microbiota counts. However, in jejunum content at 39d of age, the highest dose (2 kg/t) tended ($P = 0.082$) to increase *Enterobacteriaceae*, so that LAB/E ratio was significantly reduced in opposition to the others doses (0.5 kg/t and 1 kg/t) that had the highest ratio ($P = 0.025$). Focusing on histological parameters, the supplementation of BUT+ did not modify villi high and crypt depth at any age. However, the animals receiving the highest dose of BUT+ also had higher mitosis count in jejunum than the animals that received non-supplemented diet ($P = 0.027$). In the ileum, the highest dose of BUT+ had the lowest number of goblet cells at 10d ($P = 0.005$) and reduced the goblet cells in comparison with BUT+ at 0.5 kg/t at 39d ($P = 0.025$) that had the highest goblet cells counts. Results confirm the potential activity of this butyrate protected with sodium salt of MCFA on gut barrier modulating jejunum microbiota and mucus layer from ileum in 39d broilers.

Palabras clave: ácido butírico, ácidos grasos de cadena media, salud intestinal, pollos de carne

Introducción

La reducción del uso de antibióticos en la avicultura ha motivado la investigación para desarrollar alternativas nutricionales y promover la salud intestinal (Parlamento Europeo y Consejo Europeo, 2018; Oviedo-Rondón, 2019). Entre ellas, destaca la suplementación dietética con ácido butírico (Zhao y col., 2022). Este ácido graso de cadena corta se caracteriza por tener efecto antibacteriano, pudiendo modular la microbiota intestinal. Además, es fuente de energía para los enterocitos, favoreciendo el desarrollo y estructura del epitelio intestinal (Guilloteau y col., 2010; Chamba y col. 2014; Wu y col., 2018). En la actualidad, existen diferentes formas de presentación del ácido butírico (como sales, glicéridos o formas protegidas) con el objetivo principal de retrasar su absorción a lo largo del tracto gastrointestinal y potenciar su efecto sobre la salud intestinal (Jerzsele y col., 2012; Kaczmarek y col., 2016; Bedford y Gong, 2018). Por otro lado, los ácidos grasos de cadena media (AGCM) también han sido foco de interés por sus potenciales efectos beneficiosos sobre la barrera intestinal (Baltić y col., 2018; Amer y col., 2021). Por todo ello, el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de butirato sódico protegido con sales sódicas de AGCM (BUT+), sobre parámetros productivos y la salud intestinal.

Material y métodos

Animales e instalaciones

Un total de 192 pollos hembra de la estirpe Ross 308 (bonÀrea, Verdú; Lleida, España) recién eclosionados, se identificaron individualmente, y se distribuyeron al azar en 24 jaulas a razón de 8 aves por jaula (6 réplicas/tratamiento). El estudio se llevó a cabo en la granja experimental del *Servei de Granges i Camps Experimentals* de la Universitat Autònoma de Barcelona (Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España). Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la misma institución de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE. A lo largo de todo el estudio se realizaron controles de las condiciones ambientales según las especificaciones de la guía Ross 308 (Aviagen, 2014) y la administración de agua y pienso fue *ad libitum*.

Pienso y diseño experimental

Se siguió un programa de alimentación de dos piensos: fase de iniciación (de 0 a 21 días de edad) y de crecimiento-acabado (de los 22 a los 39 días de edad), ambos en forma de harina. Los piensos experimentales fueron formulados para cubrir los requerimientos establecidos en FEDNA (2018) a partir de una dieta base (Tabla 1 y 2). La dieta basal se fabricó en Pinos Molinet S.A (Prats de Lluçanès, Barcelona, España).

Tabla 1. Composición del pienso base.

	Pienso inicio (0 a 21 d)	Pienso crecimiento-acabado (22 a 39 d)
Ingredientes (%)		
Maíz	40,0	40,0
Trigo	24,6	30,8
Soja 47%	29,0	22,9
Aceite de soja	2,96	3,00
Fosfato bicálcico	1,14	0,69
Carbonato cálcico	0,88	1,16
Cloruro sódico	0,35	0,29
Núcleo	0,44	0,44
L-Lisina	0,34	0,28
DL-Metionina	0,31	0,23
L-Treonina	0,15	0,10
L-Valina	0,03	0,20
Bicarbonato sódico	0,05	0,04
Colina	0,06	0,07

El diseño experimental consistió en cuatro tratamientos: una dieta basal sin suplementación (CTR) y la misma dieta suplementada con niveles crecientes (0,5, 1 y 2 kg/t) de butirato protegido con sales sódicas de AGCM (BUT+).

Tabla 2. Composición analíticas del pienso base.

Composición analítica	Pienso inicio (0 a 21 d)	Pienso crecimiento-acabado (22 a 39 d)
Materia seca (%)	90,9	89,3
Proteína bruta (%)	20,2	17,7
Extracte eterio (%)	5,12	4,89
Fibra bruta (%)	1,83	2,66
Cenizas (%)	5,82	4,58
Energía bruta (Kcal/Kg)	4072	4096

Registros y recogida de muestras

El peso vivo individual y el consumo por jaula fueron controlados a lo largo de todo el período experimental. En base a los datos recogidos, se calculó la ganancia media diaria, el consumo medio diario y el índice de conversión. A los 11 y 39 días de vida, se recogió contenido digestivo para analizar la población microbiana en el yeyuno (sólo a los 39 días) y en el íleon, y se mantuvo inmediatamente en hielo. Para el estudio morfológico, se tomó una muestra de 2 cm de la zona distal del yeyuno a los 39 días de vida y otra muestra de la zona media del íleon a los 11 y 39 días de vida. Estas muestras de tejido se lavaron con PBS y se fijaron en formaldehído tamponado al 10%.

Recuento microbiológico

Las muestras de contenido intestinal se diluyeron en serie 6 veces (1:10) en Ringer lactato (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO, EEUU) y se inocularon en placas MRS o agar MacConkey. Para el recuento tradicional de las bacterias lácticas totales (LAB), las placas se incubaron en condiciones aeróbicas, microaerófilas (5% de CO₂) y anaeróbicas a 37 °C. Para los recuentos de enterobacterias (E), las placas se incubaron en condiciones aeróbicas a 37 °C y 42 °C. Entre las *Enterobacteriaceae* totales, se aislaron los coliformes.

Examen morfológico

Las muestras de yeyuno e íleon, conservadas en formol, fueron procesadas y se obtuvieron 6 secciones transversales de 4 µm de espesor que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. En cada preparación, se midió la altura de las vellosidades (distancia comprendida entre el ápice hasta la unión con la cripta) y la profundidad de las criptas de Lieberkühn (desde la unión vellosidad-cripta hasta el final de la cripta). También se determinó el ratio entre ambas medidas y se hizo recuento de células caliciformes y mitosis.

Análisis estadístico

Los efectos de los tratamientos experimentales se analizaron mediante el software R, utilizando un modelo lineal con el tratamiento como efecto fijo. La unidad experimental fue la réplica para todos los parámetros. Las diferencias entre tratamientos se establecieron significativas con P valores < 0,05 y tendencia con P valores ≥ 0,05 y ≤ 0,10.

Resultados y discusión

Parámetros productivos

En relación a los parámetros productivos (peso vivo, ganancia media diaria, consumo medio diario y el índice de conversión), no se observaron diferencias significativas ($P>0,05$). Estos resultados concuerdan con las observaciones de Leeson y col. (2005) y Wu y col. (2018). Sin embargo, estudios previos indican que el butirato sódico parcialmente protegido mejora significativamente el peso vivo y el índice de conversión. Resultados que se podrían atribuir a una mejora en el desarrollo del tracto gastrointestinal y el consecuente aumento de la digestibilidad de nutrientes (Chamba y col., 2014; Riboty y col., 2016).

Microbiota intestinal

La suplementación con BUT+ a 2 kg/t tendió ($P=0,082$) a aumentar el recuento de enterobacterias en el yeyuno (Tabla 3). En consecuencia, el ratio bacterias lácticas totales/*Enterobacteriaceae* de los animales suplementados con la mayor dosis resultó ser menor que la del resto de animales suplementados ($P=0,025$). Teniendo en cuenta que autores previos observaron un efecto antibacteriano del ácido butírico reduciendo las enterobacterias intestinales en pollos de carne (Panda y col. 2009), parece que el butirato sódico protegido con sales sódicas de AGCM se puede suplementar hasta 1 kg/t sin promover la proliferación de enterobacterias.

Tabla 3. Recuento tradicional de la microbiota en el yeyuno de animales de 39 días de edad: bacterias lácteas totales, *Enterobacteriaceae* y coliformes totales.

Yeyuno, 39 d	CTR	0,5 BUT+	1 BUT+	2 BUT+	ERS	P valor
Bacterias lácteas (LAB)	8,01	7,66	8,15	7,29	0,81	0,287
<i>Enterobacteriaceae</i> (E)	3,84	2,46	3,00	4,92	1,64	0,082
Ratio LAB/E	2,60 ^{ab}	3,11 ^a	3,00 ^a	1,73 ^b	0,79	0,025
Coliformes totales	3,34	2,40	2,95	3,99	1,36	0,259

Por otro lado, la suplementación de la dieta con diferentes dosis de BUT+ no afectó ($P>0,05$) a la microbiota ileal (datos no mostrados) de acuerdo con Czerwinski y col. (2012). La diversidad de resultados en relación al efecto antibacteriano del butirato sobre el epitelio intestinal se podría atribuir a las diferentes dosis, forma y concentración del ácido butírico.

Histomorfología intestinal

No se observaron diferencias significativas ($P>0,05$) en la longitud de las vellosidades ni en la profundidad de las criptas del epitelio del yeyuno ni del íleon (Tabla 4 y 5). Estos resultados coinciden con los descritos por Czerwiński y col. (2012), quienes evaluaron el efecto de butirato sódico protegido (3 kg/t) en la dieta. Sin embargo, previos autores observaron un aumento de la altura de las vellosidades y del ratio en el yeyuno (Chamba y col., 2014). Este aumento de la superficie de absorción del yeyuno se puede atribuir a la capacidad del ácido butírico para promover la proliferación de las células intestinal (Sikandar y col., 2017), tal y como se ha observado en el presente estudio al aumentar el recuento de mitosis ($P=0,027$) con la suplementación a 2 kg/t de BUT+.

Tabla 4. Resultados morfométricos del yeyuno en animales de 39 días de edad: altura vellosidades, profundidad criptas, ratio altura vellosidades:profundidad criptas, recuento de células caliciformes y mitosis.

Yeyuno, 39 d	CTR	0,5 BUT+	1 BUT+	2 BUT+	ERS	P valor
Altura vellosidades	1071	1052	1025	945	135	0,406
Profundidad criptas	184	167	171	166	23,5	0,542
Ratio vellosidades:criptas	5,96	6,45	6,11	5,73	0,77	0,443
Células caliciformes	12,9	13,6	13,8	13,1	2,49	0,921
Mitosis	0,004 ^b	0,005 ^{ab}	0,005 ^{ab}	0,008 ^a	0,00	0,027

En cuanto al recuento de las células secretoras de mucina, los animales de 39 días de vida que recibieron 0,5 kg/t de BUT+ en la dieta presentaban de forma significativa ($P = 0,025$) el mayor recuento de células caliciformes en el íleon. Por el contrario, la mayor dosis de inclusión evaluada (2 kg/t) de BUT+ dio lugar al menor recuento de células caliciformes a los 11 ($P = 0,005$) y a los 39 días ($P = 0,025$), que resultó inferior al número de células caliciformes presentadas en las vellosidades de los animales que recibieron 0,5 kg/t. Este aumento de células caliciformes ha sido observado en estudios previos (Wu y col., 2018). El suplemento dietético de butirato sódico mejora la estructura intestinal incrementando las células caliciformes de manera que la capa epitelial de la mucosa se ve reforzada por el moco producido y estimulado por estas células (Leeson y col., 2005; Wu y col., 2018).

Tabla 5. Resultados morfométricos del íleon en animales de 11 y 39 días de edad: altura vellosidades, profundidad criptas, ratio altura vellosidades:profundidad criptas, recuento de células caliciformes y mitosis.

Íleon	CTR	0,5 BUT+	1 BUT+	2 BUT+	ERS	P valor
11 d						
Altura vellosidades	352	356	371	368	36,9	0,778
Profundidad criptas	160	164	167	158	18,9	0,854
Ratio vellosidades:criptas	2,28	2,21	2,32	2,37	0,40	0,914
Células caliciformes	16,2 ^a	17,3 ^a	16,4 ^a	13,4 ^b	1,72	0,005
Mitosis	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,136
39 d						
Altura vellosidades	627	629	601	765	136	0,182
Profundidad criptas	183	179	181	179	15,4	0,956
Ratio vellosidades:criptas	3,48	3,57	3,39	4,37	0,83	0,187
Células caliciformes	19,5 ^{ab}	22,0 ^a	21,1 ^{ab}	18,4 ^b	2,02	0,025
Mitosis	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,296

Conclusiones

La incorporación de 0,5 y 1 kg/t de butirato sódico protegido con ácidos grasos de cadena media refuerza la capa mucosa ileal en comparación al uso de 2 kg/t en pollos de carne de 39 días de edad. Por otro lado, la administración a mayor dosis (2 kg/t) reduce el ratio bacterias lácticas totales/enterobacterias en el yeyuno en pollos de carne suplementados y aumenta las mitosis. Así, el uso de butirato sódico protegido con sales sódicas de ácidos grasos supone una modulación efectiva de la pared intestinal promoviendo un buen estado de salud intestinal. Sin embargo, la administración de 2 kg/t del aditivo a la dieta parece ser menos efectiva.

Agradecimientos

El presente estudio ha sido cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional de la Unión Europea en el marco del programa operativo FEDER de Catalunya 2014-2020 (proyecto COMRDI16-1-0033) y gestionado por ACCIÓ.

Referencias

- AVIAGEN (2014) Ross Broiler Management Handbook, Aviagen. Newbridge, Scotland, UK.
- Baltić, B., Ćirić, J., Šefer, D., Radovanović, A., Đorđević, J., Glišić, M., Bošković, M., Baltić, M.Ž., Đorđević, V., Marković, R. (2018) Effect of dietary supplementation with medium chain fatty acids on growth performance, intestinal histomorphology, lipid profile and intestinal microflora of broiler chickens. *S. African Jour. of Ani. Sci.* 48: 884-896.
- Bedford, A., Gong, A. (2018) Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Anim. Nutr.* 4: 151-159.
- Chamba, F., Puyalto, M., Ortiz, A., Torrealba, H., Mallo, J.J., Riboty, R. (2014) Effect of partially protected sodium butyrate on performance, digestive organs, intestinal villi and *E. coli* development in broilers chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 13: 390-396
- Czerwiński, J., Højberg, O., Smulikowska, S., Engberg, R. M., Mieczkowska, A. (2012) Effects of sodium butyrate and salinomycin upon intestinal microbiota, mucosal morphology and performance of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.* 66: 102-116.
- FEDNA (2018) Necesidades nutricionales para avicultura. Eds: R. Lázaro y G.G. Mateos. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, Madrid, España.
- Guilloteau, P., L. Martin, V. Eeckhaut, R. Ducatelle, R. Zabielski, Van Immerseel, F. (2010) From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr. Res. Rev.* 23: 366–384.
- Jerzsele, A., K. Szeker, R. Csizinszky, E. Gere, C. Jakab, J. J. Mallo, and P. Galfi. (2012) Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and *Bacillus amyloliquefaciens* spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers. *Poult. Sci.* 91: 837–843.
- Kaczmarek, S. A., Barri, A., Hejdysz, M., Rutkowski, A. (2016) Effect of different doses of coated butyric acid on growth performance and energy utilization in broilers. *Poult. Sci.* 95: 851–859.
- Leeson, S., Namkung, H., Antongiovanni, M., Lee, E. (2005) Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. *Poult. Sci.* 84: 1418–1422.
- Oviedo-Rondón, E. O. (2019) Holistic view of intestinal health in poultry. *Anim. Feed Sci. Technol.* 250: 1-8.
- Panda, A.K., Rao, S.V.R., Raju, M.V.L.N., Sunder, C.S. (2009) Effect of butyric acid on performance, gastrointestinal tract health and carcass characteristics in broiler chickens. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 22: 1026-1031.

Parlamento Europeo y del Consejo (2018) Reglamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de diciembre de 2018, sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE. L:4–43.

Parlamento Europeo (2010) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos. L:276-33.

Riboty, R., Chamba, F., Puyalto, M., Mallo, J.J. (2016) Effect of partially-protected sodium butyrate and virginiamycin on nutrient digestibility, metabolizable energy, serum metabolites and performance of broilers chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 15: 304-312.

Sikandar, A., Zaneb, H. Younus, M., Masood, S., Aslam, A., Khattak, F., Ashraf, S., Yousaf, M.S., Rehman, H. (2017) Effect of sodium butyrate on performance, immune status, microarchitecture of small intestinal mucosa and lymphoid organs in broiler chickens. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 30: 690-699.

Wu, W., Xiao, Z., An, W., Dong, Y., Zhang, B. (2018) Dietary sodium butyrate improves intestinal development and function by modulating the microbial community in broilers. *PLoS ONE* 13(5): e0197762.

Zhao, H., Bai, H., Deng, F., Zhong, R., Liu, L., Chen, L., Zhang, H. (2022) Chemically protected sodium butyrate improves growth performance and early development and function of small intestine in broilers as one effective substitute for antibiotics. *Antibiotics* 11: 132.