



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**RELACION ENTRE EL CONSUMO DE MANANO-OLIGOSACARIDOS DE  
LEVADURAS CON LA PRODUCCION DE LECTINA LIGADORA DE MANANOS  
EN POLLO DE ENGORDA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:  
RAUL FELIPE CORTES CORONADO**

**TUTOR: SERGIO GÓMEZ ROSALES  
CENIDFyMA-INIFAP**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
CARLOS LOPEZ COELLO. DMZA-FMVZ-UNAM  
EDGAR ZENTENO GALINDO. DB-FM-UNAM**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO DE MEXICO**

**OCTUBRE 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIAS.**

A mi Padre Fernando Cortés Teixeira que a la temprana edad de 60 años decidió junto con mi Madre Alicia Coronado, darme la oportunidad de vivir y disfrutar del mundo. Sus ejemplos han sido el motor de este trabajo.

A Baden Powell fundador de los Scouts quien también con mas de 50 años emprendió el proyecto de su vida, que nos ha permitido a muchos convertirnos en una mejor versión de nosotros mismos.

A mis mentores fallecidos: Lic. Luis V. Echevarria, Prof. Herman Hencken, Dr. Alberto Rivera, quienes me proporcionaron con su tiempo y dirección, las herramientas que me hicieron entender, lo que es un profesional en su campo.

En especial quiero dedicarla para la Dra Maria Therese Casaubon H. quien no solo ha sido una mentora, sino una amiga que ha soportado mis preguntas y ha tenido la paciencia durante muchos años para acompañarme en varios otros proyectos. Espero que muchos otros puedan seguir teniendo su inigualable acompañamiento.

Y finalmente decicarla a cualquier que lea este trabajo y tenga una idea en mente que quiera desarrollar, nunca hay un tiempo preciso para probarla, nunca hay un mejor tiempo para hacerla, solo hay que intentarla cuando se presenta la oportunidad.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Con especial agradecimiento a la dra Hellen Juul-Madsen (Q.P.D.) y la dra Tina S. Daalgard de la Universidad de Aarhus en Dinamarca por su apoyo para la realización de todos los análisis de LLM en los sueros de las aves. Por creer que este trabajo podría realizarse, sin su interés y colaboración incondicional este trabajo no hubiera podido realizarse.

Mi reconocimiento al Dr Segio Gómez por su apoyo en todo momento a la realización del trabajo, por su dirección y paciencia, así como por el tiempo que dedico para que pudiera salir a la luz toda la investigación. Espero que todo ese esfuerzo haya quedado plasmado en esta tesis.

A mis increíbles hermanos Luis, Marcela, Juan Francisco, Vicky, Fernando por todo el soporte económico y afectivo sobre todo que por años han dado a mis locuras. Para esta tesis hacer el esfuerzo de corregir el texto, de editarlo. Los quiero.

## **RESUMEN.**

La demanda de los consumidores por carne de pollo libre de antibióticos implica cambiar la forma en que se controlan algunas enfermedades, especialmente la coccidiosis que es inevitable en las condiciones de crianza moderna de las aves. El sistema inmune del intestino está capacitado para controlar la infección por coccidias, sin embargo, esto no ocurre con la velocidad que los procesos modernos de crianza requieren. El uso de productos fermentados con levaduras (PFL) ha mostrado ser útil en reducir los daños provocados por la coccidiosis temprana, sin embargo, el mecanismo de acción de estos productos no ha sido descrito completamente.

El sistema inmune innato en las aves produce diferentes moléculas de la fase de choque entre ellas las Lectinas Ligadoras de Mananos (LLM). Estas tienen la capacidad de ligarse a estructuras complejas de Manosa en la membrana de diferentes microorganismos, incluidas las coccidias. Las LLM son capaces de activar la cadena de fijación de complemento y de aumentar el índice de fagocitosis por las células inmunes.

En esta tesis se estudió la relación entre el consumo de PFL aplicados en el alimento de pollos de engorda y la producción de LLM, en condiciones libres de coccidiosis y en una infección forzada por el uso de una vacuna oral para coccidiosis. Se desarrollaron dos experimentos para probar las hipótesis.

**H<sub>0</sub>:** La suplementación con productos de levaduras en pollos de engorda, no producirá una respuesta aguda en la producción de LLM en aves no infectadas por coccidia

**H<sub>1</sub>:** La suplementación con productos de levaduras en pollos de engorda, producirá una respuesta aguda en la producción de LLM en aves no infectadas por coccidia.

**H<sub>2</sub>:** La suplementación con productos de levaduras en pollos de engorda, además de incrementar la producción de IgA y aumentará los niveles séricos de LLM en aves infectadas por coccidia.

## **Experimento 1:**

El objetivo de esta investigación fue evaluar las concentraciones séricas de la Lectina Ligadora de Mananos (LLM) en diferentes edades de pollos de engorda alimentados con cantidades crecientes de un producto Fermentado por Levaduras (PFL) y que adicionalmente fueron vacunados contra la Enfermedad de Newcastle (ENC). Ochenta pollitos mixtos Ross B308 fueron enjaulados individualmente. Grupos de 20 aves tomada al azar fueron asignadas a diferentes niveles de PFL (0, 400, 800, 1600 ppm en el alimento). Las aves tuvieron acceso libre al alimento. Las concentraciones de LLM fueron determinados a 17,21,28,35. A los 21 días, todas las aves fueron vacunadas con ENC (ocular) y los títulos de anticuerpos (Ac) contra ENC se determinaron a los 35 días de edad. Los datos de LLM se evaluaron con un proceso MIXTO; ANOVA fue utilizada para los Ac y los otros datos de desempeño productivo; también se corrieron modelos de regresión. La concentración de LLM mostró un patrón cuadrático ( $p < 0.05$ ) durante los diferentes días de muestreo con una tendencia decreciente hacia el día 35. La vacunación contra ENC no tuvo ningún efecto en la concentración de LLM. Los títulos de anticuerpos mostraron un patrón cúbico ( $p < 0.05$ ) teniendo el mínimo de los títulos al nivel más alto de PFL. En conclusión, la concentración de LLM decrece con el tiempo, alcanzando el valor mínimo a los 35 días, pero el consumo de PFL no afecto la concentración de LLM durante el experimento, pero si se asoció con la disminución de títulos de Ac contra ENC a los 35 días de edad. La vacunación contra ENC no afecto los niveles de LLM a los 35 días

## **Experimento 2**

El objetivo de esta investigación fue evaluar las concentraciones de LLM sérica y otros indicadores de la actividad inmune en el intestino de aves alimentadas con PFL y con una infección por vía de una vacunación de coccidias.

Se usaron ciento veinte pollitos machos Ross B308 de 1 día de edad que fueron alojados en jaulas en batería. Se formaron dos grupos de 60 repeticiones cada uno entre el día 1 y 21 de edad (Fase 1) y se asignaron aleatoriamente a dos tratamientos: 1) Grupo testigo: Sin inclusión de PFL entre 1-20 días (PFL-) y 2) Grupo experimental: con inclusión de PFL (800 g/ton) entre 1-20 días (PFL+). Se usó un producto anticoccidial en el alimento ofrecido de 1-21 días. Al día 21 se subdividieron las aves de cada grupo para formar cuatro

subgrupos con 30 repeticiones cada uno. Un subgrupo recibió una vacunación con Coccidia y el otro recibió solo agua destilada y se mantuvieron hasta los 28 días de edad.

La concentración de LLM en suero a los 21 días de edad no mostró diferencias entre tratamientos. La concentración de IgA en el líquido obtenido del duodeno fue mayor ( $P < 0.10$ ) en los pollos PFL+, representando un incremento de 38% respecto al grupo PFL.

En los pollos que no fueron vacunados no se encontraron ocistos a los 28 días de edad, en cambio, los pollos que recibieron el reto por vacuna de coccidia, mostraron una excreción positiva de ocistos, siendo mayor para el grupo PFL-Vac+ comparado con el grupo PFL+Vac+ (Interacción PFL y Vac,  $P < 0.05$ ).

En la concentración de LLM en suero a los 28 días de edad se observó efecto de la interacción PFL y Vac ( $P < 0.05$ ). En los pollos PFL-Vac- se observó menor concentración de LLM que en los pollos PFL+Vac- lo que podría sugerir que a falta de un desafío con coccidia, la adición de PFL resultó con una menor actividad pro inflamatoria, lo que causó la menor concentración de LLM. Mientras que los pollos PFL-Vac+ tuvieron menor concentración de LLM comparados con los pollos PFL+Vac+, lo cual podría indicar que ante un desafío con coccidia, la presencia de PFL en el alimento promovió una mayor respuesta pro inflamatoria.

En todos los tratamientos, se observó pollos con diferentes genotipos expresado en el fenotipo BLLM o ALLM. En todos los tratamientos hubo cinco pollos con los fenotipos BLLM mientras que se tuvo entre 17-23 pollos en los fenotipos ALLM. Esto es que entre el 22-30% de las aves por cada grupo fueron del genotipo BLLM y de 70-78% fueron ALLM. No se encontraron aves negativas o que no produjeran LLM.

Dentro de los pollos ALLM se observó dos patrones divergentes en las concentraciones de LLM al día 28 respecto a las concentraciones de LLM al día 21. Un grupo de pollos mostró una tendencia a tener menores concentraciones de LLM (entre 21 y 24%), los cuales se clasificaron como no reactivos (ALLMnre), mientras que otro grupo mostró una tendencia a tener mayores concentraciones de LLM (entre 11 y 29%), los que se clasificaron como reactivos (ALLMre), respecto a las concentraciones del día 21.

La concentración de LLM al día 28 fue afectada ( $P < 0.05$ ) por la interacción entre PFL, Vac y el genotipo.

Las diferencias entre los tratamientos ALLM no son perceptibles si se toman en conjunto los datos de los tratamientos, sin hacer la diferencia entre las tendencias de las LLM entre el día 21 y el 28 del experimento. Esto implicaría la existencia de diferencias no solo basadas en el fenotipo ALLM o BLLM, sino un fenotipo secundario en las aves ALLM, que no había sido descrito en la literatura previa y que tiene una influencia importante en el desempeño de las aves, tanto en condiciones sanitarias óptimas o cuando son retadas por un agente infeccioso.

El consumo de PFL se relacionó con una mayor producción de IgA en el intestino de las aves antes del reto por coccidias, pero no después del mismo. También se encontró una relación significativa con la reducción de la excreción de ocistos por gramo de heces. Dichos efectos se reflejaron numéricamente en cambios positivos de las variables zootécnicas de ganancia de peso y consumo de alimento en la fase post infección.

Adicionalmente dicha reacción es modificada por la presencia de los PFL que al tener una acción sobre el sistema inmune innato y de memoria (basada en la respuesta IgA encontrada), modifican las condiciones en que se realiza la respuesta inflamatoria del intestino en las aves sanas clínicamente y las retadas por un agente infeccioso como las coccidias.

El estudio más detallado de la respuesta inmune innata mediada por las LLM en los pollos de engorda constituye una oportunidad de realizar una mejor selección genética de las aves para aumentar su resistencia a las enfermedades, previendo un menor uso de antibióticos en las crías en los próximos años.

**Palabras clave: Pollo engorda, lectinas ligadoras de mananos, inmunidad innata, IgA, Coccidia.**

## **ABSTRACT.**

Consumers demand for chicken meat free of antibiotics involves a change in the way some diseases are controlled, especially in the case of coccidiosis, which is inevitable under modern rearing conditions in birds. The immune system in the intestine is trained to control infections by coccidia; however, this does not happen with the promptness required by modern rearing processes. The use of yeast fermented products (YFP) has proved to be useful in reducing hazard caused by an early coccidiosis, nonetheless the action mechanisms of these products have not been fully described.

The innate immune system of birds, produces different molecules from the contact stage, such as the Mannan-Binding-Lectins (MBL). These have the capacity to bind to complex mannose structures in the membrane of different microorganisms, including coccidia. The MBL are capable of activating the complement and increasing the phagocytosis index by the immune cells.

The present thesis studied the relation between Yeast Fermented Products (YFP) added to broiler feed and the production of MBL, in conditions free of coccidia and in a forced infection using an oral vaccine against coccidia. Both experiments were developed to prove the following hypothesis.

**H<sub>0</sub>:** Supplementation of yeast fermented products in broiler feed, will not result in an acute response in production of MBL in birds not infected with coccidia.

**H<sub>1</sub>:** Supplementation of yeast fermented products in broiler feed, will result in an acute response in production of MBL in birds not infected with coccidia.

**H<sub>2</sub>:** Supplementation of yeast fermented products in broiler feed, aside from increasing IgA production, will increase serum levels of MBL in birds infected with coccidia.

### **Experiment 1:**

The objective of the following research was to evaluate serum concentrations of MBL at different ages in broilers fed increasing amounts of a Yeast Fermented Product (YFP) and were additionally vaccinated against Newcastle Disease (ND). Eighty mixed Ross B308 chickens were allotted to individual cages. Groups of 20 birds each, were randomly assigned to different Yeast Fermented Product levels (0, 400, 800, 1,600 ppm in the feed). Birds had free access to feed. Concentrations of MBL were determined at 17, 21, 28 and 35 days. At day 21, all birds were vaccinated against Newcastle Disease (ND) in the eye, and antibody titers against ND were determined at 35 days of age. Data on the MBL were evaluated by means of a MIXED process; ANOVA was used for the antibodies and the productive performance data; regression models were also performed.

Concentration of Mannan-Binding-Lectins showed a quadratic pattern ( $p < 0.05$ ) along the different sampling days with a diminishing trend towards day 35. Vaccination against Newcastle Disease had no effect in the concentration of MBL. Antibody titers had a cubic pattern ( $p < 0.05$ ) with the lowest titers at the highest level of Yeast Fermented Product. In summary, the concentration of Mannan-Binding-Lectins decreases with time, reaching its lowest value at 35 days, but consumption of Yeast Fermented Products did not affect the concentration of MBL, but it was associated with the decrease in antibody titers against Newcastle Disease at 35 days of age. Vaccination against Newcastle Disease did not affect levels of MBL at 35 days of age.

### **Experiment 2**

The objective of this research was to evaluate serum concentrations of MBL and other indicators of immune activity in the intestine of birds fed with Yeast Fermented Products and infected with a coccidia vaccine.

One hundred and twenty, one-day-old, male Ross B308 chicks were allotted to battery cages. Two groups of 60 repetitions each between day 1 and 21 of age (phase 1), were randomly assigned to two treatments: 1) Control group: Without Yeast Fermented Products from day 1-20 (YFP-) and 2) Experimental Group: With Yeast Fermented Products (800 g/ton) between days 1-20 (YFP+). An anti-coccidial product was added to the feed between days 1-21. At day 21 the birds in each group were divided to form four sub-groups of 30 reps each. A sub-group was vaccinated with coccidia and the other one

was only given distilled water and birds were kept until 28 days of age. Serum concentrations of Mannan-Binding-Lectins at 21 days of age did not show differences among treatments. IgA concentrations in the liquid from the duodenum was higher ( $p < 0.10$ ) in YFP+ chicks, which means an increase of 38% compared to YFP. In chicks that were not vaccinated, no oocysts were found at 28 days of age, whereas in broilers challenged with coccidia vaccine, they showed a positive excretion of oocysts, being higher for the YFP-Vac+ compared to group YFP+Vac+ (interaction YFP and Vac,  $P < 0.05$ ).

In the concentration of MBL in serum at 28 days, an interaction of YFP and Vac ( $P < 0.05$ ) was observed. In chicks YFP-Vac- a low concentration of MBL was found, which may suggest that in absence of a challenge with coccidia, the addition of YFP resulted in a reduced pro-inflammatory activity, with a consequent lower concentration of MBL. While YFP-Vac+ chicks had lower MBL concentrations compared to YFP+Vac+ chicks, which may indicate that when challenged with coccidia, the presence of YFP in the feed promotes a higher pro-inflammatory response.

Chicks with different genotypes expressed in phenotypes as Low-MBL (LMBL) and High-MBL (HMBL) were observed in all treatments. All treatments had chicks with phenotypes LMBL. This translates in a range of 22-30% of the birds per group belonged to the LMBL genotype and 70-78% were HMBL. No negative chicks or birds that would not produce Mannan-Binding-Lectins were found.

Two divergent patterns in MBL concentrations were found among the HMBL chicks at day 28 compared to MBL at day 21. A group of chicks had a trend to have lower concentrations of MBL (between 21 and 24%), which were classified as non-reactive (HMBLnre), while the other group showed a trend to have higher concentrations of MBL (between 11 and 29%), which were classified as reactive (HMBLre) compared to concentrations of day 21.

The concentration of MBL at day 28 was affected ( $P < 0.05$ ) by the interaction between Yeast Fermented Products, Vac and genotype.

Differences among treatments HMBL are not perceivable if data from treatments are considered as a whole without pointing out the difference between the trend of MBL at day 21 and at day 28 of the experiment.

This would involve the existence of differences based not only on the phenotype HMBL or LMBL but also to a secondary phenotype in the HMBL (nre or re ) birds that has not previously been described in the literature, and that has an important influence in the bird's performance both in optimal health conditions or when drawn back as a result of an infectious agent.

Consumption of YFP was related to a higher production of IgA in the intestine of birds previous to the challenge with coccidia, but not after it. A significant relation was found with the reduction in the excretion of oocysts per gram of feces. Such effects are numerically reflected in positive changes in performance variables, such as weight gain and feed consumption in the post-infection stage.

Additionally, such reaction is modified by the presence of YFP that by acting on the innate immune system as well as on the memory (based on the IgA response), they modify the conditions in which the inflammatory response takes place in the intestine of both clinically healthy birds and the ones drawn back as a result of and infectious agent such as coccidia. The most detailed study of the innate immune response mediated by the MBL in broilers comprises an opportunity of performing a better genetic selection in birds to enhance their resilience against disease, preventing the use of antibiotics at rearing in the following years.

**Key words: broilers, Mannan-Binding-Lectins, innate immunity, IgA, Coccidia.**

# Contenido

INDICE DE TABLAS .....	I
INDICE DE FIGURAS .....	II
ABREVIATURAS .....	III
CAPITULO I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Marco teórico.....	1
CAPITULO II SISTEMA INMUNE DEL INTESTINO DE LAS AVES .....	4
2.1 Descripción general .....	4
2.3 Desarrollo del sistema inmune del intestino. ....	9
2.4 Reconocimiento de los antígenos .....	11
2.5 Células involucradas en respuesta celular al activarse los RPR en el intestino .....	14
2.6 Interacción celular y producción de mediadores químicos en el intestino .....	17
2.7 La reacción inmune del intestino en conjunto sobre un agente infeccioso. ....	19
2.7.1 Modelo en infecciones por coccidia.....	19
2.7.2 La respuesta tolerante .....	24
2.7.3 Respuestas no existentes en las aves. ....	25
2.8 La producción de IgA en las aves .....	25
CAPÍTULO III : PARTICIPACION DE LAS LECTINAS LIGADORAS DE MANANOS EN LA INMUNIDAD INNATA.....	35
3.1 Generalidades.....	35
3.2 Lectinas Ligadoras de Mananos en Aves .....	37
3.3 Participación de las LLM en la respuesta inmune contra diferentes enfermedades.....	40
CAPITULO IV MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL INTESTINO POR LA MICROBIOTA .....	47
4.1 Generalidades.....	47
4.2 Interacción de la micro biota y el sistema inmune .....	50

4.3	Papel del proceso de fermentación del alimento por la micro biota .....	54
4.4	Aditivos con microorganismos que modifican la micro flora y la respuesta inmune del intestino .....	57
4.5	Otros aditivos nutricionales que modifican la micro flora y la respuesta inmune	60
CAPITULO V LA REACCIÓN INMUNE DEL INTESTINO DE LAS AVES A LA PRESENCIA DE PRODUCTOS CON LEVADURAS EN LA DIETA.....		67
5.1	Generalidades.....	67
5.2	La adhesión bacteriana a las levaduras como modelo para describir su efecto en el intestino .....	69
5.3	Proceso inmune ante hongos y respuestas inmunes al uso de levaduras en la dieta	71
5.4	Efecto de los productos de levaduras en la respuesta inmune.....	74
5.5	Alimentación de levaduras, parámetros zootécnicos y respuesta del sistema inmune intestinal.....	76
5.6	Asociación entre la resistencia a coccidiosis y el consumo de levaduras .....	80
CAPITULO VI JUSTIFICACION.....		92
<b>6.1 Planteamiento del problema (situación actual)</b> .....		92
6.2	Hipótesis.....	95
6.3	Objetivos.....	95
6.4	Límites y alcances de la tesis .....	96
CAPITULO VII EXPERIMENTO 1 .....		99
Concentración de Lectina Ligadora de Mananos en Pollos de Engorda alimentados con un producto fermentado por levaduras y vacunado con virus de Newcastle. ....		99
7.1	Resumen .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3	Materiales y Métodos.....	102
7.4	Resultados y Discusión.....	104
7.4.1	Concentraciones séricas de LLM .....	104

7.4.2 Concentración de LLM y PFL en la dieta.....	105
7.4.3 Concentraciones de LLM y días de muestreo.....	106
7.4.4 Resultado de la vacunación contra ENC y concentración de LLM en el suero .....	107
7.4.5 Títulos séricos de Ac contra ENC y consumo de PFL .....	107
7.4.5 Consumo de PFL y desempeño en crecimiento .....	109
7.4.6 Evaluación Histopatológica .....	111
7.5 Conclusiones.....	111
CAPITULO VIII EXPERIMENTO 2 .....	116
Efecto de la adición del alimento con un producto de fermentación por levaduras y un desafío con Coccidias sobre la morfología del intestino, la respuesta inmune celular y humoral (local y sistémica) en pollos de engorda .....	116
8.1 Resumen .....	116
8.2 Introduccion.....	116
8.3 Materiales y Métodos.....	118
8.4 Resultados y Discusión.....	120
8.4.1. Período de 1 a 21 días de edad .....	120
8.4.2. Período de 21 a 28 días de edad .....	124
8. 5 Conclusiones .....	139
CAPITULO IX CONCLUSIONES .....	143

## **INDICE DE TABLAS**

**Tabla 7.1.** Concentración en diferentes días de muestreo de Lectina Ligadora de Mananos (LLM,  $\mu\text{g/mL}$ ) en el suero de pollos de engorda alimentados con diferentes niveles de Producto Fermentado de Levaduras (PFL)

**Tabla 7.2.** Títulos de Anticuerpos contra Virus ENC (log) a 35 días de edad.

**Tabla 7.3.** Variables Productivas en pollos de engorda entre 17 y 35 días de edad.

**Tabla 8.1.** Comportamiento productivo, peso de la canal y sus componentes y medidas de la tibia en pollos de 1 a 20 días de edad

**Tabla 8.2.** Conteo de ocistos, concentración de IgA y lesiones histopatológicas en duodeno y yeyuno y concentración de LLM en suero de pollos de 21 días de edad.

**Tabla 8.3.** Comportamiento productivo, peso de la canal y sus componentes y medidas de la tibia en pollos de 21 a 28 días de edad

**Tabla 8.4.** Conteo de ocistos, concentración de IgA y lesiones histopatológicas en duodeno y yeyuno y concentración de LLM en suero de pollos de 28 días de edad.

**Tabla 8.5** Concentración de Lectina Ligadora de Mananos y variables productivas de 21 a 28 días de edad de acuerdo al fenotipo con baja o alta concentración de Lectina Ligadora de Mananos.

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 7.1.** Concentración Sérica de LLM ( $\mu\text{g/mL}$ ) en los distintos días de muestro. A = Todas las observaciones, efecto cuadrático en los días de muestro. ( $y = 11.523 - 1.5458x + 0.175x^2$ ;  $R^2 = 0.92$ ). B = baja LLM en pollos; efecto cúbico en los días de muestro. ( $y = 6.87 - 1.815x + 1.18x^2 - 0.2x^3$ ;  $R^2 = 0.99$ ). C = alta LLM en pollos; efecto cuadrático en los días de muestro ( $y = 18.276 - 4.6165x + 0.67x^2$ ;  $R^2 = 0.96$ ). La desviación estándar es se presenta en las barras.

**Figura 8.1.** Lectina ligadora de Mananos a los 21 (A) y 28 (B) días en pollos alimentados con y sin levadura, vacunados y no vacunados y con diferente respuesta de LLM <sup>b-c</sup> Interacción PFL, Vac y Genotipo,  $P < 0.05$ ; EEM = 1.755.

**Figura 8.2.** Consumo de alimento (A, <sup>a-i</sup>interacción PFL, Vac y Genotipo,  $P < 0.01$ ; EEM = 0.0252) y ganancia de peso (B, <sup>a-i</sup>interacción PFL, Vac y Genotipo,  $P < 0.01$ ; EEM = 0.0260) de 21 a 28 días en pollos alimentados con y sin levadura, vacunados y no vacunados y con diferente respuesta de LLM.

## ABREVIATURAS

<b>AGCC</b>	Ácidos Grasos de Cadena Corta
<b>AGV</b>	Ácidos Grasos Volátiles
<b>AN</b>	Asesina Natural
<b>APRIL</b>	A Proliferation Inducing Ligand
<b>BAFF</b>	B-cell Activating Factor
<b>BMD</b>	Bacitracina M Di
<b>cAMP</b>	cyclic Adenine Mono Phosphate
<b>CARD9</b>	Capase Recruitment Domains
<b>CC</b>	Células Caliciformes
<b>CD</b>	Células Dendríticas
<b>CLR</b>	C-Type Lectin Receptors
<b>CM</b>	Células M
<b>CP</b>	Célula Plasmática
<b>CPA</b>	Célula Presentadora de Antígeno
<b>CREB</b>	cAMP Response Element-binding Protein
<b>CRD</b>	Carbohydrate Recognition Domain
<b>CXCL12</b>	Chemokine CXCL12
<b>CX3CR1</b>	Chemokine CX3CR1
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>ENC</b>	Enfermedad de Newcastle
<b>NDV</b>	Newcastle Disease virus
<b>Fc-g</b>	Fragment Crystallizable g
<b>FLA</b>	Folículo Linfático Asociado
<b>FOS</b>	Fructo Oligo Sacáridos

<b>FOXP3+</b>	Forkhead Box p3
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>GP-</b>	G protein receptor-
<b>HC</b>	Hormona de Crecimiento
<b>HDP</b>	Host Defensive Peptides
<b>IBDV</b>	Infectious Bursal Disease Virus
<b>IBV</b>	Infectious Bronchitis virus
<b>IFN-</b>	Interferon-
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgY</b>	Inmunoglobulina Y
<b>IL-</b>	Interleucina-
<b>iNOS</b>	Inducible Nitric Oxide
<b>IRF3</b>	Interferon Regulatory Transcription Factor 3
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor Tyrosine-Base Activation Motiff
<b>LLM</b>	Lectina Ligadora de Mananos
<b>LIE</b>	Linfocitos Intraepiteliales
<b>LLR</b>	Lectin Like Receptor
<b>LP</b>	Lámina Propia
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido bacteriano
<b>MASP1</b>	Mannan-binding lectin Serine Protease 1
<b>Mac</b>	Macrófagos
<b>MBL</b>	Mannan Binding Lecthin
<b>MHC</b>	Mayor Histocompatibility complex

<b>MOS</b>	Manano Oligo Sacaridos
<b>MUC-</b>	Mucine Cell-MyD88
<b>NFκB</b>	Nuclear Factor κ B
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NLA</b>	Nódulo Linfoide Asociado
<b>NLR</b>	NOD Like Receptor
<b>NOD</b>	Nucleotide-binding Oligomerization Domain Receptor Toll
<b>PAMP</b>	Patrón Molecular de Patogenicidad
<b>PFL</b>	Producto Fermentado de Levadura
<b>PP</b>	Placas de Peyer
<b>RIG-1</b>	Retinoic Inducible Gene-1
<b>RNA</b>	Oxiribonucleic Acid
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>RPR</b>	Receptor de Patrones de Reconocimiento
<b>RTL</b>	Receptor Tipo Lectina
<b>SR</b>	Scavenger Receptor
<b>TCR</b>	Thymic cellular receptor TRAM
<b>TED</b>	Transephithelial Dendritic Cell
<b>TGF-β</b>	Tumor Growth Factor
<b>Th1</b>	Thymic Helper 1
<b>Th2</b>	Thymic Helper 2
<b>Th17</b>	Thymic Helper 17
<b>TIRAP</b>	Toll-Interleukin 1 Receptor Domain Containing Adaptor Protein
<b>TLAR</b>	Tejido Linfoide Asociado en Respiratorio
<b>TLAI</b>	Tejido Linfoide Asociado en Intestino

<b>TLR</b>	Toll Like Receptor
<b>TRIF</b>	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon
<b>Treg</b>	Thymic Regulatory
<b>TSLP</b>	Thymic Stromal Linfoprotein
<b>SO</b>	Sulfur Oxide
<b>SFB</b>	Segmented Filamentous Bacteria
<b>SOD</b>	Super Oxide Dismutase
<b>SYK</b>	Spleen Tyrosine Kinase
<b>YFP</b>	Yeast Fermentation Product

## **CAPITULO I INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Marco teórico**

En las tres últimas décadas, la población mundial aumentó 70 por ciento, mientras que el consumo de alimentos *per capita* creció casi un 20 por ciento. Los productos cárnicos y lácteos formarán una parte cada vez más importante de la dieta humana y la avicultura será la que se extienda con mayor rapidez. En los países en desarrollo se ha dado un crecimiento espectacular de la demanda de carne con un índice anual de crecimiento de 5,5 por ciento. El sector de las aves de corral ha experimentado un crecimiento de hasta el 28 por ciento en los últimos tres decenios. La producción de carne de pollo de engorda, es la que tiene un aumento superior al de otras como la de bovino o cerdo. (DES-FA0, 2015)

El crecimiento de la demanda de carne de pollo está basado principalmente en su relación precio al público-carne, que es más barata en relación a otras fuentes, como la de bovino, cerdo e incluso en algunas regiones, que el pescado. Adicionalmente, se percibe que la carne de pollo es la que aporta mejor calidad de nutrientes, especialmente una menor grasa por unidad consumida. (Carvajal, 2001)

Para lograr la sustentabilidad de esta producción de carne de pollo, el factor más importante ha sido la selección genética, que desde los años 50's ofrece mejores líneas de aves para ser criadas en las diferentes granjas a lo largo del mundo. La selección ha llevado al pollo de engorda actual en promedio a llegar a los 2.5 kg de peso en menos de 49 días y con conversiones de alimento menores a 1.85 kg (Zuidhof et al. 2014)

Esta gran capacidad productiva del ave implica por lo tanto que para obtenerla es necesario la optimización de las instalaciones (aislamiento, recambio de aire, disponibilidad de espacio de alimentación y agua, controles de temperatura y luz), así como de la nutrición de las aves.

La nutrición aviar es la especialización donde se tienen los mayores avances para estimar el aporte adecuado de nutrientes para cada fase de desarrollo del pollo de engorda. Las dietas modernas ajustan lo más detalladamente posible la energía-proteína y otros

nutrientes necesarios para sostener y maximizar el potencial genético de crecimiento de las aves.

La dieta por sí misma no es el único factor que concurre en el intestino del ave para la utilización de los nutrientes. El intestino es un sistema con una relación ecológica muy particular entre: 1) el alimento que recibe el ave, 2) los elementos del sistema que se utilizan para lograr la digestión y absorción, 3) la micro flora que se desarrolla en el lumen del mismo y 4) El sistema inmune que debe equilibrar a la micro flora, permitiendo el desarrollo sano del ave. (Collet et al.2012)

Para lograr mantener este equilibrio en el pollo de engorda, se requiere de un proceso dinámico y complejo, especialmente porque la presencia enzoótica de algunos microorganismos inevitables en las condiciones de las granjas donde se lleva la producción de las aves, como los del género *coccidia*. La aparición de la infección y desarrollo de la enfermedad por coccidias, es el factor más importante de control que se necesita para lograr la maximización de la producción de carne por metro cuadrado en las granjas. Al año se invierten miles de millones de dólares en su control y tratamiento, ya sea por vía de programas preventivos o por aquellos tratamientos curativos implicados con el alimento. (The poultry site, 2013)

Los consumidores presionan no solo con tener una carne de alta calidad y a buen precio, sino también libre en lo posible de antibióticos. Los programas de control de coccidias, indispensables para la producción en casetas de pollos, tienen el mayor reto para conseguir opciones alternativas al uso de drogas anticoccidiales, como se ha venido realizando por los últimos 60 años en que la avicultura pudo florecer gracias a ellas.

Es necesario entonces entender a profundidad el mecanismo por el cual las coccidias se desarrollan en el organismo y a través de que otras acciones es posible darle al ave condiciones para que pueda oponerse de forma inmunológica a la infección. En condiciones normales, (correcta alimentación y sin la presencia de enfermedades inmunodepresoras), las aves lograrán desarrollar una inmunidad operante contra las coccidias aproximadamente entre las semanas 6-8 de vida. Para las condiciones actuales de la crianza del pollo de engorda este es un tiempo inaceptable, porque sería regresar

varios años en el potencial genético logrado, aunque este se apoye en el uso de drogas anticoccidiales.

De esta manera, surgen las preguntas de si es posible lograr que las aves tengan una reacción inmune diferente y en menor plazo a la presencia de coccidias en el intestino y hasta donde puede ser aplicado en las granjas de producción sin que sea, al final, un problema de costos.

## **BIBLIOGRAFIA**

**Carbajal G** (2001) Valor nutricional de carnes: res, cerdo, pollo. Corporación de Fomento Ganadero. San Jose. Costa Rica.

**Collet S.R.** (2012) Why the avian enteric tract respond the way it does. Arkansas nutrition conference . 5-sept

**DES-FAO.** Departamento económico y social. FAO. , Informe: "Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030". consultado online: <http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s00.htm>. Julio 2015

**The poultry site.** (2013) High Cost of Coccidiosis in Broilers. New & Analysis. 02-08

**Zuidhof M.J.,** B.L. Schneider, V.L. Carney, D.R. Korver and F.E. Robinson. 2014. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978 and 2005. Poultry Science. 93 (12):2970-2982.

## **CAPITULO II SISTEMA INMUNE DEL INTESTINO DE LAS AVES**

### **2.1 Descripción general**

El sistema inmune en las mucosas de las aves puede dividirse en dos compartimientos: Tejido Linfoide Asociado a Vía Respiratoria (TLAR) y Tejido Linfoide Asociado al Intestino (TLAI), que en conjunto representan la mayor superficie de epitelios mono celulares expuestos al medio ambiente (Davison et al., 2008; Gill, 2010). Esta asociación de tejidos es funcional y celularmente distinta de otros tejidos linfoides distribuidos en el organismo (Davison et al, 2008, Bar-Shira et al., 2005). Específicamente el TLAI no solo tiene la función de reconocer la micro flora del intestino y discriminar su posible patogenicidad, sino también participa en la inactivación de moléculas potencialmente dañinas que vienen en los propios alimentos que el ave consume (Ramiro-Puig et al., 2008).

La mucosa o epitelio del intestino de las aves está recubierto por una sola capa de células columnares conocidas como enterocitos. Entre los enterocitos se encuentran entremezcladas diferentes tipos celulares: células caliciformes, células entero endócrinas, células de Panneth y linfocitos intrepiteliales (LIE). Están unidas entre sí por medio de ligaduras fuertes (Davison et al., 2008) que son enlaces moleculares entre las células que permiten forman una verdadera barrera física entre la luz del intestino y el interior del organismo.

Adosado a la parte distal de los enterocitos, se encuentra el moco (producido por las células caliciformes), que presenta diferente densidad de acuerdo a la proximidad del epitelio. La calidad molecular del moco también puede variar con la edad de las aves y con el sitio funcional en el intestino. Las propiedades físico-químicas del moco también se alteran por efecto de la presencia de la micro flora (Forder et al., 2007).

Dentro de este moco se desarrolla una serie de microorganismos que inevitablemente forman parte de la microbiota que vive en el intestino del ave desde el momento de la eclosión. Esta microbiota interactúa todo el tiempo con el ave alterando los procesos digestivos, de absorción, la propia motilidad y la activación del sistema inmune (Deplancke and Gaskins, 2001). Es decir que no se puede hablar del intestino sin tomar en cuenta la respuesta propia de la microbiota y su relación con el TLAI (Forder et al., 2007).

El TLAI tiene por objetivo proteger a los enterocitos, y por lo tanto, a la estructura del intestino de los posibles patógenos o moléculas potencialmente dañinas (Bar-Shira et al., 2005). Aunque este proceso tiene como función mantener la vida del ave, la respuesta inflamatoria resultante, también ejerce efectos negativos sobre las propias células del intestino, de manera que, en condiciones de un sistema de producción de carne, la activación inmune implicará pérdida del crecimiento y aumento en los costos de producción por costos extras debidos al mayor volumen de alimento necesario para lograr una esperanza de desarrollo comercial. Por estas razones, es importante entender cómo se desarrolla la respuesta del TLAI en función de los estímulos de la microbiota, para lograr un manejo que permita obtener el mayor beneficio de los animales.

Así como el sistema digestivo de las aves está dividido en compartimientos o estructuras funcionales para permitir la mejor digestión, de la misma forma, el TLAI es diferente de acuerdo a las secciones del intestino. En general, la estructura del intestino (posterior al proventrículo y la molleja) está compuesta de vellosidades recubiertas de enterocitos, dentro de las cuales hay un vaso sanguíneo, terminaciones nerviosas y células del TLAI, que ejercen sus funciones directamente en la zona, ya sea en la lámina propia, o incluso entremezclándose entre los enterocitos (linfocitos intraepiteliales). Adicionalmente, existen acúmulos linfoides que se comunican a la luz intestinal por células con amplia capacidad de fagocitosis, conocidas como células M (CM). El tejido linfoide asociado a la CM en su conjunto se conoce como Placa de Peyer (PP).

Las PP están distribuidas por el intestino siendo más frecuentes en la sección proximal. Estos acúmulos linfoides no presentan una organización tisular como en otros tejidos linfoides, (con corteza y médula), y se caracterizan por contener varios tipos de células, entre las cuales se reconocen a los macrófagos (Macs), células dendríticas (CDs), células plasmáticas en diferentes estadios de desarrollo (B+), linfocitos apoyadores de tipo Th1, Th2, Th17, Treg, y algunas bacterias que se encuentran asociadas también a este tejido. La función de las PP es la de reconocer antígenos, hacer presentación de los mismos a las células efectoras y coordinar la propagación de las células linfoides hacia las vellosidades, de manera que puedan convertirse en efectoras inmunes *in situ* a nivel de estas estructuras (Davison et al, 2008 ).

En las aves no existen nódulos linfáticos distribuidos en el intestino como sucede en los mamíferos. Solo se encuentran algunas estructuras que tienen esa clasificación: divertículo de Meckel (aproximadamente en la parte media del intestino), tonsilas cecales (en la intersección de ciegos e intestino), bolsa de Fabricio (sobre la cloaca) (Ramiro-Puig et al., 2008). De estos, la bolsa de Fabricio es sin duda un órgano que tiene una especial importancia para las aves, dado que es el mayor sitio de producción de linfocitos B. La localización de este órgano al final del tubo digestivo, le permite absorber y procesar una serie de antígenos para modificar la respuesta inmune del ave en varios órganos. Su importancia y funcionamiento ha sido tratada en diferentes artículos y tesis, por lo que no se ampliará la información sobre la misma.

La bolsa de Fabricio (Oláh et al., 2013) está poblada en la región medular de CDs (bursal secretory DCs) delimitando la misma en los folículos. Estas células (CD45+) se mantienen en la zona, pero pueden migrar al bazo para asociarse en los folículos y ser las células parecidas a macrófagos.

Es muy importante hacer un comentario sobre el proceso digestivo de las aves, específicamente, sobre la motilidad dado el efecto que esto tiene en la ecología de la micro flora y la respuesta inmune. Las aves presentan una serie de movimientos peristálticos que no solo se dirigen antero-posteriormente, sino que también en sentido retrógrado, postero-anteriormente. Esta propiedad en la motilidad les permite poder aumentar si es necesario el tiempo de pasaje del alimento en la luz intestinal, lo que asegura una mejor digestión, y que en algunos casos, como en las aves migratorias, puedan tener tiempos de ayuno más prolongados mientras se mantienen en vuelo (Collet, 2012). Esta propiedad permite también que parte de la micro flora pueda alcanzar otras zonas del intestino, así como la recirculación del moco y otros antígenos en el intestino, aumentando la capacidad de respuesta del sistema inmune (Bar-Sira et al., 2005; Sacranie, 2006; Sacranie et al., 2007).

El consumo de alimento en las primeras 24 h post eclosión determina en gran medida el desarrollo posterior del TLAI. Un retraso en el consumo (mayor a 24 h) no afecta la fracción innata del sistema (medida por la presencia de defensinas), pero afecta sensiblemente la respuesta adaptativa (producción de anticuerpos a los antígenos orales), especialmente en el intestino posterior (pobre desarrollo de la micro flora) y al desarrollo de la bolsa de Fabricio, con el consecuente problema en protección en las siguientes dos semanas

(Friedman y Bar-Shira 2005). El desarrollo del intestino depende de: la ingesta de alimento, la capacidad del sistema inmune y las bacterias que pueblan el intestino desde las primeras fases del desarrollo.

Otro aspecto relevante en el pollo moderno es la diferencia de las líneas genéticas en su capacidad de respuesta a los antígenos, lo cual tiene un impacto importante en la resistencia o susceptibilidad a las enfermedades (Cheema et al., 2003; Yonash et al., 2001). Si bien las principales líneas de pollos de engorda, como Ross y Cobb, son afectadas por los cambios de nivel de proteína, (bajo peso a finalización en las dietas deficientes), sin cambios importantes en los pesos de órganos linfoides, si hay una variación muy importante el efecto en la respuesta a los antígenos (Bayyari *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1999; Cheema et al., 2003). Existen respuestas humorales más rápidas de cuatro o siete días post inoculación en comparación con la inoculación entre 10-15 días para ambas líneas; Cobb demuestra mejor respuesta humoral y Ross 308 mejor respuesta mediada por células (Cheema et al., 2003). Esto tiene implicaciones dependiendo del tipo de antígeno o microorganismo que se seleccione para un estudio de respuesta intestinal. De acuerdo al reporte de Sun et al. (2008), la capacidad fagocítica también parece ser afectada genéticamente. Se pueden determinar cambios en la afinidad por antígeno usando dos líneas distintas de aves, y por lo tanto, en el nivel de anticuerpos producidos, lo que afecta habilidad de liberarse de distintas infecciones.

Las funciones del TLAI están relacionadas con el secuestro de bacterias, limitando su contacto con el epitelio y desarrollando la respuesta innata y adaptativa cuando estas sobrepasan límites determinados. Además, dada la gran exposición a antígenos, restringen la reacción de las células expuestas (limitan citoquinas) y fomentan la tolerancia del sistema a la flora comensal (más células reguladoras que efectoras).

En aves sanas adultas, la población de células linfoides en las vellosidades está compuesta principalmente de células asesinas naturales (Natural killers, NK) y linfocitos T (receptor celular, TCR) TCR  $\alpha$ - $\beta$  y TCR  $\gamma$ - $\delta$ , en su conjunto conocidos como linfocitos intraepiteliales (LIE). Es importante señalar que en estas condiciones se presentan muy pocas células B. Las células T son predominantemente CD8+ con muy pocas CD4+. Muy pocos heterófilos están presentes normalmente en el tejido (Davison et al 2008).

En la lámina propia se pueden localizar otro tipo de células: Mac, CD, NK, T (TCR  $\gamma$ - $\delta$  10% y TCR  $\alpha$ - $\beta$  90%) con dominancia de las CD4+T. La mayor parte de las células B+ han desarrollado ya el isotipo de IgA secretorias. Esta inmunoglobulina es la más común en el intestino, (concentración de 3.5-12 mg/ml), comparada con las IgM (concentración menor a 100 mg/ml). La composición celular en las PP y las TC es muy similar a la encontrada en la lámina propia (Davison et al 2008).

Los enterocitos deben ser considerados también como parte del sistema inmune del intestino aunque no son parte del TLAI. Expresan una serie de quimiocinas que reclutan y retienen a los LIE. La producción de proteínas de defensa (Host defensive peptides, HDP), ha sido determinada en las aves, sin caracterizar a las células Paneth, como en mamíferos; por lo que el origen de estas moléculas es desconocido (Cuperus et al., 2013). Estas moléculas son péptidos catiónicos, responsables de: diferenciación celular, activación, quimiotaxis, inhibir LPS, y aumentar la fagocitosis; son componentes muy activos del sistema inmune innato de defensa. Se clasifican como: beta-defensinas, catelicidinas, péptidos antimicrobiales hepato-expresados-2. Son ricas en cisteína y conservan al menos tres puentes disulfuro en su estructura. La expresión de defensinas no es importante en el tracto intestinal (como si lo es en el reproductor). Las catelicidinas están más ampliamente expresadas en el intestino. La presencia de algunos patógenos sobre expresa los niveles de HDP y algunos incluso los inhiben para poder progresar en su infección. La acción de estos péptidos sobre la membrana celular de las bacterias causa la muerte de los agentes patógenos (principalmente alta actividad vs *E. coli* y *S. aureus*). Por otra parte, también pueden inhibir algunos efectos estimuladores, lo que permitiría modular la respuesta inmune local.

Los enterocitos pueden dirigir parcialmente la respuesta inmune, dado que expresan receptores de patrones de reconocimiento (RPR), que incluyen a los receptores tipo aduana (Toll like receptos, TLR). Todos los enterocitos expresan complejos mayores de histocompatibilidad (Mayor histocompatibility complex, MHC), clase I y clase II, lo que les permite interactuar con el resto de las células efectoras del TLAI.

Los enterocitos se pueden diferenciar también en células caliciformes, que son efectoras de una parte de las barreras innatas a la presencia de microorganismos. Se derivan de las células pluripotenciales de las criptas; son encargadas de la secreción de moco, una glicoproteína que es altamente hidrófila que baña por completo la capa externa de los enterocitos. La función de esta proteína rica en carbohidratos (fucosa, galactosa, n-acetil galactosamina, n-acetil glucosamina), es la convertirse en una barrera que impide la adhesión bacteriana y el efecto directo de moléculas irritantes exógenas. Igualmente, permite que moléculas defensivas, iones e IgA, puedan estar más tiempo en contacto con la microbiota. La cantidad de estas células es mayor en la parte anterior del intestino y va decreciendo hasta volver a aumentar a nivel de ciegos.

La cantidad y calidad de moco varía dependiendo del tipo de infección que se presente, mucho más cuando hay parásitos que con algunas bacterias, aunque algunas de estas utilizan como mecanismo de invasión la modificación de la expresión génica de las células caliciformes. La infección por algunos parásitos unicelulares está precedida de una baja en la producción de moco. Es muy probable que el número de células y la producción de mucina esté regulado por linfocinas secretadas por células Th2 como respuesta a la activación por CD (Kim et al., 2013). Se ha podido demostrar que existen moléculas tipo resistinas, producidas por las células caliciformes, que se estimulan por citoquinas tipo Th2 como IL-4 e IL-13 (Artis et al., 2004). Dichas moléculas son capaces de apoyar la liberación de nemátodos. Las citoquinas producidas por los Th1 (IFN- $\gamma$ ) inhiben la producción del moco y podrían promover infecciones crónicas por algún parásito. Se ha demostrado que en animales con baja carga bacteriana, se produce más mucina neutra que la alta en ácido siálico (Forder et al 2007). Por otra parte, en las aves criadas en condiciones normales, la producción de mucina siálica es mayor (determinada por más células positivas a este producto), lo que confirma las observaciones anteriores sobre el efecto de la mucina para segregar al tipo de bacterias desde los primeros cuatro días de vida de las aves.

### **2.3 Desarrollo del sistema inmune del intestino.**

En los cinco días previos a la eclosión, se forma la estructura básica del intestino por la proliferación de enterocitos. Las diferencias entre enterocitos, células caliciformes, ya se han desarrollado al momento de la eclosión. Posteriormente, los estímulos para el desarrollo vendrán de la micro flora y los componentes de la dieta. Al momento de la

eclosión, y los siguientes 7 días, se llevará un crecimiento exponencial del intestino, que no terminará hasta después de tres a cuatro semanas. Alrededor del momento de la eclosión, ocurre una importante migración de células linfoides provenientes del timo y la bolsa de Fabricio. Este proceso se puede observar en forma de oleadas a los 18-20 días de incubación, y entre los días dos a cuatro y nueve a 11 días post eclosión (Bar-Shira et al., 2005). Los cambios en el tipo celular que migra, parecen estar más dirigidos por la micro flora (Inmunología aviar 249). El grado de desarrollo del aparato digestivo y de las vellosidades es determinante para el alojamiento de una población adecuada de linfocitos; la defensa del intestino en la primera semana depende de la respuesta innata y de los anticuerpos que estuvieron presentes en la yema (anticuerpos principalmente neutralizadores) (Bar-Shira et al., 2005).

Las aves reciben una protección particular que viene de los anticuerpos maternos que se encuentran en la yema. En esta se puede determinar IgM e IgA, pero se encuentra en mayor proporción IgY, lo mismo que factores humorales de la inmunidad innata (como las lectinas ligadoras de mananos, LLM) (Wang (1986). Estos anticuerpos tienen una vida media de una a dos semanas en las aves, si la absorción de la yema es adecuada (Bar-Shira et al., 2005). Kawalilak et al. (2010), demostraron que existe una relación negativa entre la retención del saco vitelino (menor absorción) y el desarrollo de las vellosidades intestinales. Los pollitos con mayor cantidad de yema retenida, desarrollan menor tamaño de las vellosidades, lo que como se mencionó, también retrasa el desarrollo del sistema inmune.

Las aves retadas con antígenos al día de edad no son capaces de desarrollar una adecuada respuesta de anamnesis; mientras que entre los siete y 10 días esto ya es posible. Los antígenos ofrecidos por vía oral antes de los tres días inducen la tolerancia del TLAI (Bar-Shira et al., 2005). La presencia de bacterias, parásitos y virus pueden causar diferentes reacciones del sistema inmune, tanto por la edad del ave, como por la localización en la luz u otros nichos del intestino (proximidad de microvellosidades, internamente a los enterocitos); además de aquellos que pretenden sobrepasar la barrera de enterocitos para alojarse en el interior del ave.

## 2.4 Reconocimiento de los antígenos

Para iniciar la reacción inmune se debe activar un RPR (enterocitos, o TLAI), y a partir de ahí seleccionar el tipo de acciones que seguirá el TLAI. Si el sistema activa un proceso inflamatorio, la primera respuesta es la aparición de heterófilos, que a su vez se asocian con otras líneas (NK, MAC's, LIE), y se inicia una infiltración de la lámina propia, donde también concurrirán células B+. La detección y acción del sistema inmune, no implica la resolución de un problema, pero si puede estar relacionada con la disminución del tiempo que dure la respuesta.

La resistencia por efecto de la edad es muy aparente en las aves (Lillehoj y Chai, 1988; Davison et al, 2008). Los receptores secuestradores (scavengers receptors, SR), son estructuras diversas, conservadas durante la evolución, que pueden ligarse a una amplia variedad de dominios moleculares (He et al., 2009). Pueden ser solubles secretados o unidos a las membranas. Su afinidad varía por determinadas zonas antigénicas en los virus, bacterias y otros organismos, conocidas como patrones moleculares de patogenicidad (PMP). La exposición de células inmunes a estos PMP, y la asociación con los SR, inicia la producción de: óxido nítrico; TNF $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-6; IL-18; IL-12 y la producción de otras citoquinas; así como el aumento de la capacidad fagocítica de las células. La respuesta inflamatoria o tolerante, depende de la clase y asociación de los SR que son activados por el antígeno. Los SR están determinados genéticamente lo que está relacionado con la diferencia encontrada entre líneas de aves para la respuesta inmune a diferentes antígenos.

En las aves se ha determinado la existencia de TLR, al menos 10 de ellos (Brownlie et al., 2011; Keestra et al., 2013; Akira, 2011); y algunos de ellos (TLR 2a, 2b, 3, 4, 5, 7) son ortólogos a humanos. Un receptor, el TLR15, que parece estar relacionado con TLR2, es solo encontrado en las aves. Estos tipos de RPR son proteínas transmembrana. La interacción PMP-TLR inicia una cascada de señalamientos moleculares específicos, que resulta en la transcripción de factores que expresan la inmunidad innata. Dicha reacción varía con el tipo de asociación. Esto es que, la producción de péptidos antimicrobiales; citoquinas pro inflamatorias; quimosinas; interferones; producción de NOs; se incrementó en la expresión de MHC. Otras moléculas coestimuladoras son producidas por las células estimuladas.

Algunos de los TLR más estudiados en aves son:

- a) TLR2: es expresado por un gen duplicado y está direccionado al reconocimiento de diacil-péptidos (micoplasma); ácido lipoteicoico (Gram+); zymosan (producto de las levaduras), y es menos especializado en aves que en mamíferos (Keestra et al., 2013). Se asocia con otros receptores (dectin, TLR1, TLR6) que permiten reconocer otras estructuras como peptidoglicanos, glicolípidos, y otros lipopolisacáridos (efecto dimerizador entre receptores).
- b) TLR4: es un receptor direccionado a los LPS bacterianos, no está presente en la parte apical de los enterocitos, pero sí en la basal ligada a lámina propia (requiere presencia de una molécula coestimuladora conocida como CD14); está más expresado en Macs y heterófilos. Las fallas en este receptor se ligan a la baja resistencia a la infección. La activación de TLR4/MD-2 por la vía TRAM/TRIF activa tempranamente el NFκB con la producción de citoquinas pro inflamatorias, mientras que la activación de MyD88/TIRAP resulta en: un retardo del NFκB, la activación de IRF3 y la posterior producción de Interferones tipo 1. Es posible que una deficiencia en la producción del adaptador TRAM, contribuya a menor presencia de INF-β y mayor resistencia de las aves a un choque por LPS. (Keestra et al., 2013).
- c) TLR5: es asociado a flagelos, su deficiencia aumenta riesgo a *Salmonella*.
- d) TLR3, 7, 8 y 9: reconocen intracelularmente a los ácidos nucleicos en los endosomas.
- e) TLR15: de los pollos, es un componente único contra infecciones bacterianas, que es sensible a proteólisis externa a la célula (Keestra et al., 2013).

Existen otros RPR en aves que incluyen al factor inducible por ácido retinoico (RLR) y los conocidos como NOD (NLR, como el RIG-1 que reaccionan a RNA), presente en patos, no así en pollos de engorda o gallina de postura. Se reconoce que está relacionado con una mayor sensibilidad a la infección por los virus de influenza aviar. Los receptores NOD-similares, RIG-I-similares (Retinoic inducible gene), pueden reclutar adaptadores tales como: TIR; MyD88 y TRIF, que inician la producción de IL de todos tipos (Kawai et al., 2011). Existen interacciones entre los receptores para incrementar la respuesta (por ejemplo, TLR-2 y TLR4 reclutan mitocondrias y aumentan producción de ROS implicados

en la actividad bactericida). La redundancia es un factor importante para la acción del sistema inmune.

Existen grupos de receptores tipo TLR intracelulares, que pueden ser considerados redundantes en el reconocimiento de patógenos, no solo por ser receptores diferentes, sino por estar colocados en ambientes celulares distintos (extra o intracelularmente). La fagocitosis es disparada por: los receptores a manosa; complemento; cadena Fc ; receptor fosfatidilserina y receptores secuestradores, que inician la reorganización del cito esqueleto para endocitar las partículas (Blasius et al., 2010).

El reconocimiento de patógenos se da también por la interacción con otros receptores tipo Lectina, como dectin-1, que están más relacionados con  $\beta$ -lucanos (hongos y levaduras) que activa las vías ITAM y el NF $\kappa$ B (CARD 9); y es importante para reconocer microorganismos como *Candida*, *Aspergillus* y coccidioides (Akira, 2011). El receptor dectin-2, principalmente en MAC's y CD, reconoce estructuras de manosa (deficientes en cápsula), como en *Cryptococcus*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Mycobacterium*, *Hisoplasma* y *Paracoccidioides*. El receptor dectin-1 es transmembrana, reconoce  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1, 6 glucanos (sigue vía ITAM intracelular). Es altamente expresado en Macs y neutrófilos, pero poco en CD y otras células T. La activación de este receptor con zymosan produce la respuesta inflamatoria con TNF $\alpha$  (Brown et al., 2003). Existen respuestas diferenciadas para *S. cerevisiae* y para *C. albicans* (diferentemente expuestos) y no depende de la fagocitosis. Se ha demostrado su presencia en heterófilos y mononucleares de sangre periférica, que aumentan ROS al estimular el receptor dectin-1 con curdlan ( $\beta$ -1,3 glucano), y se bloquea el efecto con la ligadura del laminarin (inhibidor de dectin-1) (Nerren et al., 2009). Sin embargo, la respuesta a los patógenos podría ser distinta (Elcombe et al., 2013), cuando los MACs son activados por zymosan/curdlan, con la producción de IL-10 (activación MSK  $\frac{1}{2}$ ), el receptor se bloquea, entonces se incrementa la producción de IL-12. El ciclo de producción de IL-10 es auto reforzante y será muy importante para disminuir la inflamación en el intestino.

En la posibilidad de dirigir al sistema inmune, mediante el uso de señuelos o adyuvantes, radica la importancia de modular los TLR y los otros sistemas innatos de reconocimiento, no solo para el desarrollo de vacunas, sino para otros fines, lo que ya se conoce como una

terapia real de TLR, ya sea por la activación o por el bloqueo de los mismos activando o desactivando la acción inmune (Dunne et al., 2011).

## **2.5 Células involucradas en respuesta celular al activarse los RPR en el intestino**

La presentación de antígenos se realiza por las células que tienen RPR. Estas células linfoides se producen en la médula y migran al intestino (Ruane, 2011; Hart, 1997). Entre las más importantes se encuentran las CD103+, células potentes presentadoras de antígenos, pero no que son importantes en la destrucción de los mismos.

Se han caracterizado varios subtipos de CD103+. En las aves, como en otras especies, están localizadas en la LP y PP. Las localizadas en LP son CD103+ y CD11c+, pero las intraepiteliales de la parte apical de las vellosidades son CD103- y CD11b+. Estas células tienen la capacidad propiciar la migración de T CD4+ y promover su transformación en: iTreg, Th1, Th2, Th17; lo que permite aumentar en el intestino la respuesta de tolerancia o inflamación (producción de TGF- $\beta$  y ácido retinoico).

Las CD son clave en la identificación y acción contra patógenos por su localización en la mucosa intestinal. Cuando son estimuladas con LPS, las CD103+ incrementan la producción de IL-6 y TNF. Se pueden asociar con las células M en las PP y con el resto de células linfoides en este tejido. Las CD tienen capacidad de pasar entre los enterocitos sin romper las uniones fuertes, puesto que tienen las mismas proteínas de sellado (occludina y claudina). En el caso de las infecciones por hongos, se ha observado que, si bien algunas CD toman el antígeno en el intestino, también lo transfieren a otros órganos linfoides; lo que explica una colaboración entre células migratorias y residentes del intestino (Ersland et al., 2010).

Las CD inician la respuesta innata y adaptativa. Las CD (CD103+, CD11b+), pueden migrar de la LP al epitelio intestinal en casos de inflamación, aumentando la captación del antígeno y la maduración de Th17 en favor de la respuesta pro inflamatoria (Farache et al., 2013). De otra manera, cuando no migran, la producción de interleucinas favorece la vía de Treg, con reacción tolerante. Las CD son más móviles que los macrófagos de la LP.

Los DC se especializan más en Antígenos solubles y los MACs en proteínas de mayor tamaño y microorganismos que logran penetrar la barrera celular. Las CD producen el

factor transformador del crecimiento (TGF- $\beta$ , transforming growth factor beta, en inglés) y ácido retinoico, necesarios para convertir la Tcell en Foxp3+ (Tregs) y promover la diferenciación de células B en células Plasmáticas (CP) productoras de IgA.

La liberación por los enterocitos de la lipoproteína estromal tímica (TSLP, thymic stromal lymphoprotein, en inglés), limita la capacidad de las CD para activar TH17 y TH2 (con menos secreción de IL-12). La vitamina A es un factor primordial de este proceso. Con bajos niveles de la vitamina A, se produce una ampliación de la respuesta inflamatoria vía TH1 por estas células. Los enterocitos afectados por un antígeno secretan quimiocinas que atraen a las CD y estas son las que amplifican la respuesta, dependiendo de las condiciones en el medio (ácido butírico, vitamina A y otros).

Los MACs son importante como presentadoras de antígeno, pero aún más por su capacidad de destruir a los posibles patógenos mediante la producción de ROS (SO, NOS) extra e intra-celularmente (Dietert et al., 1998). También son responsables de la síntesis de tromboxanos, leucotrienos y prostaglandinas (en menor proporción), además de otras funciones inmunorreguladoras. La presencia de estas células en el tejido puede ser porque: 1) proceden directo de la sangre (células de Kupffer en el hígado) o. 2) proceden de la sangre y se multiplican en el tejido (pulmón, intestino) (Qureshi, 2003; Qureshi, 1998). Para propiciar su respuesta, los MACs deben ser enseñados por la exposición a los antígenos o de otra manera, no son activados (falta de exposición a antígenos). La migración a los tejidos dañados solo se da por acción de las señales de quimiotaxis (citoquinas) liberadas por los tejidos. La principal función de estas células es la fagocitosis que se ejecuta por diferentes vías de activación. La fagocitosis de un antígeno es mejor si hay cobertura por anticuerpos, pero otros determinantes (RPR) pueden ser activados en el MAC. Una vez introducido en la célula se forman los fagosomas que son rápidamente degradados por la fusión con lisosomas, y posterior a esta degradación, puede ocurrir la presentación de los antígenos y la producción de interleucinas proinflamatorias. Por ejemplo, la exposición repetida a  $\beta$ -glucanos, amplía la competencia de los MACs para producir diferentes reacciones. Estas propiedades también tienen un componente genético que muestran respuestas más rápidas en unas líneas genéticas que en otras. Factores dietéticos, y en especial las micotoxinas, son capaces de causar problemas en el funcionamiento de los MACs. Los MACs del intestino presentan más receptores para quimosinas CX3Cr1;

receptores tipo Fc-g y CD64 (para aumentar la fagocitosis de elementos cubiertos de anticuerpos e interactuar con células B). Como otras células, también son capaces de producir dendritas transepiteliales (TEDs, trans epitelial dendrites por sus siglas en inglés), que están en contacto con el lumen del intestino, por esta razón en las aves no son claramente definidos las CD. Los animales con deficiencias de MACs maduros también tienen problemas con el número de células Treg y la producción de IL-10. No son tan buenas células presentadoras de antígeno dado que destruyen muy rápidamente estas moléculas, por lo cual los MACs se asocian con otras funciones fagocíticas de limpieza en los tejidos, y no necesariamente con la activación posterior del resto de la respuesta inmune adaptativa.

Los heterófilos son células con alta capacidad de fagocitosis (Genovesa et al., 2013). Presentan varios receptores promotores de la misma: Fig.; anticuerpos y complemento; dectín-1, receptores secuestradores y otros productos no opsonizados como las bacterias (*Salmonella*, y otras). El proceso posterior a la fagocitosis y la formación de los fagosomas es la degranulación; que es necesaria para destruir a los antígenos (a través de enzimas de diferentes tipos). Estas células aviares no son altas productoras de aniones por secretar. La deficiencia de formación y activación de estas células en los primeros días de vida del ave, es la responsable de la mayor susceptibilidad a enfermedades. La expresión de TLR, lectina Tipo-C y dectina-1 (reconocimiento glucanos), permite a estas células reconocer y atacar rápidamente a las bacterias. La *Salmonella* es un fuerte activador de estas células por un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y CXCLi2, pero no del incremento oxidativo). Las aves con heterófilos menos activos son más susceptibles a las enfermedades. La capacidad de respuesta por la vía de iNOS también tiene componentes genéticos, pudiéndose diferenciar líneas altamente reactivas y otras menos activadas (Fathi, 2003).

Los linfocitos T CD4+, seleccionados en timo, son activados mediante presentación del MHCII, tanto por MACs como por CD (Maynard et al., 2009). Se conocen cuando menos 4 tipos de T CD4+: Th1; Th2; Th17 y T reg, que pueden diferenciarse directamente o adaptarse entre ellas como el caso de Treg a Th17 y Th17 a Th1 (cuando hay antígenos intracelulares o parasitarios).

Cada línea de T CD4+ tiene una especialización en la producción de citoquinas y linfocinas. Los Th1, en respuesta a antígenos intracelulares, producen: IL-1, IL-2 e IL-12, y expresan: CCR1 y CCR5. Los Th2 (en el caso de parásitos y otros microorganismos extracelulares) están más relacionados con la producción de: IL-4, IL-5 e IL-13 (lo mismo que NK). Los enterocitos son productores de IL-25 que aumenta el ciclo de producción de los Th2 e inhibe la IL-23. Los Th17 especializados en microorganismos extracelulares, como bacterias u hongos, se asocian a una mayor producción de TGF- $\beta$  e IL-6; producen específicamente IL-17 para el reclutamiento de heterófilos. Existen amplias revisiones sobre el tema, por lo que no se profundizará más sobre el particular en esta tesis.

## **2.6 Interacción celular y producción de mediadores químicos en el intestino**

La respuesta a diferentes antígenos en el intestino tiene diferencias debido a las líneas genéticas y por la susceptibilidad o resistencia mostrada por las aves. Dicho cambio puede ser evaluado por la expresión de ciertos genes que codifican distintas proteínas y enzimas involucradas en el proceso inmune (Hemert, 2004). Para iniciar la reacción inmune, un RPR debe ser activado en la superficie de una célula con estos receptores (enterocitos, o TLA1) y a partir de ahí, seleccionar el tipo de reacción que se desarrollará. Si el sistema procede a través de un proceso inflamatorio, la primera respuesta es la aparición de heterófilos que a su vez se asocian con otras líneas (NK, Macs, LIE) y lo que inicia una infiltración de la lámina propia, donde también concurrirán células B+.

A partir de la acción de una célula presentadora (MACs o CD o enterocitos) otras células del sistema son activadas (Guo et al., 2013). Los linfocitos Th1 se activan principalmente durante la respuesta a enfermedades virales reconocidas por la célula presentadora de antígeno (CPA), restringidas, por lo tanto, a ser intracelulares. Esta célula presenta la proteína específica a una célula no activada (NAIVE) junto con la MHCII y otras moléculas co-estimuladoras. La respuesta de la Th1, depende de las citoquinas presentes en el medio (IFN  $\alpha$ ,  $\gamma$ ; IL-12; IL-18) que promoverán un aumento del número de células en prevención de una dispersión del agente patógeno. La clave de esta respuesta es la producción de IL-12, que es encargada de: la proliferación y aumento de la citotoxicidad de los CTL y NK; y del aumento en la producción de IFN  $\gamma$  (círculo reforzador), siendo sinérgica con IL-2. Las MACs, Kupffer y CD producen también IL-18 (que es proliferativa de T y NK), y coestimula a las células Th1 para producir: IL-2; el factor estimulador de colonias de macrófagos (GM-

CSF) e inducir TNF  $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; CXC y CC quimiocinas. La estimulación conjunta IL-12 y de IFN $\alpha$  estimula la proliferación de las células de memoria CD8+.

La respuesta de tipo Th2, está caracterizada también por la presencia de mastocitos, basófilos, eosinófilos e hiperplasia de células caliciformes. Es generalmente asociada a parásitos y alérgenos en el sistema de las mucosas. La respuesta es mediada por IL-4, que podría provenir de células NKT; el estímulo es dado por la secreción de IL-25 o IL-33, que vienen de las células epiteliales (Koyasu et al., 2011).

La producción de las interleucinas en el intestino, como respuesta a la presencia de un agente, desencadena una serie de efectos en todo el organismo (Johnson, 1997; Spurlock, 1997). Hay al menos tres IL's: IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ , que tienen profundo impacto en el comportamiento neuroendócrino del ave y otros efectos metabólicos (anoréxicos y metabólicos) como: El incremento de temperatura; reducción del consumo y eficiencia del crecimiento; incremento de corticosterona y cambios en la distribución de Zn, Fe y Cu. Se estima que el 70% de la disminución de crecimiento experimentada por las aves ante una infección intestinal es debida al bajo consumo de alimento provocado por estas linfocinas. Estas IL's son generadoras en el hígado de proteínas de la fase aguda, que requieren aminoácidos específicos, lo que incrementa catabolismo proteico muscular para suplir los que son necesarios en la sangre. También se presenta un incremento de triglicéridos plasmáticos (mayor síntesis de lípidos y menos degradación por adipocitos, efecto ligado al TNF $\alpha$ ). Numerosos receptores en el cerebro son activados (efecto anoréxico) con respuesta sobre nervios eferentes y neuroendocrinos. Las IL's podrían afectar directamente terminaciones del vago a nivel del intestino (secreciones gástricas y motilidad). Es importante señalar que otros factores que afectan el crecimiento, como la reducción de hormona del crecimiento (HC), han sido demostrados en ratas cuando son estimuladas con endotoxinas (reducción de secreción pituitaria, mediada por interleucinas). Existen otros efectos relacionados, como lo son también la disminución en la utilización de glucosa, cambios en los niveles de aminoácidos circulantes, oxidación de los mismos y disminución de adipogénesis entre otras reacciones (Spurlock, 1997).

La contención de un agente infeccioso por el sistema inmune, implica la producción de moléculas especializadas en detener la propagación intracelular de algunos de ellos. De aquí que la participación de los interferones (IFN) es crucial en este proceso. Desde el

descubrimiento (en 1957) del interferón como la molécula que estaba involucrada con la resistencia al virus de influenza, se han determinado varias familias moleculares. Por ejemplo: los derivados de mielocitos como IFN $\alpha$ , o de fibroblastos IFN $\beta$ , son los I IFN. Los formados por las células TI y las NK como parte de respuesta inflamatoria son los II IFN (IFN $\gamma$ ). Los IFN sintetizados por células infectadas por virus, son necesarios para detener la propagación intracelular del agente infeccioso. El tipo II IFN, secretado por los Th1, activa a los Macs y hace retroalimentación positiva sobre los propios Th1, incrementando la presentación de MHC, IL-12 y la producción de superóxidos y NO. El IFN es reconocido por un receptor, traducido y posteriormente (por una serie de genes inducidos por su presencia), son transcritos, aumentando la producción de proteínas antivirales. Es muy importante en la respuesta a agentes conocidos en avicultura como la *E. coli* y coccidiosis (Guo et al., 2013).

## **2.7 La reacción inmune del intestino en conjunto sobre un agente infeccioso.**

### **2.7.1 Modelo en infecciones por coccidia**

Como ejemplo de esta reacción se tomará en esta tesis, el curso de una infección por coccidias. La presencia de *Eimeria spp.* en el intestino causa una respuesta del TLAI que está influenciada por la dosis y el tipo del propio parásito. Cuando el ave ha podido desarrollar una respuesta inmune previa al parásito, este se rechaza entre las 8-72 horas posteriores al reto, lo que resulta muy importante en la crianza moderna de aves. Sin embargo, esta situación implica una exposición anterior del sistema inmune, y es en esta primera reacción en la que se centrará el análisis de la respuesta inmune intestinal.

La presión de selección para mayor productividad ha repercutido también en los cambios en resistencia de las aves a esta y otras enfermedades. Dada la complejidad del ciclo reproductor del parásito, son necesarias la intervención de diferentes esquemas de inmunidad por parte del animal, y el entenderlas permitirá crear mejores estrategias de control. Existen implicaciones en la producción de IgA e IgY y la activación de la respuesta mediada por células, que será definitiva en el control de las infecciones primarias y subsecuentes con el parásito (Lillehoj y Okamura, 2003). De este conocimiento se pueden derivar estrategias como las vacunaciones con células íntegras (atenuadas o de campo) o

fracciones de las coccidias; inmunoglobulinas específicas; lectinas y otros adyuvantes de la respuesta inmune.

Los animales atímicos son mucho más susceptibles a la infección por coccidia y no generan defensa a las reinfecciones. Los linfocitos esplénicos o sanguíneos de aves normales, son capaces de transferir resistencia a las aves inmunosuprimidas. Las drogas inmunosupresoras, como la ciclosporina o las micotoxinas, reducen la capacidad de resistencia del ave a la infección. Sin embargo, aunque la actividad anticoccidial es demostrable, no se transfiere la capacidad de resistencia cruzada a las infecciones, situación que no ha sido entendida. Es decir, se podría tener inmunidad a coccidias en la parte anterior del intestino, pero no necesariamente en la parte media o posterior, situación que, en la práctica, complica mucho la atención de los casos clínicos. Existe una migración celular de linfocitos que acarrean el parásito del epitelio a las criptas y otras zonas del intestino, ya sea por fagocitosis o porque son invadido por los esporozoitos. De esta manera, el control de la infección debe hacerse no solo a través de la eliminación de los esporozoitos del medio, sino permitiendo mayor eliminación intracelular de los mismos.

La acción de las células citotóxicas es indispensable para el control a largo plazo de la infección (Juárez, 2009). Es importante señalar que la respuesta mediada por células es muy activa en animales previamente infectados, y la velocidad de respuesta es determinante para conferir la inmunidad, pero esta respuesta secundaria solo se da para las mismas especies de *Eimeria* previamente expuestas al huésped (Rose et al., 1979). La respuesta a la infección primaria con *Eimeria spp.* Lo que da como resultado mejor respuesta inmune a infecciones secundarias y posteriores. El esporozoito intracelular es el objetivo del sistema inmune, especialmente los linfocitos TCR  $\alpha\beta$  que son indispensables para este fin.

La infección primaria por coccidias induce una variedad de respuestas que incluyen una infiltración primaria de heterófilos, activación de NK, producción de IgA, IgY y activación de células T (Lillehoj y Trout, 1993). Debido a que el ciclo del parásito es muy rápido (7-9 días), la respuesta tiene que ser muy amplia, de manera que evite al máximo las reinfecciones. Se puede observar una rápida activación de CD4+, TCR $\alpha\beta$ - y MHCII, así como la producción de interferón  $\gamma$ . En las aves jóvenes las TCR  $\gamma\delta$ , como las células LEI, se ven alteradas por la infección, sin embargo, es la población de CD4+ la relevante para

resistir a la misma. La caída en la presencia de CD8+ parece mejorar la respuesta, posiblemente porque no hay el mismo transporte intracelular del parásito a otras partes del intestino. En aves resistentes, el proceso de infiltración es casi igual en número de CD4+ y CD8+.

No ha sido bien caracterizada la participación de las células B+ en la infección primaria con la producción de IgA y otros factores solubles innatos (LLM). El mecanismo inmune se adopta principalmente alrededor de los esporozoitos (Pascual, 2011). El factor decisivo se encuentra en el bloqueo de los esporozoitos para evitar que pasen de la IEL a la lámina propia a formar esquizontes, es decir, que no puedan reproducirse en las criptas. En las aves resistentes, la infiltración leucocitaria es mucho más rápida que en las susceptibles. Se encuentra una alta producción de IL-1 $\alpha$  después de la infección de cualquiera de las especies importantes de coccidia para el pollo de engorda. Esto incrementa la producción de linfocinas por los Th1, especialmente interferones. La producción de IgA es mayor en relación a las de IgY e IgM a partir de la segunda semana de la infección. La respuesta a largo plazo está mucho más ligada a la inmunidad mediada por células. Lillehoj (1987) al observa que la bursectomía hormonal no afecta el desarrollo de la enfermedad en una segunda infección, pero el uso de inhibidores celulares si afecta la respuesta secundaria, independientemente de la cantidad de IgA anticoccidia que se produzca.

Al día de hoy, la respuesta a la infección por coccidias en la producción del pollo de engorda, está siempre ligada a la modulación que ejercen las drogas anticoccidiales incluidas en el alimento. Drogas como el decoquinato ejercen solo efecto directo sobre las coccidias, pero otras como la monensina (ionóforo) ejercen un doble efecto sobre las coccidias y la microflora. Adicionalmente el uso de los antibióticos promotores de crecimiento, ejerce otra presión distinta sobre la microflora y la respuesta inmune (Lee, 2012). Esta interacción podría traer una menor competencia inmune de parte del ave. Sin embargo, se puede demostrar que el uso de ionóforos mejora la respuesta fagocítica celular de las aves en comparación a otras drogas coccidicidas. Ambas clases de drogas presentan una mayor respuesta en la comunidad de CD4+ en los primeros días pos infección que en los controles, mientras que a largo plazo la respuesta en CD8+ es similar. La respuesta en IL-6, IL-17, INF $\gamma$ , TGFB4 y CXCLi2 es mayor con los ionóforos, pero baja en IL-12 con respecto a controles a los 43 días.

Se encuentra menos CPA a los 43 días en las aves que consumieron drogas, sin efectos en el número de células B. La prohibición del uso de ciertas drogas para el control de la coccidiosis, obliga a tener alternativas y por lo tanto, a un mayor entendimiento de la forma en que el organismo se enfrenta a las coccidias (Lillehoj et al., 2004). Después de la infección primaria el número de CD3+  $\gamma\delta$  TCR se incrementa en el tejido afectado (MHCII dependiente), con incremento en la producción de IL-2. Los linfocitos  $\alpha\beta$ TCR no son importantes después del día 6 postinfección. Se reporta también incremento en el número de CD8+ $\gamma\delta$ TCR, con decremento de CD4+ que están relacionadas con la producción de IFN $\gamma$ . Las células NK que disminuyen en la infección primaria, aumentan su número en las infecciones subsecuentes, llegando a ser hasta un 30% del total de CD8+ en el intestino.

Las poblaciones de MACs y heterófilos también aumentan durante la infección primaria, aumentando la capacidad de fagocitar los esporozoitos, reduciendo la infección en las aves resistentes. Durante la infección por *E. acervulina* se detectó actividad de IFN $\gamma$  en tonsilas cecales pero no en duodeno; para *E. máxima* y *E. Tenella* si se detectó en yeyuno y ciegos, mayormente a los 6 días postinfección. Además del incremento en IL-2, otras linfocinas se presentan elevadas en el suero tales como: IL-16 (quimioattractante y estimulador de IL-2); IL-17 (pro inflamatoria; inductora de IL-6); TNF (efectos locales y sistémicos, reducción del apetito); TGF (reparación de tejidos, proliferación de células B); IL-12; IL-6 e IL-1 $\alpha$ . Estos perfiles aumentan en las primeras horas pos contagio modulando la calidad de la respuesta inmune que es sumamente compleja ante este tipo de parásitos.

Existen diferencias entre las etapas infectivas de la coccidia y las Lectinas de superficie que despliegan. Los esporozoitos tienen Lectinas que son diferentes para cada especie, lo que determina el sitio de infección (afinidad de carbohidratos), pero los merozoitos y gametocitos no las tienen. Esto abre la posibilidad de tener una defensa primaria de anticuerpos o lectinas que inhiban a las fases tempranas y disminuyan la infectividad posterior (Strout et al., 1994). Al utilizar una IgA monoclonal se determinó la existencia de una glicoproteína (15-kDa) en la superficie de *Cryptosporidium* que es compartida por varias especies, pero no en todas las cepas probadas (Tilley et al., 1991). El uso de esta IgA por vía oral en ratones redujo en 75% las lesiones por el parasito y 67% la excreción de ocistos. En cultivos de hepatocitos expuestos a esporozoitos de *E. stiedai* se encontró

que algunas lectinas y L-fucosa pueden inhibir el proceso invasivo, pero no la D-galactosa (Omata et al., 1999).

Las diferencias entre los epítopes entre las cepas de coccidias, dirigen una respuesta diferente entre cepas lo que confiere, por tanto, la diferencia en resistencia observada a nivel de campo (Srickler, 2000), que resalta la importancia de las cepas usadas para la vacunación y otros procesos de estimulación inmune. Los linfocitos CD8+  $\gamma\delta$ TCR son improntados por la infección primaria lo que permite su proliferación para detener posteriormente la infección. El papel de las IgA pudiera no ser indispensable para la resolución del problema, pero si para prevenir la invasión del parásito en las células.

Existen cambios en el perfil de células de la LP al disminuir las CD4+ después de la infección primaria y el incremento de CD8+ TCR  $\gamma\delta$  a los 12 días de la infección. La presencia de IL-2 es importante para activar NK y el crecimiento de CD8+TCR $\gamma\delta$ . Las infecciones autólogas incrementan CD4+, más que las heterólogas, sin embargo, la respuesta de CD8+ parece más uniformes independiente de la cepa. Seguida a la infección, el aumento de CD8+ citotóxicos, con producción de citoquinas pro inflamatorias y altas cantidades de IFN- $\gamma$ , se lleva a cabo la secreción de: IL-1; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-8; IL-10; IL-12; IL-13; IL-15; IL-16; IL-17; IL-18; TNF $\alpha$ ; TGF-b1 y GM-CSF. Existe un PAMP (profilin) que el parásito liga al TLR11 y resulta en potente activador de IL-12 en CD de ratón. Las NK producen también NK Lisina. Los MAC's aumentan la producción del factor inhibitorio de macrófagos (MIF) que incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6, IL-8, IFN-g, TNF-a), que son los componentes de la respuesta adaptativa.

La respuesta a coccidias también involucra a las Th17 y la producción de IL-17. Los niveles más altos de IL-17 están relacionados con la mayor producción de b-defensinas y mucinas y la inducción de citoquinas como IL-6, IL-8, GM-CFS. Esta linfocina se incrementa varias veces cuando inicia la infección por *Eimeria* (Min et al., 2013).

Kabel et al. (2006) trabajaron con aves infectadas por coccidia y con virus vacunal de IBVD, aplicados ambos a 21 y 24 días, utilizando virus vacunal D78 y ocistos esporulados. Se realizaron sacrificios de las aves para ver resultados a partir del día 28 y en días subsecuentes hasta el día 44. Se encontraron signos de *E. acervulina* (pero no de otras

coccidias), a los 7 días post infección en todos los grupos. Las lesiones para IBDV fueron aparentes (dentro del margen esperado), en las aves a los 7 días post inoculación. Se observaron títulos de anticuerpos a los 7 días de inoculación. No se encontró interacción de la vacuna con la presencia de *E. tenella*; sin embargo, las lesiones de bolsa fueron más importantes en los grupos infectados por coccidia.

### **2.7.2 La respuesta tolerante**

El intestino debe discriminar las moléculas y microorganismos potencialmente dañinos y en su caso, reaccionar a ellos. La reacción como ya se ha mencionado, puede ser del tipo pro inflamatoria (descrita por ejemplo para las coccidias) pero también puede tener otra respuesta de tipo tolerante, que si bien implica un cambio en las poblaciones de células, la liberación de linfocinas e IgA, no implican por otra parte un proceso inflamatorio (citoquinas y linfocinas en el suero) con el cual se consigue detener la progresión del agente, pero no causar un daño secundario, por ejemplo; pérdida de apetito y peso.

Se reconoce que las aves pueden desarrollar los CD4+CD25+ (Tres), pero no los tipos FoxP3 como en los mamíferos. Sin embargo, cuando son estimulados por antígenos, si pueden producir altas cantidades de IL-10 y TGFβ y no IL-2 (Lowenthal et al., 2013, Davison et al, 2008); este efecto limita a otros linfocitos a través de caminos-contacto dependientes y a través de linfocinas, lo que impide propagar la respuesta adaptativa proinflamatoria mediada por otras CD4+ (Th1, Th2, Th17) (Selvaraj et al., 2013). La IL-2 y su receptor IL-2R son indispensables para el mantenimiento de las Tregs; la molécula FoxP3 reprime a IL-2, lo que mantiene la función supresora de Treg (sin este, las aves son más susceptibles a enfermedades autoinmunes).

La inmunidad de tipo tolerante facilita la supervivencia de las bacterias comensales al inducir anergia inmune contra los microbios comensales. Al menos 15% de los CD4+ son Treg en el intestino de las aves. La diferencia entre la actividad de estas células en patos y gallináceas explica parcialmente porque la Influenza puede o no ser más activa en los segundos. Las células Treg tienen receptores TLR 4, 5, 7, 8 y tienen hasta 30 veces más TLR-2, y 6 veces más TLR4 que las células solo CD4+. Al ser activadas proliferan pero pierden su capacidad supresora y se vuelven anérgicas, recuperando su capacidad reguladora hasta 4 días después de la afección.

El sistema de enterocitos no tiene TLR5 (flagelos bacterianos) y es hipo responsivo a LPS (Barnes et al., 2009). La producción por los enterocitos de TGF $\beta$  e IL-12 en presencia de la micro flora sin citoquinas pro inflamatorias aumenta la diferenciación de Treg. Como la cantidad de bacterias varía en el intestino, es necesario tener diferentes niveles de Treg en distintos nichos del mismo. Los ligandos de TLR9 activan la producción de linfocinas pro inflamatorias en lugar de IL-10, y antagónicamente, el ácido retinoico deficiente, aumenta la producción de IL-10. La infección por coccidias induce la producción de IL-10 y consecuentemente anergia del sistema para facilitar la infección. La infección con *E. máxima* incrementa la relación de CD4+CD25+ en el intestino. La adición de anti IL-10 aumenta la supresión del parásito. *S. enteritidis*, así como otras *Bifidobacterias* pueden incrementar la producción de IL-10 aumentando el tiempo de retención del parásito (Selvaraj et al., 2013).

### **2.7.3 Respuestas no existentes en las aves.**

Las aves presentan diferencias en el sistema inmune en comparación con los mamíferos. La más importante, por ejemplo, es la falta de receptores TLR8 y RIG-I que se especializan en el reconocimiento de RNA de una sola tira (como los de la Influenza aviar), especialmente en galliformes y no en anatis. Se ha observado también carencia de algunos isotipos de Ig, como las IgD o bien la presencia de IgY, que son diferentes de las IgG. Incluso en los patos puede haber IgY truncadas (sin la porción FcR). El transporte y presentación de MHC I es limitado o inexistente, lo que permite que el cambio de uno o dos epitopes, provoque que no sean presentados correctamente a los linfocitos citotóxicos y escapen del sistema inmune. No tienen nódulos linfoides. En cuanto a la información para esta tesis, se tiene claramente una división entre las líneas que reaccionan o no con la producción de LLM (Magor et al., 2013).

## **2.8 La producción de IgA en las aves**

Las cantidades de bacterias pueden variar de entre  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  en el duodeno a entre  $10^{-10}$  a  $10^{-12}$  en los ciegos, que además, cambian en la complejidad de los géneros bacterianos (Cerutti et al., 2008). El intestino aporta a la relación mutualística la alta energía de los alimentos, mientras que las bacterias aumentan la degradación de las partes indigestibles y aportan nutrientes esenciales. En este proceso, también el sistema inmune se desarrolla

para conservar el ambiente y mantener el número constante de la micro biota. En este sentido, la presencia de IgA es la estrategia de protección no inflamatoria más importante del intestino. Las IgA interaccionan con el receptor Ig (pIgR) en la región baso lateral de los enterocitos y son excretadas en forma de dímeros (IgA secretoras). Una vez en el moco, las IgA son capaces de inactivar los RPR pro inflamatorios, evitar la adhesión a las células y facilitar la toma de antígenos por las CD o MAC's pero ya no activar respuesta vía TLR-LLR. Esta limpieza de microorganismos que atraviesan la pared intestinal se favorece al promover la fagocitosis vía FcαRI e IgA receptor en CD, heterófilos o MAC's.

Las PP son los principales sitios para la inducción de células B, debido a la presencia de nódulos germinales y a la proximidad de varios tipos de células (CD, MAC's, T CD4+). Las células DC presentadoras de antígeno en las PP, inician la polarización de Th2 con la producción de IL-4, TSLP (que bloquea producción de IL-12) e IL-10 que es importante inductora de IgA y bloqueadora de Th1 (interferón, TNF, IL-6, IL-1). La presencia de IgA aumenta la captación de antígeno por las células M, reforzando el ciclo de producción de IgA. Otras estructuras como los folículos linfáticos asilados, pueden seguir el mismo patrón de diferenciación, aunque tienen un rol marginal en la respuesta en relación a las PP. Es posible determinar la migración de células IgM+B a la LP que no han sido marcadas en las PP, las cuales pueden efectuar el cambio de isotipo (switch en Inglés) a IgA+ (acción de células CD4+T productoras de IL-10 y otros factores de desarrollo) correspondiendo a una respuesta que también puede ser independiente de células T (que incluye la secreción de BAFF y APRIL por CD, debido a una reacción tipo TLR mediada y promovida por los enterocitos). Esta respuesta si bien existe, no es tan potente como la producida por células T. El desarrollo de una respuesta específica de IgA a un antígeno, toma entre 3-4 semanas vía células B-2 de las PP, mientras que las B-1 de la LP pueden ser activadas más rápidamente.

La producción de IgA intestinal es un proceso complejo que depende de la maduración de células B en CP. Todas las células B son MHCII+, CD19+ pero van desarrollando otros receptores como CD22 y CD20 cuando ya han logrado diferenciarse en una línea productora de IgA. Las células B en las aves principalmente se diferencian en la BF en los primeros días de vida del ave (Davison et al., 2008). Estas células mueren si se exponen inmaduras al antígeno. Las células B maduran en órganos linfoides secundarios donde aún

expuestas a antígenos se vuelven activas plasmáticas. Se reconocen dos tipos de células B (B-1 y B-2). La presencia de IL-15 producida por MAC's y enterocitos (utiliza receptor de IL-2) es indispensable para lograr la respuesta de IgA por células B-1 en mucosas, y esto es más activo en ellas que en las B-2 (Hiroi et al., 2000).

De acuerdo con su afinidad, es posible reconocer dos tipos de IgA. Las de baja afinidad tienen que ver con el bloqueo de la adhesión de la microflora a las células intestinales, confinando a los microorganismos (producidas principalmente por las B1). y las de alta afinidad, que inactivan microorganismos y toxinas producidas por una vía T-dependiente principalmente en las B2 (Cong et al., 2009). Las IgA de baja afinidad también neutralizan antígenos para que no estimulen la mucosa. Así mismo, son mediadoras de la transcitosis de micro flora en las células M. La cantidad de micro biota es directamente correlacionada con las IgA (animales libres de microbios, tienen baja cantidad de IgA).

Ambas vías son dependientes de TGF- $\beta$  y ácido retinoico aunque no se reconoce el sitio de secreción de estos factores. Estos factores son principalmente formados por las Treg, que también secretan otro cofactor para mantener la supervivencia de las células B IgA+ en la LP, razón por la cual la disminución de células Treg, disminuye la producción de IgA al disminuir el número de células B activas, especialmente del tipo B2 y no las B1. Resulta entonces determinante la activación de Treg para mantener una respuesta inmune correcta a ciertos antígenos, situación que podría no darse en algunas condiciones pro-inflamatorias. La supresión de la inflamación por las células Treg (vía IL-10 o activando producción de IgA para evitar la adhesión de micro biota a las CPA), resulta un buen mecanismo de la evolución para aumentar la resistencia a los patógenos e incrementar la capacidad digestiva del huésped.

Las CD no destruyen totalmente a algunos microorganismos por varios días, esto permite a estas células inducir, de mejor manera, la producción de IgA y los subsecuentes efectos de los mismos en el sistema al introducirse en las PP (Macpherson et al., 2004). Estas CD son restringidas a la LP, lo que asegura solo una respuesta local al antígeno. Kunisawa (2012) mostró que la comunidad de bacterias en la PP es diferente de la encontrada en la luz intestinal o en el epitelio. La deficiencia de PP disminuye también la capacidad de formar IgA contra antígenos particulados por vía oral; sin embargo, esto no sucede con los antígenos solubles. En humanos se ha encontrado que bacterias como *Alcaligenes* son

encontradas en las PP, mientras que no otras como las SFB. La presencia de *Alcaligenes* en CD de PP, incrementa la producción de IgA, IL-6 y TGF- $\beta$ . Estas bacterias entran a las PP al estar totalmente cubiertas por IgA (que no causan destrucción de la bacteria). Para que las CD promuevan la producción de IgA es necesaria la presencia de TGF-b y RA (Massacand et al., 2008). Los factores BAFF y APRIL pueden inducir a las B2 a producir IgA en ausencia de CD40 y LPS como coestimuladoras (Macpherson et al., 2000). Cerutti (2008b) demuestra que no solo en focos linfoides o las PP se pueden formar las IgA, dado que pueden existir células B secretoras en la LP activadas por los mecanismos ya descritos. Las CD provenientes de ratones libres de microflora, fueron poco activas promoviendo la formación de IgA, lo que demuestra la importante participación de las bacterias en modular la función de las CD.

Benkert et al. (2011) utilizando aislamiento celulares de humanos, demostraron que al menos 25% de los plasmoblastos que son productores de IgA e IgG son polireactivos, es decir: la mayoría son antigénicamente específicos, pero las Ig pueden también tener afinidad cruzada. Todos los anticuerpos muestran los arreglos debido a la selección monoclonal de células B-específicas. Los pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino, presentan micro flora no convencional, lo que muestra que en condiciones normales se monta una inmunidad específica (muy baja reacción cruzada también) y fuerte en contra de la flora comensal y en su caso de otros patógenos. Van der Waaij et al. (1996) determinaron en humanos sanos, la capacidad de la respuesta inmune del intestino grueso en la que se demostró que entre un 24-74% de las bacterias, tienen alguna IgA (menos IgG o IgM) adherida, lo que significa que estas bacterias no son removidas de la luz por este sistema, pero ya no pueden adherirse o penetrarlo. Adicionalmente es posible encontrar también una micro flora a la que las IgA no tienen reacción alguna. Ambas reacciones de la respuesta se muestran en individuos sanos sin inflamación de la mucosa. Se estima que cantidades de hasta 2.5 g/día de IgA son producidas en humanos, pero no todas las bacterias son recubiertas por ellas. La falta de respuesta antigénica por algunas bacterias, no está bien explicada, aunque puede depender mucho más de una falta de respuesta específica del sistema inmune. Por otra parte, el que las bacterias estén recubiertas pero no inactivas, implica que la IgA solo es una forma de controlar el nicho que usa la bacteria y no una forma de destruirla, como meta del ataque del sistema inmune.

Lee et al. (2009) observaron una reducción de lesiones y excreción de ocistos en aves utilizando anticuerpos IgY hiperinmunes contra diferentes coccidias obtenidos de purificación de yema de huevo de aves inoculadas. La adición a la dieta comprueba que es posible realizar una inmunidad pasiva a la coccidia, aprovechando las condiciones especiales de la infectividad de los esporozoitos.

Existen otros factores humorales innatos, como las Lectinas ligadoras de mananos, que no han sido estudiadas en cuanto a la manera en que participan dentro de la inmunidad del intestino, tanto posiblemente atacando a la micro flora comensal, como a la que invade el tejido. Este tema será tratado en otro capítulo.

## **BIBLIOGRAFÍA CAPITULO II**

**Akira S.** 2011. Innate immunity and adjuvants. *Phil trans. R. Soc. B* 366:2748-2755

**Artis D,** Wang ML, Keilbaugh SA, He W, Brenes M, Swain G P, Knight PA, Donalson DD, Lazar MA, Miller H RP, Schad GA, Scott P, Wu GD,( 2004). RELMb/ FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *PNAS* 101 (37) 13596-13600

**Bar-Shira E,** Friedman A. 2005. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *Israel J. Vet. Med.* 60(2):42-50

**Barnes MJ,** Powrie F, (2009), Regulatory T Cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 31:401-411

**Blasius AL,** Beutler B, (2010). Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* 32:305-316

**Benkert J,**Schmolka N, Kreschel C, Zoller MJ, Sturm a, Wiedenmann B, Wardemann H (2011) The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablast in the human gut are antigen-specific. *Jour. Clin. Inves.*121(5)1946-1955

**Brown GD,** Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of b-glucans. *J. Exp. Med.* 197(9):1119-1124

**Brownlie R,** Allan B. 2011 . Avian Toll-like receptors. *Cel Tissue Res.* 343:121-130

- Cheema MA**, Qureshi MA, Havenstein GB, 2003, A comparison of the immune profile of commercial broilers strains when raised on marginal and high protein diets. *Int. Jour. Poult Sci.* 2(5):300-312
- Cerutti A**, Rescigno M. (2008) The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28(6):740-750
- Cerutti A** (2008) The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol* 8(6):421-434
- Collet S.R.** (2012) Why the avian enteric tract respond the way it does. Arkansas nutrition conference . 5-sept
- Cong Y**, Feng T, Fujihashi K, Schoeb T, Elson CO (2009) A dominant coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *PNAS.* 106(46):19256-19261
- Cuperus T**, Coorens M., van Dijk A., Haagsman H.P. 2013. Avian host defense peptides. *Develop and Comp Immun.* 41:352-369
- Davison F.**, Kaspers B., Schat K.A. (2008) *Avian immunology.* Elsevier Ltd.
- Dunne A**, Marshall NA, Mills HG,( 2011), TLR based therapeutics. *Current Opinion in Pharm.* 11:404-411
- Dietert R.R**, Golemboski K A. 1998 . Avian Macrophage Metabolism. *Poult. Sci.* 77:990-997
- Elcombe SE**, Naqvi S, Van den Bosch MWM, Mackenzie KF, Cianfanelli F, Brown GD, Arthur SC, 2013. Dectin-1 regulates IL-10 production via MSK 1/2 and CREB dependent pathway and promotes the induction of regulatory Macrophage markers. *PLOS ONE* 8(3):1-15
- Ersland K**, Wüthrich M, Klein BS. (2010) Dynamic Interplay among Monocyte-derived, Dermal and Resident Lymph Node Dendritic Cells during the generation of vaccine immunity to fungi. *Cell Host & Microbe* 7:474-487
- Farache J**, Zigmond E, Shakhar G, Jung S. (2013) Contributions of dendritic cell and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunol. Cell Biol.* 91:232-239
- Fathi MM**, Ali R.A., Qureshi MA, 2003. Comparison of immune responses of inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) hyper and hypo-responsive genotypes of chickens. *Int Jour. Poul. Scie.* 2(5):280-286

- Forder REA**, Howarth GS, Tivey DR, Hughest RJ (2007) Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. *Poult Sci* 86:2396-2403
- Friedman A**, Bar-shira E (2005) Effects of nutrition on development of immune competence in chicken's gut-associated lymphoid system. *Feedinfo* . 16/08/2005
- Genovese KJ**, He H, Swaggerty CL, Kogut MH, 2013. The avian heterophil. *Devp and comp. immune.* 41:334-340
- Gill N**, Wlodarska M., Finlay BB .2010. the future of mucosal immunology: studying an integrated system-wide organ. *Nature immunology.* 11(7) 558-560
- Guo P**, Thomas JD, Bruce MP, Hinton TM, Gean AGD, Lowenthal JW. 2013. The chicken Th1 response: potential therapeutic applications of ChIFN-g. *Dev. And Comp. Imm.* 41:389-396
- Hart DNJ**, 1997 Dendritic Cells: unique leukocyte population which control the primary immune response.
- He H**, MacKinnon KM, Genovese KJ, Nerren JR, Swaggerty CL, nisbet DJ, Kogut MH.2009. Chicken scavenger receptors and their ligand-induced cellular immune responses. *Mol. Immun.* 46:2218-225
- Hermet van S**, Hoekman A J, Smits M A, Rebel JMJ,(2004), differences in intestinal gene expression profiles in broiler lines varying in susceptibility to malabsorption syndrome. *Poult. Sci.* 83:1675-1682
- Hiroi T**, Yanagita M, Ohta N, Sakaue G, Kiyono H (2000) IL-15 and IL-15 receptor selectively regulate differentiation of common mucosal Immune system-independent B-1cells for IgA responses. *J Immunol.* 165:4329-4337
- Johnson RW**. (1997) Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: An integrated view. *J Anim. Sci* 75:1244-1255
- Juarez MA** (2009) Inmunidad celular e naves domésticas durante la infección con *Eimeria* spp. *Engormix* 15/05/2009
- Kabell S**, Handerberg KJ, Bisgaard M (2006) Impact of coccidial infection on vaccine- and vvIBDV in lymphoid tissue of SPF chickens as detected by RT-PCR. *Acta Vet. Scand.* 48(17):1-22
- Kawai T**, Akira S. (2011). Toll-like Receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34:637-650

- Kawalilak LT**, Franco AMU, Fassenko GM.(2010). Impaired intestinal villi growth in broiler chicks with unhealed navels. *Poultry Science* 89:82-87
- Keestra MA**, de Zoete MR, Bouwman LI, Vaezirad MM, van Putten JPM. 2013. Unique features of chicken toll-like receptors. *Devp and Comp. Imm.* 41:316-323
- Kim J J**, Khan WI (2013) Goblet cells and mucins: role in innate defense in enteric infections. *Pathogens* 2:55-70
- Kunisawa J**, Kiyono H 2012. *Alcaligenes* is commensal bacteria habituating in the gut-associated lymphoid tissue for the regulation of intestinal IgA responses. *Frontiers in Immunology*. 3 article 65:1-5
- Koyasu S**, Moro K (2011) type 2 innate immune response and the natural helper cell. *Immunology* 132:475-481
- Lee KW**, Lillehoj HS, Lee SH, Jang SI, Park S, Bautista DA, Ritter GD, Hong YH, Siragusa GR, Lillehoj EP. 2012. Effect of dietary antimicrobials on immune status in broiler chickens. *Asian-Aust J Anim. Sci.* 25(3):382-392
- Lee SH**, Lillehoj HS, Park DW, Jang SI, Morales A, Garcia D, Lucio E, Larios R, Victoria G, Marrufo D, Lillehoj EP (2009) Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. *Vet. Parasitol.* 163:123-126
- Lillehoj H S**. (1987). Effects of immunosuppression on avian coccidial coccidiosis: cyclosporine A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infection and Immunity*. 1616-1621
- Lillehoj HS**, Min W, Dalloul RA (2004) Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poult Sci* 83:611-623
- Lillehoj HS**, Trout JM (1993) Coccidia: a Review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathology* 22(1):3-31
- Lillehoj H**, Okamura M (2003) Host Immunity and vaccine development to coccidian and *Salmonella* infections in chickens. *Jour. Poult. Sci* 40:151-193
- Lowenthal J.W.**, Bean AGD, Kogut MH, 2013. What's so special about chicken immunology?. *Developmental and comparative immunology*. 41:307-309
- Macpherson AJ**, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM (2000) A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288:2222-2227

- Macpherson AJ**, Uhr T. (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*. 303:1662-1665
- Magor KE**, Navarro DM, Barber MRW, Petkau K, Fleming-Canepa X, Blyth GAD, Blaine AH. 2013. Defense genes missing from flight division. *Dev and Comp Immun*. 41:377-388
- Maynard CL**, Weaver CT. 2009. Intestinal effector T cell in health and disease. *Immunity* 31:389-400
- Massacand JC**, Kaiser P, Emst B, Tardivel A, Bürki K (2008) Intestinal bacterial condition dendritic cells to promote IgA production. *PLoS ONE* 3(7):e2588
- Min W**, Kim WH, Lillehoj EP, Lillehoj HS 2013. Recent progress in host immunity to avian coccidiosis: IL-17 family cytokines as sentinels of the intestinal mucosa. *Develop and Comp. Immun*. 41:418-428
- Nerren JR**, Kogut MH, 2009 The selective dectin-1 agonist, curdlan, induces an oxidative burst response in chicken heterophils and peripheral blood mononuclear cells. *Vet Imm. And Immuno histopat*. 127:162-166
- Oláh I.**, Nagy N. 2013. Retrospective to discovery of bursal function and recognition of avian dendritic cells: past and present. *Develop. and Comp. Immun*. 41:310-315
- Omata Y**, Munene NJ, Rodriguez ME, Kawano T, Saito A, Toyoda Y, Mikami T (1999) Identification of carbohydrates on *Eimeria stiedai* sporozoites and their role in invasion of cultured cells in vitro. *Tokai J Exp Clin Med* 23(6) 365-371
- Pascual G.**, De Marzi M, Barrios H, De Franceschi M. 2011. Immune mechanisms in avian coccidiosis. *Engormix* 10/20/2011. XXII Latin American Poultry Congress
- Qureshi MA**, (1998). Role of macrophage in Avian Health and Disease. *Poult Sci* 77:978-982
- Qureshi MA** (2003). Avian Macrophage and Immune Response: an Overview. *Poult. Sci*. 82:691-698
- Rose ME**, Hesketh P, Ogilvie BM (1979) Peripheral blood leucocyte response to coccidial infection: a comparison of the response in rats and chickens and its correlation with resistance to reinfection. *Immunology* 36:71-80
- Ruane DT**, Lavelle EC 2011. The role of CD103+ dendritic cells in the intestinal mucosal immune system. Mini review article. *Frontiers in Immunology* 2(25):1-6

- Selvaraj RK.** (2013) Avian CD4+CD25+ regulatory T cells: properties and therapeutic applications. *Devep. And Comp. Immun.* 41:397-402
- Strickler K.** (2000). Immune response of chickens to immunologically-distinct strains of the coccidian parasite *Eimeria maxima*. Thesis. Faculty of Graduate studies. University of Guelph.
- Strout RG,** Alroy J, Lucakcs NW, Ward HD, Pereira MEA (1994) Developmentally regulated lectins in eimeria species and their role in avian coccidiosis. *J Parasitol* 80 (6) 946-951
- Spurlock ME.** (1997). Regulation of Metabolism and Growth during immune challenge: an overview of cytokine function. *J. Anim. Sci* 75:1773-1783
- Sun SF,** Pan QZ, Hui X, Zhang BL, Wu HM, Li H, Xu W, Zhang Q, Li JY, Deng XM, Chen JW, Lian ZX, Li N. (2008) Stronger in vitro phagocytosis by Monocytes-Macrophages is indicative of greater pathogen clearance and antibody levels in vivo. *Poult. Sci* 87: 1725-1733
- Tilley M,** Upton SJ, Fayer R, Barta JR, Chrisp CE, Feed PS, Blagurn BL, Anderson BC, Barnard SM (1991) identification of a 15 –kilodalton surface glycoprotein on sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *Inf. Immun.* 59(3) 1002-1007
- Van der Waaij LA,** Limburg PC, Mesander G, van der Waaij D (1996) In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut.*38:348-354
- Wang Ke-Yi** (1986) Identification of the mayor mannose-binding proteins from chicken egg yolk and chicken serum as immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci* 83: 9670-9674

## **CAPÍTULO III: PARTICIPACION DE LAS LECTINAS LIGADORAS DE MANANOS EN LA INMUNIDAD INNATA**

### **3.1 Generalidades**

A pesar de que la respuesta específica es más efectiva para el control de los patógenos, el tiempo de reacción puede constituir un perjuicio para la vida de los animales. Por esta razón, existen mecanismos de activación del sistema inmune menos específicos pero de reacción más inmediata, que en su conjunto se conoce como: respuesta inmune innata. Dentro de esta respuesta inmune innata se encuentra la activación de líneas celulares (MACs y AN's) (Brown 2003, Qureshi 2003, Willment, 2001); la activación de proteínas hepáticas de la fase aguda, como la proteína C reactiva (reconocimiento de carbohidratos fosforilados) (Culley et al., 2000); y las Lectinas Ligadoras de Mananos (LLM) que reconocen las estructuras ricas en manosa y galactosa de algunas membranas en microorganismos.

Desde el siglo XIX se ha conocido la presencia de factores aglutinadores de eritrocitos (Sharon, 2004), aunque no solo estas células son aglutinadas debido a sus carbohidratos. Las propiedades de aglutinación han sido utilizadas para numerosas pruebas de reconocimiento específico. Estas proteínas se pueden encontrar en animales, plantas y microorganismos. Son fuertes estimuladores de la actividad mitogénica de las células linfoides. Se identifican en animales desde 1952 con los primeros aislamientos en anguilas. Algunas de ellas existen en sitios específicos para el reconocimiento de carbohidratos en algunas de las membranas biológicas (proteínas transmembranales), conocidas como dominios de carbohidratos para reconocimiento (CRD carbohydrate-recognition domain, en inglés), que pueden ser de varios tipos (galectinas, lectina tipo-C). Otras pueden ser de tipo soluble o séricas, denominadas como LLM, que se originan del sistema inmune innato, y sus funciones han sido asociadas con la protección y reconocimiento celular autólogo y exógeno.

La LLM es una molécula con estructura de colágena que es calcio-dependiente (collectina). Es un factor soluble de reconocimiento de patrones de patogenicidad que se liga a manosas y n-acetilglucosamina, GlcNAc que son carbohidratos distribuidos en varios

microbios relevantes para la salud de las aves y otras especies (Brouwer, 2008; Takahashi, 2005).

Presanis et al. (2003) reportan que las LLM están constituidas por una cadena de polipéptidos, la región de carbohidratos de reconocimiento, un cuello hidrofóbico y la región de colágena (tres cadenas estabilizadas por puentes disulfuro). Las LLM pueden existir en formas oligoméricas de dímeros o hexámeros (estructuras tipo tulipán). En su forma circulante se asocian a una MASP's (proteasa de serina) que es indispensable para la activación del complemento por la vía alterna dependiente de  $Ca^{2+}$  (rompimiento de los factores C4-C2 y activación de C3).

La afinidad de la LLM puede variar dependiendo del microorganismo que se trate. En las distintas especies se han reconocido diferencias genéticas para la capacidad de producir las LLM, adicionalmente, el contenido sérico de LLM depende de varios factores como: hora del día de la toma, edad, presencia de infecciones. Al ser una proteína de la fase aguda, su producción más alta se encuentra entre los 2 a 7 días posteriores al reto. Numerosos estudios han mostrado la asociación entre una deficiente producción de LLM y las fallas en el control de algunas infecciones (dependiendo de la especie considerada); sin embargo, también puede ser asociada con la mayor patogenicidad de otros microorganismos, lo que ha desarrollado una controversia sobre un doble papel en la salud de los animales.

Los macrófagos tienen receptores de membrana que pueden reconocer diferentes antígenos (TLR, RTL) en los cuales, estructuras como el MOS, activan la producción de interleucinas y/o la opsonización de las bacterias, hongos, o protozoarios con estos epítopes. La interacción entre las células dendríticas como presentadoras de antígenos y los macrófagos está bien establecida. Por otra parte, la activación de los macrófagos, permite la liberación de interleucinas, específicamente las IL-2 e IL-6, que son capaces de activar a nivel hepático la producción de distintas proteínas de la fase aguda, cuya función será a nivel sistémico, protegiendo al organismo y modulando la reacción inflamatoria en las primeras horas-días de la agresión de un agente patógeno. Spurlock (1997) y Kuhlman (1989) demostraron que la presencia de LLM eleva la opsonización de varios tipos de bacterias con epítopes ricos en manos como la *S. montevideo*.

### 3.2 Lectinas Ligadoras de Mananos en Aves

Sørensen et al. (2006) identifican que la LLM es sintetizada por los hepatocitos. La respuesta *in vitro* de estas depende del nivel de IL-6, dexametasona y el estrés por calor., La producción decrece por la presencia de IL-1 y no es afectada por IFN $\gamma$ , TNF o TGF $\beta$ . En otra evaluación con el mismo tipo celular hepático *in vitro* expuesto a: GH, IL-6 u hormonas tiroideas, estas últimas tuvieron efecto en incrementar la producción de LLM; siendo más potentes la T3 y el GH, que la IL-6. La hidrocortisona, el IGF-1 y la insulina no tuvieron ningún efecto en la producción. El tiempo de respuesta para alcanzar su máxima expresión varió entre 24 a 48 h. Uemura et al. (2002) reportan que la presencia de LLM, también puede ser producida por los enterocitos en el intestino delgado (demostrada por expresión de mRNA), y no solo por los hepatocitos, lo que sugiere una relación importante con la defensa innata del intestino (pudiendo representar hasta el 8% de la activación total).

La LLM ha sido caracterizada en las aves y es un polímero de proteína y carbohidratos de estructura similar a las IgG, sin tener la especificidad de las mismas y parecida en estructura a las ya reportadas en humanos (Laursen, 1995; 1998; 2000). Wang (1986) reporta la existencia de LLM en yema del huevo y describe que en algunas pruebas pueden ser identificados como IgG, lo que refuerza el concepto que las LLM encontradas en la yema vienen del suero de la gallina.

La LLM de aves es capaz de ligarse a los receptores con estructuras tipo MOS presentes en la membrana de los microorganismos, así como a las membranas de las células que han sufrido apoptosis por efecto de una infección. La adhesión se inhibe en orden de potencia por: ManNac > L-fucosa > manosa > N-acetylglucosmina. La adhesión de las LLM es capaz de activar por dos vías al sistema inmune: 1) Las LLM pueden servir como marcadores para la opsonización de microorganismos o células muertas frente a los macrófagos y linfocitos activados en forma inespecífica, lo que permite una respuesta inflamatoria de mayor amplitud (Nielsen, 1999); 2) Las LLM pueden activar la fijación de complemento por la vía alterna (proteína C3) asociadas a una proteasa de serina (MASP), lo que igualmente permite incrementar en forma significativa la capacidad del sistema inmune innato para detener las infecciones (Linch, 2005; Norup, 2007);.esta activación es mayor que la iniciada por IgG. La falla de este sistema en humanos ha sido asociada a procesos infecciosos crónicos o a padecimientos que no responden adecuadamente al uso

de antibióticos en el intestino (Seibold, 2007). Nielsen et al. (1998) encuentran, cuando las aves no son infectadas, la presencia de LLM en hepatocitos en el centro de las tonsilas cecales, pero en ninguno de los otros tejidos muestreados (músculo cardiaco, riñón, cerebro, timo, glándula adrenal, BF, medula adrenal, tráquea). En aves infectadas por ILTV, se presenta una mayor tinción en los hepatocitos (sitios de producción) y en la superficie y citoplasma de las células infectadas. La misma reacción sucede en la infección experimental de IBDV; sin embargo, la presencia de LLM solo se detectó en células del intersticio y el citoplasma de MACs del bazo y no en la BF. El hígado es el órgano de producción y las LLM se desplazan hacia los órganos en función del tipo de infección.

Laursen et al. (1998) en 308 muestras de diferentes aves (14 líneas genéticas) identificaron un rango de LLM de entre 0.4 y 37.8 mg/ml en una distribución tipo Xi. Ninguna de las aves fue encontrada como nula a LLM. Las LLM se pueden encontrar desde el día 10 de incubación, y al momento de la eclosión, los niveles ya son parecidos a las de aves adultas. Los niveles se mantienen estables en la primera semana y luego se pueden observar aumentos y disminuciones. Las aves pueden ser divididas en bajas y alta productoras de LLM, lo cual tiene un componente genético heredable.

Aunque la respuesta es inmediata, el mayor nivel sérico de LLM pos infección ha sido determinado a los 3 a 4 días y desaparece paulatinamente en los siguientes 5 a 6 días. La mayor producción de LLM se correlaciona negativamente con los títulos de IgG originados por la infección. Se ha propuesto como explicación que la capacidad de la LLM para neutralizar virus no hace necesaria otro tipo de respuesta inmune (Kase, 1999). Wang et al. (2011) demuestran que los LPS que regularmente inducen la respuesta inflamatoria, pueden ser inhibidos por la LLM y reducir la maduración de monocitos hacia CD que puedan producir interleucinas pro inflamatorias. Se ha relacionado también la presencia de LLM como un agente que puede inactivar al virus de Influenza, que representa una de las amenazas de salud actuales más importantes en la avicultura (Lillehoj, 2007; Kase, 1999). También las LLM están asociadas a la respuesta a la infección por Micoplasmas. En humanos con infección por estas bacterias, dos terceras partes de los infectados fueron deficientes en LLM. Estas moléculas pueden determinar la menor invasividad del microorganismo. Sin embargo no se pudo demostrar que se adhieren a todas las cepas evaluadas (Hamvaas et al., 2005).

En las aves se encuentran rangos muy amplios de producción natural de la LLM detectada en sangre (5-37 mg/ml) que no están ligados a la estirpe (Kase, 1999). Nielsen (1999) muestra que los niveles de LLM en aves infectadas por IBV pueden incrementarse de 6 a 12 mg/ml y esta concentración puede tener un pico entre los 3 a 7 días. Para la infección con ILTV, el pico es más temprano entre 3 a 5 días. Lo que muestra que es congruente con su acción como proteínas de la fase aguda. Los niveles regresan a la normalidad entre 6 a 10 días después del pico. Schou et al. (2010) relacionan los altos niveles séricos de LLM con una menor susceptibilidad a la infección por *P. multocida* sistémica.

Juul-Madsen et al. (2011) mencionan que la respuesta a virus de Bronquitis infecciosa en aves, es modificada de acuerdo a la capacidad o no de respuesta en LLM. Se demuestra también que, el virus cultivado previamente con LLM de pollo, cambia el tipo de respuesta de las células T circulantes, con lo que se obtienen diferencias en los títulos de anticuerpos. Juul-Madsen et al. (2003) menciona que el grado de respuesta a la infección por IBV está determinado por si esta ocurre en la mañana (12 sin luz) o por la tarde (12 con luz); los tiempos de respuesta son distintos (3.1 días vs 4.6 días, respectivamente). Esta situación también afecta los títulos finales obtenidos en el suero en contra de la infección, encontrándose hasta un 35% menos de IgG en los animales sin actividad antes del reto (mayores niveles de LLM), lo que está relacionado con la capacidad de las LLM de inactivar (vía complemento) al virus, y por lo tanto, no causar el mismo efecto sobre el sistema inmune. Juul-Madsen et al. (2007) demostraron que las LLM están positivamente relacionadas con la disminución de la propagación del virus de IBV en la tráquea y que esto está ligado a la activación de complemento. Las líneas genéticas con baja producción de LLM son más susceptibles a la infección.

Norup et al. (2009) estudiaron en gallinas el comportamiento de diferentes líneas, encontrando diferencias de 2 a 3 veces en la concentración basal de LLM entre líneas. Durante el seguimiento del trabajo en gallinas de postura, suceden dos elevaciones durante la crianza, a las 5-7 semanas, y a las 18-19 semanas (que corresponden a eventos como aparición de coccidias y el inicio de la postura respectivamente). En condiciones normales se presentan niveles estables por varias semanas. En otra parte de la investigación, se probó el efecto del nivel basal de LLM (alto o bajo productor genéticamente seleccionado). Cuando las aves fueron retadas con IBDV (vacunal) y *E. coli*, se encontraron valores más

bajos de peso en las aves con menor nivel de LLM. Los valores de sero-conversión a *E. coli* fueron más bajos en los grupos con nivel alto de LLM, pero con pesos más altos. Existieron diferencias en las lecturas de CD4+ y CD8+ en los animales con bajas LLM en comparación a los de altas LLM.

### **3.3 Participación de las LLM en la respuesta inmune contra diferentes enfermedades**

Van Asbeck et al. (2008) muestran que la respuesta a microhongos, (como *C. Albicans* o *C. parapsilosis*), en humanos neonatos, se presenta una disminución de las infecciones derivadas de la actividad de LLM. Las LLM son cruciales en el mecanismo de fagocitosis de estos microhongos, dicho efecto fue semejante para *S. aureus* o *E. coli*.

La lectina desencadena el depósito de complemento, un importante apoyador de la fagocitosis. El efecto de opsonina solo ocurre en presencia de complemento y tiene poco efecto sobre bacterias G-. Brouwer et al (2008) reportaron hallazgos similares al buscar afinidad de LLM y opsonización in vitro de levaduras o subproductos (que si se mejora su opsonización por neutrófilos) en relación con *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *E. coli*, que no presentaron modificaciones del patrón de opsonización. Valdimarsson et al. (1998) utilizaron LLM de humanos para incrementar la actividad fagocítica de linfocitos humanos y restaurar su capacidad de defensa contra algunas infecciones. Lu et al. (1990) reportaron que las formas penta y hexaméricas son las que mejor reaccionan para activar complemento en presencia de zymosan, lo que indica una diferente afinidad dependiente de la forma de la LLM. Lee et al. (1983) utilizando hepatocitos de ratón mostraron que la estructura con mayor cantidad de residuos de Gal y de formas ramificadas complejas, son más afines a la LLM. Meenashi et al. (2001) reportan que debe existir alta homología de la región de colágena de la LLM con el C1qA para que se produzca una buena estimulación de la fagocitosis; por lo que no todas las lectinas pudieran ser activadoras de este proceso. Mac Donald et al. (2010) determinaron que la acción de las LLM sobre las células dendríticas en presencia de monocitos es un factor que permite la maduración de estas células e incrementa su capacidad de producir IL-1- $\beta$  y IL-6, TNF $\alpha$  in vitro.

Fuller y McDougald (2002) indican que, debido a que en las membranas de varios de los eucariotes existen proteínas glicosiladas complejas, estas son empleadas para determinar algunas interacciones (adherencia, activación de genes y otras). Los esporozoitos utilizan

estas moléculas para poder iniciar la infección celular; sin embargo, esta puede ser disminuida *in vitro* por el uso de ciertos carbohidratos o bien por distintas lectinas de origen vegetal. Se ha demostrado que diferentes tipos de lectinas pueden ligarse a estructuras diferentes extras e intracelulares de los esporozoitos de *E. Tenella*, ricas en N-Acetilgalactosamina, L-Fucosa, manosa, chitina, ácido siálico y galactosa. La Concanavalina A y otras lectinas dependientes de manosa lo hacen con afinidad mediana o moderada. Algunas lectinas ni siquiera son capaces de adherirse. Si bien este efecto *in vitro* tiene un valor de reconocimiento para fines de investigación, es posible pensar que se presenten efectos *in vivo* por la presencia de LLM en algunos animales. Alroy et al. (1992) obtuvieron una patente para la prevención de coccidiosis en animales utilizando una serie de lectinas y otras glicoproteínas administradas por vía oral. Hasta el momento no se ha demostrado la afinidad *in vivo* de la LLM de animales ante estos parásitos.

Cedzynski et al. (2004) encontraron que la deficiencia de LLM en niños se puede asociar con enfermedades recurrentes de las vías respiratorias. A pesar de encontrarse una alta dispersión de los datos intramuestra (debido a las diferencias genéticas que controlan la producción de LLM), es posible encontrar diferencias de entre 30-50% menos LLM en los más susceptibles, asociadas o no a otras enfermedades inmunes (entre otros, alergias o defectos de la inmunidad celular). Christiansen et al. (2009) asocian en mujeres, problemas de aborto en el segundo tercio de gestación con la baja producción de LLM. Kase et al. (1999) demostraron *in vitro* la capacidad de las LLM de inhibir la infección por virus de Influenza (H3N2) al cultivarlo en presencia de ellas. La utilización de EDTA y manosa evitó la neutralización. La neutralización de la infectividad es reversible y no daña directamente al virus, sino a su capacidad de ligarse a otras células. Takahashi et al. (2011) reportaron mayor daño vascular (coagulación diseminada) *in vivo* en animales infectados por *S. aureus* con deficiente producción de LLM. Peterslund et al. (2001) demostraron una asociación entre la mayor susceptibilidad a infecciones entre pacientes que han recibido quimioterapia contra leucemias y que tienen bajos niveles de LLM en relación con los pacientes con niveles normales. Messias et al. (2005) confirman la apreciación de que la mayor susceptibilidad de pacientes deficientes de LLM es con la infección por *M. leprae*. Takahashi et al. (2011) encontraron que la respuesta innata mediada por las LLM y la proteasa de serina asociada, están relacionadas con la reacción primaria para detener la diseminación de bacterias como *S. aureus*. Este mecanismo permite evitar el aumento de

IL-6 y los efectos asociados con la coagulación intravascular encontrada en los choques sépticos y la falla hepática.

Miranda Santos et al. (2001) mencionan un posible efecto de las LLM, el cual al aumentar el poder opsonico de los monocitos, aumenta la posibilidad de infección por *L. changasi*, liberando mayor cantidad de TNF $\alpha$  e IL-6, lo que le permitiría al parásito modular parte del proceso de la infección (concepto de la espada de doble filo).

Müller et al. (2010) encuentran deficiencias de LLM en humanos con enfermedad de Chron (CD), con un incremento en los títulos de anticuerpos anti-*S. cerevisiae*. Utilizando sulfato sódico de dextrano en ratones con presencia de *C. albicans* o *E. coli*, provocaron colitis, sin conseguir la presencia de LLM local. Sin embargo, los animales con menos LLM, presentaron colitis más fuerte y evidencias de translocación de los microorganismos en los riñones, con mayor seroconversión, que se asocia con una menor capacidad de detener localmente la infección.

Los efectos de las LLM en aves no han sido completamente estudiados. Se desconocen los mecanismos in vivo que desencadenan la producción hepática de LLM bajo diferentes estímulos antigénicos. La reacción que puedan generar agentes antigénicos, (como los productos de levaduras a nivel del intestino), y la producción de LLM no se ha caracterizado; al igual que los posibles cambios en los niveles séricos, provocados por coccidias en el intestino. Ambos aspectos son los objetivos de la presente tesis.

### **BIBLIOGRAFÍAS CAPÍTULO III**

**Alroy J.**, Pereira MEA (1992) Vivo methods for teating coccidiosis. USPatent 5141925. Publication date 8/25/1992

**Arai T**, Tabona P, Summerfield JA (1993) human mannose-binding protein gene is regulated by interleukins, dexamethasone and heat shock. An Int. Jour. Med. 86(9):575-582

**Brown Gordon.**(2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. Journal Exp.Med. 197 no.9:1119-11124

**Brouwer N**, Dolman KM, van Houdt M, Sta M, Roos D, Kuijpers TW (2008) Mannose-binding lectin (MBL) facilitates opsonophagocytosis of yeast but not of bacteria despite MBL binding. J Immunol 180:4124-4132

- Brouwer N** (2008) The role of mannose-binding lectin in vitro and in vivo. *Academisch Proefschrift*. Chapter 1:9-27
- Cedzynski M**, Szemraj J, Swierzko AS, Bak-Romaniszyn L, Banasik M, Zeman K, Kilpatrick DC (2004) Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. *Clin Exp. Immunol.* 136:304-311
- Christiansen OB**, Nielsen HS, Lund M, Steffensen R, Varming K (2009) Mannose-binding lectin-2 genotypes and recurrent late pregnancy losses. *Human Reproduction* 24(2) 291-299
- Culley F**, Bodman-Smith KB, Ferguson MAJ, Nikolaev AV, Shantilal N, Raynes JG (2000) C-reactive protein binds to phosphorylated carbohydrates. *Glycobiology* 10(1) 59-65
- Fuller AL**, McDougald LR (2002) Lectin-binding by sporozoites of *Eimeria Tenella*. *Parasitol Res* 88:118-125
- Hamvas RMJ**, Johnson M, Vlieger AM, Ling C, Sherriff A, Wade A, Klein NJ, Turner MW. (2005) Role for Mannose Binding Lectin in the prevention of mycoplasma infection. *Infect. Immun.* 73(8):5238-5240
- Juul-Madsen H. R**, Munch M, Handberg J, So/rensen P, Johnson AA, Norup LR, J/orgensen PH. (2003) Serum levels of mannan-binding lectin in chickens prior to and during experimental infection with avian infectious bronchitis virus. *Poultry Science* 82:235-241
- Juul-Madsen HR**, Norup LR, Handberg KJ, Jo/rgensen PH (2007) Mannan-binding lectin (MBL) serum concentration in relation to propagation of infectious bronchitis virus (IBV) in chickens. *Viral Imm.* 20(4):562-570
- Juul-Madsen HR**, Norup LR, Jorgensen PH, Handberg KJ, Watrang E, Delgaard TS (2011) Crosstalk between innate and adaptive immune responses to infectious bronchitis virus after vaccination and challenge of chicken vary in serum mannose-binding lectin concentrations. *Vaccine.* 29(51):9499-950
- Kawai T.** (2007) Anti-influenza A virus activities of MBL and bovine conglutinin. *J Vet Med. Sci.* 69(2):221-224
- Kase T.**, Suzuki Y, Kawai T, Sakamoto T, Ohtani K, Eda S, Maeda A, Okuno Y, Kurimura T, Wakamiya N (1999) Human mannan-binding lectin inhibits the infection of influenza A virus without complement. *Immunology* 97:385-392
- Kuhlman M**, Joiner K, Ezekowitz RA (1989) The human mannose-binding protein function as an opsonin. 169:1733-1745

- Laursen SB**, Hedemand JE, Thiel S, Willis AC, Skriver E, Maden PS, Jensenius JC (1995) Collectin in a non-mammalian species: isolation and characterization of mannan-binding protein (MBP) from chicken serum. *Glycobiology*. 5(6) 553-561
- Laursen SB**, Dalgaard, Thiel, Lim, Jensen, Juul-Madsen, Takahashi, Hamana, Kawakami, Jensenius (1998a) Cloning and sequencing of a cDNA encoding chicken mannan-binding lectin (MBL) and comparison with mammalian analogues. *Immunology* 93 (3):421-430
- Laursen SB**, Hedemand JE, Nielsen OL, Thiel S, Koch c, Jensenius JC (1998b) Serum levels, ontogeny and heritability of chicken mannan-binding lectin (MBL). *Immunology* 94:587-593
- Laursen S.B.**, Nielsen OL (2000) Mannan-binding lectin (MBL) in chickens: molecular and functional aspects. *Developmental and Comparative Immunology* 24:85-101
- Lee YC**, Townsend RR, Hardy MR, Lonngreen JL, Arnarp J, Haraldsson M, Lonn H (1983) Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNac lectin. Dependence on fine structural features. *J.Biol. Chem* 258(1) 199-202
- Lillehoj H. S.** (2007) Immunogenomic approaches to study host immunity to enteric pathogens. *Poultry Science* 86:1491-1500.
- Lynch, NJ**, Khan SH, Stover CM, Sandrini SM, Marston D, Presanis J, Schwaeble WJ. (2005) Composition of the lectin pathway of complement in *Gallus Gallus*: absence of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 in birds. *Jour. Immunology* 174:4998-5006
- Lu JH**, Thiel S, Wiedmann H, Timpl R, Reid KB (1990) Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *Journal of Immunology* 44(6):2287-2294
- MacDonald SL**, Downing I, Atkinson APM, Gallagher RCJ, Turner ML, Kilpat DC.(2010) Dendritic cells previously exposed to mannan-binding lectin enhance cytokine production in allogeneic mononuclear cell cultures. *Humman Immunol.*71(11)1077-1083
- Messias LJ**, Boldt ABW, Moraes Braga AC, Von rosen E, Stahlke S, Dornelles L, Pereira-Ferrari L, Kremsner PG, Kun JFJ (2007) the association between Mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm. *J Infect. Dis* 196(9):1379-1385

- Miranda Santos IKF**, Costa CHN, Krieger H, Feitosa MF, Zurakowski D, Fardin B, Gomes RBB, Winer DI, Harn DA, Ezekowitz RAB, Epstein JE (2001) Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral Leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 69(8):5212-5215
- Meenakshi A**, Munoz E, Tenner AJ (2001) Identification of a site on mannan-binding lectin critical for enhancement of phagocytosis. *Jour. Biol. Chem.* 276(46) 43087-43094
- Müller S**, Schaffer T, Flogerzi B, Seibold-Schmid B, Schnider J, Takahashi K, Darfeuille-Michaud A, Vazeille E, Schoepfer AM, Seibold F (2010) Mannan-binding lectin deficiency results in unusual antibody production and excessive experimental colitis in response to mannose-expressing mild gut pathogens. *Gut*.2010.208348
- Nielsen O. L.** Joergensen PH, Hedemand J, Jensenius JC, Koch C, Laursen SB (1998) Immunohistochemical investigation of the tissue distribution of mannan-binding lectin in non-infected and virus-infected chickens. *Immunology* 94:122128
- Nielsen O.L.**, Jensenius JC, Joergensen PH, Laursen SB (1999) Serum levels of chicken MBL during virus infections, indication that chicken MBL is an acute phase reactant. *Vet Imm. and Immunopathology*. 70:309-316
- Norup LR.** Juul-Madsen HR (2007) An assay for measuring the mannan-binding lectin pathway of complement activation in chickens. *Poultry Science* 86: 2322-2326
- Norup LR**, Dalgaard TS, Friggens NC, Sorensen P, Juul-Madsen HR (2009) Influence of chicken serum mannose-binding lectin levels on the immune response towards *Escherichia coli*. *Poult Sci.* 88:543-553
- Peterslund NA**, Koch C, Jensenius JC, Thiel S (2001) Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *The Lancet* 358:637-638
- Presanis JS**, Kojima M, Sim RB (2003) Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochemical Society transactions* 31(4): 748-752
- Qureshi M.A.** (2003) Avian Macrophage an immune response: An overview. *Poultry Science* 82:691-69
- Schou TW**, Permin A, Christensen JP, Cu HP, Juul-Madsen HR (2010) Mannan-binding lectin (MBL) in two chicken breeds and the correlation with experimental *Pasteurella multocida* infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 33(3): 183-195

- Sharon N, Lis H** (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14(11):53R-62R
- Seibold F.** (2007) Association of deficiency for mannan-binding lectin with anti-mannan antibodies in Crohn's disease: a family study. *Inf. Bowel Dis.* May 4
- So/rensen CM,** Hansen TK, Steffensen R, Jensenius JC, Thiel S (2006) Hormonal regulation of mannan-binding lectin synthesis in hepatocytes. *Brit. Soc. Immun. Clin. Exper. Immunolgy*
- Spurlock M.E.** (1997) Regulation of metabolism and growth during immune challenge: An overview of cytokine function. *Journal of Animal Science:* 75: 1773-1783
- Takahashi K,** Ezekowitz AB (2005) the role of the Mannose-Binding lectin in innate immunity. *Clinical Infectious Diseases* 41(S7):S440-445
- Takahashi K,** Chang WC, Takahashi M, Pavlov V, Ishida Y, La Bonte L, Shi L, Fujita T, Stahl GL, van Cott EM (2011) Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. *Immunobiology.* 216 (1-2):96-102
- Uemura K,** Saka M, Nakagawa T, Kawasaki N, Thiel S, Jensenius JC, Kawasaki T (2002) L-MBP is expressed in epithelial cells of mouse small intestine. *J Immunol* 169:6945-6950
- Van Asbec EC,** Hoepelman AIM, Scharringa J, Herpers B, Verhoef J (2008) Mannose binding lectin play a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells. *BMC Microbiology.* 8:229.1-10
- Valdimarsson H,** Stefansson M, Vikingdottir T, Arason GJ, Koch C, Thiel S., Jensenius JC (1998) Reconstitution of opsonizing activity by infusion of Mannan-binding lectin (MBL) to MBL-deficient humans. *Scand J. Immunol.* 48:116-123
- Willment J.** (2001) Characterization for the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol. Chem* 10:1074
- Wang Ke-Yi** (1986) Identification of the mayor mannose-binding proteins from chicken egg yolk and chicken serum as immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci* 83: 9670-9674
- Wang M,** Zhang Y, Chen Y, Zhang L, Lu X, Chen Z (2011) Mannan-binding lectin regulates dendritic cell maturation and cytokine production induced by lipopolysaccharide. *BMC immunology* 12(1):1-10

## **CAPITULO IV MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL INTESTINO POR LA MICROBIOTA**

### **4.1 Generalidades**

Se ha demostrado que existe una amplia influencia de la microbiota en las reacciones del intestino de las aves al igual que en otras especies. Estos efectos en el metabolismo del órgano alteran la respuesta genómica y la inmune. La microbiota desarrolla una serie de acciones para poder mantenerse y reproducirse dentro del intestino. Permanecer en el intestino permite al microorganismo desplegar una serie de enzimas que apoyan el proceso de digestión, que a su vez es aprovechado por el huésped. Son de especial interés los mecanismos por los cuales los diferentes microorganismos pueden adherirse o no a distintas estructuras y lugares dentro del intestino, creando nichos especializados para el microbioma (Collet, 2012).

El TLAI se va capacitando (como ya se mencionó en el Capítulo II), para reconocer diferentes PAMP (ligandos de superficie) y para determinar los tipos de reacción que va a realizar para contener a la microbiota en su nicho y evitar que penetre la capa unicelular de enterocitos. Ningún microorganismo debería estar en la LP, y en caso que la logren alcanzar, los mecanismos inmunes del ave deben ser capaces de retirarlas.

La microflora del intestino es el resultado de numerosos factores, siendo los principales la dieta, así como el tiempo de ayuno (muy común en la crianza de aves), que inducen alteraciones en la comunidad microbiana (Burkholder, 2008). La interacción microbiota-sistema inmune también se afecta por estas condiciones; además de algunos otros factores microambientales (que pueden ser estresores agudos), que alteren profundamente la relación. Sin embargo, ninguno de estos será tratado en esta tesis.

La complejidad de la microflora va aumentando con la edad (afectada por la dieta y la respuesta inmune) (David et al., 2014). En humanos (que se mantienen normalmente en un microambiente), se ha determinado que la microflora intestinal tiende a ser estable por largos periodos de tiempo si no existen agentes externos (por ejemplo antibióticos), que la alteren o condiciones medio ambientales (cambios de lugares, comidas, nivel de fibra de la dieta, entre otros). Esta observación resulta importante porque significa que las aves en

una misma granja, tenderán a criar un micro flora singular propia de este entorno, mientras que el cambio de granja (por ejemplo en aves de postura) implicará acomodamientos de la micro flora diferentes a los ya causados por la dieta. Lu et al. (2003), analizaron la micro flora de aves alimentadas con dietas vegetales y sin aditivos (antibióticos, probióticos y otros), por vía de las secuencias de genes (16SrRNA), encontraron que casi el 70% de la micro flora de íleon son del género *Lactobacilos*, seguido de diferentes cantidades de *Clostridiaceae*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (íleon), y que en los ciegos son *Clostridiaceae* en un 65%, *Fusobacterium*, *Lactobacillus* y *Bacteroides*. Las diferencias también se pueden percibir, de acuerdo a estos autores, por los muestreos a 3, 7 y hasta 28 días, es decir, hay un cambio debido a la edad, como ya fue mencionado.

La micro flora ileal es idéntica a la cecal, hasta aproximadamente el día 14, y a partir de ahí va cambiando notoriamente, lo que determina, como era de esperarse, que la colonización en el intestino va de adelante hacia atrás. Torok et al. (2007), comprueban que la colonización primaria de micro biota en el intestino deriva de su medio ambiente, y principalmente, de la cama. El cambio en la micro biota entre los 2 y 7 días de nacimiento, no se observó entre los mismo animales, sino como referencia a las condiciones donde se les crio (alta o baja densidad de microorganismos). La utilización de diferentes materiales en las camas resultó con efectos diferentes, observando que el mayor efecto diferenciador es el tiempo de vida, ya que hay cambios importantes perceptibles a los 14 y 28 días, independientes del material de la cama. En las camas reusadas fue posible ver cambios de micro flora que no se observaron entre otros 6 materiales de la cama, lo que determina que la cantidad de bacterias también es importante en el proceso de colonización primaria del intestino. Swick et al. (2012) encuentran una relación entre el contenido de la fibra (por el uso de cebada) y el tipo de cama, tanto en la conversión de alimento como en la cuenta de *C. perfringens* (en ambos caso se presentaron reducciones), por lo que proponen el uso de una cama de papel limpio con alta contenido de fibra de cebada como el más benéfico para lograr una mejor colonización de la micro biota, evidenciando la importancia de los productos consumidos en la primera semana en el efecto de colonización intestinal.

Lumpkins et al. (2007) establecen numerosas relaciones simbióticas entre el huésped y la micro flora; la ocupación del ecosistema intestinal implica numerosos mecanismos de adaptación de uno y otro, lo que puede ser utilizado para prevenir enfermedades, mejorar

la integridad intestinal y cambiar algunos metabolitos que influyen sobre el ave. La presencia de bacterias en aves demostró un mejor desarrollo corporal y del intestino en comparación con animales libres de bacterias. La suplementación de diferentes tipos de micro flora como probióticos tiene efectos en las comunidades que finalmente se encuentran en las aves al final del ciclo. Patterson et al. (2003) y Pickler (2011) demostraron que la actividad de micro flora además de ser conducida por los ingredientes de la dieta también puede ser modificada por la presencia de otras moléculas y microorganismos conocidos como prebióticos (moléculas, microorganismo muertos) y probióticos (microorganismos vivos, como *Lactobacilos*, *Bifidobacterias*, y otras). Los mecanismos de esta modificación son muy variados, como la propia competencia de microorganismo a microorganismo por lugares para la colonización (exclusión competitiva), productos que interfieren el desarrollo de la micro flora (antibióticos, aceites esenciales, entre otros), activadores de la producción de moco o de la respuesta de IgA; estas interacciones son el objeto de estudio de esta tesis.

En humanos donde se han desarrollado más algunas observaciones sobre la micro biota, se ha determinado que las perturbaciones en la composición temprana en la micro biota están asociadas con varias de las patologías como el asma y las alergias, y que estas están aumentando en los países del primer mundo (Noverr et al., 2004). Esto ha creado la hipótesis de la higiene, es decir, una falta de exposición normal en la edad temprana a los agentes de la micro biota, como sucede en las dietas altas en antibióticos o con los animales criados en condiciones estériles, tienden a retrasar el tiempo en que el sistema inmune entra en contacto con determinada micro biota, disminuyendo su capacidad de reacción o creando tipos de reacciones no adecuadas para mejorar el desarrollo. Como ya se mencionó, hay cambios debidos a la edad, por lo que puede determinarse la existencia dentro de la micro biota de especies estables (autóctonos o permanentes) y de colonizadores de transición (brevemente adquiridos de forma externa). Los principales géneros de microorganismos estables son: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* y *Lactobacillus*. Algunos aeróbicos (anaerobios facultativos) como *E. coli* y *Salmonella* spp (menos del 3% del total) y *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, más algunas especies de hongos (*C. albicans*). Como cualquier ecosistema, las presiones de selección alteran los tipos de microorganismos en el sistema (antibióticos, dieta, otros microbios) sobre todo cuando la proporción de las bacterias

anaeróbicas benéficas decae e incrementa la de aeróbicas u hongos o anaeróbicas patógenas.

No se consigue tolerancia oral a los antígenos en los animales criados en condiciones estériles. La micro biota aerógena inoculada tiene también correspondencia a la encontrada en intestino, lo que determina también que una inmunidad oral correctamente desarrollada pueda mejorar también la respuesta en vías respiratorias. Por lo tanto, es muy importante entender la relación de la micro biota y el organismo, tanto en condiciones estables como en el desarrollo de patologías potencialmente inflamatorias (Feng et al. (2011). Existe una serie de mecanismos de adaptación en ambos casos, sobre todo de parte de la micro biota que generalmente está bien compartimentalizada en el intestino y que interactúa con las acciones defensivas como las IgA o el moco, presentándose un fenómeno de tolerancia o Ignorancia inmune en algunos casos. Es muy poco probable que el organismo reaccione a los miles de antígenos distintos presentes en la micro biota, pero, ¿Cómo sucede esto?

#### **4.2 Interacción de la micro biota y el sistema inmune**

El intestino desarrolla dos tipos de defensas, una que trata en primer lugar de evitar contacto de la micro biota con los enterocitos, a lo cual la micro biota reacciona evadiendo la respuesta inmune. Por otra parte la respuesta celular se establece una vez que la micro biota se adhirió al epitelio o lo ha penetrado. La mayoría de las bacterias intestinales no desarrollan respuestas mediadas por IgG en su contra, mientras que cuando son inyectadas, los anticuerpos aparecen como en otros casos. Esto sugiere que existe una especie de ignorancia por el compartimiento donde se localiza la bacteria (luz del Intestino); sin embargo, si hay una fuerte respuesta en IgA (que puede ser iniciada con o sin el apoyo de células T, como se describe en otro capítulo de la tesis, Capítulo II). Esta respuesta es confinada a los sitios donde se presenta un cierto tipo de microorganismo.

La respuesta Treg-IgA-micro biota puede ser la clave para mantener la homeostasis ya que al actuar juntas mantienen los patógenos restringidos de una mejor manera que si estuvieran actuando solas cada una. La presencia de Treg (productoras de IL-10 y TGF- $\beta$ ), es importante por su efecto antiinflamatorio. La activación de estas se da por la acción de las células presentadoras de antígeno (DC y MAC's) que ya se ha descrito. La presencia

de anticuerpos en la luz intestinal (que detienen a las bacterias) reduce esta activación, reinstalando la micro flora en su nicho y devolviendo el nivel normal de Tregs en la lámina propia (Nover et al., 2004).

Las CD y los MAC's (caracterizados por tener receptores tipo TLR, CD-14, lectina tipo-C y RIG-I), son encargados de la respuesta rápida a patógenos a nivel del intestino, por lo que son los más involucrados en la respuesta a microorganismos y otros antígenos, lo que es clave para la resistencia a las enfermedades y susceptibles a ser modulados por los productos "nutracéuticos" y las vacunaciones (de Geus et al., 2013). En el caso de la coccidiosis, en los primeros días cuando los esporozoitos no han alcanzado las criptas, el contacto entre MAC's de la LP (y otras células como heterófilos), no impide que la célula sea invadida, sin embargo, reduce el desarrollo del esporozoito ya que hay una alta producción de NO que puede determinarse localmente y en sangre. El uso de diferentes productos en la dieta (betaina, aceites esenciales de plantas), cambia el tipo de respuesta de los MAC's *in vitro* pero no necesariamente a nivel de la luz intestinal.

Los linfocitos T CD4+ son "inocentes" (naives) después de ser reclutados en el timo y su desarrollo posterior en linajes, dependen de las señales que reciben (infecciones intracelulares o extracelulares), y que condicionan a las células cooperadoras (como ya se ha descrito previamente, Mazmanian, 2009). La presencia de algunos microbios en las PP, ayudan a realizar una más fina adaptación de las CD4+T. Estudios en animales libres de gérmenes muestran que sin ellas, se tienen desbalances en los CD4+T y menores proporciones en los segmentos del intestino; más aún, también se ha determinado que no todas las bacterias tienen igual capacidad de estímulo de estas células. Algunos patógenos se distinguen por no causar este tipo de respuestas (tienen mecanismos para evadirla). Las bacterias segmentadas filamentosas (especie del género *Clostridium*), resultan ser el más fuerte inmunógeno para el desarrollo del TLAI y la diferenciación de TCD4+. Las respuestas entre los organismos con flora compleja o con solo los SFB son casi idénticas. Estas últimas, individualmente producen reacciones con liberación de IFN $\gamma$ , IL-10 e IL17; colectivamente se afectan expresiones de otros genes en los linfocitos, sin embargo, aumentar el número de linfocitos en la LP requiere la presencia de mayor número de individuos de la micro biota.

La reacción producida por TH1, con incremento de IL-12 se asocia con la mayor inflamación del intestino, lo mismo que la línea Th17-IL-23 (seguida a la activación de IEL y secreción de IL-6). La plasticidad de las células CD4+ es la clave de la dirección de la respuesta inmune del intestino. El cambio posible de Treg a Th17 en casos de infecciones agravadas, puede ser un sistema de defensa alterno rápido de amplia importancia. La micro flora no patógena regula la presencia de células linfoides como las bacterias segmentadas filamentosas que al aumentar de número aumentan la respuesta de Th17, o bien, otras que pueden estimular (vía TLR-2), la producción de IL-10 por Treg. Estos mecanismos implican activación de DC para producir IL-6 por vía de TLR y no de TCR. Esta reacción puede ser modulada por otras bacterias que no lo harían propiamente, como se demuestra con el uso de un *Lactobacilo* (*E. faecium*), que es capaz de inducir fuerte reacción de producción de IgA (Yasuhiro et al. 2014).

La presencia de vitamina A es esencial para el desarrollo de los linfocitos y la activación de los genes de defensa dependientes de retinol (RIG-I) y también para la modulación del crecimiento de los enterocitos directa e indirectamente (Thurnham et al. 2000; Feng, 2011).

Los enterocitos son una barrera entre los microorganismos y el sistema inmune, cuando hay perturbaciones de esta barrera física, se puede desarrollar también los problemas inflamatorios (Goto et al., 2013). Los enterocitos también dirigen (vía molecular), las respuestas en los linfocitos de la LP, creando un “diálogo” entre ambos. Los animales libres de micro biota tienen PP reducidas y no tienen nódulos linfoides aislados (NLA), como se presentan en los animales normales. Las bacterias G- inducen la formación de NLA (vía NOD receptores), maduros o inmaduros. En estos nódulos se lleva a cabo la producción de IgA (T dependiente o T independiente). Las señales de los enterocitos son necesarias para el desarrollo de las células B que producen IgA y estas dependen de la micro biota presente (los SFB producen más que otro tipo de micro biota), y dependen también de la localización del microorganismo (algunos que aparecen en el colón producen reacción inmune, pero los presentes en íleon no). Los IEL son células T, ricas en TCR  $\gamma\delta$  y son CD8+, reciben señales tanto de la micro biota como de los enterocitos. Esta función de regulación del diálogo la ejercen de varias maneras, afectadas por la presencia de bacterias (los animales libres de micro flora casi no tiene IEL). Los linfocitos en la LP son principalmente células T TCR $\alpha\beta$ , pero los más encontrados en animales libres de

patógenos son los CD4+ Th17 y las Treg. Los Th17 son inexistentes en animales libres de gérmenes, pero tienen un número reducido en animales libres de patógenos específicos (presencia mayor o nula de SFB que interactúan directamente con los enterocitos). Como ya fue mencionado, la colonización y el número de microorganismos varían de la parte anterior a la posterior del intestino y con ello también la población de Treg, que en el colon pueden ser hasta el 50% de las células (regulación de respuesta por la basta presencia de micro flora).

Las células NK son innatas sin TCR variante y responden a los glicolípidos y las no clásicas MHC-I; la relación con la micro biota no está bien definida y así, su papel en la regulación de la cantidad de células presentes. Mantener la separación de micro biota y sistema inmune por los enterocitos requiere de varias adaptaciones como son: 1) secreción de moco y excreción de IgA (ver Capítulo II);2) mantenimiento de uniones fuertes entre células;3) la recepción de señales de la micro flora (a través de los receptores moleculares de patrones: TLR, RIG-I, lectinas), y 4) la secreción de péptidos antibacterianos (tratado en otra sección). La activación por parte de las bacterias de la vía TLR-MyD88 (y posterior activación NF- $\kappa$ B), tiende a incrementar los niveles de inflamación intestinal (formación de los inflamosomas intracelulares), y la apoptosis celular con la pérdida de la barrera intestinal por la secreción basolateral de citoquinas. También, los productos de la micro biota, como los ácidos grasos de cadena corta (butírico, propiónico y acético), son detectados por los receptores moleculares tipo GP43 y GP41 en linfocitos y células enteroendócrinas modificando su respuestas; situación que será desarrollada en la siguiente sección. La micro flora difiere en su capacidad de fermentar el alimento, y por lo tanto, de producir o no estas moléculas. La expresión de MHCII también es regulada por ciertas bacterias, pero no de ciertas moléculas coestimuladora, lo que aún no tiene una explicación clara.

Los patrones de glicolización de los enterocitos también se modifican, y esto crea barreras de adhesión para ciertas bacterias (aumentos o disminuciones de los géneros *Bififobacterium* o *Bacteroides*). Las células en los folículos linfoides asociados (FLA) se modifican también por la presencia de la micro flora, produciendo o no citoquinas para el reclutamiento celular (células T y B). Los datos sugieren que también la secreción de los enterocitos podría regular la expresión de las células B (ya descrito), permitiendo el cambio

de isotipo a la producción de IgA en respuesta a la micro biota (producción de limfopoiatina estromal tímica -TSLP, thymic stromal lymphopoietin-, que estimula la producción de APRIL y BAFF por los Treg), así como otras linfocinas (TGF antiinflamatoria). La IL-25 reprime la producción de IL-22 (Th2), reduciendo actividad de los linfocitos; es decir, los enterocitos no solo forman la barrera física de división entre la micro biota y el sistema inmune, sino que también forman parte activa del sistema que intercambia información entre ellos.

### **4.3 Papel del proceso de fermentación del alimento por la micro biota**

La fermentación de la fibra dietética por las bacterias (Beyer-Sehlmeyer et al., 2003) produce una serie de AGCC y a la degradación de otros compuestos de las plantas. A pesar que los AGCC producidos son múltiples, es el ácido butírico el que tiene mayor efecto no solo en la nutrición de los enterocitos y colonocitos, sino también sobre la actividad del sistema inmune. La producción de butirato está fuertemente relacionada a las bacterias del tipo *Clostridium* (anaerobios altamente sensitivos al oxígeno) que pueden ser provistas por bacterias en la dieta (JMM, 2010). Las bacterias productoras de ácido láctico pueden ser utilizadas para proveer sustrato a los clanes de *Clostridios* involucrados en la producción de ácido butírico (mecanismo de alimentación cruzada). Por otra parte, esto también puede ser logrado por la administración directa de *Clostridios*, como *F. prausnitzii*, u otras bacterias de ese género. Una tercera opción es la inclusión directa del butirato en la dieta. Jørgensen et al. (1995) describen diferencias en la fuente, la dosis de la fibra y el resultado de la fermentación en el intestino, que depende del tipo de bacterias presentes.

Nakamura (2004) incluyó en la dieta FOS a 5% y encontró cambios en la producción de IgA, casi al doble de los grupos no suplementados en todas las secciones del intestino; también se incrementó la expresión del receptor de inmunoglobulina (pIgR) en el íleon. Así mismo, reporta un mayor número de B220+IgA+ en las PP en los grupos que consumieron FOS, lo que puede sugerir un cambio de isotipo mayor para células B, provocado por el tipo de bacterias que se promueven con estas dietas. Le Blay (1999) reportó que la administración de FOS elevaba la cantidad de ácido láctico y de butirato en periodos de más de dos semanas de adición en la dieta. Sin embargo, en ratas en periodos de 8 semanas, la producción de lactato tendió a no verse afectada por el FOS, manteniéndose niveles altos de butirato. Utilizando lactosa en dosis de 2.5% o 4.5% en la dieta de aves retadas con *C. perfringens* fue posible disminuir las lesiones intestinales con relación al

grupo control; sin embargo, no se mostraron cambios claros en la micro flora asociada al tratamiento a los 21 días de edad (*Enterococcus*, *Lactobacilli*, *Clostridium*, *E. coli*) (McReynolds et al., 2007).

Huda-Faujan et al. (2010) reportaron cambios en el perfil de AGCC en las heces de humanos que presentaron colitis con relación a los humanos normales. Los cambios más importantes están en la concentración anormalmente alta de ácido láctico y un marcado descenso de la proporción de butirato, propionato y acetato. El más afectado fue el ácido butírico, que bajó hasta 50% comparado con el nivel del control, situación que podría estar ligada a la patogenia de la enfermedad.

El butirato producido por las bacterias del intestino, incrementa la producción de IL-23 de CD *in vitro* (Berndt et al., 2012). El efecto esta mediado por la activación de las enzimas histona deacetilasas. La activación *in vitro* de CD en presencia de LPS, produjo mayores niveles de IL-23, con reducción de IL-12 (modificación epigenética). El cultivo sin butirato, incrementó la secreción de IL-17 e IL-10; sin embargo, *in vivo*, la administración de butirato no fue efectiva para detener colitis causada por sulfato de dextrano, mientras que la inyección intraperitoneal del butirato si tuvo efecto sobre la presencia de colitis, lo que sugiere que el uso de diferentes rutas puede tener diferentes efectos. Säemann et al. (2000) encontraron resultados similares al utilizar *S. aureus* para estimular leucocitos, produciendo altas cantidades de IL-12 y TNF $\alpha$ , pero esto fue inhibido de manera dosis-dependiente por la presencia de butirato (inhibe secreción del heterodímero IL-12p70), incrementando la expresión de la citoquina IL-10. En ausencia de la estimulación bacteriana el butirato no incrementa la secreción de IL-10 (no utiliza la vía NF-kB, si no la cAMP). No solo inhibe la proliferación, sino también la activación de Th1 (IL-2, IFN-g), lo que sucede por la inhibición a su vez de la presencia de receptores IL-12 en leucocitos inducida por el butirato.

Klampfer et al. (2003) reportan que el butirato ejerce una importante reducción de la activación del receptor II IFN que activa la expresión de los genes IFN-responsivos vía STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), en linfocitos de la LP del intestino; lo que se traduce en una reducción del problema inflamatorio intestinal. Cox et al. (2009) demostraron que el receptor para GPR43 es altamente expresado en neutrófilos y monocitos (en humanos). En presencia de LPS estas células secretan PGE2, la cual es

inhibida por el butirato, lo mismo que la toxina pertussis, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  y también la MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1); sin embargo, se activa la producción de IL-10. Sanderson (2007) refiere efectos similares sobre la expresión génica de los enterocitos expuestos a infecciones bacterianas y al ácido butírico, modulando el tipo de respuesta linfocitaria (acción epigénica). Esta función es muy importante para regular la respuesta intestinal y evitar la sobreproducción de interleucinas como respuesta a la presencia de la micro flora.

Zhang et al. (2011) administraron vía oral distintas cantidades de butirato de sodio y probaron el efecto de la infección intraperitoneal de *E. coli*. No se observaron efectos en cuanto a la respuesta en peso de las aves, sin embargo, se encontró una importante reducción de IL-6, TNF $\alpha$  y malonaldehído, con incrementos de SOD y catalasa en suero. El reto disminuyó significativamente el peso solo en los lotes controles, los alimentados con el butirato mantuvieron la tasa de crecimiento, indicando una moderación de la respuesta inmune, aún por la administración de este producto por vía oral. Sunkara et al. (2011) encontraron incrementos en la producción de péptidos antimicrobianos de defensa a nivel intestinal en aves suplementadas con butirato, mayor actividad fagocítica de MAC's y menor producción de citoquinas proinflamatorias en presencia de *S. enteritidis*, reduciendo la expresión de la misma en heces, que implica una activación mayor de la respuesta inmune innata.

El tipo de MUC expresado fue diferente en presencia de butirato y esto dependió también de la presencia de glucosa o no en el medio, especialmente en colonocitos, lo que estaría relacionado con el tipo de bacteria que crece y la cantidad de las mismas, regulando la producción de moco como forma de defensa (Gaudier et al., 2004). Deplancke et al. (2001) mencionan que el tipo de mucina presente es alterado dependiendo del tipo de microorganismos y la cantidad de los mismos. Como ya se ha mencionado, la mucina se libera en forma continua por las CC o bien en forma abrupta cuando existen estímulos agudos (secreto gogos). De igual forma, la mucina cambia de calidad y cantidad al convertirse en más ácida en las zonas del intestino grueso (más sialificada), lo que reduce la capacidad bacteriana de penetrarla. Por otra parte, la mucina es más neutral y más sulfatada cuando hay menos bacterias (como en animales libres de gérmenes). Existen mecanismos que las bacterias ejercen para evitar la reacción del organismo, como son los

secreto gogos (toxina del cólera), o aquellas señales que disminuyen la secreción (decremento de secreción post infección por amibas, debida a la inhibición de genes por toxina de *Clostridium*). Algunos *Lactobacillus* pueden también aumentar la secreción de mucina y disminuir la adherencia de bacterias como *E. coli*. Otras bacterias evaden el moco por el uso de las sialidasas, sulfatasas, glicosilasas o bien, por el uso de flagelos. *Candida* usa una aspartil proteinasa. El sistema inmune también regula la secreción; por ejemplo: IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$  incrementan la secreción y lo mismo que IL-4-IL-9, producidas por Th2, para acelerar la salida de nemátodos. Forder et al. (2007) reportan que las diferencias en el patrón de mucinas que cambian de neutral a sulfatada y más ácida (sialilato) es posible encontrarla desde la primera semana de vida. El cambio es una respuesta a la presencia de bacterias como se puede demostrar al criar aves en piso convencional o en pisos de baja carga bacteriana.

#### **4.4 Aditivos con microorganismos que modifican la micro flora y la respuesta inmune del intestino**

Housmand et al. (2012) demuestra que las interacciones de ingredientes conocidos como prebióticos, probióticos o ácidos orgánicos, tienen efectos tanto en la respuesta inmune del intestino, como en la morfología de los órganos digestivos; aunque los efectos en el peso corporal y otros parámetros no se vean afectados al comparar grupos controles y tratados. En general, el desarrollo de las vellosidades es mejor en tamaño y las respuestas a la vacunación también se ven mejoradas en los grupos que reciben estos aditivos con relación a los controles negativos, y esto tiene, por ejemplo, interacciones con los niveles de proteína en la dieta, Situación que concuerda con lo ya expresado en cuanto a la capacidad de la micro biota de condicionar una reacción inmune de diferente capacidad en respuesta a los ingredientes de la dieta (nutrientes y otras moléculas).

Los probióticos (bacterias o microorganismos vivos adicionados en la dieta) han sido utilizados por muchos años para modificar la salud intestinal (Rolfe, 2000). Los más estudiados, *Lactobacillus sp* y *Bifidobacterium sp.*, se utilizan solos o en combinaciones entre estos y otras bacterias con los objetivos de mejorar la digestión de los ingredientes de la dieta o de disminuir la propagación de patógenos como *Salmonella* y *E. coli*. Existen numerosos mecanismos por los cuales estos cultivos desarrollan sus efectos en el intestino: producción de sustancias inhibitorias, bloqueo de sitios de adhesión,

competencia por nutrientes, degradación de receptores de toxinas, además de la modificación de la respuesta inmune del TLAI.

Yoshimura et al. (2010) mencionan que el consumo en aves de dietas adicionadas con probióticos como *S. faecalis*, *C. buthricum*, *B. mesentericus* durante 10 días, provocó un patrón ascendente en el número de células positivas a IL-6 iniciando del duodeno al colon, a la LP y la submucosa, siendo esto más visible a los 10 días que a los 5 días post consumo. No se observó diferencias en el número, ni en la localización de las células positivas a IgA. En otra evaluación utilizando *L. casei* en contra de la infección mixta de coccidias aplicadas al día 0, los *Lactobacilos* y sus productos de cultivo se inyectaron por vía intraperitoneal, obteniendo mejores respuestas en el peso cuando se aplicó la vacuna de coccidia, y bajas respuestas en el peso cuando se dio el sobrenadante del cultivo, indicando que son las células y no los productos los que están relacionados con el efecto. Los *Lactobacilos* intervinieron en la inmunidad a la coccidia (Bautista et al., 2003).

Haghighi et al. (2006) mostraron que el consumo de *Lactobacilos*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* cambió positivamente la respuesta humoral del intestino de aves expuestas a *C. perfringens*,  $\alpha$ -toxina o toxoide tetánico, aumentando los títulos de IgA en la luz del intestino y en el suero, mostrando una inducción de la respuesta inmune por el tratamiento con el probiótico. Lee et al. (2010) incluyeron *Bacillus spp* por 21 días a pollitos recién nacidos, no observando diferencias en peso corporal y tampoco respuesta a una vacuna recombinante de proteína de coccidia; sin embargo, si hubo una remodelación intestinal encontrando vellosidades de mayor tamaño que el grupo control y menor cantidad sérica de glicoproteína ácida-1- $\alpha$  (proteína de la fase aguda de la inflamación) e incremento en la población de LIE.

Dalloul et al. (2003), demostraron cambios en la proporción de LIE, en aves alimentadas con probióticos (*Lactobacillus spp*) y posteriormente retadas por coccidia (*E. acervulina*). Los LIE expresaron más CD3, CD4, CD8 y TCR $\alpha\beta$  que los controles y produjeron menos ocistos comparados a los no tratados, sin encontrar cambios entre ellos en el nivel de interferones y con mayores títulos de anticuerpos contra coccidia en los grupos controles. Mountzouris et al. (2010) utilizando un cultivo de 5 bacterias adicionado en forma continua niveles crecientes, obtuvo diferencias en peso en los tratados comparados contra los controles; pero, los que recibieron avilamicina tuvieron aún mejores resultados (posible

efecto aditivo). Las aves que recibieron la mayor cantidad del inóculo, presentaron menores cuentas de *Coliformes* cecales, lo que muestra efectos del producto sobre la microflora.

Jiang et al. (2010) aplicaron un probiótico multiespecies previo a la inyección de LPS de *E. coli*, con lo que se disminuyeron los efectos negativos de la fase aguda de respuesta. Las aves controles deprimieron su consumo por efecto del LPS; sin embargo, los alimentados con el probiótico disminuyeron menos su consumo total durante el experimento, principalmente porque recuperaron más rápido la ingesta de alimento. Los cambios en la acumulación de proteína corporal y retención de energía fueron similares entre los grupos. Yasui et al. (1994) demostraron que la presencia de bacterias, como *Bifidobacterium*, en las PP son factores indispensables para el desarrollo y diferenciación de las células plasmáticas (se comentará con detalle en otra sección), lo que ya se había descrito en la participación de varias líneas celulares para lograr dicho efecto. Este proceso afecta tanto la producción de anticuerpos antibacterianos como para virus (Influenza, probada en este caso), demostrando que la presencia de ciertos tipos de bacterias activan más la liberación de IgA. Bekeredjian-Ding et al. (2007) demostraron que un LPS de *S. aureus* puede activar la vía de proliferación de células B, mediante la activación de TLR2, pero no necesariamente la producción de IgM, la cual requiere de otras señales como TLR7-TLR9 y presencia de otras interleucinas que activen a más líneas de linfocitos.

Araújo et al. (2013) demostraron que otro tipo de microorganismos, como *Z. mobilis*, al ser utilizado antes y durante un proceso séptico inducido, mejora la supervivencia de los animales, al presentarse menores niveles de TNF $\alpha$  y actividad de mieloperoxidasa (MPO, en pulmón), con incremento en la cantidad de IL-10 y en la proporción de neutrófilos que migraron, en relación al control.

Fink et al. (2007) reportaron que el efecto de *Lactobacillus* en células NK, fue consistente en diferentes cepas, aumentando la proliferación, citotoxicidad y activación de otros marcadores *in vitro*. Este efecto no fue igual para las CD en la producción de IFN $\gamma$  activada por células NK. Se indica que las CD estimuladas por los *Lactobacillus* incrementan el pool de NK citotóxicas en la LP. Por lo que se producirá mayor cantidad de IL-12, con IFN por las células NK. Esta acción puede ser controlada por la producción de butirato por otras

bacterias, estableciéndose una regulación alternada entre las bacterias más inmunogénicas y las que no lo son.

#### **4.5 Otros aditivos nutricionales que modifican la micro flora y la respuesta inmune**

Los antibióticos promotores de crecimiento (avilamicina, bacitracina metileno disalicilato, enramicina, entre otros), han sido usados para controlar o modificar la micro flora (Pedroso, 2006). Aunque tienen una influencia sobre el tipo de bacterias presentes, no necesariamente reducen el número de bacterias en el intestino (independiente de si son criados en pisos con posibilidades de coprofagia o en jaulas). Cada antibiótico cambia la micro flora y algunos reducen más el número de comunidades. El efecto neto de los productos antibióticos ha sido el incremento en el crecimiento de los animales, aunque no necesariamente se deba a una menor utilización de nutrientes por la micro flora, sino que puede deberse a otros efectos como una menor estimulación del sistema inmune por la comunidades presentes en el intestino, es decir, un proceso de promoción de menor inflamación y menor producción de citoquinas pro inflamatorias que interfieren el metabolismo del animal en dirección del crecimiento.

Lee et al. (2012) mencionan que los efectos de la utilización de anticoccidiales químicos o ionóforos sobre el sistema inmune residen en la capacidad de respuesta de los linfocitos en el intestino. Ambas drogas son distintas en sus mecanismo de atacar a las coccidias por lo que el sistema inmune reacciona de diferente forma: ya sea por la proliferación de un mayor número de células cooperadoras (CD4+ MHC2+ entre los linfocitos intraepiteliales del intestino) o por su actividad al ser estimulados por Conavalina A (Con A), lo mismo que los niveles de interleucinas.

Lesson (2006) reporta que el uso en de ácido butírico (recubierto o gliceril-butirato) en aves vacunadas contra coccidias, previamente y durante una infección de coccidias adicional, permite mantener la ganancia de peso y reduce la incidencia de lesiones en los 6 días posteriores a la infección. Jerzsele et al. (2012) utilizando un modelo para producir *Enteritis Necrótica* por *C. perfringens*, demuestra el efecto en el desarrollo de las vellosidades (longitud y grosor), y la disminución en el número de lesiones en el intestino de las aves, cuando se alimentan con una mezcla de butirato de sodio, aceites esenciales y/o *B.*

*amyloliquefaciens*, pero no cuando se administran individualmente. Taherpour (2012) utilizó también la suplementación de probióticos, butirato o gliceril-butirato, en aves que consumieron o no salinomicina para controlar coccidiosis durante 28 días y retadas con una mezcla de ocistos de diferentes coccidias. No reporta diferencias en las lesiones cecales de los grupos. Por otra parte, los grupos con probióticos y ácidos orgánicos tuvieron menor excreción de ocistos que el control con salinomicina, aunque no hubo diferencias entre ellos, y podrían, por lo tanto, ser suplementarios a los programas comúnmente utilizados con antibióticos anticoccidiales. Ao (2012) utilizó un grupo control sin aditivos y otros con bacitracina de zinc, MOS o un acidificador, con dos tiempos de acceso al alimento, a las 0 y a las 48 h de eclosión. Se encontraron mayores lesiones a mayor tiempo de ayuno, pero estas fueron de menor importancia cuando las aves consumieron MOS. Existe una relación muy importante en la primera semana de vida, entre el acceso al alimento y los componentes del alimento, como ya se ha mencionado, pero la pronta exposición de antígenos (como el MOS) puede cambiar los resultados en producción.

Los cambios en la micro flora pueden ser logrados también por la adición de enzima fitasa en las dietas, modificando no solo la disponibilidad de los nutrientes para el ave, sino también para la micro flora. Se pueden demostrar cambios en los porcentajes de CD4+CD8+ T en el intestino, sin modificaciones en las proporciones, aumentos de IgA y respuesta de anticuerpos contra ENC. El nivel de 500 FTU/kg no mostró diferencia contra el de 1000 FTU entre el día 1 y el día 28 (Liu et al., 2008).

Dahiya et al. (2007) demuestran que el uso de DL-Metionina o 2-hidroxi-4-metilbunaoato, modifica la proporción de *C. perfringens* en aves a 28 días de edad, pero solo dependiendo de la dosis de metionina real y no en función del tipo de producto usado. La dosis de 0.8% fue la mejor para reducir la contaminación con el *Clostridium*, aunque no se encontraron cambios en el crecimiento y otras variables productivas.

Otra forma de modificar la respuesta inmune del intestino es la utilización de prebióticos. Estas son moléculas no digeribles o microorganismos muertos que se utilizan para cambiar el balance de microorganismo e incrementar la salud del intestino (mejorar la utilización de algún nutriente, decrecer la población de alguno, cambiar el tipo de respuesta del sistema inmune) (Hajati et al., 2010). Entre los microorganismos muertos (o sus

fracciones), más usados están los productos de levaduras y microhongos de diferentes géneros. Existen muchos productos de este tipo investigados en los últimos años por su relación a esta capacidad de alterar la micro flora y con ello alterar las respuestas inmune-productivas de las aves. El caso especial de los productos derivados de levaduras será tratado en otro capítulo, por la relación con el objetivo general de la esta tesis.

## **BIBLIOGRAFÍA CAPITULO IV**

- Ao Z**, Kocher A, Choct M (2012) Effects of dietary additives and early feeding on performance, gut development and immune status of broilers chickens challenged with clostridium perfringens . Asian-Aust J Anim. Sci 25(4):541-551
- Araujo I**, Azevedo E, Helder C, Carvalho CHR, de Mesquita ARC, Silva JB, Mia MBS, Souza E, Mediros PL, Peixoto CA, Goncalves T. (2013) Zymomonas mobilis culture protects against sepsis by modulating the inflammatory response, alleviating bacterial burden and suppressing splenocyte apoptosis. Europ. Jour. Pharma. Science. 48:1-8
- Bautista CR**, Arriola T, Trejo L, Ixta O, Rojas E (2003) Comparación entre el efecto de lactobacillus casei y el de una vacuna comercial en pollos contra coccidiosis. Técnica Pecuaria en México. Sept-dic 41(3)317-327
- Burkholder KM**, Thompson KL, Einstein ME, Applegate TJ, Patterson JA (2008) Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology and susceptibility to Salmonella enteritidis colonization in broilers. Poult Sci 87:1734-1741
- Bekeredjian-Ding I**, Imanura S, Giese T, Moll H, Endres S, Sing A, Zähringer U, Harman G (2007) Staphylococcus aureus protein A triggers T cell-independent B cell proliferation by sensitizing B cells for TLR2 ligands. J Immunol 178:2803-28012
- Beyer-Sehlmeyer G**, Gleim M, Hartmann E, Hughes R, Persin C, Böhm V, Rowland I, Schubert R, Jahreis G, Pool-Zobel B L. (2003) Butyrate is only one several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. British Jour. Nut. 90:1057-1070
- Berndt BE**, Zhang M, Owyang SY, Cole TS, Wang TW, Luther J, Venlaminova NA, Mechant JI, Chen CC, Huffnagle GB, Kao JY (2012) Butyrate increases IL-23 production by stimulated dendritic cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 303:1384-1392
- Collet S.R. (2012) Why the avian enteric tract respond the way it does. Arkansas nutrition conference . 5-sept.

- Cox MA**, Jackson J, Stanton M, rojas-Triana A, Bober L, Lavery M, Yang X, Zhu F, Liu J, Wang s, Monsma F, Vassileva G, Maguire M, Gustafson E, Bayne M, Chou CC, Lundel D, Jenh CH (2009) Short-chain fatty acids act as anti-inflammatory mediators by regulatin prostaglandin E2 and cytokines. *World J Gastroenterol.* 15(44) 559-5557
- Dalloul RA**, Lillehoj HS, Shellem TA, Doerr JA (2003) Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a lactobacillus-based probiotic. *Poultry Sci* 82:62-66
- David LA**, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrota A, Erdeman SE, Alm EJ (2014) Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biology* 15:r89:1-15
- Deplancke B**, Gskins HR.(2001) Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Amer. Jour. Clin. Nutr.*73(suppl):1131-1142
- Feng T**, Elson CO (2011) Adaptative immunity in the host-microbiota dialog. *Immunology* 4(1):15-22
- Fink LN**, Zeuthen LH, Christensen HR, morandi B, Frokieer H, Ferlazzo G. (2007) *International Immunology* 19(12):1319-1327
- Forder REA**, Howarth GS, Tivey DR, Hughest RJ (2007) Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. *Poult Sci* 86:2396-2403
- Gaudier E.**, Jarry A., Blottiere HM, Copet P, Buisine MP, Aubert JP, Laobisse C, Cherut C, Hoebler C. (2004) Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cell deprived of glucose. *Am J Gastrointest. Liver Physiol.* 287:1168-1174
- Geus de ED**, Vervelde L. (2013) Regulation of machophage and dendritic cell function by pathogens and through immunomodulation in the avian mucosa. *Developmental and Comp. Immunol.* 41:341-351
- Goto Y**, Ivanov I I, (2013) Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. *Immunology Cell Biolog.* 91:204-214
- Haghighi H**, Gong J, Gyles C, Hayaes M, Zhou H, Sanei B, Chambers J, Sharif S (2006) Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. *Clinical and Vacc. Immunol.* Sept:975-980

- Hajati H, Rezaei M** (2010) The application of prebiotic in poultry production. *Int Jour. Poult Sci* 9(3):298-304
- Houshmand M, Azhar K, Zulkifii L, Bejo MH, Kamyab A** (2012) Effect of non-antibiotic feed additives on performance, immunity and intestinal morphology of broilers fed different level of protein. *South Afr. Jour. Anim. Sci.* 42(1):22-33
- Huda-Faujan N, Abdulamir AS, Fatimah AB, Anas OM, Shuhaimi M, Yazid AM, Loog YY.** (2010) The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *Open Biochem. Jour.* 4:53-58
- Ihara Y, Murakami H, Takahagi Y.** ( 2014). Lactic Acid Bacterium having high immunoglobulin –A-inducing ability. US Patent and Trademark Office. US Patent 8,728,461 - 20/05/2014
- Jerzsele A, Szeker K, Csizinszky R, Gere E, Jacob C, Mallo JJ, Galfi P** (2012) Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and *Bacillus amyloliquefaciens* spore suspension against artificially necrotic enteritis in broilers. *Poult. Science* 91:837-843
- Jiang Z, Schatzmayr G, Mohnl M, Applegate TJ** (2010) Net effect of an acute phase response – Partial alleviation with probiotic supplementation. *Poult. Sci.* 89:28-33
- Jørgensen H, Zhao XQ, Bach KE, Eggum BO** (1996) The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens. *British Journal Nut* 75:379-395
- JMM Editorial** (2010) Butyric acid-producing anaerobic bacteria as a novel probiotic treatment approach for inflammatory bowel disease. *Journal Med. Microb.* 59: 141-143
- Klampfer L, Huang J, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L.** (2003) Inhibition of interferon  $\gamma$  signaling by the short chain fatty acid butyrate. *Molecular Cancer Research*, 1:855-862
- Lee KW, Lee SH, Lillehoj HS, Li GX, Jang SI, Babu US, Park MS, Kim DK, Lillehoj EP, Neuman AP, Rehberger TG, Siragusa GR** (2010) Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry and immune characteristics in broiler chickens. *Poult Sci* 89:203-216
- Lee KW, Lillehoj HS, Lee SH, Jand SI, Park MS, Bautista DA, Ritter GD, Hong YH, Siragusa GR, Lillehoj EP.** Effect of dietary antimicrobials on immune status in broilers chickens. *Asian-aust J Anim Sci* 25(3):382-392

- Leeson S** (2006).Temas de interés presentes y futuros en nutrición de aves.XXII Curso de Especialización FEDNA. Barcelona 16-17 oct. :143-150
- Le Blay G**, Michael C, Blottiére HM, cherbut C. (1999) Prolonged Intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. JNutr. 129: 2231-2235
- Liu N**, Ru YJ, Cowieson AJ, Li FD, Cheng XC (2008) Effects of phytate and phytase on the performance and immune function of broilers fed nutritionally marginal diets. Poult Sci 87:1105-1111
- Lu J**, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD.(2003) Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. App. Envir. Microb. 69(11):6816-6824
- Lumpkins BS**, Batal AB, Lee MD (2007).Evaluating the inoculation of novel bacteria on intestinal development and the microbiota community. Feed Info.13/04/2007: 1-4
- Mazmanian S**,(2009) Gut Immune balance is as easy as S-F\_B. Immunity 31 Oct 15:536-539
- McReynolds JL, Byrd JA, Genovese KJ, Poole TL, Duke SE, Farnell MB, Nisbet DJ (2007) Dietary lactose and its effect on the disease. Poult Sci. 86:1656-1661
- Mountzouris KC**, Tsitrsikos P, Plamidi I, Aravaniti A, Mohnl M, Schatzmayr G, Fegeros K (2010) Effects of probiotics inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. Poult Sci 89:58-67
- Nakamura Y.**, Nosaka S, Susuki M, Nagafuchi S, Takahashi T, Yajima T, Takenouchi-ohkubo N, Iwase T, Moro I. (2004) Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. Clin Exp. Immunol. 137:52-58
- Noverr M**, Huffnagle GB (2004) Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?. Trends in Microbiology 12(12):1-7
- Patterson JA**, Burkholder KM (2003) Application of prebiotics and prebiotics in poultry production. Poult Science 82:627-631
- Pedroso AA**, Menten JFM, Lambais MR, Racanicci AMC, Longo FA, Sorbara JOB. (2006) Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. Poult Sci 85:747-752

- Pickler L**, Santin E, Fischer da Silva AV (2011) Alternativas aos antibióticos para equilibrar a microbiota gastrointestinal de frangos. *Archives Vet. Sci* 16(3): 1-13
- Rolfe RD** (2000) The role of probiotics cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr.* 130: 396-402
- Säeman MD**, Böhmig G, Österreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, Stöckl J, Hörl WH, Zlabinger GJ (2000) Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10. *FASEB Journal.* 14: 2380-2382
- Sanderson IR.** (2007) Dietary modulation of GALT. *Journal of Nutrition.* 137:2557S-2562S.
- Sunkara LT**, Achanta M, Schreiber NB, Bommineni YR, Dai G, Jiang W, Lamont S, Lillehoj HS, **Teeter RG**, Zhang G. (2011) Butyrate enhances disease resistance of chickens by inducing antimicrobial host defense peptide gene expression. *PlosONE.* 6(11) e27225: 1-10
- Swick B**, Wu SB, Mikkelsen LL, Macalpine R, Torok VA, Balding K (2012). Effect of litter material and dietary fibre on gut development, gut microflora and performance in broilers. 23rd Australian Poult. Soc. Symp.
- Taherpour K**, Moravej H, Reza H, Shivazad M (2012) Effect of dietary inclusion of probiotic, prebiotic and butyric acid glycerides on resistance against coccidiosis in broiler chickens. *JPoult Sci* 49:57-61
- Thurnham DI**, Northrop-Clewes CA, McCullough FSW, Das BS, Lunn PG. Innate immunity gut integrity and vitamin A in Gambian and Indian Infants. *Jour. Infect. Diseases* 182(sup 1):S23-8
- Torok VA**, Ophel-Keller K, Hughes RJ, Forder R, Ali M, Macalpine R (2007). Environmental and age: impact on poultry gut microflora. *Austr. Poult. Sci. Symp.* 149-153
- Yoshimura Y**, Oda M, Isobe N (2010) Effects of feeding probiotics on the localization of cell containing immunoreactive interleukin-6 in the intestine of broiler chicks. *J Poult Sci* 47:250-255
- Yasui H**, Ngaoka N, Hayakawa K (1994) Augmentation of anti-influenza virus hemagglutinin antibody production by Peyer's Patch cell with *Bifidobacterium breve* YIT4064. *Clin Diag. Lab. Immun.* 1(2) 244-246

**Zhang W. H**, Jiang Y, Zhu Q.F., Gao F, Dai SF, Chen J, Zhou GH (2011) Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. *British Poultry Science* 52(3):292-301

## **CAPITULO V LA REACCIÓN INMUNE DEL INTESTINO DE LAS AVES A LA PRESENCIA DE PRODUCTOS CON LEVADURAS EN LA DIETA**

### **5.1 Generalidades**

Los mecanismos de acción de los antibióticos promotores de crecimiento no han sido totalmente descritos, pero sí los efectos principales que producen como: el incremento de la digestión y absorción de nutrientes, la menor variabilidad de las parvadas y el mejor peso final (Ferket et al., 2002). Dentro de los mecanismos descritos están la reducción del crecimiento de algunas familias de microbios, la limitación en la colonización y el traspaso de la barrera intestinal, lo que reduce la exposición de estas al sistema inmune y la posterior inflamación. Este efecto también reduce el tiempo de reparación de la mucosa (ver Capítulo IV), y puede interferir con la producción de ciertas toxinas que producen algunas bacterias. El incremento de la resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias y el posible daño que esto pudiera implicar en la salud humana, son las razones que han llevado a la prohibición del uso de estos productos en los alimentos para animales, a pesar de los efectos benéficos en la crianza. Esta prohibición ha conducido a la necesidad de implementar otras estrategias para el control de microorganismos en el intestino de las aves que permita llevar a cabo una producción óptima.

Otro aspecto de preocupación que se ha mencionado, es la pérdida de eficacia de las drogas antibióticas para controlar problemas en las aves. Xavier et al. (2011) revisó las capacidades de varias drogas anticoccidiales y su relación con las infecciones a nivel de campo, encontrando que la liberación de ocistos por gramo de heces fue mayor para maduramicina y diclazuril; fue menor para salinomicina, maduramicina, y casi nulas para nicarbazina. Por años, se ha detectado que los anticoccidiales han venido perdiendo eficacia a nivel de las granjas para controlar eficientemente la coccidiosis, por lo que remediar esta situación ha sido una razón más para buscar alternativas a los antibióticos.

Los prebióticos están definidos como alimentos no digeribles que tienen efectos selectivos benéficos en el huésped, por su efecto estimulador del crecimiento corporal o por su actividad en limitar el crecimiento bacteriano. En numerosos trabajos se ha demostrado la posibilidad de usar productos de levaduras como parte de la dieta de las aves para reducir el uso de algunas vitaminas y minerales (Miazzo et al., 2011). Se ha experimentado en animales con productos ricos en oligosacáridos (OS), derivados del cultivo de levaduras o de otros hongos como *Aspergillus* (Hajati y Rezaei, 2010). Todos ellos han mostrado efectos en las poblaciones bacterianas del intestino, especialmente en las cuentas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*, que incrementan su número, y por otro parte, la cuenta de *Salmonella* o *E. coli* disminuyen. Külle et al. (2005) describen las propiedades de *S. cerevisiae* para adherirse a diferentes cepas en células de yeyuno de cerdos, distinguiendo que la adhesividad de las cepas usadas para alimentos es de 13-17%, mientras que las de *S. cerevisiae var boulardii* lo hacen de 16-28%, mostrando que existen diferentes afinidades por el origen de la levadura. Sin embargo, la baja en la producción de IL-1 $\alpha$  no estuvo directamente relacionada a la adhesividad, lo que significa que siguen un distinto sistema de relacionarse con el sistema inmune, que no depende solamente de la adhesión de la levadura a cierta sección del intestino.

Lindberg et al. (1992) demuestran diferencias en la inmunidad intestinal a la ovalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, gliadina y levaduras enteras (*S. cerevisiae*). Especialmente en humanos, los enfermos de Crohn tuvieron títulos elevados en todos los productos de levaduras con respuesta en IgA, IgG e IgM, pero no a la gliadina, ovoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina. Esto fue considerado un indicador importante de la barrera intestinal que determina el proceso inflamatorio, donde antígenos como la levadura son los que podrían inducir la presencia de

ciertas enfermedades asociadas a ellas misma, pero no de otras afecciones (respuesta selectiva).

Los productos de la fermentación de las levaduras dejan en los medios de cultivo varias moléculas (como exotoxinas), que son comunes en algunas cepas, lo que ha sido utilizado por algunas de estas como forma de prevenir el desarrollo de otros microorganismos en el medio, incluidas las propias levaduras de otra especie; estos efectos no serán explorados en esta tesis. Es posible que en alguno de los trabajos referidos pudieran estar afectados los resultados por estas exotoxinas de levaduras, dado que no se menciona sobre todo en los trabajos con productos comerciales, si se incluyen o no los medios de cultivo en las levaduras que son reproducidas (El-Banna et al., 2011). Los medios de cultivo de las levaduras también pueden tener una serie de bacterias asociadas (no atacadas por las exotoxinas), que en algunos casos pueden estar relacionadas a los efectos encontrados como promotores del crecimiento y causar confusión con la vía por la cual se presenta el efecto (Reale et al., 2013).

## **5.2 La adhesión bacteriana a las levaduras como modelo para describir su efecto en el intestino**

Las paredes de las levaduras se forman por carbohidratos y proteínas de cadenas ramificadas de glucosa, manosa y N-acetylglucosamina (Ferket et al., 2002). Las estructuras compuestas de glucanos y mananos pueden ser reconocidas por el sistema inmune (TLR, receptores tipo lectina). Se han referido numerosos efectos como la inhibición de la colonización de algunas bacterias (*S. typhimurium*, *Campylobacter*, *E. Coli*), que pueden estar relacionados con la formación de aglutinaciones de las bacterias con los elementos de las paredes de la levadura. Derivados de estas investigaciones se han desarrollado numerosos trabajos para probar los efectos comparativos entre antibióticos y los productos de levaduras (PL), con distintos resultados como los ya descritos (aumentos de peso y disminución de conversión, similares a los encontrados con los antibióticos). Por otra parte, tanto los antibióticos como los PL, reducen también las proporciones de AGV de cadena corta como el butírico, propiónico, acético (reportados en pavos), y de la concentración de amoníaco. El ácido láctico a nivel de yeyuno no sufre cambios, lo que significa que las PL ejercen efectos sobre la micro flora del intestino, siendo posiblemente uno de ellos, la inhibición de la adhesión bacteriana a los epitelios.

Panthong (2005) utilizando seis diferentes productos de levadura probó la capacidad de adhesión de diferentes cepas de *E.coli* y *S. typhimurium*. Cinco de los productos aglutinaron entre el 60- 70% de las cepas de *E. coli* y uno de los productos solo el 46%. Una relación similar se obtuvo para el caso de *S. typhimurium*. Los residuos de manosa en la superficie de estas bacterias están ligados con su capacidad de adhesión a la levadura. La adhesión varió dependiendo del tipo de producto de levadura utilizado, lo que sugiere la aparición de estructuras diferentes de los residuos de manosa en la pared y que son distintos, aún en el mismo género de levadura, pero en otras condiciones de cultivo. Algunos géneros bacterianos fueron diferentes al tener muy poca afinidad de adhesión por las levaduras (*E. cloacae*, *E. agglomerans*). Aunque todas las bacterias fueron manosa-específicas, se presentaron diferentes afinidades por estos azúcares, lo que se puede relacionar con la forma en que las bacterias ocupan distintos nichos de adhesión en la misma parte del intestino (vellosidades o criptas), o en distintas secciones (duodeno, yeyuno, íleon, ciegos), situación que ya se había descrito anteriormente (Capítulo IV).

Panthong (2005) demostró que la acción de las fracciones ricas de mananos también tiene que ver con la modulación de la respuesta de iNOs e IL-6 en macrófagos estimulados por LPS. Parece existir una competencia dinámica entre las fracciones de manosa en las levaduras y el TLR4 por el LPS lo que reprime la reacción. Los macrófagos de pollitos infectados con *E. coli* fueron más productores de NO cuando no tuvieron exposición previa a la levadura y con mayor actividad productora de IL-6, este tema será tratado con más detalle adelante en la revisión.

Firon et al. (1983; 1984) utilizaron varios oligosacáridos ramificados y lineales, así como glucósidos de d-manosa para inhibir la aglutinación de levaduras y bacterias que poseen fimbria tipo 1, demostrando una misma afinidad entre algunas bacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae*, pero diferente de *S. typhimurium*. La afinidad está principalmente determinada por N-oligomananos en la superficie de las glicoproteínas.

Pérez-Sotelo et al. (2009) reportaron que una cepa de levadura (*S. cerevisiae* Sc47), puede tener resultados de aglutinación *in vitro* en 57.7% de las cepas aisladas de *Salmonella spp* a las que fueron presentadas y en 66.6% de *S. serovars* que fue también probada; confirmando la capacidad de reconocimiento entre las paredes de ambos microorganismos. Line et al (1997) ya había descrito que el uso de levadura seca a una

concentración al 10% de la dieta por 60 h previas al sacrificio, fue suficiente para reducir a 40% el número de aves positivas para *Salmonella spp* comparado con el 67% de las controles; estas concentraciones fueron superiores a las tomadas en granja (53%); relacionando posiblemente al coeficiente de adhesión entre bacterias y levaduras. Trevesi et al. (2012) mostraron que es posible lograr una inhibición de la adhesión de *E. coli* a los enterocitos de la vellosidades intestinales en cerdos mediante el uso de productos de levadura, que se ligan y coagulan a las bacterias previo a que estas se presenten al enterocito. Existen diferencias entre distintos productos de levaduras en su capacidad de inhibir la adhesión después de 21 días de consumo. Estos resultados son consistentes con los encontrados en aves y otras especies.

Davis et al. (2004) utilizando productos fosforilados de levadura en cerdos alimentados por 14 días posteriores al destete, encontraron efectos favorables en peso y la conversión de alimento. Aunque se describe el efecto aglutinador de las cepas bacterianas como causa del efecto, otras respuestas en el sistema inmune fueron descritas como bajas en el número de neutrófilos y aumento en los linfocitos. Los MAC's aislados de lámina propia, también presentaron mayor capacidad de fagocitosis y describen un cambio en la relación entre CD4+:CD8+. Por lo que, la explicación de la adhesión bacteriana resulta solo una justificación parcial del efecto del consumo de PL.

### **5.3 Proceso inmune ante hongos y respuestas inmunes al uso de levaduras en la dieta**

A pesar que el uso de levaduras en la dieta pudiera afectar la micro flora por los efectos en la adhesión de algunas bacterias a ellas (como fue descrito anteriormente), muchos otros efectos sobre la actividad del sistema inmune no pueden ser explicados por esta vía. El incremento en infecciones por hongos (las levaduras son un tipo de hongos), y el mayor número de ellos o sus productos en las dietas de humanos y animales ha resultado en la mayor investigación del modo en que estos organismos son detectados y atacados por el sistema inmune.

Los hongos están representados por varios grupos y desencadenan todo tipo de enfermedades por inhalación, penetración de mucosas, daño a las comunidades microbianas del huésped y desordenes metabólicos (LeibungGut-Landemann et al., 2013).

Los hongos son inicialmente reconocidos por varias de las colectinas solubles (LLM, petraxin-2), pero también son opsonizados y fagocitados por un amplio número de células, y estas a su vez, producen señales moleculares distintas cuando actúan sobre estos microorganismos. Los TLR 1 a 4, 6, 7 y 9 están involucrados en la señalización de las infecciones por hongos. Las respuestas celulares pueden ser de dos tipos. Las que involucran la activación de Th1 y Th17 (IL-12, TNF, IL-17, IL-22) o bien las que incrementan la actividad de Treg (IL-10, TGF- $\beta$ ). Se activan también las respuestas de células NK, MAC's y CD por vía de los receptores dectin-1, dectin-2 y mincle (se describe más adelante). La respuesta mediada por linfocitos T puede conferir inmunidad por la vía celular y anticuerpos como en otro tipo de infecciones. Romani (2011) ha demostrado también que los mecanismos de evasión de la respuesta inmune son variados en los hongos, desde encubrir receptores para evitar la fagocitosis, como crear una respuesta tipo Th1 deficiente sin factores externos de opsonización lo que impide la eliminación del parásito.

Drummand et al. (2011) y Romani (2011) mencionan la importancia de los receptores tipo C (lectinas) dentro de las membranas de células inmunes como MAC's/CD que son determinantes en la inmunidad innata contra los hongos. Estos receptores están acoplados a Syk kinasa- CARD9-NF $\kappa$ B. Entre ellos se reconoce al dectin-1, dectin-2 y mincle. Dectin-1 está especializado en estructuras de tipo glucano (mayormente las  $\beta$ 1-3,  $\beta$ 1-6), y es uno de los receptores que inician la fagocitosis, pero más aún, la actividad de producción de peróxidos. Los macrófagos con deficiencia de este receptor, o con isotipos no activos, son deficientes en la formación de IL-6 y TNF $\alpha$ . También mediante este receptor se inicia la actividad citotóxica de células NK y la diferenciación de CD4<sup>+</sup> Th1/Th17 (esto puede ser también por la vía de conversión desde Treg a Th17). Osorio et al. (2008) demuestran que bajo el mismo estímulo algunas FoxP3<sup>+</sup> son convertidas en IL-17<sup>+</sup>, mientras otras no se ven afectadas; esta es una situación poco conocida de las Treg que bajo ciertas circunstancias podrían ser proinflamatorias (se requiere presencia de IL-23 de la misma CD).

Schorey y Lawrence (2008), muestran que el receptor dectin-1, con la capacidad de ligar glucanos, es expresado en otras células inmunes innatas (asociados a motivos activados basados en tirosina, ITAM), como en eosinófilos y células B; y se expresa más en algunos tejidos como el respiratorio. Las estructuras de glucanos en general están cubiertas por

las de mananos en las levaduras; sin embargo, en algunos “parches” de la pared es posible encontrar espacios por donde son presentados ambos al sistema inmune. La asociación de dectin-1 y otros receptores como TLR-2 dirigen a los MAC's en la producción de TNF, IL-12p40, IL-1 $\beta$ , IL-6 e iNOS. Gatner et al. (2003) también reportan los efectos asociativos del TLR2 y del dectin-1 en la activación del NF $\kappa$ B en MAC's y CD que derivan en la mayor formación de IL-12, TNF e iNOS, mostrando los efectos colaborativos de estos PMR. Gales et al. (2010) utilizando MAC's deficientes en dectin-1; demuestra que estos no tienen la misma habilidad para fagocitar *C. albicans* ni para la producción de IL-13 y del receptor activador proliferador de peroxisomas, por lo que el sistema es inadecuado para reducir la infección.

Dectin-1 también regula la producción de IL-10 por la vía de MSK1/2 y CREB en MAC's. Elcombe et al. (2013), demuestran con la activación simultánea por zymosan y curdlan, la producción de IL-10 por la vía de activación de MSK1 sobre la fosforilación de CREB. Los MAC's privados de MSK disminuyeron la producción de IL-10 e incrementaron la de IL-12p40 en respuesta al zymosan. Este tipo de efectos se ha descrito también por la presencia de butirato en el medio, lo que cambia la respuesta de los propios macrófagos para aumentar la producción de IL-10. Otras citoquinas como TNF $\alpha$  también son inducidas pero en mucho menor nivel que IL-10 por la presencia de zymosan (producto derivado de *S. cereviceae*). Nerren y Kogut (2008), mostraron la existencia del receptor dectin-1 en monocitos y heterófilos de aves. En ambas células la activación específica de este receptor por efecto del curdlan incrementa la producción de iNOS *in vitro*. Brown et al (2003) demostraron que se requiere la asociación del receptor dectin-1 y TLR-2 con Myd88 y que esto es un factor crítico en la respuesta a patógenos como los hongos y otros microorganismos. Jiménez et al. (2008) utilizando CD de ratones susceptibles y resistentes a coccidioides, estimuladas *in vitro* con glucanos  $\beta$ 1-3 de ocistos u ocistos completos, estas células tenían mayor producción de TNF- $\alpha$  e IL-6, IL-23 e IL-12p70 y menor producción de IL-10 que las líneas susceptibles. La reacción fue inhibida por anticuerpos anti-dectin-1, lo que muestra la necesidad de la asociación TLR-2 y dectin-1 para reconocer a estos parásitos. Las líneas susceptibles parecen tener deficiencias en estos tipos de receptores.

Otro receptor tipo lectina, el dectin-2, es igualmente localizado en células presentadoras profesionales y es más especializado en estructuras ricas en mananos (Drummand et al. 2011). Es un factor crítico en la resistencia a infecciones por *C. albicans*. Mincle es un receptor de la familia de dectin-2; no es un receptor para fagocitosis, pero si para controlar producción de linfocinas. Se liga principalmente a manosas e induce la producción de TNF $\alpha$  e IL-10; parece estar más relacionado con la inmunidad a micobacterias (trehalosa 6,6'). Tanto dectin-2, como mincle requieren de asociarse a otros receptores para activar SyK, en su caso TLR2 o FcRg. Este tipo de asociaciones regula a su vez la respuesta en linfocinas y citoquinas por parte de la célula presentadora de antígeno, dependiendo de la posible patogenicidad del agente. Kercher et al. (2012) reportan sobre el receptor dectin-2 que aparece en varias células mieloides. Esta familia de receptores identifica a varias líneas celulares de CD, asociadas o no a receptores FcRy (Mincle, dectin-2, mDCAR) que activan SyK y dos vías distintas de las copias nucleares de citoquinas, por la vía NFkB o por PLCy2. Boyd et al. (2012) reportan que las aves y los reptiles son los únicos que tiene un TLR15 que activa NF-k-B por la vía HEK293, que reacciona específicamente con lisados de levaduras, pero no con otros derivados similares de bacteria, o virus; y tampoco a zymosan. La activación no representa cambios tan importantes en los niveles de citoquinas y linfocinas proinflamatorias como la estimulación de TLR4. Sin embargo, muestra una respuesta única de las aves a los productos de levaduras y la manera cómo estos generan la inmunidad.

#### **5.4 Efecto de los productos de levaduras en la respuesta inmune.**

Yitbarek et al (2013) utilizaron un producto de levaduras para determinar sus efectos por 42 días, con o sin BMD y coccidiostato. No se encontraron efectos de la levadura en el crecimiento y conversión; pero si en la altura de las vellosidades y la relación altura: criptas en los grupos suplementados con relación a los controles o BMD. La respuesta en citoquinas fue marcada en las tonsilas cecales para IFN-b, IL-6, TGF-b4, IL-2 e IL-4. En la BF se determinó una mayor expresión de TLR2, TLR4 y TGF-b4, y en el bazo de TLR4, IL-12p35, IFN-g y TGF-b4. Esta reacción estaría en línea con la producción desarrollada por Th1 y Th2, con mayor efecto en las tonsilas cecales.

Munyaka et al. (2012), utilizando dietas con diferentes contenidos de productos derivados de levaduras en dosis de 0.05 a 0.2% en los alimentos de inicio a final, demuestra la

presencia de respuesta en el peso corporal en las primeras semanas. Reporta cambios en el número de células caliciformes en íleon entre las aves que consumieron levadura con respecto a los controles. Se presentó también una mayor expresión de TLR2b en tonsilas e íleon, sin embargo, la expresión de TLR4 y producción de IL-6 fue más baja en los grupos con levaduras, lo mismo que IL-12p35, IFN- $\gamma$  e IL-10 en las tonsilas cecales. Yitbarek et al. (2012), utilizando una infección de *C. perfringens* en pollos que consumieron o no MOS, obtuvieron pesos bajos y altas conversiones en todos los grupos infectados, aún con el consumo de MOS. No se presentaron diferencias en la morfología intestinal (yeyuno e íleon). Como ya se había descrito, en los grupos que consumieron MOS se incrementó en las muestras de íleon la expresión de TLR2b, TLR4, IL-12p35, IFN $\gamma$  e IL-6/IL-10, tanto en el control, como en los grupos infectados. En las tonsilas cecales aumentó TLR2b por el reto con *C. perfringens*, lo cual se define una acción proinflamatoria tipo TH1 asociada.

Jensen et al. (2007) demostraron que es posible aumentar la expresión de CD25 y CD69 (moléculas coestimuladoras), en células NK *in vitro*, cultivadas con un extracto de productos de levaduras, lo mismo que de CD86 en linfocitos B, con una menor producción de radicales libres (dosis dependiente). Jensen (2007b), utilizando cultivo de levaduras *in vitro* cultivando extractos mixtos de linfocitos, muestra la reducción de producción de ROS por neutrófilos, aumento en la activación de marcadores CD80 y CD86 en linfocitos B y CD69-CD25 en NK. Otras moléculas como fucoidan y fitohemaglutinina no fueron tan activas en la producción de citoquinas y linfocinas en los mismos extractos celulares. Gómez-Verduzco et al. (2012) muestran diferentes comportamientos del número de linfocitos que se incrementaron en un 20% sobre el grupo control con el uso de productos de levaduras, con y sin antibióticos en dietas con y sin contaminación con aflatoxina B1. El número de heterófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos fue menor lo que implica una reacción diferencial de las aves al tratamiento con levaduras. Monroy-Salazar et al. (2012) también reportan cambios en los niveles intestinales de CD4+, CD8+ y linfocitos circulantes después de incluir 0.3% de un producto de levadura en cerdos.

Volman et al. (2010a) encontraron que  $\beta$ -glucanos de otros orígenes, como los de la avena, pueden también estimular receptores en enterocitos y linfocitos aislados *in vitro*, activando la expresión de NF-kB, la producción de IL-12 y disminuyendo la producción de INF $\gamma$  en la parte proximal del intestino de ratas, pero no en el colon. Esto parece derivarse de la

inducción inicial de linfocitos, y después estos a los enterocitos. Volman et al. (2010b) también demuestran los efectos de hongos comestibles en la activación de receptores a  $\beta$ -glucanos con producción de NO en MAC's o activación de NF-kB en células de colon Caco-2. Los efectos son distintos dependiendo del hongo. Algunos como *A. bisporus* activan a los linfocitos sin activar a los enterocitos, y esto es determinado por la estructura ramificada de los  $\beta$ -glucanos en el hongo.

### **5.5 Alimentación de levaduras, parámetros zootécnicos y respuesta del sistema inmune intestinal**

Hooge (2004), llevó a cabo una revisión de diferentes trabajos publicados entre 1993-2003 donde utilizaron productos de levaduras reportando efectos favorables en el peso corporal (+1.6%), del índice de conversión (-1.99%), y sobre todo, una baja en las mortandades (-21.4%), comparadas con los controles no medicados. En los grupos medicados con APC la mortalidad se redujo en 18.1% cuando además se usó productos de levaduras. Estos resultados implican que hay una diferencia importante en la respuesta inmune de los animales, que no solo se determina en los resultados del aparato digestivo, sino que puede abarcar otros sistemas. Yang et al. (2007) utilizando un producto de MOS en aves y comparando a 35 días contra un APC, no encontraron diferencias importantes en el peso final, pero si en las primeras semanas. Otros comportamientos de la morfología intestinal, tampoco fueron modificados. Las tendencias solo fueron numéricas. Tampoco encontraron diferencias en los tipos de bacterias y los conteos de colonias en duodeno, íleon y ciego. Se muestra que en condiciones de alta limpieza, las diferencias entre los tratamientos tienden a desaparecer. Gómez y Ángeles (2011), muestran una relación entre el consumo de productos de levadura hidrolizados y los niveles de lisina en las dietas. Las dietas mostraron efectos aditivos para el uso de un nivel alto de lisina y los productos de levaduras en la misma dieta. El consumo de materia seca se incrementó en las aves que recibieron levaduras.

Shanmugasundaram y Selvaraj (2012) reportan que el uso de un producto de levaduras muertas a dosis de 0.2% en pollo de engorda resultó en un incremento de la producción de IL-10 y disminución de IL-1 (medidas por expresión de mRNA), en las tonsilas cecales a los 21 días, sin cambios en la proporción de CD4+ y CD8+. Se reportaron también incrementos de Treg (CD4+CD25+) a los 21 y 35 días del consumo. No fueron reportados

los mismos cambios en el bazo, lo que sugiere el efecto local de la estimulación de las levaduras. Cox et al. (2010) reportan el uso de  $\beta$ -glucano extractado de *S. cerevisiae* durante los 7 o 14 días posteriores a la eclosión, sin obtener cambios significativos en el peso corporal; el peso relativo de los órganos o la relación de heterófilos: linfocitos en la sangre. En las muestras de intestino se encontró una disminución de la expresión de iNOS (asociada a respuesta innata), IL-4 e IL-13 (asociadas a Th2) a los 7 días pero no a los 14 días. En ambos tiempos de consumo disminuyeron el IL-8 e IL-18 (asociada a Th1). El iNOS fue superior con la dosis de 0.1% al día 14. En su conjunto, todos estos indicadores muestran una menor actividad proinflamatoria en el intestino, aunque esto no se refleje en parámetros productivos.

Hooge et al. (2003) reporta cambios en el peso de pollos de engorda con diferentes niveles de MOS y la presencia de antibióticos promotores de crecimiento, comparados con pollos no suplementados en programas tipo dual, pero con cambio a la baja en mortalidad. Brennan et al. (2014), utilizando un fracción enriquecida de mananos y BMD consiguen mejores pesos de las aves a 42 días en comparación a los controles solo con BMD. También se presentaron cambios aparentes en el tamaño de las vellosidades, la relación de vellosidades: criptas y en el número de células caliciformes en los grupos con mananos. Brennan et al. (2014) utilizaron fracciones de levaduras en comparación a BMD, encontrando cambios en la morfología intestinal (tamaño de vellosidades, número de células caliciformes en yeyuno) a los 21, 35 y 42 días de uso del producto con relación a los controles sin medicación, y similares a los obtenidos con BMD. Brümmer et al. (2010) utilizando MOS en diferentes niveles o mananos solubles, no encontraron cambios en el índice de conversión (15 días de consumo solamente). Ambos productos causaron aumento de la densidad de células caliciformes.

Baurhoo et al. (2007) utilizando productos de levaduras o lignina, observaron cambios en la micro flora del intestino de pollos, que se pudieron asociar con mayor desarrollo de las vellosidades intestinales en los pollos que consumieron los productos con relación a los que no lo hicieron o solo consumieron antibióticos. Los que utilizaron productos de levaduras, tuvieron cuentas diferentes de *Bifidobacterias* en el ciego y menor excreción fecal de *E. coli*. Baurhoo et al. (2009) en otra evaluación donde utilizaron modelos con diferentes promotores de crecimiento, en comparación a niveles altos o bajos de MOS, no

encontraron diferencia importante en el peso, pero si incremento del tamaño de vellosidades y de células caliciformes tanto en los MOS, como antibióticos promotores. Los grupos que consumieron MOS tuvieron mayor número de *Bifidobacterium* y fueron libres de *Salmonella*, además de una amplia reducción en *E. coli* y *Campylobacter* a los 34 días (no a los 14 ni 24 días). Morales-López et al. (2009) utilizando paredes de levaduras, mananoproteínas o extractos de glucano (b-1,3/1,6-glucano), a diferentes dosis en dos experimentos en aves, no encontraron diferencia en el peso del timo entre las aves tratadas, pero si con respecto a los controles negativos o con un APC, en los cuales el timo mostró menor peso. En cuanto al peso a los 42 días no se reportaron diferencias significativas; sin embargo, si las hubo en el tamaño de las vellosidades y con menor peso del hígado y el intestino en las aves que recibieron el tratamiento con las paredes de levaduras, pero no con los otros tratamientos. No se reportaron cambios en el peso de la BF o en el bazo. Solís et al. (2007) encontraron también diferencia en el tamaño de las vellosidades y superficie de las mismas, y un mayor número de células caliciformes, a los 7 y 21 días en pavos alimentados con un extracto de levaduras. Las diferencias fueron mayores en las muestras de íleon que en yeyuno o duodeno, sugiriendo que el extracto fue un factor de desarrollo en algunas regiones del intestino.

Corrigan et al. (2011) Utilizando PL en dosis de 1 y 2 kg durante 42 días, no encontraron diferencias significativas en el peso ni en el índice de conversión en pollos, pero si hubo alteración de la composición de la micro flora bacteriana (medida por evaluación de 16SrRNA), en relación al grupo control en las medidas realizadas a los 7 días (tomadas de ciegos). El tipo de bacterias analizado fue *Phylums Firmicutes* (clases *Clostridia* y *Bacilli*), *Bacteroidetes* (clase *Bacteroidia*) y *Proteobacteria* (clase *Gammaproteobacteria*). Las poblaciones a los 14 días fueron más bajas en los grupos con PL, pero en los siguientes días, los números se mantuvieron similares entre los grupos controles y tratados. Zdunczyk et al. (2005) utilizando MOS en dietas de pavos (entre 0.1-0.4%) obtuvieron diferencia en el peso a las 16 semanas, sin cambios en pH de ciegos e íleon y menor concentración de amoníaco en las dosis mayores de MOS. La concentración de AGCC fue diferente entre los grupos al expresarse en mmol/kg de peso vivo, presentaron una diferencia del 50% en la producción de butirato, con caída del acetato. Se presentó también aumento de *Bifidobacterium*, pero las cuentas de *Lactobacillus* no fueron distintas, mientras que las de *E. coli* fueron menores.

Morales-López y Brufau (2013) utilizando paredes de levaduras en el alimento de aves retadas con LPS de *E. coli* con y sin coccidiostatos o APC o enzimas, observaron disminución del peso por efecto de la inyección de LPS, pero este efecto no ocurrió en las aves que consumieron las paredes de levaduras. También hubo hipersensibilidad cutánea y mayor peso de la BF. Shashidhara y Davegowda (2003) encontraron incremento de la incubabilidad en huevos provenientes de reproductoras que consumieron un producto con MOS de *S. cerevisiae*, con aumento de los títulos séricos anti-IBDV, tanto en las madres como en los huevos y en los pollitos (mediciones a las 4 semanas). Oliveira et al. (2009) demostraron que incluir una mezcla de MOS y enzimas (fitasas, proteasas, celulasas y amilasas), en aves vacunadas contra IBDV y ENDV, resultó en un incremento en los títulos séricos de anticuerpos desde la semana 3. Existe una posible asociación entre la mejor digestión de nutrientes (incluidos los NSP), y la respuesta inmune promovida por el MOS.

Tokic et al. (2007) reportaron diferencia en peso corporal y disminución del índice de conversión alimenticia en pollos adicionados con MOS en comparación con el grupo control. También encontraron mayores títulos cuando se revacunó contra ENC y una mayor reacción de hipersensibilidad a fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés). Huff et al. (2006) Usando un polisacárido de  $\beta$ 1-3/ $\beta$ 1-6 glucanos de *S. cerevisiae* ofrecido durante los 7 o 25 días anteriores a un reto con *E. coli* en pollos de engorda, demostraron que la mortalidad fue reducida de un 63% en el control, y a 53% con el consumo durante 25 días, y a un 47% con un consumo de solo 7 días. Sin embargo, también se reportaron disminución en el peso de las aves alimentadas con el PL durante 7 o 25 días.

Lavielle et al. (2004) utilizando un extracto de  $\beta$ -1-3 glucomananos por vía oral en el agua, consiguió incremento en los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de NC, con solo 7 días de la suplementación. Se utilizaron dosis de 4-15 ppm, lo que representa una dosis inferior a la utilizada en muchos otros trabajos con productos de levaduras comúnmente aplicados en el alimento. Cheled-Shoval et al. (2011) utilizando MOS en solución para administrar a embriones de pollos en los 3 días antes de la eclosión, demostraron un incremento del mRNA MUC2 en intestino (tres veces sobre el control). Al nacimiento el desarrollo de las vellosidades fue de 20% a 32% mayor, lo mismo que el número de células caliciformes y la expresión de TLR4. El efecto no se prolongó en el tiempo; se sugirió que el cambio no fue mediado por la micro flora, sino por un efecto directo del MOS. La

presencia de moco diferenciado podría inducir el desarrollo de mayor número de *Lactobacilos* y *Bifidobacterias* que tuvieran que ver con el efecto en tamaño de las vellosidades.

## **5.6 Asociación entre la resistencia a coccidiosis y el consumo de levaduras**

Emulsharaf y Beynenen (2007) describen que hay varias alternativas probándose para aumentar la resistencia de las aves a las coccidias (probióticos, prebióticos, vacunas, enzimas, otros aditivos herbales o manejo de los ingredientes), con limitados efectos dada la complejidad del ciclo de vida de las coccidias, la falta de inmunidad cruzada entre los géneros y las diferencia de patogenicidad de las cepas de campo.

La prohibición del uso de drogas, como los arsenicales, que por mucho tiempo fueron la clave para mejorar la respuesta de los pollos de engorda a la infección por coccidia, ha sido estudiada por algunos investigadores, determinando la ventaja que puede tener la sustitución de estas drogas por el uso de productos con paredes de levaduras. Zhu et al. (2000) mencionan que los principales factores relacionados con la resistencia a las coccidias se pueden determinar por: la eliminación de ocistos en las heces, la ganancia de peso, la concentración de carotenoides en sangre y la producción de iNOS, para poder calcular un índice de infección para ser usado en las pruebas.

La infección por coccidia también ha sido estudiada por los efectos de inmunógenos propios de la enfermedad, que además pueden ser considerados cuando se evalúan los productos de levaduras en la misma secuencia de infección. Ayaz et al. (2008) utilizando vacunas de gametocitos vivos o inactivados, producen una reacción localizada en el bazo en aves, relacionándose con una mayor producción de IgA (270%), IgG (225%) e IgM (300%); los niveles de estas células productoras se relacionaron inversamente con la excreción de ocistos en heces. Esto demuestra una relación importante entre las inmunoglobulinas y la protección contra *Eimeria*.

Galuska y Murray (1984) desarrollaron una forma de inmunización que utiliza una suspensión de ocistos extractada y purificada, con otra parte de una fracción de esporozoitos (15 diferentes polipéptidos), que son capaces de desarrollar una respuesta inmune medida por la producción de inmunoglobulinas. Juárez et al. (2007) utilizando aves

vacunadas y retadas contra coccidia, demostraron que las aves vacunadas tuvieron menor peso que las no vacunadas, y las aves retadas tuvieron pesos aún menores. Las aves retadas/no vacunadas tuvieron los mayores niveles de excreción de ocistos y el mayor incremento de IgA en los 7 días post infección; las aves vacunadas/retadas tuvieron un menor incremento de IgA en ciego y una menor excreción de *E. acervulina* y *E. Maxima*, pero no de *E. tenella* que las retadas/no vacunadas.

Ho-Hong et al. (2006) analizaron la expresión génica en linfocitos que resultó de la infección por coccidias en aves en la secuencia primaria o secundaria del proceso. Las interleucinas: IFN $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17, se incrementan varias veces después de la primera infección; sin embargo, estas mismas casi no sufrieron cambios durante la segunda infección. Se aprecian diferencias en las citoquinas estimuladas por *E. acervullina* o *E. Tenella*, pero también se detectaron cambios en la producción de IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10 e IL-12 en menor amplitud que en las proinflamatorias. Se observó una mayor expresión de TLR-2 en la infección por *E. acervulina* y de TCR1+ e IL-16 en el caso de *E. Tenella*. La expresión mayor de IL-10 solo fue detectada en CD4+ en el caso de *E. acervulina*.

Pérez-Carbajal et al. (2010) Usando dietas altas en arginina o vitamina E en aves infectadas por *Eimeria spp*, demostraron que niveles altos de ambas pudieran ser utilizados para mejorar la respuesta al reto por coccidias evaluadas por las lesiones intestinales, principalmente en yeyuno pero no en ciegos o duodeno; sin cambios en los niveles de IgA en suero a los 14 días post infección. Silvia et al. (2011) empleando dieta alta en vitamina E (65 mg/kg alimento) en aves vacunadas contra coccidia, obtuvieron mejor respuesta en sensibilidad cutánea en aves a los 36 días. Dalloul et al. (2002) demostraron que la deficiencia de vitamina A comprometió la inmunidad intestinal contra coccidias medida por la excreción de ocistos y los niveles de IFN $\gamma$ . Las proporciones de CD4+ fueron muy afectadas por la deficiencia de vitamina A y no tanto para CD8+. Los niveles de IgA fueron más altos en los deficientes de vitamina A no retados, pero casi nulos en los retados, incluyendo los normales de vitamina A, lo que significa una amplia relación entre la vitamina A y la aparición de la respuesta a coccidias.

Rodrigues et al. (2000) usando ratones libres de gérmenes, demostraron la capacidad de *S. boulardii* de colonizar el intestino e incrementar la producción de IgA totales (7 vs 4 mcg/g), como anti-*S. boulardii* (2 vs 0.5 mcg/g). La cantidad de células de Küpfer se

incrementó significativamente, con aumentos de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12b. También se disminuyó el tiempo de presencia de *E. coli* en la sangre de animales infectados. Mc Dougal. (2008) reportaron reducciones en la presentación de lesiones por *E. máxima* o *E. acervulina*, pero no por *E. tenella*, cuando sustituyó roxarsona por MOS durante 42 días en pollos. Dawson y Sefton (2006) patentaron un programa de uso de paredes de levaduras (0.5-20 kg por tonelada) para reducir los problemas de coccidiosis en pollos, mostrando diversos trabajos donde obtienen resultados positivos con el consumo de productos que proponen. McCann et al. (2006) utilizando MOS y taninos, no encuentra diferencia en el peso de aves retadas a los 28 días y evaluadas 7 días después. La reducción de las lesiones fue mayor en el grupo MOS para *E. acervulina*, pero no para *E. máxima*; para *E. tenella* la respuesta fue mejor con la combinación de ambos productos.

Gomez-Verduzco et al. (2009) Utilizaron un producto basado en paredes de levaduras en forma continua en el alimento de pollos durante las primeras 4 semanas de vida, encontraron un incremento de la respuesta humoral del intestino (IgA), de la respuesta mediada por células (prueba en cojinete plantar), y una reducción de excreción de coccidias en las heces con o sin el uso de vacuna de coccidias. Estas diferencias se expresaron en un mayor peso de los animales a las 3 semanas de vida. El uso de anticoccidiales mejoró el peso sobre los lotes vacunados con coccidia. Elmusharaf et al. (2006) utilizando un modelo de infección por *E. tenella* (con producción de lesiones y eliminación de ocistos, sin efectos aparentes en el peso), pudo observar disminución en el número de esquizontes, aunque no en las lesiones cecales, ni incrementos en los pesos. La infección ocurrió entre el día 8-12 de crianza y el consumo del producto de levaduras fue continuo. Guo (2004) utilizando extractos de dos tipos de hongos *Lentinus edodes* y *Tremella fuciformes* y la hierba *Astragalus membranaceus*, durante el período entre 8-14 días, demostró que se incrementó la producción de IgA e IgM (en suero) a 14 y 21 días post-infección por *Eimeria*. El grupo con *Astragalo* tuvo mayores niveles de IgA, incluso que los infectados (a 7 y 14 días post infección, en suero y ciegos), también se vio influenciado el factor de proliferación de esplenocitos. Nolet et al. (2007) utilizando aves con y sin vacuna contra coccidiosis y con y sin MOS, que luego fueron retadas con una combinación de *Eimerias*, encontró que las aves retadas y que recibieron MOS presentaron mayor peso con respecto a los grupos que no usaron el producto. La proporción de lesiones disminuyó en los grupos vacunados, con o sin MOS. Las lesiones fueron menores aún para los grupos vacunados con MOS en

caso de *E. máxima* y *E. tenella*, pero no de *E. acervulina*. Cortés y García (2005) utilizando nicarbacina/salinomicina en un programa dual en comparación con aves que consumieron MOS sin tratamiento anticoccidial durante 21 o 49 días (todo el periodo de crianza), no observaron diferencias de peso a los 21 y 49 días. Los animales fueron infectados a los 21 días con *E. acervulina*. Se encontraron lesiones de bajo desarrollo a los 6 días post infección y menor producción de ocistos en aquellos que consumieron MOS. Tampoco se presentaron diferencias en pigmentación al final de la crianza. Esto sugiere la posibilidad del uso de productos de levadura para los programas de control de coccidias sin antibióticos.

Stanley et al. (2004) utilizando un producto de residuos de cultivo de levadura en experimentos diferentes con grupos infectados con *E. tenella*, *E. máxima* y *E. acervulina*, encontraron mejores pesos con el uso del producto en relación al uso de lasalocid (tres experimentos en camas recicladas). Los pesos disminuyeron en todos los grupos al tiempo que la cama se usó en parvadas subsecuentes (la misma para tres experimentos), y se aumentó la humedad. El conteo de ocistos (ocistos/g de cama x 100), en el grupo con levaduras disminuyó hasta un 30% con respecto al control y el grupo con coccidiostato disminuyó en un 48% al final de los tres experimentos. El peso del hígado fue superior al control únicamente en el caso del tercer experimento, relacionado el mayor uso de la cama, que aumentó las cuentas microbianas en la cama, y las posibles lesiones secundarias ya descritas. El uso del cultivo de levadura demostró ser una opción al uso de lasalocida o bacitracina.

Faber et al. (2012) utilizando MOS alto en galacto-mananos (derivados de astillas de madera), reprodujo los efectos ya encontrados con los MOS de *S. cerevisiae* en aves infectadas por coccidia, con dosis de 0, 1, 2 y 4% de la dieta total en aves infectadas por *E. acervulina*. En las aves no infectadas se observaron incrementos de peso, sin consecuencias en la concentración de butirato cecal, pero con incrementos de *Bifidobacterium* en ciegos. No se midieron excreciones de ocistos. Los efectos no fueron tan efectivos como con MOS de levadura.

Gao et al. (2008) utilizando producto de levaduras en dosis de 0 a 7.5 kg/ton de alimento durante 42 días en pollos, encontraron un respuesta cuadrática con mejores resultados en 2.5 kg para el crecimiento. El uso del producto de levadura aumentó los títulos séricos a

ENC, la concentración de IgA a nivel de duodeno a 42 días (100% más que el control), pero no a 21 días (en suero). Pero a nivel intestinal, el nivel de IgA (secretorias) fue 150% mayor, pero fue aún mayor con 7.5 kg/ton tanto a 21, como a 42 días. La reacción a la mayor dosis es en sentido contrario al peso del ave.

Gao et al. (2009) utilizando un producto de fermentación de levaduras en diferentes dosis en pollos retados con *E. tenella*, reportaron pesos menores por la infección en los grupos controles, pero no en los adicionados con levaduras. Se demostró aumentos de CD3+, CD4+, CD8+ y del radio de CD4+/CD8+ en sangre, hígado e íleon. La concentración de IgA fue superior también en los 7 días post infección.

Broomhead (2013) reportó un experimento con grupos no tratados, no infectados, en relación a grupos con PL, con y sin salinomicina como anticoccidial. Las aves fueron retadas a los 21 días con un paquete de *Eimerias* y evaluadas a los 6 días post infección. El uso de la mezcla de salinomicina y PL fue mejor en relación al uso de solo salinomicina o de solo MOS en relación al control infectado no medicado. También se reportó reducción en las lesiones en todas las secciones del intestino por el uso del antibiótico o levaduras. Los conteos de occistos disminuyeron más rápidamente también en estos grupos (dosis de levaduras de 1.25 kg/ton).

Dada la importancia que tiene la infección por coccidias en la fase de producción del pollo de engorda en confinamiento, y la necesidad de reducir los efectos negativos de la misma en un entorno donde los antibióticos serán utilizando cada vez en menor grado, incrementar nuestro conocimiento de la forma en que podemos mejorar la respuesta inmune de las aves ante esta enfermedad, tiene un valor importante para el mercado. La respuesta inmune que se ha caracterizado contra las coccidias es una interacción muy compleja con la intervención de varios grupos celulares en el intestino, reacción que puede ser modulada para mejorarla por el uso de diferentes aditivos en la dieta.

El objetivo fundamental de esta tesis es describir las relaciones de los resultados de un proceso infeccioso provocado por coccidias, en relación con la presentación de las LLM y otros efectos sobre la respuesta inmune del intestino en aves que han o no consumido productos de levaduras previamente a la infección.

## BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO V

- Aa Kühle van der A**, Skovgaard K, Jespersen L (2005) In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. Jour. Food Mic.* 101(1):29-39
- Ayaz MM**, Akhtar M, Hussain I, Muhammad F, Haq AU (2008) Immunoglobulin producing cells in chicken immunized with *Eimeria tenella* gametocyte antigen vaccines. *Vet. Medicina* 53(4):207-2013
- Baurhoo B**, Phillip L, Ruiz-Feria CA (2007) Effects of purified lignin and Mannan Oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poult. Sci* 86:1070-1078
- Baurhoo B**, Ferket PR, Zhao X (2009) Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poult Sci* 88:2262-2272
- Brennan KM**, Paul MA, Samuel RS, Lumpkins B, Pierce JL, Collett SR, Mathis GF (2014) Comparison of performance and intestinal morphology of broilers using step-down supplementation with a mannan-rich fraction versus bacitracin methylene disalicylate. *Jour. Appl. Anim. Nutr* 2(12):1-7
- Boyd A**, Peroval MY, Hammond JA, Prickett MD, Young JR, Smith AL (2012) TLR15 is unique to avian and reptilian lineages and recognizes a yeast-derived agonist. *J Immunol* 189:4930-4938
- Broomhead J** (2013) Improving gut health with a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product, original XPC, reduces pathogen stress. XVI Congreso Bienal AMENA22-25/10
- Brown GD**, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of  $\beta$ -Glucans. *The Journal Experimental Med.* 197(9):119-124
- Bümmer M**, Jansen c, Moran C.A. (2010) *Saccharomyces cerevisiae* cell wall products: the effects on gut morphology and performance of broiler chickens. *S. African J. Anim. Scie* 40(1):14-22
- Cheled-Shoval SL**, Amit-Romach E, Barbakov M, Uni Z. (2011) The effect of in ovo administration of mannan oligosaccharide on small intestine development during the pre and posthatch periods in chickens. *Poult Sci.* 90:2301-2310

- Corrigan A**, Horgan K, Clipson N, Murphy RA (2011) Effect of dietary supplementation with a *Sacharomyces cerevisiae* mannan oligosaccharide on the bacterial community structure of broiler cecal contents. *Appl. Envi. Microb.* 77(18):6653-6662
- Cortes R**, Garcia J (2006) The use of Bio-Mos (Mannan-oligosaccharides) in coccidia control strategies in broilers. *SSPSci. Abstracts* 119 : 120
- Cox CM**, Stuard LH, Kim S, McElroy AP, Bedford MR, Dallou RA (2010) Performance and immune responses to dietary  $\beta$ -glucan in broiler chicks. *Poult Sci* 89:1924-1933
- Dalloul RA**, Lillehoj HS, Shellem TA, Doerr JA (2002) Effect of vitamin A deficiency on host intestinal immune response to *Eimeria acervulina* in Broiler Chickens. *Poult Sci* 81:1509-1515
- Davis ME**, Maxwell CV, Erf GF, Brown DC, Wistuba TJ (2004) Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weaning pigs. *J Anim. Sci* 82:1882-1891
- Dawson KA**, Sefton AE (2006) Methods and compositions for control of coccidiosis. United States Patent 7048937. 24/05/2006
- Drummond RA**, Saijo S, Iwakura Y, Brown GD (2011) The role of Syk/CARD9 couple C-type lectins in antigungal immunity. *Eur. J. Immunol.* 41:276-281
- El-Banna AA**, El-Sahn MA, Shehata MG (2011) yeast producing killer toxins: an overview. *Alex J. Fd. Sci and Technol.* 8(2):41-53
- Elcombe SE**, Naqvi S, van Den Boch MWM, MacKenzie KF, Cianfanelli F, Brown GD, Arthur JSC (2013) Dectin-1 regulates IL-10 production via MSK1/2 and CREB dependent pathway and promotes the induction of regulatory Macrophage markers. *PLOS ONE* 8(3):E60086 1-15
- Elmusharaf MA**, Bautista V, Nollet L, Beynen AC (2006) Effect of a mannanoligosaccharide preparation on *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *Int Jour Poul Sci* 5(6):583-588
- Elmusharaf MA**, Beynen AC (2007) Coccidiosis in poultry with emphasis on alternative anticoccidial treatments. Universiteit Utrecht. DoctorThesis chapter 1 :9-44
- Faber TA**, Dilger RN, Hopkins AC, Price NP, Fahey Jr GC (2012) The effects of a galactoglucomannan oligosaccharide-arabinoxylan (GCMO-AX) complex in broiler chicks challenged with *Eimeria acervulina*. *Poul. Sci.* 91:1089-1096

- Ferket PR**, Parks CW, Grimes JL (2002) Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. Multi-State Poultry Meeting May 14-16 (1-22)
- Firon N**, Ofek I, Sharon N (1983) Carbohydrate specificity of surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydrate Reserch* 120:235-249
- Firon N**, Ofek I, Sharon N (1984) carbohydrate-binding sites of the Mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. *Inf. Imm.* 43(3)1088-1090
- Fuller AL**, McDougald LR (2002) Lectin-binding by sporozoites of *Eimeria tenella*. *Parasitol. Res* 88:118-125
- Gales A**, Conduche A, Bernard J, Lefevre L, Olganier D, Béraud M, Martin-Vlondel G, Linas MD, Auwerx J, Coste A, Pipy B. (2010) PPAR  $\alpha$  controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *Plos Pathogens* 6(1)e1000714 (1-12)
- Gatner BN**, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like Receptor 2. *J. Exp. Med* 197(9):1107-1117
- Gao J**, Zhang HJ, Yu SH, Wu SG, Yoon I, Quigley J, Gao YP, Qi GH (2008) Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poult Sci.* 87:1377-1384
- Gao J**, Zhang HJ, Wu SG, Yoon I, Moore D, Gao YP, Yan HJ, Qi GH (2009) Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on immune functions of broilers challenged with *Eimeria tenella*. *Poult Sci* 88:2141-2151
- Gomez S**, Angeles ML (2011) Effects of an enzymatically hydrolyzed yeast and yeast culture combined with flavomycin and monensin on finishing broiler chickens. *Int Jour. Poult. Sci.* 10(6):433-439
- Gomez-Verduzco G**, Cortes-Cuevas, Lopez-Coello C, Avila-Gonzalez E, Nava GM (2009) Dietary supplementation of mannan-oligosaccharide enhances neonatal immune responses in chicken during natural exposure to *Eimeria* spp. *Acta Vet. Scand.* 51:11
- Gomez-Verduzco G**, Cortes-Cuevas, Lopez-Coello C, Avila-Gonzalez, Arce-Menocal J. (2012). Comportamiento productivo y respuesta de pollos alimentados con dietas sorgo-sya con y sin aflatoxina y paredes celulares de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). *Engormix.Avicultura. Articulos Técnicos.Sanidad* 03/09/12

- Galuska S**, Murray PK (1987) Coccidiosis vaccine. USpatent 4639372
- Hajati H**, Rezaei M (2010) the application of prebiotics in poultry production. *Int. Jour. Poult. Sci* 9(3):298-304
- Ho-hong Y**, Lillehoj HS, Lee SH, Dalloul RA, Lillehoj EP (2006) Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria Tenella* infections. *Vet Immunology and Immunopathology*. 114(3-4):209-223
- Hooge DM**, Sims MD, Sefton AE, Connolly A, Spring P (2003) Effect of dietary mannan oligosaccharide, with or without bacitracin or virginamycin on live performance of broiler chickens at relatively high stocking density on new litter. *J. Appl. Poult Res*. 12:461-467
- Hooge DM** (2004) Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993-2003. *Inter. Jour. Poult. Sci*. 3(3):163-174
- Huff GR**, Huff WE, Rath NC, Tellez G (2006) Limited treatment with b-1,3/1-6-glucan improves production values of broiler chickens challenged with *Escherichia coli*. *Poult. Sci*. 85:613-618
- Jensen GS**, Patterson KM, Yoon I (2007) yeast culture has anti-inflammatory effects and specifically activates NK cells. *Comparative Immunology. Microbiology Infect. Dis*. 31:487-500
- Jensen GS**, Hart AN, Schauss AG (2007) An antiinflammatory immunogen from yeast culture induces activation and alters chemokine receptor expression on human natural killer cells and B lymphocytes in vitro. *Nut Research*
- Jimenez-A MP**, Viriyakosol S, Walls L, Datta SK, Kirkland T, Heinsbroek S, Brown G, Fierer J. (2008) Susceptibility to coccidioides species in C57BL/6 mice is associated with expression of a truncated splice variant of Dectin-1 (Clec7a). *Genes and Immunity* 9:338-348
- Juarez-Estrada MA**, Nava-Morales G, Merino-Guzman R (2007) Efecto de una vacuna anticoccidial sobre parámetros fisiológicos e inmunológicos de pollos de engorda. *Vet. Mex* 38(3):303-318
- Kerscher B**, Willment JA, Brown GD (2012) the Dectin-2 family of C-type lectin-like receptors: an update. *Inter. Immun*. 25(5)271-277
- Lavielle J**, Soler DM, Miranda I, Pedroso M (2004) Aceptabilidad de la formulación oral de b-1-3 glucano particulado lineal (b1-3 GPL) e influencia sobre la respuesta a la vacuna de Newcastle. *Rev. Sallud Anim*. 26(3):183-187

- LeibundGut-Landmann S**, Wütrich M, Hohl TM (2012) Immunity to fungi. *Immunology* 24:449-458
- Line JE**, Bailey JS, Cox NA, Stern NJ (1997) yeast treatment to reduce Salmonella and Campylobacter populations associated with broiler chickens subjected to transport stress. *Poult. Sci.* 76:1227-1231
- Lindberg E**, Magnusson KE, Tysk C, Järnerot G (1992) Antibody (IgG, IgA, IgM) to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast mannan, gliadin, ovalbumin and betalactoglobulin in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *Gut* 33:909-913
- Monroy-Salazar HG**, Perez-Sotelo L, Gonzalez-Hernandez Y, Vaughan G, Lagunas-Bernabé S, Cuarón-Ibarguengoytia J, Montaña-Hirose JA, Alonso-Fresán MU, Pradal-Roa P, Vazquez-Chagoyán JC (2012) Effects of a live yeast dietary supplement on fecal coliform counts and on peripheral blood CD4+ and CD8+ lymphocyte subpopulations in nursery pigs. *Journal Swine Health Production.* 20(6) 276-282
- McCann MEE**, Newell E, Preston C, Forbes K (2006) The use of mannan-oligosaccharides and/or tannin in broilers diets. *Int. Jour. Poul. Sci* 5(9):873-879
- McDoulgald LR** (2008) Control of coccidiosis and performance enhancement in poultry in a post-arsenic world. *Engormix articles.* 09/06/2008 p1-3
- Miazzo RD**, Peralta MF, Nilsson AJ, Picco M (2011) combination of brewer's yeast (*S. cerevisiae*) with vitamin E as replacement for the vitamin-mineral premix in broiler diets. *Engormix.* 10/20/2011
- Morales-Lopez R**, Auclair E, García F, Esteve-Garcia E, Brufau J (2009) Use of yeast cell walls;  $\beta$ -1,3/1,6-glucans; and mannoproteins in broiler chicken diets. *Poult. Sci* 88:601-607
- Morales-Lopez R**, Brufau J (2013) Immune-modulatory effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* cell wall in broiler chickens with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Brit. Poul. Sci.* 54(2):247-251
- Munyaka PM**, Echeverry H, Yitbarek A, Camelo-Jaimes G, Sharif S, Guenter W, House JD, Rodriguez-Lecompte JC (2012) Local and systemic innate immunity in broiler chickens supplemented with yeast-derived carbohydrates. *Poult Sci.* 91:2164-2172
- Nerren JR**, Kogut MH (2008) The selective dectin-1 agonist, curdlan, induces an oxidative burst response in chicken heterophils and peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Imm. Immunopath.* 127:162-166

- Nolet L**, Hyghebaert G, Spring P (2007) Effect of dietary mannan oligosaccharide (Bio-Mos) on live performance of broiler chicken given an anticoccidial vaccine (paracox) followed by a mild coccidial challenge. *Poul. Sci. Assoc.* 16:397-403
- Osorio F**, Leinbundgut-Landemann S, Lochner M, Lahl K, Saprwasser T, Eberl G, Reis e Sousa C. (2008) DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur. J. Immunol.* 38:3274-3281
- Oliveira MC**, Figueiredo-Lima DF, Faria-Filho DE, Marques RH, moraes VMB (2009) Effect of mannanoligosaccharides and/or wnzymes on antibody iters against infectious bursal and Newcastle disease viruses. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 61(1):6-11
- Panathong S** (2005) Reduction of inflammatory responses by mannan rich fraction. Dissertation to the Graduate Doctor Phylosophy. Fac. North Caroline State U. 46, 65,109,134
- Perez-Carbajal C**, Caldwell D, Farnell M, Strinfellow K, Pohl S, Casco G, Pro-Martinez A, Ruiz-Feria CA (2010) Immune response of boriler chickens fed different levels of arginine and vit E to a coccdiosis vaccine and Eimeria challenge. *Poult Sci* 89:1870-1877
- Perez-Sotelo LS**, Talavera-Rojas M, Monroy-Salazar HG, Lagunas-Bemabe S, Cuaron-Ibargüengoytia JA, Montes de Oca R, Vazquez-Chagoyan JC (2005) *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47(3-4)70-75
- Reale A**, Di Renzo T, Succi M, Tremonte P, Coppola R, Sorrentino E (2013) Microbiologicla and Fermentative proprieties of baker's yeast starter used in breadmaking. *Journal of Food Sci.* 78(8) m1124-1232
- Rodrigues ACP**, Cara DC, Fretez SHGG, Cunha FQ, Vieira EC, Nicoli JR, Vieira LQ (2000) *Saccharomyces boulardii* stimulates slgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *Journal Appl micro* 89:404-414
- Romani L** (2011) Immunity to fungal infections. *Nature Reviews. Immunology* 11(april) 275-288
- Silva ICM da**, Ribeiro AML, Canal CW, Vieira MM, Pinheiro CC, Goncalves T, de Moraes ML, Ledur VS (2011) Effect of vitamin E levels on the cell-mediated immunity of broilers vaccinated against coccidiosis. *Brazilian Journal of Poult. Sci.* 13(1):53-56
- Shashidhara RG**, Devegowda G (2003) Effect of dietary mannan oligoxaccharide on broiler breeder production traits an immunity. *Poult Sci* 82:1319-1325

- Schanmugasundaram R**, Selvaraj PK (2012) Effect of killed whole yeast cell prebiotic supplementation on broiler performance and intestinal immune cell parameters .  
Poult Sci 91:107-111
- Schorey JS**, Lawrence C (2008) the pattern recognition receptor dectin-1: from fungi to mycobacteria. *Curr Drug Targets* 9(2):123-129
- Solis de los Santos F**, Donoghue AM, Farnell MB, Huff GR, Huff WE, Donoghue DJ. (2007) Gastrointestinal maturation is accelerated in turkeys poult supplemented with a mannan-oligosaccharide yeast extract (Alphamune). *Poult. Sci.* 86:921-930
- Stanley VG**, Gray C, Daley M, Krueger WF, Sefton AE (2004) An alternative to antibiotic-based drugs in feed for enhancing performance of broilers grown on *Eimeria* spp. – infected litter. *Poult Sci* 83:39-44
- Tokic V**, Lazarevic M, Sonvec Z, Tokic A (2007) the influence of different feed additives to performances and immune response in broiler chicken. *Acta Vet. (Beograd)* 57 (2-3):217-229
- Trevisi P**, Priori D, Gandolfi G, Colombo M, Coloretto F, Goossens T, Bosi P (2012) In vitro test on the ability of a yeast cell wall based product to inhibit the *Escherichia coli* F4ac adhesion on the brush border of porcine intestinal villi. *J Anim Sci* 90:275-277
- Volman JJ**, Mesninka RP, Ramakers JD, Winther MP, Carlsen H, Biomhoff R, Buurmand WA, Plat J (2010a) Dietary (1-3), (1-4)- $\beta$ -D-glucans from oat activate nuclear factor  $\kappa$ B in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. *Nut. Res* 30(1):40-48
- Volman JJ**, Helsper JPF, Wi S, Baars JJP, van Griensven LJLD, Sonnenber ASM, Mesink MP, Plat, J. (2010b) Effects of mushroom-derived  $\beta$ -glucan-rich polysaccharide extracts on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and NF- $\kappa$ B transactivation in Caco-2 reporter cells: Can effects be explained by structure. *Mol Nut Food Res.* 54:268-276
- Xavier J**, Sigal-Escalada MG, Kohler P, Iglesias MF (2011) Monitoring anticoccidial performance of several products broiler chicken farms over a period of five years. *Engormix* 10/20/2011
- Yang Y**, Iji PA, Kocher A, Mikkelsen LL, Choct M (2007) Effects of Mannan oligosaccharide on growth performance, the development of gut microflora, and gut function of broiler chickens raised on new litter. *J. Appl. Poult. Res* 16:280-288
- Yitbarek A**, Echeverry H, Brady J, Hernandez-doria J, Camelo-Jaimes G, Sharif S, Gunter W, House JD, Rodriguez-Lecompte JC (2012) Innate immune response to yeast-

derived carbohydrates in broiler chickens fed organic diets and challenged with clostridium perfringes. Poult Sci. 91:1105-1112

**Yitbarek A**, Rodriguez-Lecompte JC, Echeverry HM, Munyaka P, Barjesteh N, Sharif S, Camelo-Jaimes G (2013) Performance, histomorphology, and Toll-like receptor, chemokine and cytokine profile locally and systemically in broiler chickens fed diets supplemented with yeast-derived macromolecules. Poult. Sci 92:2299-2310

**Zdunczyk Z**, Juskiewicz J, Jankowski J, Biedrzycka E, Koncicki A (2005) Metabolic response of the gastrointestinal tract of turkeys to diets with different levels of Mannan-oligosaccharide. Poul. Sci. 84:903-909

**Zhu JJ**, Lillehoj HS, Allen PC, Yun CH, Pollock D, Sajadi M, Emara MG (2000) Analysis of disease resistance-associated parameters in broiler chickens challenged with Eimeria maxima. Poult Sci. 79:619-62

## **CAPITULO VI JUSTIFICACION**

### **6.1 Planteamiento del problema (situación actual)**

La prioridad para la industria del pollo de engorda es la búsqueda de un mecanismo de control no antibiótico para coccidiosis. El uso de vacunas para modular la respuesta inmune ante las coccidias ha sido la opción más utilizada para sustituir los antibióticos. Esta

opción si bien ha probado ser de utilidad en aves de vida larga (gallinas de postura y reproductoras), no es tan eficiente en el pollo de engorda con vida muy corta y crecimiento acelerado. (McDoulgald ,2008) (Elmusharaf et al.2007)

La utilización de vacunas de coccidia elaboradas con cepas atenuadas o cepas autógenas implica que se debe presentar en el intestino una infección por las coccidias con un nivel bajo tal que el sistema inmune reaccione y las pueda controlar, confiriendo una inmunidad al ave para evitar otros contagios por cepas más severas del parasito. (Lillehoj et al. 2003)

Este proceso, además de causar una reacción inmune inflamatoria en el intestino, implica que el ave desarrolle también pérdida del apetito, elevación de la temperatura y un gasto de energía superior al estimado para su mantenimiento; lo que en conjunto se expresa como un retardo en el crecimiento, que puede ser que si se dejara desarrollar la infección de campo, que por otro lado, no siempre es compensado económicamente como si se hubieran usado antibióticos para prevenir estos efectos.

La inmunidad a las coccidias esta mediada por: 1) una respuesta primaria con la producción de IgA y, 2) una acción de linfocitos citotóxicos. La velocidad de esta reacción distingue a las aves resistentes de las que son más susceptibles a la enfermedad. Si bien se ha determinado que existen aptotipos más resistentes a la infección (por mejor producción de IgAs y respuesta celular más rápida), no se ha dado en las líneas comerciales la selección genética a este factor, por lo que no se pueden tener por ahora parvadas genéticamente "resistentes". (Dalloul et al 2003)

La utilización de productos de levaduras de diferentes tipos (completas, dobles fermentados, paredes, nucleótidos y otras combinaciones) ha mostrado ser un factor potencialmente favorable en la respuesta de las aves a liberarse más rápidamente de los efectos nocivos de la infección por coccidias. Si bien esta asociación se ha mostrado en varios trabajos, el mecanismo por el cual ocurre este efecto no ha sido estudiado a profundidad de manera que pueda optimizarse el efecto a nivel de las parvadas de pollo de engorda. (Hooge ,2004)

Los productos de levaduras generan por si mismos un respuesta inmune que ha sido evaluada por la presencia de IgA en la luz intestinal. Sin embargo, existe poca información

del desarrollo de otras respuestas del sistema inmune innato o el mediado por células. Dada la presencia de patrones de moleculares de patogenicidad (PMP) en las diferentes estructuras de las levaduras, estas pueden estimular Receptores Tipo Toll (TLR), como el TLR<sub>2</sub> y del tipo Lectina (LLR) Dectin 1, que se presentan en las células dendríticas y estimulan la reacción de las mismas al entrar en contacto con las levaduras en las vellosidades intestinales o en las placas de Peyer; Se ha demostrado que este efecto existe y que aparecen una serie de interleucinas (IL-12, IL-10, TGF) que principalmente están relacionadas con la maduración de linfocitos Treg, y estos a su vez, apoyan el cambio de producción de IgA en las células plasmáticas desplegadas en el intestino. (Cong et al. 2009), (Nerren et al. 2009)

Por otra parte, se ha demostrado también que los macrófagos y los linfocitos citotóxicos, aumentan sus capacidades para manejar antígenos, lo que se conoce como “armado” de los mismos, muy importante para activar una respuesta inmune más pronta ante los antígenos.

Dentro de las respuestas innatas a la presencia de patógenos, existen además de las líneas celulares, proteínas defensivas también. La Lectina Ligadora de Mananos (LLM) es una de las proteínas de la fase aguda que ha mostrado ser determinante en la reacción inmune para detener infecciones de diversa índole. Las LLM son capaces de ligarse a PMP similares a los presentados por las levaduras y otros microorganismos, al fijarse al PMP activan la vía alternativa del complemento, por lo que pueden destruir a los microorganismos o inactivar virus. Adicionalmente, la presencia de la LLM incrementa la capacidad fagocítica de los macrófagos y la reacción citotóxica de los linfocitos. (Wang et al 2011) En las aves se ha demostrado que están presentes entre las 48-96 horas de iniciar la infección, (como Bronquitis infecciosa, Gumboro, Laringotraqueítis, *E. coli*), y que son un factor que beneficia al ave aumentando su resistencia a la enfermedad. (Juul-Madsen et al. 2011)

En el pollo de engorda existen dos tipos genéticamente distinguibles en cuanto a la capacidad para aumentar el contenido sérico de LLM. Uno de los aplotipos produce un nivel bajo, aproximadamente 5-9 µg/ml de sangre, mientras que el aplotipo reactivo puede subir los niveles para llegar a más de 15 µg/ml. Estas líneas genéticas no están seleccionadas en las aves comerciales. .( Lauresen et al. 2000)

La relación entre el consumo de levaduras por pollos de engorda y el posible papel que pudiera tener las LLM en la respuesta inmune de los mismos no ha sido explorada. Esta relación pudiera ser de importancia para mejorar la respuesta a infecciones por coccidia y por lo tanto ser un factor importante en la crianza de pollos de engorda para el control de la coccidia sin el uso de antibióticos.

## 6.2 Hipótesis

**H<sub>0</sub>:** La suplementación con productos de levaduras en pollos de engorda, no producirá una respuesta aguda en la producción de LLM en aves no infectadas por coccidia

**H<sub>1</sub>:** La suplementación con productos de levaduras en pollos de engorda, producirá una respuesta aguda en la producción de LLM en aves no infectadas por coccidia.

**H<sub>2</sub>:** La suplementación con productos de levaduras en pollos de engorda, además de incrementar la producción de IgA y aumentará los niveles séricos de LLM en aves infectadas por coccidia.

## 6.3 Objetivos

1. Evaluar la respuesta sérica de LLM diferencial entre aves que consumieron o no productos de levaduras a los 4, 7 y 14 días del inicio del consumo, comparando las diferencias entre los grupos reactivos a la producción de LLM y los no reactivos.
2. Determinar los efectos sobre las variables zootécnicas: peso, consumo alimento, ganancia de peso de las aves entre las que consumieron o no productos de levaduras y, que sean o no reactivas a la producción de LLM.
3. Determinar los cambios en la morfología microscópica del intestino en aves que recibieron levaduras a los 4, 7 y 14 días de iniciado el consumo y su asociación con la condición reactiva o no reactiva a la producción de LLM.

4. Evaluar la respuesta humoral por ELISA a la vacunación por Virus Enfermedad de NewCastle (vENC) en relación a su reactividad o no en la producción de LLM.
5. Comparar la respuesta humoral de IgA en intestino durante el uso de productos de levaduras en el alimento por 28 días, con y sin infección por coccidias de baja patogenicidad.
6. Comparar la respuesta sérica en la producción de LLM en aves después de 28 días de consumo de productos de levaduras, con y sin la infección por coccidias de baja patogenicidad.
7. Identificar los cambios en la morfología microscópica de intestino de aves que consumieron productos de levaduras por 28 días y su relación al tipo de reactividad o no a la producción de LLM en aves con y sin infección por coccidias de baja patogenicidad.

#### **6.4 Límites y alcances de la tesis**

La incapacidad de tener un grupo control previamente seleccionadas de aves por su aptotipo reactivo o no a la producción de LLM, limita la posibilidad de contar con una evaluación con más especificidad sobre la influencia de este factor en la respuesta inmune. Por esta razón, este factor genéticamente determinado se puede apreciar solo por la respuesta sérica, posterior a los retos.

Para producir la infección por coccidias se depende de una serie de cepas atenuadas que, a las dosis usadas, pueden no causar el tipo de lesiones adecuadas para disparar una respuesta inmune suficiente para marcar un diferencial entre los efectos.

La producción de IgA en el intestino puede determinarse a nivel de totales, pero no a nivel de especificidad que probaría una reacción directa, como por ejemplo, contra las estructuras de la levadura.

Con esta tesis se busca aumentar el conocimiento de la respuesta inmune ante la infección por coccidias y qué factores pueden ser usados para disminuir el daño provocado por esta enfermedad en la producción moderna de carne de pollo de engorda

## **BIBLIOGRAFIA CAPÍTULO VI**

- Cong Y**, Feng T, Fujihashi K, Schoeb T, Elson CO (2009) A dominant coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *PNAS*. 106(46):19256-19261
- Dalloul RA**, Lillehoj HS, Shellem TA, Doerr JA (2003) Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a lactobacillus-based probiotic. *Poultry Sci* 82:62-66
- Elmusharaf MA**, Beynen AC (2007) Coccidiosis in poultry with emphasis on alternative anticoccidial treatments. Universiteit Utrecht. DoctorThesis chapter 1 :9-44
- Farache J**, Zigmund E, Shakhar G, Jung S. (2013) Contributions of dendritic cell and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunol. Cel Biol.* 91:232-239
- Feng T**, Elson CO (2011) Adaptive immunity in the host-microbiota dialog. *Immunology* 4(1):15-22
- Geus de ED**, Vervelde L. (2013) Regulation of macrophage and dendritic cell function by pathogens and through immunomodulation in the avian mucosa. *Developmental and Comp. Immunol.* 41:341-351
- Hooge DM** (2004) Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993-2003. *Inter. Jour. Poult. Sci.* 3(3):163-174
- Juul-Madsen HR**, Norup LR, Jorgensen PH, Handberg KJ, Watrang E, Delgaard TS (2011) Crosstalk between innate and adaptive immune responses to infectious bronchitis virus after vaccination and challenge of chicken varyin in serum mannose-binding lectin concentrations. *Vaccine.* 29(51):9499-950
- Kunisawa J**, Kiyono H 2012. *Alcaligenes* is commensal bacteria habituating in the gut-associated lymphoid tissue for the regulation of intestinal IgA responses. *Frontiers in Immunology.* 3 article 65:1-5
- Lauresen S.B.**, Nielsen OL (2000) Mannan-binding lectin (MBL) in chickens: molecular and functional aspects. *Developmental and Comparative Immunology* 24:85-101
- Lillehoj H**, Okamura M (2003) Host Immunity and vaccine development to coccidian and *Salmonella* infections in chickens. *Jour. Poult. Sci* 40:151-193
- Macpherson AJ**, Uhr T. (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.* 303:1662-1665

- McDougal LR** (2008) Control of coccidiosis and performance enhancement in poultry in a post-arsenic world. Engormix articles. 09/06/2008 p1-3
- Nerren JR**, Kogut MH, 2009 The selective dectin-1 agonist, curdlan, induces an oxidative burst response in chicken heterophils and peripheral blood mononuclear cells. Vet Imm. And Immuno histopat. 127:162-166
- Pascual G.**, De Marzi M, Barrios H, De Franceschi M. 2011. Immune mechanisms in avian coccidiosis. Engormix 10/20/2011. XXII Latin American Poultry Congress
- Stanley VG**, Gray C, Daley M, Krueger WF, Sefton AE (2004) An alternative to antibiotic-based drugs in feed for enhancing performance of broilers grown on Eimeria spp. – infected litter. Poult Sci 83:39-44

## **CAPITULO VII EXPERIMENTO 1**

### **Concentración de Lectina Ligadora de Mananos en Pollos de Engorda alimentados con un producto fermentado por levaduras y vacunado con virus de Newcastle.**

#### **7.1 Resumen**

El objetivo de esta investigación fue evaluar las concentraciones séricas de la Lectina Ligadora de Mananos (LLM) en diferentes edades de pollos de engorda alimentados con cantidades crecientes de un producto Fermentado por Levaduras (PFL) y que adicionalmente fueron vacunados contra la Enfermedad de Newcastle (ENC). Ochenta pollitos mixtos Ross B308 fueron enjaulados individualmente. Grupos de 20 aves tomados al azar fueron asignadas a diferentes niveles de PFL (0, 400, 800, 1600 ppm en el alimento). Las aves tuvieron acceso libre al alimento. Las concentraciones de LLM fueron determinados a 17,21,28,35. A los 21 días, todas las aves fueron vacunadas con ENC (ocular) y los títulos de anticuerpos (Ac) contra ENC se determinaron a los 35 días de edad. Los datos de LLM se evaluaron con un proceso MIXTO; ANOVA fue utilizada para los Ac y los otros datos de desempeño productivo; también se corrieron modelos de regresión. La concentración de LLM mostró un patrón cuadrático ( $p < 0.05$ ) durante los diferentes días de muestreo con una tendencia decreciente hacia el día 35. La vacunación contra ENC no tuvo ningún efecto en la concentración de LLM. Los títulos de anticuerpos mostraron un patrón cúbico ( $p < 0.05$ ) teniendo el mínimo de los títulos al nivel más alto de PFL. En conclusión, la concentración de LLM decrece con el tiempo, alcanzando el valor mínimo a los 35 días, pero el consumo de PFL no afectó la concentración de LLM durante el experimento, pero si se asoció con la disminución de títulos de Ac contra ENC a los 35 días de edad. La vacunación contra ENC no afectó los niveles de LLM a los 35 días.

**Palabras clave:** pollo de engorda, probiótico, Inmunidad, desempeño.

## Introducción

Los beneficios del uso de los Antibióticos promotores de Crecimiento (APC) en la salud y el crecimiento de los animales ha sido muy bien documentados en la literatura científica, aunque existen argumentos en contra del uso extensivo de estos productos que podrían conducir al desarrollo de Resistencia en bacterias patógenas y convertirse estas en un riesgo para la salud de animales y humanos. (Gomez y Angeles, 2011; Gómez et al., 2012). En consecuencia, varios aditivos alimenticios han sido evaluados para reemplazar a los APC. (Faria-Filho et al., 2006; Barbosa et al., 2010). Uno de los más estudiados como reemplazo han sido los productos de levaduras y sus derivados ricos en manooligosacáridos (MOS). Un meta-análisis que incluyó 21 estudios en pisos concluyó que los pollos de engorda en cuyas dietas se incluyó MOS tenían pesos corporales similares e índices de conversión menores, así como más bajas mortalidades que los alimentados con las dietas adicionadas de antibióticos (Hooge, 2004). Adicionalmente, otro holo-análisis que incluyó 32 publicaciones con el uso de MOS como aditivo confirmaron los efectos en pollos de engorda. (Rosen, 2007).

Los estudios realizados en condiciones de campo y experimentales han mostrado que los diferentes productos de MOS pueden mantener la salud intestinal de las aves contra retos tales como la infección por coccidias, *E. coli* y *Salmonella* spp. Sin embargo el mecanismo subyacente a estas respuestas no ha sido completamente determinado. (Gómez-Verduzco et al., 2009; Gomez and Angeles, 2011; Gómez et al., 2012).

Un modo de acción propuesto para la acción de Levadura y MOS implica que las estructuras de las membranas ricas en unidades de Manosa pueden unir a bacterias potencialmente patógenas, particularmente aquellas que tienen fimbria tipo 1, disminuyendo su capacidad de adhesión a los enterocitos y su colonización. En otras palabras, diferentes bacterias pueden aglutinar MOS con distinta capacidad. (Oyofó et al., 1989; Spring et al., 2000; Hooge, 2004). Aún más, Sheng et al. (2006) encontraron que aislado de Mananos de levaduras pueden ligar Lactinas tipo C de receptores de Manosa, como las expresadas en células presentadoras de antígeno incluidas CD y MACs. Como estos receptores determinan la endocitosis, estos pueden ser seleccionados como ligandos para estimular la respuesta en las células inmunes. (Cox et al., 2006). Receptores ligadores de Manosa han sido descritos como posibles adyuvantes capaces de introducir una

respuesta de inmunidad protectora y son importantes para desarrollar estrategias de vacunación en vacunas de mucosas. (Cox et al., 2006).

En humanos la Lectina Ligadora de Mananos (LLM) una proteína de origen hepático juega un papel crucial en la inmunidad innata contra levaduras como la *Candida* spp. (Laursen, 2003; Brouwer et al., 2006; Brouwer et al., 2008). Las LLM pertenecen a la familia de las lectinas calcio dependientes (colectinas) y son capaces de activar la cadena de complemento al fijarse a carbohidratos microbianos y la opsonización aumentando la tasa de destrucción de los microorganismos. (Valdimarsson et al., 1998). Las LLM se unen a las manosas, la N-acetilglucosamina y otros derivados presentes en la superficie de varias bacterias Gram+ y Gram -, hongos y partículas de levaduras. Se liga fuertemente a *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, y *Streptococci β-hemolitico* grupo A. La capacidad de ligar es intermedia para *E. coli*, *Klebsiella* spp., y *Haemophilus influenzae* tipo b (Laursen, 2003).

Estos descubrimientos sugieren que la presencia de unidades de Manosa en la superficie de las levaduras usadas como productos promotores de crecimiento podría estimular el crecimiento y la salud de las aves mediante dos posibles mecanismos

- 1) ligando bacterias patogénicas y bloqueando por tanto la adhesión a las células intestinales
- 2) Interactuando con las células dendríticas y macrófagos, disparando la reacción inmune en el intestino que conduzca a la producción de Lectina Ligadora de Mananos (LLM) por el Hígado. Dichas LLM mejorarían la opsonización y destrucción de bacterias que tuvieran Manosa y N-acetil glucosamina en su superficie.

En aves domésticas, Laursen et al (1998) demuestran que existen valores de LLM en suero que van de 0.4 a 37.8 µg/mL en el suero de diferentes poblaciones. Se ha reportado incrementos de dos a tres veces los niveles de LLM en aves que sufren infecciones virales por Bronquitis y Virus de Laringo Traqueítis (Nielsen et al 1999; Juul-Madsen et al, 2003; Juul-Madsen et al, 2006).

Dentro del material revisado no tenemos conocimiento de que se haya probado una relación entre el consumo de productos de levaduras o MOS y los valores séricos de LLM en aves. Si esta relación existe, esto aportaría un conocimiento mayor al mecanismo de acción de las levaduras y esto puede ser aprovechado para mejorar la efectividad de los programas de vacunación por promover la respuesta del sistema inmune. De esta manera, el objetivo del este estudio fue evaluar el efecto de un producto fermentado por levaduras (PFL) en el alimento. y su relación en las concentraciones de LLM y los títulos de inmunoglobulinas contra la enfermedad de New Castle en pollo de engorda comercial.

### **7.3 Materiales y Métodos**

Esta investigación fue revisada y aprobada por el comité de buenas prácticas de manejo de animales de la Universidad Nacional Autónoma de México (SICUAE). 80 pollos de engorda mixtos de un día, de estirpe Ross B308 fueron alojados en cajas y arreglados en baterías. Las aves tuvieron acceso libre al iniciador (1-21 días) y finalizador (22-35 días) alimentos que fueron formulados de acuerdo a las recomendaciones del NRC (1994). Se añadió Nicarbazina como anticoccidial a 125 ppm. Las aves fueron vacunadas contra enfermedad de Marek en la incubadora. Los regímenes de temperatura y luz fueron determinados de acuerdo al guía de manejo (Ross, 2009). A los 17 días de edad, las 80 aves fueron seleccionadas y asignadas al azar a diferentes niveles de PFL (0, 400, 800,1600 ppm). Se utilizaron 20 réplicas (una réplica fue creada con cada ave) por tratamiento.

El PFL usado fue un producto comercial con proceso de doble fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* que contenía 5 millones de UFC/g (Original XPC, Diamond V, Cedar Rapids IA, USA).

El peso corporal de las aves fue evaluado al inicio y al final del trabajo y la cantidad de alimento ofrecida y rechazada fue registrada durante todo el periodo experimental para determinar la ganancia de peso (g/d), el consumo de alimento (g/d) y el índice de conversión de alimento.

A los 17, 21, 28, 35 días de edad, 1 ml de sangre fue obtenido de cada ave por venipuntura en el ala izquierda. El suero fue separado e inmediatamente conservado a -4 C hasta su valoración en el laboratorio. A los 21 días de edad, las aves fueron vacunadas en el ojo

con una dosis contra ENC utilizando cepa La Sota (B1, virus vivo). A los 17 días de edad, 12 aves (3 por cada grupo) fueron seleccionadas al azar y sacrificadas por dislocación cervical para desarrollar necropsias y determinar la presencia de lesiones en las muestras de duodeno, yeyuno e hígado. Al final del experimento (35 días de edad) se repitió el procedimiento para obtener las muestras por necropsia. Las muestras fueron guardadas en formalina y llevadas al laboratorio para su fijación, tinción por H/E y posterior evaluación histopatológica.

Las muestras de suero fueron analizadas para determinar LLM utilizando la técnica de ELISA de acuerdo al método descrito por Norup y Juules-Madsen (2007). Los análisis fueron realizados en el laboratorio de la Facultad de Science and Agriculture de la Universidad Aarhus en Dinamarca. Las determinaciones de anticuerpos contra ENC en los sueros, fue desarrollada en el mismo laboratorio utilizando el kit Proflock NDV plus ELISA de Symbiotiks Europe SAS (Francia) en las muestras colectadas a 35 días.

Basados en las observaciones previas (Laursen et al, 1998, Juul-Madsen et al, 2007; Kjaerup et al, 2013) en los cuales aves con bajos y altos títulos de LLM fueron identificadas en la misma estirpe (asociadas a diferentes genotipos) y considerando la concentración sérica de LLM al día 17 en este estudio, dos subgrupos de pollos por cada tratamiento fueron formados, uno en el cual la concentración LLM fue menor de 9 µg/mL que fue clasificado en bajo (bLLM) y otro en el cual la concentración de LLM fue superior a 9 µg/mL que fue calificado alto (aLLM). Para evaluar estos límites fue asegurado un mínimo de 4 réplicas por combinación en cada día de muestreo. Se obtuvieron 24 y 36 observaciones en los bLLM y aLLM respectivamente.

La concentración de LLM fue analizada utilizando un procedimiento de modelo mixto con mediciones repetidas y dos factores: nivel en la dieta de PFL y día del muestreo (SAS, 1990). La variable aleatoria fue el ave. El nivel de LLM mostro un skewnes positivo y fue transformado a logaritmo antes de ser analizado. Los datos de Ac y los de variables de producción (peso corporal, consumo alimento, índice de conversión) fueron trabajados por ANOVA. Se aplicó un análisis de regresión para describir la relación entre las variables de respuesta y los niveles de PFL en los diferentes días de análisis. Adicionalmente, se corrieron análisis evaluaciones para el coeficiente de correlación entre los valores de LLM

y las variables de producción y los títulos de Ac utilizando un procedimiento de PROC CORR.

## 7.4 Resultados y Discusión

### 7.4.1 Concentraciones séricas de LLM

Durante el estudio, la concentración media de LLM varió de 7.54 a 11.46  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 1). Los valores absolutos de LLM se encontraron entre 2.9 a 38  $\mu\text{g/mL}$ , 2.7 a 26.9  $\mu\text{g/mL}$ , 2.5 a 21.1  $\mu\text{g/mL}$  y 2.7 a 21.8  $\mu\text{g/mL}$  en los días 17,21,28,35 respectivamente. La concentración de LLM previamente reportada por Laursen et al (1998) tenía un rango de 0.4 a 37.8  $\mu\text{g/mL}$ , con una media de 5.8  $\mu\text{g/mL}$  en aves de 1 a 70 días de edad. El rango de LLM encontrado en nuestro estudio se encuentra dentro de esos valores. Sin embargo, en este trabajo, el nivel promedio de la concentración de LLM entre los 17 y 35 días fue de 8.98  $\mu\text{g/mL}$ , el cual es aproximadamente 1.5 veces más alta que la cantidad promedia reportada por Laursen et al (1998). Dentro de la media mostrada en al tabla 1, la diferencia observada fue de 1.6 veces entre la mínima y máxima de las concentraciones de LLM. Norup et al (2009) encuentra una diferencia de 2- a 3- veces contra el nivel basal de LLM en el suero de diferentes líneas comerciales de gallinas entre los 3 y 42 días de edad; a los 21 y 42 días la concentración basal de LLM varió de 8 a 16.5  $\mu\text{g/mL}$  .

Tabla 1. Concentración en diferentes días de muestreo de Lectina Ligadora de Mananos (LLM,  $\mu\text{g/mL}$ ) en el suero de pollos de engorda alimentados con diferentes niveles de Producto Fermentado de Levaduras (PFL)

Nivel de PFL, ppm	Día de edad al muestreo			
	17	21	28	35
0	9.93 (1.575) <sup>a</sup>	10.33 (1.166)	9.01 (0.928)	7.90 (0.808)
400	9.14 (1.717)	7.54 (1.293)	8.16 (1.014)	7.00 (0.858)
800	11.46 (1.779)	8.65 (1.331)	9.00 (1.014)	9.10 (0.883)
1600	10.50 (1.774)	8.78 (1.240)	8.94 (1.048)	8.18 (0.862)

<sup>a</sup> En paréntesis el error estándar, se muestran las medias.

En pollitas de postura de 14 a 35 días de edad el rango de LLM fue de 5-9 µg/mL fue reportado por Juul-Madesen et al (2003) mientras que a los 49 días el nivel basal de LLM se movía entre 1.8 y 7.5 µg/mL (Nielsen et al, 199). En el estudio de Kjaerup et al (2013) los niveles de LLM se encontraron de 2.6 a 14.3 µg/mL en los bLLM y aLLM respectivamente al genotipo de las aves. Los valores absolutos de LLM en nuestras observaciones se encuentran en los rangos de los tres estudios con la excepción del mínimo reportado por Nilsen et al (1999).

En el estudio de Laursen et al (1998) las concentraciones de LLM fueron determinadas en pollos de engorda pero la media no fue mostrada en su trabajo. En la misma publicación, 14 estirpes diferentes de aves fueron evaluadas representando tanto tipos de productores de carne como líneas de huevo para plato sin reportar diferencias en las observaciones de LLM entre ellas. Nielsen et al (1998) evaluó en sueros la LLM en pollos de engorda o gallinas de postura, no reportó diferencias entre ellas a los 21 días de edad. Las concentraciones de LLM tampoco fueron presentadas en esta publicación. En su conjunto, las concentraciones de LLM en nuestro estudio se encuentran en los rangos reportados para gallinas de postura. Los autores no tenemos conocimiento de ningún reporte de LLM en pollos de engorada Ross B308.

#### **7.4.2 Concentración de LLM y PFL en la dieta.**

La media de la concentración de LLM en el suero no fue afectada por la interacción entre los niveles de PFL en las dietas y el tiempo del muestreo (Tabla 1). El resultado indica que no hay ninguna relación con el incremento del nivel de PFL en la dieta y los niveles séricos de MBL durante el periodo experimental. Uno de los posibles mecanismos de acción de las levaduras está relacionado con la interacción entre las Células Dendríticas localizadas en la Mucosa, tanto como con los Macrófagos, ambas células capaces de reconocer las unidades de Manosa en las levaduras. Esto podría haber iniciado un proceso inflamatorio que fuera suficiente para inducir la producción de LLM por el hígado. La función de las LLM es mejorar la opsonización de bacterias patogénicas con Manosa o N-acetilglusamina en sus paredes. Sin embargo, la falta de relación entre la presencia de PFL y los niveles séricos de LLM en este estudio, refuta esta hipótesis.

### 7.4.3 Concentraciones de LLM y días de muestreo.

Los niveles séricos de LLM muestran una respuesta cuadrática en el tiempo ( $p < 0.05$ ), iniciando con los más altos valores en el día 17 y llegando al mínimo al día 35 de edad con valores intermedios a los días 21 y 28 (Figura 1<sup>a</sup>). La ecuación de regresión obtenida fue la siguiente:  $y = 11.523 - 1.548x + 0.175x^2$ ,  $R^2 = 0.92$ . Juul-Madsen et al (2003) reportan pocos cambios en las concentraciones de LLM en el suero entre los 21 y 42 días de edad en un genotipo de pollos, pero ningún cambio fue reportado en el mismo periodo para el otro genotipo. Estos patrones son diferentes claramente de los encontrados en los grupos de nuestro estudio. Norup et al (2009) encuentra que el nivel de LLM en aves de 21 a 294 de edad muestra un incremento estable con picos y caídas en el tiempo. Debido a que en nuestro estudio las LLM fueron determinadas en una pequeña parte de la vida de los pollos, es posible que el decremento encontrado en la tendencia de las LLM represente solo una pequeña caída en el ciclo biológico más largo.

Hace varios años se identificaron y desarrollaron líneas de aves aLLM y bLLM por selección que estaba basada en determinar las variantes genéticas y la función biológica de la LLM, específicamente en la respuesta del sistema inmune en grupos de aves retadas o no por un agente biológico (Laursen et al ,1998; Juul-Madsen et al, 2007; Kjaerup et al, 2013). En nuestro estudio, los pollos fueron clasificados en aLLM o bLLM para detectar cualquier patrón divergente de las LLM en el tiempo, así como en la respuesta inmune de las aves de la misma parvada. El promedio de LLM al día 17 para los pollos bLLM y aLLM fueron por grupos 6 y 14.5  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Las concentraciones de LLM en los aLLM de nuestro estudio, fueron más bajas (2.6  $\mu\text{g/mL}$ ) que las reportadas por Kjaerup et al (2013), o las reportadas por Laursen et al (1998) que fueron de 7.5  $\mu\text{g/mL}$  y similares a las encontradas por Juul-Madsen et al (2007) de 6.3  $\mu\text{g/mL}$ . Por otra parte, las concentraciones de LLM en el grupo aLLM de nuestro estudio fue más baja que la concentración de aLLM (30.4  $\mu\text{g/mL}$ ) reportada por Juul-Madsen et al (2007), más alta que las aLLM encontrada por Lauresen et al (1998) de 11.1  $\mu\text{g/mL}$  y casi la misma que el valor (14.3  $\mu\text{g/mL}$ ) mostrado por Kjaerup et al (2013).

Las concentraciones de LLM en los días de muestreo no siguieron el mismo patrón en aLLM y bLLM (Figuras 1B, 1C). Las concentraciones de LLM en bLLM tuvieron una respuesta cuadrática en los días de muestreo ( $y = 6.87 - 1.815x + 1.18x^2$ ,  $R^2 = 0.99$ ).

Comparadas con el nivel basal al día 17, las bLLM se incrementaron de 5 a 10% en los días 21 y 28 y cayeron casi 6% en el día 35. Este patrón fue marcadamente distinto del encontrado para las LLM de todos los pollos en su conjunto (aLLM y bLLM en conjunto, figura 1<sup>a</sup>). La concentración de LLM en los aLLM (figura 1C) mostró una respuesta cuadrática ( $y=18.276-4.6165x+0.67x^2$ ,  $R^2=0.96$ ) el cual fue similar al patrón mostrado cuando todos los datos son utilizados en conjunto en los diferentes días del muestreo (figura 1<sup>a</sup>). Esto es consecuencia del alto peso que tienen en los valores de LLM las concentraciones en las aves aLLM sobre la media ponderada de cada día de muestreo.

#### **7.4.4 Resultado de la vacunación contra ENC y concentración de LLM en el suero**

El decremento en los títulos séricos de LLM en todos los grupos durante los 18 días del experimento, independientemente del reto con la vacuna de ENC, indica que no fue un estímulo suficiente para la producción de una respuesta por parte del Hígado. Estos resultados son opuestos a los previamente reportados (Nielsen et al, 1999, Juul-Madsen et al 2003; Juul-Madsen et al, 2006) en los cuales 2- y 3- veces de incremento en LLM fue observado en pollos infectados con virus vivo de Bronquitis Infecciosa y virus de Laringo traqueítis. En esos trabajos se ha demostrado que el tiempo de reacción para la producción de LLM es de 2.5 a 4.5 días posteriores al reto, dependiendo de la línea genética y que la vida media de las LLM es de 4-8 días (Laursen et al, 1998; Juul-Madsen et al, 2003). De acuerdo a esto, esperamos ver incrementos de LLM a los 28 y 35 días de edad (i.e., entre los 7 y 14 días después de la vacunación) pero esto no ocurrió.

Varios factores podrían explicar la falta de diferencias entre los niveles de LLM después de la vacunación en este estudio. Por ejemplo, la virulencia de la cepa vacunal usada en el reto podría afectar la respuesta (Nielsen et al. 199). La vacunación contra ENC por vía ocular podría no ser un modelo adecuado para producir un incremento de larga duración en el nivel de LLM 7 días después de la inoculación.

#### **7.4.5 Títulos séricos de Ac contra ENC y consumo de PFL**

El incremento de la dosis de PFL se asoció con un patrón cúbico ( $p < 0.05$ ) en los títulos séricos contra ENC (tabla 2). La Ecuación de regresión obtenida fue:  $y= 6587-4.9029x+0.0091x^2-4E-06x^3$ ,  $R^2=0.99$ . Comparados con el nivel 0 de inclusión de PFL, los

Ac cayeron 12%, otro 7% y más aún 27% a 400, 800 y 1600 ppm en la dieta, respectivamente. Gao et al (2008) reportan la inclusión creciente de niveles de PFL en pollos de engorda y la relacionan con un efecto lineal en los títulos de Ac contra ENC a 21 posteriores a la vacunación. En otros trabajos fueron observados niveles más altos (Shashidhara y Devegowda, 2003; An et al.,2008) o sin cambios (Silva et al., 2009) de los títulos de Ac también contra ENC utilizando productos de levadura o extractos de la misma en las dietas de los animales retados. Nuestros resultados son diferentes a los anteriores reportes con menos Ac encontrados en los niveles más altos de PFL

Tabla 2. Títulos de Anticuerpos contra Virus ENC (log) a 35 días de edad.

Nivel de PFL, ppm	Todas las observaciones	bLLM	aLLM
0	6433 <sup>b</sup>	6915 <sup>b</sup>	5951 <sup>c</sup>
400	5641	5506	5776
800	6889	7864	5914
1600	4698	5585	3811
SEM <sup>a</sup>	605.03	956.64	741.01

<sup>a</sup> SEM = Standard error of the mean.

<sup>b</sup> Cubic effect of YFP level,  $p < 0.05$ .

<sup>c</sup> Quadratic effect of YFP level,  $p < 0.05$ .

En las aves bLLM el incremento de PFL mostro un patrón cubico en los títulos de Ac contra ENC (tabla 2) ( $y = 691 - 12.043x + 0.00261x^2 - 1E-05x^3$ ,  $R^2 = 0.99$ ;  $p < 0.05$ ) mientras que en las aLLM el patrón fue cuadrático ( $y = 5860 + 0.9434x - 0.0014x^2$ ;  $R^2 = 0.97$ ;  $p < 0.05$ ). La principal diferencia encontrada fue un ligero incremento de los títulos de Ac en los pollos bLLM con la dosis de 800 ppm de PFL, mientras que ningún incremento fue encontrado en los pollos aLLM. En promedio los títulos Ac fueron 20% menores ( $p < 0.01$ ) en las aves aLLM comparados con las bLLM. Este patrón de títulos de Ac descrito para las bLLM es similar

al mostrado cuando los datos son considerados en conjunto. De cualquier manera, los títulos menores de Ac en las aves aLLM están de acuerdo con lo encontrado también para altas concentraciones de LLM reportado por otros autores (Juul-Madsen et al, 2003; Juul-Madsen et al, 2006).

#### **7.4.5 Consumo de PFL y desempeño en crecimiento**

La tabla 3 presenta el consumo de alimento, la ganancia de peso y el índice de conversión de alimento en los pollos durante el periodo experimental. La evaluación de la productividad no ha sido el objetivo de esta investigación debido al protocolo de sangrado para dar seguimiento a las LLM en suero. Sin embargo, los datos de desempeño de las aves, mostraron un crecimiento dentro de lo normalmente esperado, evaluando que el promedio de peso fue de 900 entre el día 17 y 35 de edad (Ross, 2009). En el análisis de todas las observaciones, la ganancia de peso tuvo una respuesta cuadrática ( $y=950.34 + 0.0633x - 2E-05x^2$ ;  $R^2=0.99$ ;  $p<0.01$ ) al incrementar los niveles de PFL mostrando un máximo de respuesta a los niveles más altos de inclusión en la dieta. El índice de conversión de alimento también mostró una respuesta cúbica ( $y=2.34-0.0005x+ 1E-06x^2-5E-10x^3$ ;  $R^2=0.99$ ;  $p<0.01$ ) de acuerdo al nivel de inclusión de PFL, con el menor resultado en el nivel más alto de inclusión. El efecto benéfico del PFL en la ganancia de peso y el índice de conversión de alimento está en acuerdo con los reportes de la inclusión de diferentes productos derivados de levaduras que han sido evaluados en pollos de engorda (Hogge, 2004; Rosen, 2007). Debido a estos efectos, las levaduras y los productos de levaduras con el PFL utilizado en esta prueba, han sido reconocidos como alternativas a los APC en los alimentos.

En las aves bLLM tanto la ganancia de peso ( $y = 927.75 + 0.2196x - 1E-04x^2$ ;  $R^2 = 0.99$ ) y el índice de conversión ( $y = 2.4293 - 0.0005x + 2E-07x^2$ ;  $R^2 = 0.89$ ) tienen un patrón cuadrático ( $p<0.05$ ; Tabla 3). Este patrón indica que ambos, el peso y la conversión mejoran linealmente hasta la inclusión de 800ppm de PFL y con un plateau a las 1600 ppm. Para las aves aLLM la ganancia de peso ( $y = 972.94 - 0.0929x + 6E-05x^2$ ;  $R^2 = 0.99$ ) y en índice de conversión ( $y = 2.1947 + 0.0005x - 3E-07x^2$ ;  $R^2 = 0.90$ ) tuvieron también un patrón cuadrático ( $p<0.05$ ). Sin embargo, en contraste con los bLLM ambos parámetros incrementaron con 800 ppm de PFL y aún más con 1600 ppm. Las respuestas finales para las aves con el nivel 0 ppm de PFL fue similar. El patrón de ganancia de peso mostrado

por las bLLM con la inclusión de PFL semeja el mostrado cuando todos los datos son analizados en su conjunto. En contraste, el patrón para la conversión de alimento observada en combinación de los datos fue una mezcla de las respuestas cuadráticas ya descritas para los pollos aLLM y bLLM

Tabla 3. Variables Productivas en pollos de engorda entre 17 y 35 días de edad.

Nivel de PFL, ppm	Consumo alimento, g	Peso Ganado, g	Indice de Conversión de alimento
<b>Todas las observaciones</b>			
0	2185	949 <sup>b</sup>	2.33 <sup>c</sup>
400	2181	956	2.25
800	2225	966	2.31
1600	2204	994	2.22
SEM	58.00	31.61	0.085
<b>bLLM</b>			
0	2234	929 <sup>b</sup>	2.45 <sup>b</sup>
400	2200	997	2.20
800	2238	1045	2.20
1600	2261	1035	2.19
SEM <sup>a</sup>	94.86	56.23	0.133
<b>aLLM</b>			
0	2136	974 <sup>b</sup>	2.21 <sup>b</sup>
400	2162	942	2.30
800	2213	937	2.43
1600	2147	969	2.25
SEM	73.48	43.55	0.104

<sup>a</sup> SEM = Error estandar de la Media.

<sup>b</sup> Efecto cuadrático del nivel PFL,  $p < 0.05$ .

<sup>c</sup> Efecto cúbico del nivel de PFL,  $p < 0.05$ .

#### **7.4.6 Evaluación Histopalógica**

En general, las aves se comportaron normalmente sin signos clínicos de enfermedades antes de iniciado el estudio. Sin embargo, se detectaron retenciones de saco vitelino en casi el 30% de las aves sacrificadas a los 17 días. Ninguna otra lesión (macroscópica o microscópica) que sugiriera la presencia de una patología fue reportada en las aves sacrificadas a 17 y 35 días (datos no mostrados). Laursen et al. (1998) identifica la presencia de LLM desde los 10 días de incubación; la yema del huevo es una fuente de LLM durante el proceso de reabsorción que ocurre en la primera semana (Wang, 1986). Parece que las LLM están presentes en cantidades significativas al momento de la eclosión y pueden ejercer su función como parte de la defensa innata. Desde el día 21 después de la eclosión las aves sintetizan sus propias LLM a niveles constantes al menos hasta 1 año de edad (Laursen and Nielsen, 2000; Norup et al., 2009). Nosotros asumimos que nuestras aves tuvieron estas cantidades fijas de LLM disponible de la yema al momento de la eclosión. No podemos determinar que hubieran tenido un reto sanitario durante o después del periodo de incubación y que esto tuviera continuidad en los cambios de concentración de los patrones mostrados del día 17 al 35 de edad.

#### **7.5 Conclusiones**

Este estudio fue realizado en la línea Ross B308 que son poblaciones híbridas como son encontradas en los pollos de engorda comerciales entre los cuales, los genotipos bLLM y aLLM pueden estar sub o sobre representados, dependiendo de la distribución en cada población. Controlar el genotipo será crucial para la correcta evaluación de los resultados de los programas de vacunación y de los efectos clínicos, así como de los resultados productivos de los promotores de crecimiento como los PFL, otros productos derivados de levaduras y los probióticos, dada la íntima relación que se da entre el sistema inmune y la respuesta de ganancia de peso e índice de conversión que parece diferir entre ambos genotipos. No se encontró asociación entre los niveles usados de PFL y los niveles séricos de LLM lo que implicaría que este mecanismo de la respuesta innata, no es activado. Por otra parte, se confirma la observación de otros autores que en las condiciones de campo, la presencia de bajos títulos de Ac después de la vacunación, podría no ser causada por una falla de vacunación, más bien por la presencia de pollos de engorda bLLM y aLLM.

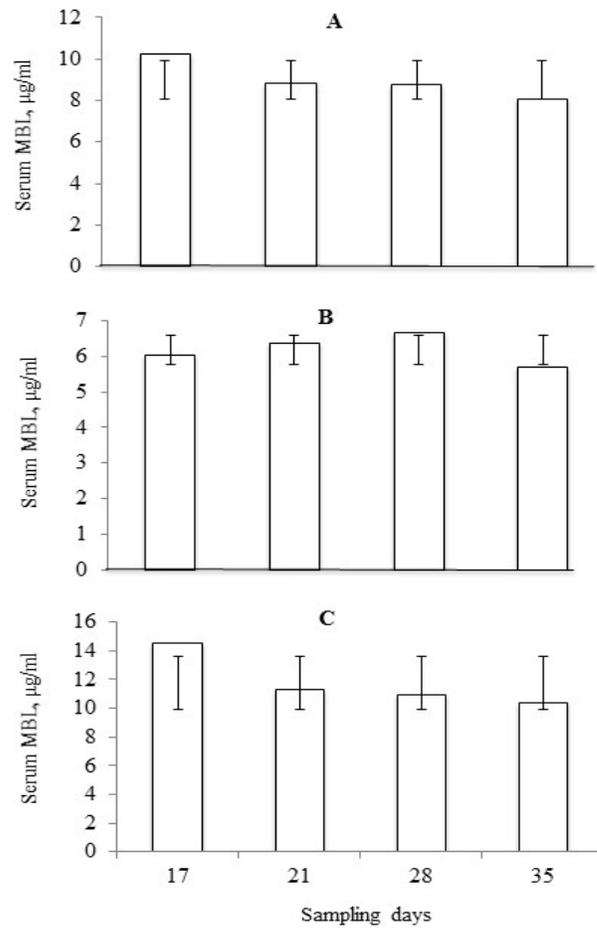
## BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO VII

- An BK**, Cho BL, You SJ, Paik HD, Chang HI, Kim SW, Yun CW, Kang CW. (2008) Growth performance and antibody response of broiler chicks fed yeast derived  $\beta$ -glucan and single-strain probiotics. *Asian Australas. Journal of Animal Science* ;21:1027–1032.
- Barbosa-Lima R**, Figueiredo-Lima DF, Givisiez PEN, Rabello CBV, Gonzales E, Silva JHV (2010). Probiosis: Concepts and Prospects. *Brazilian Journal of Poultry Science*. ;12(4)215 – 222.
- Brouwer N**, Dolman KM, van Zwieten R, Nieuwenhuys E, Hart M, Aarden LA, Roos D, Kuijpers TW. (2006) Mannan-binding lectin (MBL)-mediated opsonization is enhanced by the alternative pathway amplification loop. *Molecular Immunology*;43:2051–2060.
- Brouwer N**, Dolman KM, van Houdt M, Sta M, Roos D, Kuijpers TW. (2008) Mannose-binding lectin (MBL) facilitates opsonophagocytosis of yeasts but not of bacteria despite MBL binding. *Journal of Immunology*.180:4124–4132.
- Cox E**, Verdonck V, Vanrompay D, Goddeeris B.(2006) Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. *Veterinary Research* ; 37:511–539.
- Faria Filho DE**, Torres KAA, Faria DE, Campos DMB, Rosa PS. (2006) Probiotics for broiler chickens in Brazil: Systematic review and meta-Analysis. *Brazilian Journal of Poultry Science* ; 8(2):89-98.
- Gao HJ**, Zhang SH, Yu SG, Wu I, Yoon J, Quigley YP, Qi GH. (2008) Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poultry Science* ;87:1377–1384.
- Gómez S**, Angeles ML, Mojica MC, Jalukar S. (2012) Combination of an enzymatically hydrolyzed yeast and yeast culture with a direct-fed microbial in the feeds of broiler chickens. *Asian Australasian Journal Animal Science* ;25:665–673.
- Gomez S**, Angeles ML. (2011) Effects of an enzymatically hydrolyzed yeast and yeast culture combined with flavomycin and monensin on finishing broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* ;10:433–439.
- Gómez-Verduzco G**, Cortes-Cuevas A, López-Coello C, Ávila-González E, Nava MG.(2009) Dietary supplementation of mannan-oligosaccharide enhances neonatal immune responses in chickens during natural exposure to *Eimeria* spp. *Acta Veterinaria Scandinavica* 51:11. doi:10.1186/1751-0147-51-11.

- Hooge DM.** (2004) Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993–2003. *International Journal of Poultry Science* ;3:163–174.
- Juul-Madsen HR,** Munch M, Handberg KJ, Sørensen P, Johnson AA, Norup LR, Jørgensen PH. (2003) Serum levels of mannan-binding lectin in chickens prior to and during experimental infection with Avian Infectious Bronchitis Virus. *Poultry Science*;82:235–241.
- Juul-Madsen HR,** Dalgaard T, Rotved C, Jensen KH.(2006) Immune response to a killed infectious Bursal Disease Virus vaccine in inbred chicken lines with different major histocompatibility complex haplotypes. I. *Poultry Science* ;85:986–998.
- Juul-Madsen HR,** Norup LR, Handberg KJ, Jørgensen PH. ( 2007) Mannan-binding lectin (MBL) serum concentration in relation to propagation of infectious bronchitis virus (IBV) in chickens. *Viral Immunology* ;20:562–570.
- Kjærup RM,** Norup LR, Skjødt K, Dalgaard TS, Juul-Madsen HR. (2013) Chicken mannose-binding lectin (MBL) gene variants with influence on MBL serum concentrations. *Immunogenetics*;65:461–471.
- Laursen S B (2003).** Mannan-binding lectin (MBL) production from human plasma. *Biochemical Society Transactions*;31:758–762.
- Laursen SB,** Hedemand JE, Nielsen L, Thiel S, Koch C, Jensenius JC.(1998) Serum levels, ontogeny and heritability of chicken mannan-binding lectin (MBL). *Immunology* ;94:587–593.
- Laursen SB,** Nielsen OL. (2000) Mannan-binding lectin (MBL) in chickens: molecular and functional aspects. *Developmental & Comparative Immunology* 24:85-101.
- Nielsen OL,** Sørensen P, Hedemand JE, Laursen SB, Jørgensen PH. (1998) Inflammatory response of different chicken lines and B haplotypes to infection with infectious bursal disease virus. *Avian Pathology* ;27:181–189.
- Nielsen OL,** Jensenius JC, Jørgensen PH, Laursen SB. (1999) Serum levels of chicken mannan-binding lectin (MBL) during virus infections; indication that chicken MBL is an acute phase reactant. *Veterinary Immunology and Immunopathology* ;70:309-316.
- Norup LR,** Juul-Madsen HR (2007). An assay for measuring the mannan-binding lectin pathway of complement activation in chickens. *Poultry Science*;86:2322–2326.

- Norup LR**, Dalgaard TS, Friggens NC, Sørensen P, Juul-Madsen HR. (2009) Influence of chicken serum mannose-binding lectin levels on the immune response towards *Escherichia coli*. *Poultry Science* ;88:543–553.
- NRC. National Research Council. Nutrient Requirements of Poultry.** (1994)9th ed. Washington, D.C.: National Academic Press. :19-34.
- Oyfo BA**, Droleskey RE, Norman JO, Mollenhauer HH, Ziprin RL, Carrier DE, Deloach JR. (1989) Inhibition by mannose of in vitro colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science* ;68:1351–1356.
- Rosen GD.** (2007) Holo-analysis of the efficacy of Bio-Mos® in broiler nutrition. *British Poultry Science* ;48:21–26.
- Ross.**(2009) Ross Broiler Management Manual.. [www.aviagen.com](http://www.aviagen.com).
- SAS** (1990). SAS user's guide: Statistics. Version 6 (4th ed). Statistical Analysis Systems Institute, Inc, Cary, NC, USA. .
- Shashidhara RG**, Devegowda G. (2003) Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. *Poultry Science* ;82:1319–1325.
- Sheng K-C**, Pouniotis DS, Wright MD, Tang CK, Lazoura E, Pietersz GA, Apostolopoulos V.(2006) Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells. *Immunology* ;118:372–383.
- Silva VK**, Della Torre da Silva J, Torres KAA, de Faria Filho DE, Hirota Hada F, Barbosa de Moraes VM.(2009) Humoral immune response of broilers fed diets containing yeast extract and prebiotics in the prestarter phase and raised at different temperatures. *Journal of Applied Poultry Research* ;18:530–540.
- Spring P**, Wenk C, Dawson KA, Newman KE. (2000)The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Science* ;79:205–211.
- Valdimarsson H**, Stefansson M, Vikingsdottir T, Arason GJ, Koch C. (1998) Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin to MBL-deficient humans. *Scandinavian Journal of Immunology* ;48:116–123.
- Wang KY**, Hoppe CA, Datta PK, Fogelstrom A, Lee YC. (1986) Identification of the major mannose-binding proteins from chicken egg yolk and chicken serum as immunoglobulins (affinity purification/binding specificity). *Proceedings of the National Academy of Sciences* ;83:9670–9674.

**Figura 1.** Concentración Sérica de LLM ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en los distintos días de muestreo. A = Todas las observaciones, efecto cuadrático en los días de muestreo. ( $y = 11.523 - 1.5458x + 0.175x^2$ ;  $R^2 = 0.92$ ). B = baja LLM en pollos; efecto cúbico en los días de muestreo. ( $y = 6.87 - 1.815x + 1.18x^2 - 0.2x^3$ ;  $R^2 = 0.99$ ). C = alta LLM en pollos; efecto cuadrático en los días de muestreo ( $y = 18.276 - 4.6165x + 0.67x^2$ ;  $R^2 = 0.96$ ). La desviación estándar es se presenta en las barras.



## **CAPITULO VIII EXPERIMENTO 2**

### **Efecto de la adición del alimento con un producto de fermentación por levaduras y un desafío con Coccidias sobre la morfología del intestino, la respuesta inmune celular y humoral (local y sistémica) en pollos de engorda**

#### **8.1 Resumen**

#### **8.2 Introduccion.**

Actualmente, la aparición de la infección por Coccidias en las parvadas de pollos de engorda es inevitable en las condiciones normales de crianza. Esta enfermedad causa daño al proceso productivo, dado que retrasa el crecimiento de las aves e induce al establecimiento de programas de control que significan aumento del costo de producción. Desde hace más de 50 años se han desarrollado numerosos esquemas de control de los daños por esta enfermedad, siendo los más efectivos los basados en el uso de antibióticos. Sin embargo, con la presión de los consumidores por el retiro de estas drogas de los alimentos, se hace indispensable contar con esquemas alternos, que sean igualmente eficaces (Pilleo y Okamura, 2003) El proceso por el cual las aves pueden controlar la infección por Coccidias a nivel de intestino, se ha asociado a la respuesta del sistema linfóide asociado a la mucosa del intestino (Lillehoj et al (2004), Hermet (2004)). En una primera fase, la infección produce una reacción en la producción de interleucinas proinflamatorias, seguida de cambios en la distribución de linfocitos, la secreción de mayores cantidades de IgA y la aparición de una mayor cantidad de líneas de linfocitos CD8+. (Lillehoj (1987), Juarez-Estrada et al (2007)).

La presencia de una infección por Coccidias causa la destrucción celular del epitelio, por la presencia intracelular del parásito, y también afecta profundamente la ecología de la micro flora, permitiendo que bacterias como Clostridium aumenten su patogenicidad. De esta manera, la respuesta inmune del ave debe conducirse para controlar a la Coccidia, y además para proteger al ave de otras especies de la micro flora de carácter oportunista o que provocan una infección secundaria, que puede ser aún más agresivas y requerir el uso de antibióticos en dosis terapéuticas para su control.

En los últimos 10 años, diferentes autores han reportado que los productos derivados de las levaduras *Sacharomises cereviciae* (levaduras completas, productos con alto contenido de paredes obtenidas por hidrólisis, productos de fermentación con alto contenido de levaduras, productos de purificación de las paredes) cuando son utilizados en las dietas de las aves, antes y durante el curso de la infección por Coccidias, pueden asociarse al mejoramiento de los parámetros productivos en las aves (Gomez-Verduzco et al (2009), Gao et al (2009)).

Se ha demostrado que en condiciones *in vitro* los productos de levaduras pueden aglutinar bacterias que presentan lectinas capaces de asociarse a las estructuras de carbohidratos en las paredes de las levaduras, y aunque se presume que este es uno de los mecanismos *in vivo* de la acción de estos productos no se han desarrollado trabajos en este sentido, utilizando Coccidias aviares. En condiciones *in vitro*, también se ha demostrado que los productos de levaduras presentan diferentes reacciones productoras de interleucinas, citoquinas e incremento de fagocitosis. Los estudios se han llevado a cabo en diferentes líneas celulares, tales como células dendríticas, macrófagos, asesinas naturales y linfocitos B; sin embargo, se tiene poco conocimiento de la interacción *in vivo* de estas líneas celulares y de su asociación a los efectos en contra de la coccidiosis.

El uso de productos de levaduras se ha asociado también con la mayor secreción de IgA en diferentes localizaciones a lo largo del intestino, pero no se ha caracterizado el mecanismo posible de este proceso. La presencia y asociación de otros componentes de la respuesta inmune innata en el intestino tanto a la infección por Coccidias, como al consumo de productos de levaduras, no ha sido estudiada en las aves. Entre los componentes de la respuesta innata, que están mejor asociados con la mejor respuesta inmune a un reto infeccioso, se encuentra la producción de lectina ligadora de Mananos (LLM) (Lauren et al 2000). Las LLM son proteínas de la fase aguda de la respuesta inmune (Nielsen et al 1999); en aves se producen como en otras especies por la modulación de la respuesta hepática en producción de estas proteínas, por el estímulo de hormona del crecimiento y la mayor concentración de IL-6, esta última como factor asociado al estímulo por agentes infecciosos en células presentadoras de antígeno, tales como macrófagos y células dendríticas en las aves. El nivel sérico de LLM se incrementa varias veces dentro de las primeras 96 h como respuesta a un agente infeccioso ya sea vacunal o vivo (Norup

y Juul-Madsen (2007), Norup et al (2009). Este nivel sérico puede asociarse con la capacidad de las aves para sobrevivir a diferentes retos infecciosos, así como también a la respuesta humoral en la producción de anticuerpos.

***Con los antecedentes anteriores, en el presente trabajo se propone desafiar dos hipótesis:***

1). En pollos que consumen levaduras se presentarán aumentos en la producción de IgA secretoras y modificaciones en la relación de linfocitos en la lámina propia de la mucosa intestinal, pero no habrá cambios en las concentraciones de LLM en el suero ni otros signos de inflamación en la mucosa intestinal comparados con los pollos no consumidores de levadura.

2). En pollos suplementados con levaduras y desafiados con Coccidias se presentarán aumentos más pronunciados en la producción de IgA secretoras, elevación de las concentraciones de LLM en el suero y signos de inflamación en la mucosa intestinal, pero con índices de resolución más temprana a la infección primaria por Coccidia comparados con los pollos no suplementados con levadura y desafiados con Coccidias.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue la evaluación de la histología, la concentración de IgA en el intestino, las concentraciones séricas de LLM e IL-6 y la cuantificación de ocistos en la excreta de pollos suplementados con y sin consumo de PFL y desafiados o no con vacuna de Coccidias.

### **8.3 Materiales y Métodos**

Se usaron ciento veinte pollitos machos Ross B308 de 1 día de edad que fueron alojados en jaulas en batería. Se formaron dos grupos de 60 repeticiones cada uno entre el día 1 y 21 de edad (Fase 1) y se asignaron aleatoriamente a dos tratamientos: 1) Grupo testigo: Sin inclusión de PFL entre 1-20 días (PFL-) y 2) Grupo experimental: con inclusión de PFL (800 g/ton) entre 1-20 días (PFL+). El PFL que se utilizó fue el Diamond XPC. Se usó un producto anticoccidial en el alimento ofrecido de 1-21 días. Al día 21 se subdividieron las aves de cada grupo para formar cuatro subgrupos con 30 repeticiones cada uno. Un subgrupo recibió una vacunación con Coccidia y el otro recibió solo agua destilada y se mantuvieron hasta los 28 días de edad (Fase 2). La inoculación se hizo a través del

alimento con una dosis 16x de vacuna de coccidia (Coccivac MSD<sup>1</sup>). Se retiró el producto anticoccidial en las dietas ofrecidas del día 21 al 28. En la Fase 2 los subgrupos quedaron de la siguiente manera: 1) Grupo testigo negativo: Sin inclusión de PFL entre 21-28 días/No vacunado contra coccidia (PFL-Vac-); 2) Grupo testigo positivo: Sin inclusión de PFL entre 21-28 días/Vacunado contra coccidia (PFL-Vac+); 3) Grupo experimental negativo: Con PFL en el alimento de 21-28 días/No vacunado contra coccidia (PFL+Vac-). Grupo experimental positivo: Con PFL en el alimento de 21-28 días/Vacunado contra coccidia (PFL+Vac+).

Las aves fueron alimentadas con una dieta formulada con base en las recomendaciones de la estirpe (Ross 2014) en dos fases: de 0-14 días y de 15-28 días. Al día 1, 21 y 28 todas las aves fueron pesadas y se llevó registro del consumo de alimento ofrecido y rechazado. Al día 21, 24 y 28 se tomó un g de heces por cada ave en cada línea de baterías y se colocó en una sola muestra por línea (6 g por cada muestra). La muestra total de 6 g fue mezclada con una cantidad equivalente de dicromato de potasio (2%) y se conservaron en refrigeración para realizar la evaluación de ocistos en el laboratorio. Al día 21 y 28 de edad, se obtuvo una muestra de sangre de todas las aves por punción de la vena braquial (ala izquierda). La sangre se dejó a temperatura ambiente para acelerar su coagulación y se centrifugó para clarificar el suero y se guardó en congelación -4C para su análisis posterior de cLLM.

Al día 21 y 28 de edad, seis aves de cada tratamiento fueron sacrificadas de manera humanitaria de acuerdo a la norma zootécnica vigente. Todas las aves fueron ayunadas un mínimo de 8 h previas al sacrificio. Se obtuvieron muestras de aproximadamente un cm de duodeno, yeyuno e hígado que fueron conservadas en formol 10% para evaluación de histopatologías. Una sección del yeyuno anterior a la zona de Meckel fue cortada para obtener un lavado que fue utilizado para la evaluación de IgA.

---

<sup>1</sup> Frasco de 1,000 dosis; Título: 626,000 ooquistes esporulados/ml; % de esporulación: 90 %; % por especie: 42% E. acervulina, 22% E. mivati, 11% E. tenella, 25% E. máxima.

## **Determinaciones de laboratorio**

Determinación de ocistos en las heces por flotación de MackMaster de acuerdo a la técnica seguida en el Departamento de Clínica y zootecnia de las aves.FMVZ.UNAM .

Determinación de cLLM. Se usó una alícuota del suero utilizando la técnica de ELISA. Los análisis fueron realizados en el laboratorio de la Facultad de Ciencias y Agricultura de la Universidad Aarhus en Dinamarca de acuerdo al método descrito por Juules-Madsen et al (2007).

Histopatología. Las muestras tomadas durante la necropsia y mantenidas en solución de formol se procesaron en un histocinet para obtener las laminillas para tinción (Luna 1968).

Evaluación de IgA en luz intestinal. Se tomó una sección de 10 cm para realizar un lavado con solución salina fría y estéril buferada con fosfato (PBS). Las muestras se clarificaron por centrifugación (1200 x g) y fueron congeladas a -20° C. La concentración de IgA en una alícuota de esta suspensión se determinó utilizando un kit comercial de ELISA específico para IgA aviar (Chicken IgA ELISA quantittation kit Bethyl Laboratories Inc. Montgomery, TX) siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante del kit (metodología descrita por: Gómez-Verduzco et al., 2009).

Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza usando los procedimientos de los Modelos Lineales Generales del SAS. La unidad experimental fue cada pollo.

## **8.4 Resultados y Discusión**

### **8.4.1. Período de 1 a 21 días de edad**

En la Tabla 8.1 se presentan los resultados de comportamiento productivo, peso de la canal y sus componentes y medidas de la tibia en pollos de 1 a 20 días de edad. Aunque al inicio del experimento (día 1) los pollos se asignaron aleatoriamente a los tratamientos, el peso inicial de los pollos fue mayor ( $P < 0.01$ ) en el grupo testigo (PFL-) comparado con el grupo experimental (PFL+), siendo la diferencia en peso de aproximadamente 5%. Debido a lo anterior, el peso inicial se usó como covariable en los análisis subsecuentes. A los 21 días de edad, el peso corporal fue similar entre los dos tratamientos, siendo la diferencia en

peso de aproximadamente 1%. Esto sugiere que los pollos PFL+ fueron capaces de superar la diferencia de peso inicial, logrando un aumento de 4% por arriba de los pollos del grupo testigo. En diversos trabajos realizados en pollos de engorda se han reportado mejoras de entre 1.6 a 7% en la ganancia de peso de los grupos suplementados con diferentes productos derivados de levadura (Hooge, 2004; Gomez and Angeles, 2011; Gómez et al., 2012). La mejora de 4% en el peso corporal mostrada por los pollos PFL+ concuerda con los hallazgos previos. El consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia del día 1 al 20 también fueron similares entre los tratamientos.

Tabla 8.1. Comportamiento productivo, peso de la canal y sus componentes y medidas de la tibia en pollos de 1 a 20 días de edad.

Variables	PFL-	PFL+	EEM <sup>a</sup>
<b>Comportamiento productivo</b>			
Peso inicial, g	42.64 <sup>b</sup>	40.49 <sup>c</sup>	0.485
Peso final, g	695.40	687.90	7.800
Consumo de alimento, g	823.18	829.33	7.191
Ganancia de peso, g	652.76	647.41	7.797
Conversión alimenticia	1.27	1.28	0.012
<b>Peso de la canal y sus componentes, g</b>			
Canal	328.15	329.61	8.001
Pechuga	115.57	117.82	2.917
Piernas	79.34	78.72	2.319
Muslos	52.46	53.15	1.552
Huacal	80.78	79.92	1.927
<b>Medidas de la tibia</b>			
Longitud, cm	6.23	6.20	0.045
Peso en base seca, g	1.41	1.41	0.044
Peso de cenizas, g	0.55	0.54	0.016
Diámetro de epífisis superior, mm	1405	1356	61.6
Diámetro de epífisis inferior, mm	1028 <sup>d</sup>	1070 <sup>e</sup>	16.72
Diámetro de la diáfisis, mm	505	502	8.07

<sup>a</sup> Error estándar de la media.

<sup>b-c</sup> P < 0.01.

<sup>d-e</sup> P < 0.05.

El peso de la canal y sus componentes, así como las medidas de la tibia, a excepción del diámetro de la diáfisis inferior, fueron similares entre los tratamientos. El diámetro de la diáfisis inferior de la tibia fue mayor ( $P < 0.10$ ) en los pollos PFL+. En dos trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Gomez y Angeles, 2011; Gómez et al., 2012) se encontró mayor retención y digestibilidad de cenizas en pollos adicionados con una levadura hidrolizada enzimáticamente en los alimentos experimentales durante un período de 14 días. En el estudio de Gao et al. (2008) los pollos adicionados con niveles crecientes de un cultivo de levaduras tuvieron incrementos lineales en la digestibilidad de calcio y fósforo a los 21 y 42 días de edad, pero solo los aumentos al día 42 fueron estadísticamente diferentes. En otro reporte también se observó mejoras en la utilización de calcio y fósforo en pollos que fueron alimentados con dietas deficientes y suficientes en calcio y fósforo y adicionadas con cultivo de levaduras (Thayer et al., 1978; Bradley and Savage, 1995). Los aumentos reportados en la retención y digestibilidad de cenizas, calcio y fósforo en pollos adicionados con diferentes productos derivados de levaduras podrían mejorar la mineralización de los huesos, y explicar el mayor diámetro de la diáfisis inferior encontrada en el presente trabajo.

En la tabla 8.2 se muestran los resultados de conteo de ocistos, concentración de IgA y lesiones histopatológicas en duodeno y yeyuno y concentración de LLM en suero de pollos de 21 días de edad. No se detectaron ocistos en los conteos realizados al día 21 por efecto de la adición de PFL. Esto sugiere que el uso de jaulas en batería elevadas más la inclusión de nicarbazina en los alimentos usados del día 1 al 20 de edad fueron efectivos en evitar la infección por coccidias. En cambio, la concentración de IgA en el líquido obtenido del duodeno fue mayor ( $P < 0.10$ ) en los pollos PFL+, representando un incremento de 38% respecto al grupo PFL-. Gomez-Verduzco et al. (2009) utilizando un producto basado en paredes de levaduras en forma continua en el alimento de pollos en las primeras 4 semanas de vida, encontraron un incremento en la concentración de IgA en el intestino. Gao et al. (2008) utilizando producto de levaduras en dosis de 0 a 7.5 kg/ton de alimento durante 42 días en pollos encontraron aumento de 150% en la concentración de IgA intestinal siendo mayor con la dosis mayor de levadura tanto a 21, como 42 días de edad. Rodríguez et al. (2000) utilizando *S. boulardii* en pollos libres de gérmenes observaron aumento en los títulos de IgA secretoras de hasta 75% a 10 días post inoculación. Estos hallazgos

concuerdan con la mayor concentración de IgA observada en el grupo PFL+ de este trabajo.

En la evaluación histopatológica del intestino se encontró mayores signos de inflamación en el duodeno que el yeyuno de ambos grupos (con y sin PFL). Los cúmulos linfoides y la hiperplasia de las PP tuvieron promedios de 1.6 y 1.2, en una escala de 0-3, mientras que en el yeyuno la mayoría de las observaciones fueron negativas. En ambos casos hay signos de hiperemia, ligeramente más pronunciadas en el yeyuno para ambos grupos. En las lesiones del duodeno del grupo de pollos PFL+, los cúmulos linfoides ( $P < 0.13$ ) y la hiperplasia de las PP ( $P < 0.10$ ) mostraron aumentos discretos mientras que el grado de hiperemia/hemorragia fue más pronunciado ( $P < 0.05$ ) en el grupo PFL-.

Tabla 8.2. Conteo de ocistos, concentración de IgA y lesiones histopatológicas en duodeno y yeyuno y concentración de LLM en suero de pollos de 21 días de edad.

Variables	PFL-	PFL+	EEM <sup>a</sup>
Conteo de ocistos en heces	0	0	0
Concentración de IgA en el yeyuno, ng/ml de líquido	78.95 <sup>b</sup>	101.93 <sup>c</sup>	8.944
Lesiones histopatológicas en el duodeno			
Cúmulos linfoides	1.17	2.00	0.337
Hiperplasia de las PP	0.50 <sup>d</sup>	1.83 <sup>e</sup>	0.415
Hiperemia/hemorragia	1.50 <sup>b</sup>	0.83 <sup>c</sup>	0.269
Lesiones histopatológicas en el yeyuno			
Cúmulos linfoides	0.17	0.00	0.118
Hiperplasia de las PP	0.00	0.00	0
Hiperemia/hemorragia	1.83	2.17	0.401
Concentración de LLM en suero, µg/ml	14.9	14.8	0.859

<sup>a</sup> Error estándar de la media.

<sup>b-c</sup>  $P < 0.10$ .

<sup>d-e</sup>  $P < 0.05$ .

La concentración de LLM en suero a los 21 días de edad no mostró diferencias entre tratamientos. Esto concuerda con los resultados del primer experimento en donde se usaron niveles crecientes (0 a 1600 ppm) del mismo producto usado en el presente

experimento, en pollos de 17 a 35 días de edad. Es de llamar la atención que en el presente trabajo la concentración promedio de LLM fue de 14.85 µg/ml mientras que en el estudio previo, la concentración promedio fue de 8.825 µg/ml en pollos de 21 días de edad.

#### **8.4.2. Período de 21 a 28 días de edad**

En la tabla 8.3 se presenta el comportamiento productivo, peso de la canal y sus componentes y medidas de la tibia en pollos de 21 a 28 días de edad. Los pollos vacunados al día 21 recibieron aproximadamente 10,000 oquistes infectantes, mientras que la dosis normalmente aplicada en pollos de un día es equivalente a 600 oquistes esporulados. El peso corporal de los pollos a los 28 días de edad y la ganancia de peso en el período de 21 a 28 días no mostraron diferencias estadísticas entre tratamientos. El consumo de alimento fue similar entre los pollos de los grupos PFL-Vac- y PFL+Vac- (pollos que no fueron vacunados), pero en los pollos PFL-Vac+ el consumo de alimento fue el más bajo, mientras que los pollos PFL+Vac+ mostraron un consumo intermedio (Interacción PFL y Vac,  $P < 0.05$ ). En los pollos PFL-Vac+ el consumo se redujo en aproximadamente 9% respecto a los pollos PFL-Vac-, y en los pollos PFL+Vac+ la reducción en el consumo de alimento solo fue de 3% respecto a los pollos PFL+Vac+.

Tabla 8.3. Comportamiento productivo, peso de la canal y sus componentes y medidas de la tibia en pollos de 21 a 28 días de edad.

	PFL- Vac-	PFL- Vac+	PFL+ Vac-	PFL+ Vac+	EEM <sup>a</sup>
Comportamiento productivo					
Peso final, g	1.21	1.21	1.21	1.23	0.014
Consumo de alimento, g	0.83 <sup>b</sup>	0.75 <sup>d</sup>	0.82 <sup>b</sup>	0.79 <sup>c</sup>	0.019
Ganancia de peso, g	0.50	0.50	0.50	0.52	0.013
Conversión alimenticia	1.68 <sup>e</sup>	1.55 <sup>f</sup>	1.65 <sup>e</sup>	1.53 <sup>f</sup>	0.039
Peso de la canal y sus componentes, g					
Canal	649.63	634.23	631.76	641.44	11.835
Pechuga	229.81	219.30	222.59	228.93	5.529
Piernas	143.62	145.96	143.20	142.82	2.902
Muslos	109.01	107.20	104.33	105.77	2.392
Huacal	167.18	161.78	161.65	163.92	4.138
Medidas de la tibia					
Longitud, cm	7.61 <sup>e</sup>	7.42 <sup>f</sup>	7.62 <sup>e</sup>	7.40 <sup>f</sup>	0.050
Peso en base seca, g	2.45	2.38	2.30	2.43	0.068
Peso de cenizas, g	0.70 <sup>g</sup>	0.63 <sup>h</sup>	0.71 <sup>g</sup>	0.65 <sup>h</sup>	0.031
Diámetro de epífisis superior, mm	1629	1615	1626	1627	17.23
Diámetro de epífisis inferior, mm	1232 <sup>b</sup>	1216 <sup>c</sup>	1262 <sup>d</sup>	1234 <sup>b</sup>	10.02
Diámetro de la diáfisis, mm	611 <sup>b</sup>	596 <sup>c</sup>	615 <sup>b</sup>	621 <sup>b</sup>	8.66

<sup>a</sup> Error estándar de la media.

<sup>b-d</sup> Interacción PFL y Vac,  $P < 0.05$ .

<sup>e-f</sup> Efecto de Vac,  $P < 0.01$ .

<sup>g-h</sup> Efecto de Vac,  $P < 0.05$ .

Spurluk (1997) reportó que el proceso inflamatorio del intestino y en otros órganos implica la liberación de interleucinas como IL-1 e IL-6, TNF que tienen efectos en los centros nerviosos que controlan el consumo de alimento. La infección primaria de Coccidias administradas oralmente pudieran haber inducido una reacción inflamatoria suficiente para deprimir parcialmente el consumo de alimento. Sin embargo, la resolución rápida de la infección por la participación del sistema inmune (humoral o celular) podría recuperar la

capacidad de crecimiento de las aves. Pascual (2011) describe que el proceso de recuperación de las aves es más rápido en las líneas genéticamente resistentes ya que pueden incrementar más rápidamente la presencia de células inmunes en la lámina propia, reduciendo la capacidad de los esporozoos de alcanzar las criptas. Gomez-Verduzco et al. (2009) reportaron que las aves que consumieron PFL desarrollaron una respuesta inmune inespecífica de mayor nivel que las aves que no recibieron el producto durante 21 días. Es posible que una reacción previa del sistema inmune a nivel intestinal sea mediada por la presencia de levaduras en la dieta, lo que podría acelerar la respuesta en contra de las coccidias independientemente de la línea genética del ave.

La conversión alimenticia fue similar entre los pollos PFL- y PFL+, pero fue mayor ( $P < 0.01$ ) en los pollos Vac- en comparación con los pollos Vac+. La mejora en la conversión alimenticia en los pollos vacunados fue inesperada. Sin embargo, los efectos de esta vacuna en pollos de 21 días de edad sobre las variables productivas o cambios en fisiología digestiva y respuesta inmunitaria no se han descrito en trabajos previos. Como fue observado anteriormente, el uso regular de esta vacuna es en pollos de un día de edad con el fin de provocar una respuesta inmune temprana previa a una infección de campo por coccidias. Nollet et al. (2007) reportaron mayor peso corporal y ganancia de peso a los 15 días de edad en pollos vacunados contra *Coccidia* comparados con los pollos no vacunados en el día uno de edad; la eficiencia alimenticia tuvo una tendencia a ser mayor también en los pollos vacunados. En el mismo trabajo (Nollet et al., 2007) se encontró que los pollos vacunados a un día de edad y desafiados contra *Coccidia* a los 15 días de edad tuvieron menor peso y ganancia de peso en el período de 15-22 días de edad, pero a los 42 días de edad no hubo diferencias entre los grupos vacunados y no vacunados y desafiados y no desafiados.

En otro estudio se reportó que pollos vacunados contra coccidias a los 8 días de edad no mostraron efectos detrimentales en la salud o peso corporal a los 30 días de edad (Williams y Andrews, 2001). Por su parte, Williams y Gobbi (2002) reportaron que los pollos vacunados a un día de edad tuvieron mayor peso corporal a los 37 (hembras) y a los 56 días de edad (machos) comparados con los pollos no vacunados. En pollos vacunados a un día de edad y desafiados a los 28 días con cepas virulentas de varias *Coccidias*, se demostró efectos protectores de la vacuna sobre la presencia de lesiones intestinales y

sobre la depresión del peso corporal, así como mejoras en la conversión alimenticia en el período posterior a la vacunación (Crouch et al., 2003). Esto también coincide con la menor incidencia de lesiones intestinales contra Enteritis necrótica y los menores conteos de *C. perfringens* en el ciego de pollos vacunados contra Coccidias y desafiados con *C. perfringens* y con *E. máxima* comparados con los pollos desafiados, pero no vacunados (Tsiouris et al., 2013); los autores sugieren que estos resultados probablemente se deben a un efecto positivo de la vacuna sobre el ecosistema intestinal.

En el presente trabajo los pollos vacunados mostraron menor consumo de alimento, pero igual ganancia de peso que los pollos no vacunados en el período de 21-28 días, lo que causó la menor conversión alimenticia, probablemente debido a una menor excreción de nutrientes, y por ende, mayor eficiencia en la digestión y absorción de nutrientes. En uno de los trabajos pioneros de Sibbald (1975) se demostró que la excreción de energía y nitrógeno en gallos fue mayor conforme se aumentó el nivel de alimentación, lo que afecta la conversión alimenticia negativamente. En los pollos vacunados, la reducción del consumo de alimento fue del orden del 6%, mientras que la conversión alimenticia se mejoró en 7%, respecto a los pollos no vacunados. Aunque se usó una dosis alta de oquistes vacunales, probablemente la edad de los pollos influyó en esta respuesta.

La concentración de cenizas en la tibia fue similar entre tratamientos. La longitud de la tibia ( $P < 0.01$ ) y el peso de las cenizas de la tibia ( $P < 0.05$ ) fueron menores en los pollos Vac+. Walk et al. (2001) encontraron que en pollos vacunados a un día de edad y no vacunados contra Coccidia no hubo diferencias en la concentración de cenizas de la tibia a los 7 y 14 días de edad, pero no se reportó el peso de las cenizas. En cambio, también se ha observado (Ward et al., 1993; Watson et al., 2005) reducción en el porcentaje de cenizas en pollos infectados con una cepa de *E. acervulina*. En los tres trabajos citados (Ward et al., 1993; Watson et al., 2005; Walk et al., 2001) se redujo el consumo de alimento y la ganancia de peso en los pollos infectados. En cambio, en el presente trabajo, aunque se redujo el consumo de alimento en los pollos desafiados, se mantuvo la ganancia de peso, lo que puede deberse al mayor potencial de crecimiento de las líneas de pollos modernos. Sin embargo, es probable que debido a que la tasa de mineralización ósea es menor a la tasa de síntesis de tejidos blandos, los huesos no alcanzaron a compensar en su crecimiento, debido a que solo se midió el efecto en un período de siete días.

El diámetro de la epífisis inferior y el diámetro de la diáfisis fueron dependientes de la inclusión o no de PFL en la dieta y de la presencia o no de pollos vacunados (Interacción PFL y Vac,  $P < 0.05$ ). Los pollos que no recibieron PFL y que fueron vacunados (PFL-Vac+) tuvieron menor diámetro de la epífisis inferior comparados con los pollos PFL-Vac-, lo cual coincide con los resultados de longitud y contenido de cenizas de la tibia discutidos anteriormente. En cambio, los pollos PFL+ y que no fueron vacunados (Vac-) tuvieron el mayor diámetro de la epífisis inferior, respecto al resto de los tratamientos, mientras que en los pollos PFL+Vac+ las medidas de la diáfisis inferior fueron similares al grupo PFL-Vac-. Esto sugiere que la presencia de PFL en los pollos vacunados recuperó la capacidad de mineralización de los huesos, probablemente a través de una mejora en la utilización de minerales como el calcio y fósforo, como también se discutió previamente.

El diámetro de la diáfisis fue menor en los pollos PFL-Vac- comparado con los grupos PFL-Vac+, PFL+Vac- y PFL+Vac+; entre estos tres tratamientos no hubo diferencias significativas. Los efectos positivos de PFL sobre las variables relacionadas a la mineralización de la tibia en los pollos vacunados, especialmente con el grosor del hueso, probablemente tengan un mayor impacto en pollos alojados en piso y criados durante todo el ciclo de vida, en donde los pollos están expuestos a desafíos naturales con diferentes cepas de coccidias. Los beneficios pueden incluir menor incidencia de problemas locomotores, fracturas y desechos en la granja, así como una menor incidencia de decomisos en rastro.

En el tabla 8.4 se muestra el conteo de ocistos, concentración de IgA y lesiones histopatológicas en duodeno y yeyuno y concentración de LLM en suero de pollos de 28 días de edad. En los pollos que no fueron vacunados no se encontraron ocistos a los 28 días de edad, en cambio, los pollos que recibieron el reto por vacuna de coccidia, mostraron una excreción positiva de ocistos, siendo mayor para el grupo PFL-Vac+ comparado con el grupo PFL+Vac+ (Interacción PFL y Vac,  $P < 0.05$ ). Estos resultados son correspondientes con los datos ya previamente citados de la conversión de alimento, que fue más baja para el grupo que recibió PFL y el desafío por coccidia. En trabajos previos se encontró disminución del número de ocistos excretados por aves que habían sido infectadas por coccidia y que consumieron productos con MOS, similares a los que reportamos en este trabajo (Gomez-Verduzco et al., 2009; Gao et al., 2009; Broomhead,

2013; Stanley et al., 2004). Así mismo Lillehoj y Okamura (2003) y Pascual et al. (2011) mencionan que la reducción en la excreción de ocistos está ligada a una respuesta del sistema inmune tanto con la producción de IgA, como con la aparición de mayor actividad de células asesinas.

La concentración de IgA fue similar entre tratamientos. Es de notarse que respecto a la concentración observada al día 21 (Cuadro 2) la concentración de IgA al día 28 se incrementó ligeramente en el grupo PFL-, pero se disminuyó en el grupo PFL+, esto independientemente del uso de la vacuna. Gao et al. (2009) utilizando niveles crecientes de producto de levadura de *S. cerevisiae* observaron aumentos de 35-58% en IgA secretoras en las tonsilas cecales con respecto a los controles, previo a un desafío; después de 7 días del desafío los controles que no recibieron PFL aumentaron en 43% la concentración de IgA, contra solo 23-27% en las aves que previamente habían consumido el producto. Contrario al aumento en IgA en pollos PFL+ de 21 días, en pollos PFL+ de 28 días de edad, los niveles de IgA no aumentaron después de la infección, sino que más bien tendieron a ser menores, de la misma manera que en el reporte de Gao et al. (2009).

Tabla 8.4. Conteo de ocistos, concentración de IgA y lesiones histopatológicas en duodeno y yeyuno y concentración de LLM en suero de pollos de 28 días de edad.

	PFL- Vac-	PFL- Vac+	PFL+ Vac-	PFL+ Vac+	EEM <sup>a</sup>
Conteo de ocistos en heces	0 <sup>b</sup>	40816 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	21275 <sup>d</sup>	8657.5
Concentración de IgA en el yeyuno, ng/ml de líquido	75	82	77	73	5.746
Lesiones histopatológicas en el duodeno					
Cúmulos linfoides	2.00 <sup>b</sup>	1.17 <sup>bd</sup>	1.00 <sup>d</sup>	1.50 <sup>bd</sup>	0.369
Hiperplasia de las PP	0.50	1.17	0.67	1.33	0.508
Hiperemia/hemorragia	1.67	2.33	2.33	2.17	0.396
Lesiones histopatológicas en el yeyuno					
Cúmulos linfoides	0.50	0.83	0.50	0.50	0.307
Hiperplasia de las PP	0.00	0.00	0.00	0.00	0
Hiperemia/hemorragia <sup>ef</sup>	1.17	2.00	1.67	2.83	0.329
Concentración de LLM en suero, µg/ml	15.56 <sup>bc</sup>	13.34 <sup>cd</sup>	11.87 <sup>d</sup>	16.04 <sup>b</sup>	1.105

<sup>a</sup> Error estándar de la media.

<sup>b-d</sup> Interacción PFL y Vac,  $P < 0.05$ .

<sup>e</sup> Efecto de PFL,  $P < 0.05$ .

<sup>f</sup> Efecto de Vac,  $P < 0.05$ .

La severidad de las lesiones histopatológicas encontradas fue de mayor magnitud en el duodeno comparadas con el yeyuno. Los cúmulos linfoides y el grado de hiperemia/hemorragia fueron 2.6 y 1.2 veces mayores en el duodeno respecto a las mismas variables en el yeyuno. Mientras que en la escala de 0-3, en la hiperplasia de las PP se obtuvo un valor cercano a 1 en el duodeno, pero no se encontraron indicios de hiperplasia de las PP (las lecturas fueron negativas). Se apreció la presencia de coccidias en el duodeno de los grupos infectados, lo que concuerda con las observaciones anteriores y la excreción de ocistos en heces. En el duodeno no hubo diferencias en los cúmulos linfoides, hiperplasia de las PP ni en el grado de hiperemia/hemorragia. En el yeyuno, hubo efecto principal de PFL y Vac de manera independiente ( $P < 0.05$ ) en el grado de

hiperemia/hemorragia. El grado de hiperemia/hemorragia fue menor en el grupo Vacc-comparado con Vacc+ y en el grupo PFL+ con relación al PFL-. Los cúmulos linfoides fueron similares entre tratamientos; no se encontraron indicios de hiperplasia de las PP (las lecturas fueron negativas).

Probablemente el uso de una dosis baja de ocistos esporulados causó que la severidad de las lesiones también fuera limitada. De acuerdo a la clasificación de Johnson y Reid (1970) para lesiones macroscópicas en ambos grupos infectados se obtuvieron lesiones grado cero tanto en duodeno como en yeyuno. Idris et al. (1997) mencionan una asociación entre la severidad de las lesiones macroscópicas y microscópicas con la dosis utilizada de ocistos en la infección. De igual manera, el uso de líneas vacunales, también implica una atenuación de la capacidad de infección de las coccidias, aun con niveles altos de ocistos inoculados (Fetterer, 2011). Sin embargo, a nivel microscópico se encontraron esquizontes en el duodeno de ambos grupos infectados, lo que muestra que la infección por coccidia se logró, aunque limitada. Gholamiandekhordi et al. (2007) utilizando una dosis similar (10x de vacuna por ave) obtuvieron lesiones en intestino, solo cuando se mezcló también con una infección de *C. perfringens*. La clasificación de lesiones que ellos presentan fue similar a la que se usó en la presente evaluación para determinar la cantidad de células linfoides y el grado de hiperemia/hemorragia. La severidad de las lesiones reportada por estos autores (Gholamiandekhordi et al., 2007) fue similar a la que se reporta aquí con solo la inclusión de vacuna de coccidia.

Nuestros datos están en concordancia con los de otros autores que han mostrado diferencias en la presencia de células linfoides en el duodeno como respuesta a la infección por coccidias. Sin embargo, no se encontraron otros reportes sobre el crecimiento de las PP en pollos adicionados con productos de levaduras, como se demostró en los pollos sacrificados a los 21 días, que recibieron PFL en el período de 1-20 días. Por otra parte, ya que esta estimulación solo fue apreciable en el duodeno, esto podría deberse a una rápida desaparición del producto en la luz intestinal, posiblemente debido a mecanismos de fagocitosis de las células M, y su posterior transformación por los Macs o las células dendríticas. Esta transformación por las células presentadoras, explicaría los cambios en la concentración de IgA secretoras como ya se reportó. Por otra parte, el ligero aumento de lesiones inflamatorias (hiperemia y aumento de cúmulos linfoides) sugiere que la

infección por la vacuna fue leve, que fue presentada en el duodeno, pero no en el yeyuno de las aves sacrificadas.

Al comparar las lesiones histopatológicas dentro de los grupos PFL- a los 21 y 28 días, en el duodeno se aprecia que la reacción linfoide, el crecimiento de las PP y la hiperemia/hemorragia disminuyeron sensiblemente al día 28; lo que sugiere que no hubo interferencia de otro tipo de desafíos. Pero dentro de los grupos PFL+, los cúmulos linfoides y el tamaño de las PP aumentaron en 1.6 y 1.8 veces mientras que el grado de hiperemia/hemorragia disminuyó del día 21 al 28. Mientras que en el yeyuno, en ambos grupos los cúmulos linfoides disminuyeron y las respuestas en el tamaño de las PP y la hiperemia/hemorragia se mantuvieron casi sin cambios entre el día 21 y 28.

En la concentración de LLM en suero a los 28 días de edad se observó efecto de la interacción PFL y Vac ( $P < 0.05$ ). En los pollos PFL-Vac- se observó menor concentración de LLM que en los pollos PFL+Vac- lo que podría sugerir que, a falta de un desafío con coccidia, la adición de PFL resultó con una menor actividad proinflamatoria, lo que causó la menor concentración de LLM. Mientras que los pollos PFL-Vac+ tuvieron menor concentración de LLM comparados con los pollos PFL+Vac+, lo cual podría indicar que ante un desafío con coccidia, la presencia de PFL en el alimento promovió una mayor respuesta proinflamatoria. Estos resultados no coinciden con los hallazgos del primer experimento en donde no se encontró ninguna relación entre los niveles crecientes de PFL en el alimento y la concentración sérica de LLM probablemente porque no hubo un desafío con coccidia. Se ha sugerido que uno de los mecanismos de acción de las levaduras se relaciona a su interacción con células dendríticas localizadas en la superficie mucosa así como con macrófagos que reconocen las unidades de Manosa de la levadura. Esto puede iniciar la producción de LLM en el hígado, lo que puede aumentar la opsonización de microorganismos patógenos con unidades de Manosa y N-acetilglucosamina en sus paredes. Probablemente la presencia de ocistos vacunales indujo una respuesta similar, lo que puede estar asociado a la menor excreción de ocistos en los pollos PFL+Vac+.

Sin embargo, es aparente que los cambios en la concentración de LLM del día 21 al día 28 después del desafío no se relacionaron con los cambios observados en la concentración de IgA en el duodeno en el mismo período. Esto sugiere que si la mayor concentración de LLM estuvo relacionada con la menor excreción de ocistos en los pollos PFL+Vac+, este

efecto no fue mediado por las IgA secretadas en el intestino. La concentración promedio de LLM fue de 14.20 µg/ml mientras que, en el estudio previo, la concentración promedio fue de 8.78 µg/ml en pollos de 28 días de edad.

En reportes previos se identificaron líneas de gallinas que presentaban concentraciones de LLM bajas (BLLM) y altas (ALLM) y a través de varios años de selección se desarrollaron dos líneas con genotipos BLLM y ALLM con el propósito de determinar las variaciones genéticas y funciones de la LLM, especialmente, en las respuestas del sistema inmune en aves desafiadas y no desafiadas (Lauren et al., 1998; Juul-Madsen et al., 2007; Kjaerup et al., 2013). En un trabajo previo, se logró también demostrar diferencias en la concentración de LLM en pollos de engorda. Por estas razones se analizó los resultados del presente trabajo con base en los posibles genotipos. En la investigación reciente, se decidió utilizar como parámetro los valores de LLM a 21 días, dado que estos valores ya no dependen de la cantidad de LLM transmitida por las gallinas (Lauren and Nielsen, 2000; Norup et al., 2009), y por tanto, ya solo son parte de la producción de cada ave. Los pollos se dividieron en BLLM, los cuales mostraron una concentración menor de 10 µg/ml de LLM a los 21 y 28 días) y en ALLM, los pollos que tuvieron más de 10 µg/ml de LLM.

En el la tabla 8.5 se presentan las concentraciones de LLM en pollos de 21 y 28 días y las variables productivas de 21 a 28 días de edad dentro de los cuatro tratamientos evaluados. En todos los tratamientos, se observó pollos con diferentes genotipos expresado en el fenotipo BLLM o ALLM. En todos los tratamientos hubo cinco pollos con los fenotipos BLLM mientras que se tuvo entre 17-23 pollos en los fenotipos ALLM. Esto es que entre el 22-30% de las aves por cada grupo fueron del genotipo BLLM y de 70-78% fueron ALLM. No se encontraron aves negativas o que no produjeran LLM. Hubo una diferencia estadística en la concentración de LLM entre los grupos BLLM y ALLM ( $P < 0.01$ ) a los 21 (7.84 vs 16.15 µg/ml) y 28 (7.27 vs 15.73 µg/ml) pero dentro de estos dos grupos no hubo cambios en la concentración de LLM dentro de los combinaciones de PFL y Vac y tampoco hubo diferencias en las variables productivas al evaluar la interacción entre la inclusión de PFL, el desafío con Vac y el genotipo de los pollos.

En un trabajo previo se encontró que las concentraciones de LLM en pollos BLLM y ALLM fueron en promedio de 6.50 y 11.09 µg/ml, respectivamente, a los 21 y 28 días de edad (Cortés et al., 2016). Estos valores son 14 y 10% menores a las concentraciones promedio

de LLM que tuvieron los pollos BLLM y ALLM, respectivamente, a los 21 y 28 días en el presente trabajo. En gallinas de postura se ha reportado que las concentraciones de LLM varían entre 2.6-7.3 y 11.1-30.4 µg/ml en los genotipos BLLM y ALLM, respectivamente (Lauren et al., 1998; Juul-Madsen et al., 2007; Kjaerup et al., 2013). Los resultados del presente trabajo coinciden con el estudio previo en donde se reportó que no hubo diferencias en el peso corporal, consumo de alimento y conversión alimenticia entre los pollos con genotipos BLLM y ALLM (Cortés et al., 2015). No se encontró en la literatura científica reportes previos sobre los valores séricos de LLM en pollos de la línea Ross B308, antes o después de una infección por coccidia. Sin embargo, las concentraciones de LLM están dentro de los rangos encontrados en estudios anteriores (Lauren et al., 1998; Juul-Madsen et al., 2007; Kjaerup et al., 2013), en aves después de un desafío o infección con otros agentes patógenos.

Tabla 8.5. Concentración de Lectina Ligadora de Mananos y variables productivas de 21 a 28 días de edad de acuerdo al fenotipo con baja o alta concentración de Lectina Ligadora de Mananos.

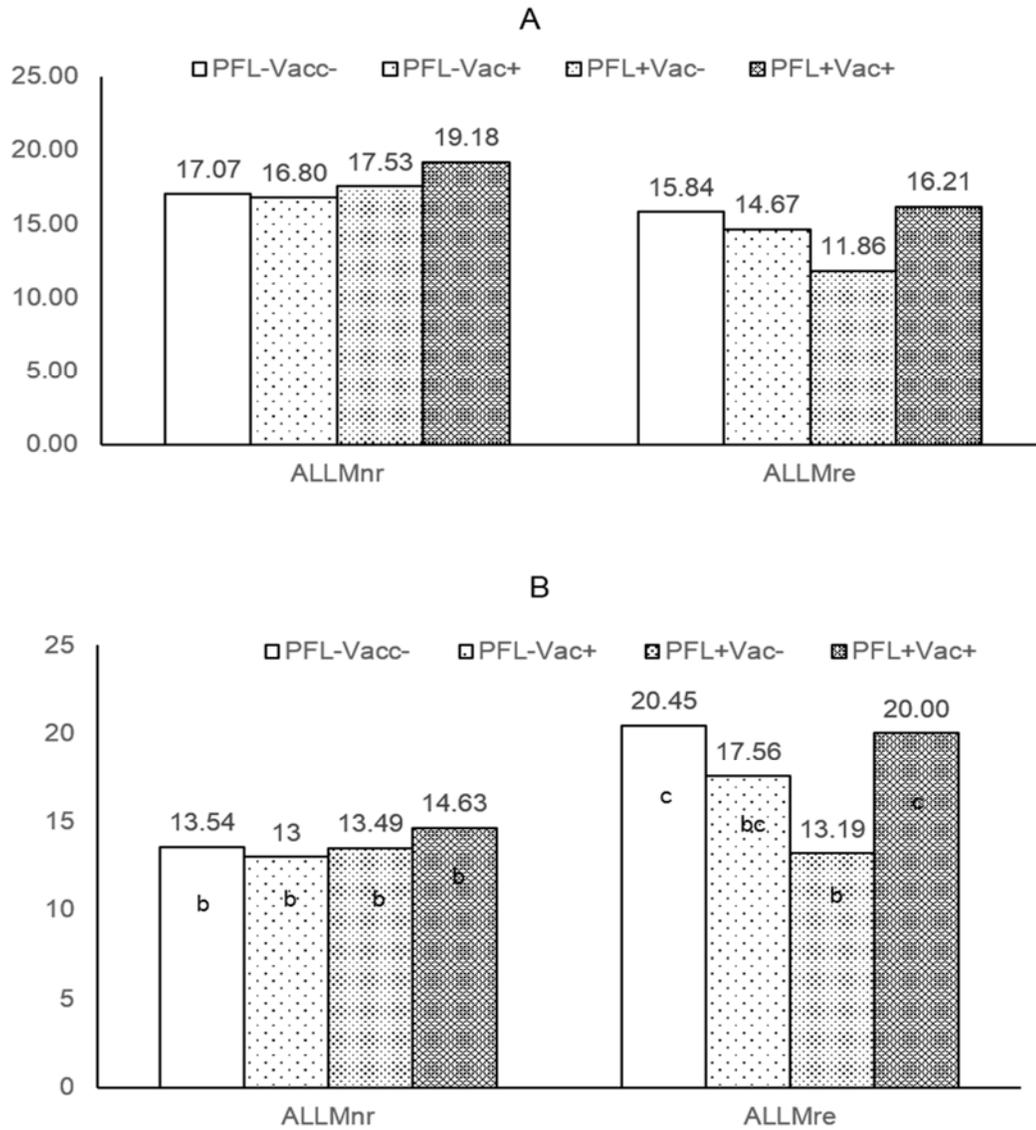
	Baja concentración de LLM				Alta concentración de LLM				EEM <sup>a</sup>
	PFL- Vac-	PFL- Vac+	PFL+ Vac-	PFL+ Vac+	PFL- Vac-	PFL- Vac+	PFL+ Vac-	PFL+ Vac+	
Número	5	5	5	5	22	23	22	17	
LLM, 21 días, µg/mL <sup>b</sup>	8.4	8.1	8.5	6.4	16.5	15.7	14.7	17.7	1.601
LLM, 28 días, µg/mL <sup>b</sup>	8.2	6.7	6.7	7.5	17.0	15.3	13.3	17.3	1.592
Consumo de alimento, g/d	0.87	0.75	0.83	0.78	0.83	0.76	0.80	0.80	0.073
Ganancia de peso, g/d	0.56	0.48	0.53	0.53	0.49	0.50	0.49	0.53	0.026
Conversión alimenticia	1.55	1.58	1.58	1.48	1.71	1.53	1.65	1.53	0.075

<sup>a</sup> Error estándar de la media.

<sup>b</sup> Efecto del genotipo,  $P < 0.01$ .

Dentro de los pollos ALLM se observó dos patrones divergentes en las concentraciones de LLM al día 28 respecto a las concentraciones de LLM al día 21. Un grupo de pollos mostró una tendencia a tener menores concentraciones de LLM (entre 21 y 24%), los cuales se clasificaron como no reactivos (ALLMnre), mientras que otro grupo mostró una tendencia a tener mayores concentraciones de LLM (entre 11 y 29%), los que se clasificaron como reactivos (ALLMre), respecto a las concentraciones del día 21. De acuerdo a esta clasificación, pollos ALLMnre y ALLMre, y después de hacer un análisis estadístico se encontraron diferencias en las concentraciones de LLM al día 28 y el consumo de alimento y ganancia de peso en el período de 21 a 28 días de edad. La concentración de LLM al día 28 fue afectada ( $P < 0.05$ ) por la interacción entre PFL, Vac y el genotipo (Figura 8.1). La concentración de LLM en los pollos ALLMnre fue similar dentro de las diferentes combinaciones de PFL y Vac. Pero la concentración de LLM en los pollos ALLMre fue mayor en PFL-Vac- y PFL+Vac+, intermedia en PFL-Vac+ y menor en PFL+Vac-. La concentración de LLM en los pollos PFL-Vac- y PFL+Vac+ también fueron mayores respecto a la de los pollos ALLMnre.

Figura 8.1. Lectina ligadora de Mananos a los 21 (A) y 28 (B) días en pollos alimentados con y sin levadura, vacunados y no vacunados y con diferente respuesta de LLM <sup>b-c</sup> Interacción PFL, Vac y Genotipo, P < 0.05; EEM = 1.755.



El consumo de alimento al día 28 fue afectado ( $P < 0.01$ ) por la interacción entre PFL, Vac y el genotipo (Figura 2A). El consumo de alimento dentro de los pollos ALLMre fue mayor en los grupos PFL-Vac- y PFL+Vac-. Pero en los pollos ALLMre el consumo de alimento solamente fue menor en el grupo PFL-Vac+; esto indica que el grupo PFL+Vac+ fue capaz de sobreponerse al desafío con Vac, mostrando un consumo similar a los pollos Vac-. La

ganancia de peso al día 28 fue afectado ( $P < 0.01$ ) por la interacción entre PFL, Vac y el genotipo (Figura 8.2). La ganancia de peso dentro de los pollos ALLMre fue similar entre tratamientos. En cambio, en los pollos ALLMnre la ganancia de peso fue mayor en el grupo PFL+Vac+ comparada con el grupo PFL-Vac+ y fue intermedia en los otros dos grupos.

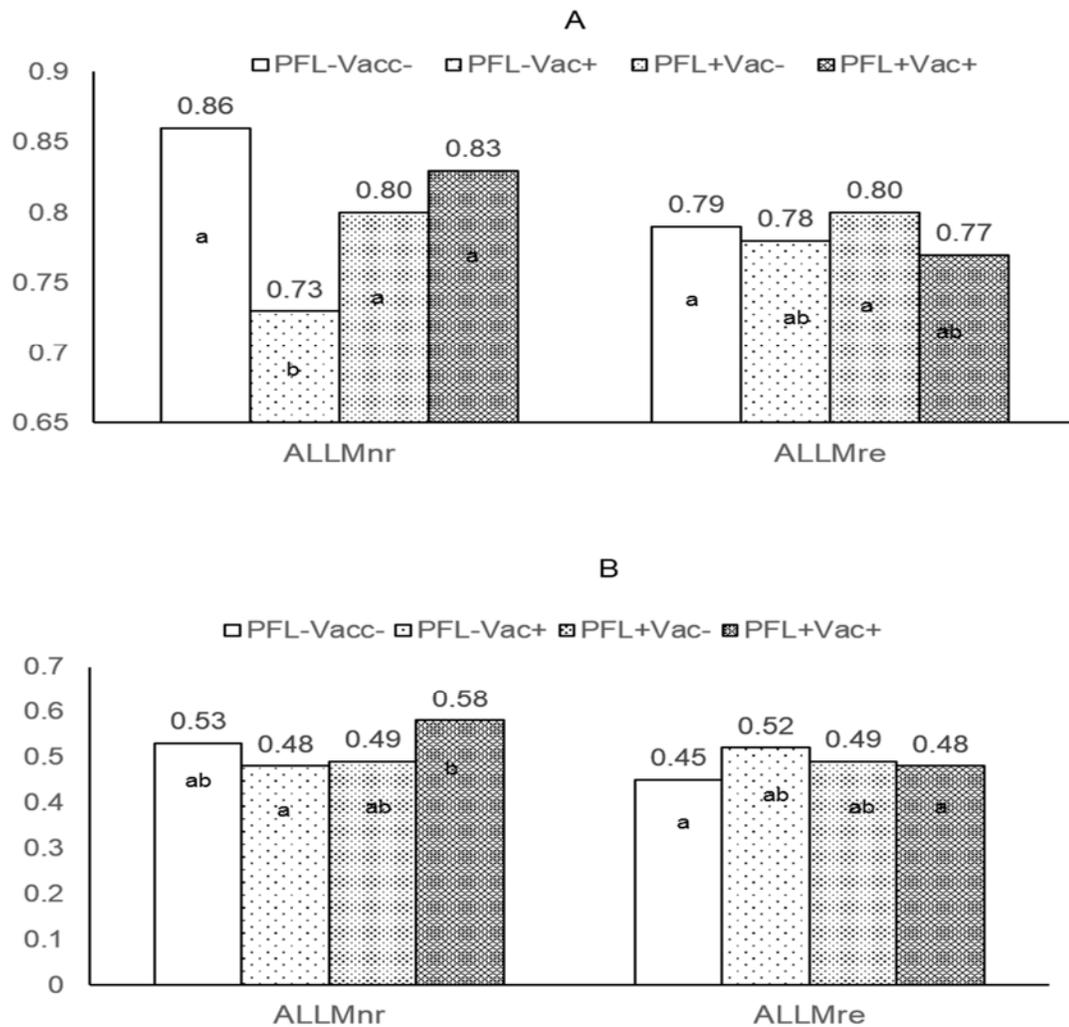
Estos resultados indican que, en lo general, dentro de los pollos ALLMnre, es decir, los que mostraron una tendencia a tener menores concentraciones de LLM, el grupo PFL+Vac+ sobresalió por tener consumos de alimento y ganancia de peso similares a los pollos Vac-

Mientras que en los pollos ALLMre no se observó esta tendencia. En varios reportes (Juul-Madsen et al., 2003, 2007; Norup et al., 2009; Schow et al., 2010) se han encontrado cambios en los niveles séricos de LLM después cuatro días de un desafío (Virus de Bronquitis Infecciosa, *P. multocida*, *E. coli*, virus de Laringo Traquitis) y los títulos van recuperando su nivel normal en los siguientes 6-15 días de la infección. Este patrón de respuesta demuestra que las LLM son proteínas de la fase de choque. De acuerdo al modelo de la presente investigación, no se tomaron muestras a los cuatro días para no aumentar el estrés de manejo sobre las aves. Sin embargo, debido al ciclo mismo de la coccidia, se conoce que las lesiones más importantes sobre la pared del intestino se producen de cuatro a seis días posteriores a la infección, por lo que se esperaba encontrar cambio en los niveles séricos aun en las muestras tomadas a los 7 días. Cortes et al. (2015) no encontraron cambios en los niveles séricos de LLM en aves restada por virus vacunal de Enfermedad de Newcastle, independientemente del consumo de PFL. No se encontró información de referencia para comparar los resultados por una infección subclínica de coccidia como la conseguida en este trabajo.

El análisis de las variables zootécnicas por tratamiento al dividir a los mismos por niveles séricos ALLMnre y ALLMre (Figuras 8.1 y 8.2) muestra algunas diferencias al compararlas solamente por los tratamientos como se desarrolló anteriormente (Tabla 8.1). Los pesos de una parte de las aves ALLM fueron menores que los mostrados por los pollos BLLM en los tratamientos no retados, tanto si consumieron o no PFL. Dichos resultados son similares a los obtenidos por Cortés et al (2015) que reporta menores consumos de alimento y menores pesos numéricamente en las aves que tiene el fenotipo ALLM cuando no existe un reto infeccioso. Al ser una proteína de la fase aguda, la producción de LLM implica una respuesta a un estímulo producido por algún factor antigénico que está activando al

sistema inmune, y con esto la producción de Interleucinas (IL-1- $\beta$  y IL-6, TNF $\alpha$ ) reportadas por Sørensen et al. (2006) como factores necesarios para la producción hepática de las mismas. La presencia de estas interleucinas a ciertos niveles, interfiere con el consumo voluntario de alimento, además de la eficiencia de utilización de nutrientes (Spurlock , 1997).

Figura 8.2. Consumo de alimento (A, <sup>a-i</sup>interacción PFL, Vac y Genotipo, P < 0.01; EEM = 0.0252) y ganancia de peso (B, <sup>a-i</sup>interacción PFL, Vac y Genotipo, P < 0.01; EEM = 0.0260) de 21 a 28 días en pollos alimentados con y sin levadura, vacunados y no vacunados y con diferente respuesta de LLM.



Los efectos de la infección por coccidia producen la misma respuesta del TLAI ya mencionada anteriormente, con los efectos de la producción de interleucinas pro inflamatorias en el organismo. Norup et al (2009) encuentran que la infección por E. coli en el intestino reduce más el peso en las aves BLLM que las ALLM. Este mismo efecto numéricamente fue encontrado en esta evaluación donde los grupos BLLM y ALLMre retados por coccidias que no consumieron PFL, tuvieron el consumo más bajo de alimento y la menor ganancia de peso. Por otra parte, en estos animales infectados el grupo con ALLMre tuvo un peso similar a los controles. Este resultado no ha sido mencionado en la literatura, sin embargo, es congruente con el efecto esperado de la reacción innata ante la presencia de un agente infeccioso en el intestino.

Los grupos BLLM o ALLM dentro del tratamiento retado que consumió PFL tuvieron mejores respuestas numéricamente de peso y consumo de alimento en relación con los que no consumieron PFL, sin llegar a ser tan altos como en los grupos no retados. No se tienen referencias que permitan la comparación de estos datos.

## **8. 5 Conclusiones**

La infección por coccidia es una condición generalizada en los pollos de engorda criados en piso. La reducción de los problemas causados por esta infección es de la mayor importancia sobre los resultados económicos de la parvada, dado que involucra la ganancia de peso de las aves.

Dentro del desarrollo de este trabajo se encontró una diferencia de menor consumo de alimento de las aves infectadas. El grado de infección sin embargo se puede considerar que fue subclínico tanto por las lesiones presentadas en el intestino, como por el poco efecto sobre el peso final de las aves que no fue diferente entre los distintos tratamientos.

El consumo de PFL se relacionó con una mayor producción de IgA en el intestino de las aves antes del reto por coccidias, pero no después del mismo. También se encontró una relación significativa con la reducción de la excreción de ocistos por gramo de heces. Dichos efectos se reflejaron numéricamente en cambios positivos de las variables zootécnicas de ganancia de peso y consumo de alimento en la fase post infección.

Las diferencias entre los tratamientos ALLM no son perceptibles (Tabla 5) si se toman en conjunto los datos de los tratamientos, sin hacer la diferencia entre las tendencias de las LLM entre el día 21 y el 28 del experimento. Esto implicaría la existencia de diferencias no solo basadas en el fenotipo ALLM o BLLM, sino un fenotipo secundario en las aves ALLM, que no había sido descrito en la literatura previa y que tiene una influencia importante en el desempeño de las aves, tanto en condiciones sanitarias óptimas o cuando son retadas por un agente infeccioso.

Adicionalmente dicha reacción es modificada por la presencia de los PFL que al tener una acción sobre el sistema inmune innato y de memoria (basada en la respuesta IgA encontrada), modifican las condiciones en que se realiza la respuesta inflamatoria del intestino en las aves sanas clínicamente y las retadas por un agente infeccioso como las coccidias en nuestro experimento.

## **BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO VIII**

- Broomhead J** (2013) Improving gut health with a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product, original XPC, reduces psthongen stress.XVI Congreso Bienal AMENA22-25/10
- Cortes R**, Gomez S, Angeles L, Casaubon MT (2016) Influence of a yeast fermented product on the levels of mannan-binding lectin and the antibodies against New Castle Disease Virus in Rose Broilers. On publishing process
- Fetterer R.H.** (2011 ) Preocious lines and attenuated Coccidian. Vacidiosis Symposium. Poult. Sci. 90 (E-suppl. 1) abst 250
- Gao J**, Zhang HJ, Yu SH, Wu SG, Yoon I, Quigley J, Gao YP, Qi GH (2008) Effects of yeast culture in broiler filets on performance and immunomodulatory functions. Poult Sci. 87:1377-1384
- Gao J**, Zhang HJ, Wu SG, Yoon I, Moore D, Gao YP, Yan HJ, Qi GH (2009) Effect of *saccharomyces cerevisiae* fermentation product on immune functions of broilers challenged with *Eimeria tenella*. Poult Sci 88:2141-2151
- Gholamiandekhordi AR**, Timbermont L, Lanckriet A, Van Den Broeck W, Dewulf J, Pedersen K, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Immeseel F.(2007) Quantification of gut lesion in a subclinical necrotic enteritis model. Avian Pathology . Cavp-2007-0026.R1: 1-28

- Gomez-Verduzco G**, Cortes-Cuevas, Lopez-Coello C, Avila-Gonzalez E, Nava GM (2009) Dietary supplementation of mannan-oligosaccharide enhances neonatal immune responses in chicken during natural exposure to *Eimeria* spp. *Acta Vet. Scand.* 51:11
- Hermet van S**, Hoekman A J, Smits M A, Rebel JMJ,(2004), differences in intestinal gene expression profiles in broiler lines varying in susceptibility to malabsorption syndrome. *Poult. Sci.* 83:1675-1682
- Johnson J.**, Reid WM (1970) AntiCoccidial drugs: lesión scoring techniques in battery an floor-pen experiments with chickens. *Experimental Parasitology* 28(1) 30-36
- Juarez-Estrada MA**, Nava-Morales G, Merino-Guzman R (2007) Efecto de una vacuna antiCoccidial sobre parámetros fisiológicos e inmunológicos de pollos de engorda. *Vet. Mex* 38(3):303-318
- Juul-Madsen H. R**, Munch M, Handberg J, So/rgensen P, Johnson AA, Norup LR, J/orgensen PH. (2003) Serum levels of mannan-binding lectin in chickens prior to and during experimental infection with avian infectious bronchitis virus. *Poultry Science* 82:235-241
- Juul-Madsen HR**, Norup LR, Handberg KJ, Jo/rgensen PH (2007) Mannan-binding lectin (MBL) serum concentration in relation to propagation of infectious bronchitis virus (IBV) in chickens. *Viral Imm.* 20(4):562-570
- Laursen SB**, Hedemand JE, Nielsen OL, Thiel S, Koch c, Jensenius JC (1998b) Serum levels, ontogeny and heritability of chicken mannan-binding lectin (MBL). *Immunology* 94:587-593
- Lauresen S.B.**, Nielsen OL (2000) Mannan-binging lectin (MBL) in chickens: molecular and functional aspects. *Developmental and Comparative Immunology* 24:85-101
- Lillehoj H S.** (1987). Effects of immunosuppression on avian Coccidial Vacidiosis: cyclosporine A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infection and Immunity.* 1616-1621
- Lillehoj H**, Okamura M (2003) Host Immunity and vaccine development to Coccidian and Salmonella infecctions in chickens. *Jour. Poult. Sci* 40:151-193
- Lillehoj HS**, Min W, Dalloul RA (2004) Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poult Sci* 83:611-623
- Luna, L. G.** (1968) Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3<sup>rd</sup> ed: American Registry of Pathology. McGraw-hill. New York.

- Nielsen O.L**, Jensenius JC, Jo/rgensen PH, Laursen SB (1999) Serum levels of chicken MBL during virus infections, indication that chicken MBL is an acute phase reactant. *Vet Imm. and Immunopathology*. 70:309-316
- Norup LR**, Juul-Madsen HR (2007) An essay for measuring the mannan-binding lectin pathway of complement activation in chickens. *Poultry Science* 86: 2322-2326
- Norup LR**, Dalgaard TS, Friggens NC, S/orensen P, Juul-Madsen HR (2009) Influence of chicken serum mannose-binding lectin levels on the immune reponse towards *Escherichia coli*. *Poult Sci*. 88:543-553
- Pascual G.**, De Marzi M, Barrios H, De Franceschi M. 2011. Immune mechanisms in avian Vacidiosis. *Engormix* 10/20/2011. XXII Latin American Poultry Congress
- Rodrigues ACP**, Cara DC, Fretez SHGG, Cunha FQ, Vieira EC, Nicoli JR, Vieira LQ (2000) *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *Journal Appl micro* 89:404-414
- Schou TW**, Permin A, Christensen JP, Cu HP, Juul-Madsen HR (2010) Mannan-binding lectin (MBL) in two chicken breeds and the correlation with experimental *Pasteurella multocida* infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 33(3): 183-195
- Sørensen CM**, Hansen TK, Steffensen R, Jensenius JC, Thiel S (2006) Hormonal regulation of mannan-binding lectin synthesis in hepatocytes. *Brit. Soc. Immun. Clin. Exper. Immunolgy*
- Spurlock ME**. 1997. Regulation of Metabolism and Growth during immune challenge: an overview of cytokine function. *J. Anim. Sci* 75:1773-1783
- Stanley VG**, Gray C, Daley M, Krueger WF, Sefton AE (2004) An alternative to antibiotic-based drugs in feed for enhancing performance of broilers grown on *Eimeria* spp. – infected litter. *Poult Sci* 83:39-44
- Willment J**. (2001) Characterization for the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol. Chem* 10:1074

## CAPITULO IX CONCLUSIONES

- a) La inmunidad a nivel intestinal en el pollo de engorda es un proceso básico para mantener la capacidad de crecimiento del ave al mejorar la integridad de la mucosa y permitir la digestión y absorción mayor de nutrientes.
- b) El proceso inmune en el intestino esta mediado por factores humorales y celulares. Este proceso ha sido descrito por varios autores. En esta tesis pusimos especial énfasis en uno de los factores humorales las Lectinas Ligadoras de Mananos.
- c) La inmunidad humoral a nivel del intestino es importantemente mediada por las IgA que se secretan como respuesta del sistema inmune a los agentes potencialmente patógenos y también para aquellos microorganismos que deben regularse en su crecimiento.
- d) Las LLM son un tipo de Lectina que se secretan principalmente en el hígado (posiblemente también en el intestino) y son capaces de ligarse a estructuras de tipo Manosa en los microorganismos, activando la fijación de factores del complemento o la fagocitosis. Aunque se conoce que son muy importantes para el control primario de varias enfermedades infecciosa, su papel en la inmunidad intestinal no ha sido estudiado.
- e) La micro flora del intestino se implanta desde la primera semana y continúa cambiando durante la vida del ave. El papel de la micro biota en madurar al sistema inmune y permitir una serie de reacciones defensivas ha sido estudiado en numerosos trabajos. La modificación de esta micro biota por la interacción entre la dieta y el sistema inmune es clave para mantener la salud del animal.
- f) Con el retiro de los productos antibióticos, se ha generado un nuevo conocimiento de los posibles efectos de algunos productos que cambian la micro biota y con ello la respuesta del sistema inmune y proteger la salud del ave aun en condiciones de alto reto.

- g) El pollo de engorda en las condiciones actuales de crianza, tendrá siempre asociado un crecimiento de coccidias en el intestino mientras no se pueda establecer una inmunidad efectiva contra el parásito. Para contrarrestar esta deficiencia de la inmunidad, se utilizan drogas anticoccidiales de diferentes tipos. Estas drogas son parte de los programas que están en cuestionamiento por los consumidores y con posibilidades de ser retiradas del mercado en los próximos años.
- h) Como parte de los productos considerados para mejorar el desempeño del pollo de engorda se han probado los productos de Levaduras (*Sacharomices sereviciae*) en diferentes presentaciones. En varios de los trabajos se han mostrado efectos benéficos para reducir el daño por coccidias. Sin embargo, no se ha descrito el posible mecanismo para lograrlo.
- i) Una posible explicación del efecto de la los productos de levaduras para ejercer este control, está dado por la presencia adicional de IgA en la luz del intestino y la mayor capacidad de respuesta de las líneas celulares, que ha sido mostrada por otros autores. Sin embargo la participación asociada de otros factores inmunes como las LLM no ha sido estudiada a este nivel.
- j) En el primer estudio fue realizado en la línea Ross B308 que son poblaciones híbridas (para los genotipos asociados con la producción de LLM) como son encontradas en los pollos de engorda comerciales. Se puedo determinar la presencia de LLM en todos ellos. Sin embargo, los genotipos bLLM y aLLM pueden estar sub o sobre representados, dependiendo de la distribución en cada población.
- k) Controlar el genotipo será crucial para la correcta evaluación de los resultados de los programas de vacunación y de los efectos clínicos, así como de los resultados productivos de los promotores de crecimiento como los PFL y otros productos derivados de levaduras, dada la íntima relación que se da entre el sistema inmune y la respuesta de ganancia de peso e índice de conversión. Estos factores parecen diferir entre los genotipos bLLM y aLLM.

- l) El consumo de PFL no alteró el patrón sérico de las LLM (para los genotipos bLLM o aLLM), es decir estos productos no ejercen una acción sobre el sistema inmune que sea correlacionada con la activación de este tipo de respuesta innata en ninguno de los niveles de consumo de PFL
- m) Bajo las condiciones de campo, la presencia de bajos títulos de Ac después de la vacunación, podría no ser causada por una falla de vacunación, más bien por la presencia de pollos de engorda bLLM y aLLM como ya fue descrita por otros autores y que mostramos también para la vacunación contra ENC
- n) Dentro del desarrollo del segundo trabajo (con vacunación para coccidiosis) se encontró una diferencia de menor consumo de alimento de las aves infectadas. El grado de infección sin embargo se puede considerar que fue subclínico tanto por las lesiones presentadas en el intestino, como por el poco efecto sobre el peso final de las aves que no fue diferente entre los distintos tratamientos
- o) El consumo de PFL se relacionó con una mayor producción de IgA en el intestino de las aves antes del reto por coccidias, pero no después del mismo. También se encontró una relación significativa con la reducción de la excreción de ocistos por gramo de heces. Dichos efectos se reflejaron numéricamente en cambios positivos de las variables zootécnicas de ganancia de peso y consumo de alimento en la fase post infección.
- p) Se encontraron diferencias entre las aves aLLM que no son perceptibles si se toman en conjunto los datos de los tratamientos, sin hacer la diferencia entre las tendencias de las LLM entre el día 21 y el 28 correspondientes al periodo pos infección del experimento. Esto implicaría la existencia de diferencias no solo basadas en el fenotipo aLLM o bLLM, sino un fenotipo secundario en las aves aLLM, que no había sido descrito en la literatura previa y que tiene una influencia importante en el desempeño de las aves, tanto en condiciones sanitarias óptimas o cuando son retadas por un agente infeccioso.
- q) Adicionalmente dicha respuesta es modificada por la presencia de los PFL que al tener una acción sobre el sistema inmune innato y de memoria (basada en la

respuesta IgA encontrada), modifican las condiciones en que se realiza la respuesta inflamatoria del intestino en las aves sanas clínicamente y las retadas por un agente infeccioso como las coccidias en nuestro experimento. Esta interacción no había sido descrita en la literatura. Se vuelve de importancia al ser un factor que modifica los resultados de la parvada compuesta de híbridos para la producción de LLM.

- r) El estudio más detallado de la respuesta inmune innata mediada por las LLM en los pollos de engorda constituye una oportunidad de realizar una mejor selección genética de las aves para aumentar su resistencia a las enfermedades, previendo un menor uso de antibióticos en la crianza en los próximos años.
- s) Así mismo, será necesaria una mayor información en como estas posibles nuevas líneas genéticas interaccionan con productos como los derivados de levaduras que a su vez tienen un efecto sobre la respuesta inmune del intestino. Ambos conocimientos deberán ser considerados para la formulación de programas de prevención-tratamiento de enfermedades (como la coccidiosis), consiguiendo mejores resultados productivos a menores costos.