

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE FITASAS Y  $\beta$ -MANANASAS  
EN DIETAS SORGO-SOYA PARA POLLOS EN CRECIMIENTO SOBRE  
EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y LA SALUD INTESTINAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**NICOLÁS SASTRÉ CALDERÓN**

Asesores:

MVZ. Dr. Arturo Cortes Cuevas

MVZ. Dra. Gabriela Guadalupe Gómez Verduzco

Ciudad Universitaria, CDMX

2017



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.

## DEDICATORIA

. A mi abuela Tere: y a mi abuelo Nicolás:

Por brindarme el mejor ambiente posible para mi desarrollo personal y profesional, Abuela te amo y te agradezco todo lo que haces y aguantas por mí, Abuelo eres el ejemplo más cercano que he tenido de lo que es llegar a la cima en el ámbito al que te dediques, eres y serás siempre mi máximo ejemplo a seguir.

A mi mamá Betty:

Madre, sabes que esto es nada más el comienzo, que puedo lograr muchas cosas más, siempre seguiré superándome como me enseñaste, te amo y te agradezco por haberme dado las bases desde un principio para llegar a donde estoy y apuntar mucho más lejos..

A mi Liz:

Gracias por formar parte de este proceso tan importante para mí, apoyándome en todo momento, jamás lo olvidaré, estuviste ahí conmigo cuando más lo necesitaba, aguantarme no es trabajo fácil amor, eres mi mayor motivación para seguir adelante, te amo.

A la Dra. Carolina Segundo:

Gracias por ser mi madre académica desde tercer semestre, tu apoyo, enseñanzas, confianza y protección fueron las bases para mi motivación, sé que no estuviste presente la mayor parte del tiempo, pero esto es un resultado del esfuerzo que he hecho durante todo ese tiempo, siempre estás presente en mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A mis asesores: el doctor Cortes, por permitirme realizar este proyecto ayudándome en todo momento en la granja y a la doctora Gaby, que siempre me ha apoyado en con gran amabilidad y cariño, gracias por creer en mí y adoptarme.

Al doctor Ernesto Ávila, de no ser por usted este proyecto se hubiera prolongado mucho más, gracias por todo.

Al doctor Antonio Díaz, por ser mi primer profesor favorito de la licenciatura y un gran amigo desde el inicio de mi carrera.

Al doctor Benjamín Fuente, por haberme asistido en mi experimento, gracias por todo lo que hizo por mí y por siempre brindarme una sonrisa en la granja, lo aprecio mucho.

A la doctora Xóchitl, por confiar en mí para invitarme a los proyectos de los que formé parte en su momento, recién ingresado al departamento de aves, le agradezco mucho su apoyo y confianza.

Al doctor Quintana: “No te presiones pero nunca dejes de exigirte”, sus palabras, apoyo y confianza desde que entré al DMZA nunca serán olvidados, gracias por todo.

Al doctor David: gracias por ayudarme con el análisis estadístico, con tus consejos y tu amistad, te aprecio muchísimo.

A la doctora Mireya, por su apoyo en la toma de muestras y la medición de vellosidades intestinales.

Y por último a mi padre, contigo quiero terminar esta parte, simplemente con la frase:

**“Sometimes you can’t make it on your own”**

U2

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55
ANEXOS.....	61
FIGURAS.....	64

## RESUMEN

SASTRÉ CALDERÓN NICOLÁS. Evaluación de la interacción de fitasas y  $\beta$ -mananasas en dietas sorgo-soya para pollos en crecimiento sobre el comportamiento productivo y la salud intestinal. (Bajo la dirección de MVZ. Dr. Arturo Cortes Cuevas y MVZ. Dra. Gabriela Guadalupe Gómez Verduzco).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto que tiene el uso de fitasas y  $\beta$ -mananasas en dietas sorgo-soya para determinar si existe interacción entre las enzimas, medir el efecto en los parámetros productivos, salud intestinal y respuesta inmune. Se emplearon 240 pollos de engorda de un día de edad, de la línea Ross 308®, distribuidos en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x2. El primer factor fueron las dietas con dos niveles de fitasas Axtra® PHY (500 y 1500 FTU/kg) y el segundo factor con y sin la adición de  $\beta$ -mananasas Hemicell® HT (400 g/ton). Se sacrificaron los pollos a los 21 días y se colectaron muestras de duodeno, yeyuno e íleon para realizar la medición de la longitud de vellosidades intestinales (LV), profundidad de criptas (PC) y la relación vellosidad cripta (VCR). Se tomó la relación entre el peso corporal y de la bolsa de Fabricio (RPBF), bazo (RPB) e intestino (RPI). Se determinaron los títulos de anticuerpos séricos a la Enfermedad de Newcastle e IgA secretora en duodeno. Se determinó la relación Heterófilos:Linfocitos (RHL). En el factor Hemicell® se observó mejores resultados en los parámetros productivos a los 21 días ( $p < 0.05$ ), peso y ganancia de peso en un 8%; el índice de conversión alimenticia (ICA) fue menor 0.7 puntos, y el coeficiente de variación fue 3.2% menor respecto a los que no fueron tratados con Hemicell®. En el factor fitasas se observó un ICA menor en 0.2 puntos cuando se usaron 1500 FTU/kg ( $p < 0.05$ ). En el factor Hemicell® se observó un efecto positivo en la respuesta inmune; la cantidad de IgA secretora en contenido intestinal fue mayor (50%) y también en inmunoglobulinas séricas (0.75 puntos) ( $p < 0.05$ ), el índice morfométrico de órganos linfoides fue mayor 4 puntos en RPBF y RPB ( $p < 0.05$ ), la RHL disminuyó 50% ( $p < 0.05$ ). La RPI fue menor en las dietas con Hemicell® 1.5 puntos porcentuales ( $p < 0.05$ ). En los resultados del estudio histopatológico, hubo interacción entre enzimas a nivel del duodeno ( $p < 0.05$ ), la LV y VCR fueron mayores en las dietas con 500 FTU/kg, se observó que en dietas con Hemicell® aumenta la LV y la VCR conforme incrementa la dosis de fitasas a 1500 FTU/kg ( $p < 0.05$ ).

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Situación actual de la avicultura mexicana

La industria avícola se ha logrado consolidar a lo largo de las últimas décadas como la actividad pecuaria más importante de México. Generó alrededor de 1, 226, 000 empleos en el año 2015 y se proyecta que para el 2016 genere aproximadamente 1, 238, 000 empleos. Su crecimiento y desarrollo se ha mantenido con una tasa anual sostenida de alrededor de 3%. (UNA, 2016). El sector avícola participa con el 63.6% de la producción pecuaria; 34.7% aporta la producción de pollo, 28.8% la producción de huevo y 0.10% la producción de pavo. Actualmente México se coloca en el séptimo lugar de países productores de pollo en el mundo (UNA, 2016). A lo largo de décadas de desarrollo genético en la avicultura intensiva se ha logrado que los pollos de engorda alcancen un peso adecuado para venta en tan solo seis semanas o menos; debido a un proceso de selección genética intensiva, a la alimentación, manejo y medidas de bioseguridad adecuadas, se han logrado obtener animales que potencialicen su información genética, mostrando mejores parámetros productivos, pero de la misma manera se han perdido las características de resistencia a enfermedades y rusticidad, aunado a las altas densidades de población utilizadas en las producciones intensivas que provocan mayor grado de estrés lo que favorece la vulnerabilidad a algunas enfermedades (Quintana, 2013).

Actualmente se realizan diversas acciones para mejorar las condiciones de los pollos de engorda, los avicultores necesitan tomar medidas preventivas en las parvadas para evitar la presencia de enfermedades y la consecuente disminución de los parámetros productivos o la pérdida total de los animales; algunas medidas involucran la intensificación en las reglas de bioseguridad dentro y fuera de la explotación, vacunación contra distintos agentes patógenos que pueden variar dependiendo la zona geográfica (Quintana, 2013) y el uso de aditivos en los alimentos que favorezcan la salud de los animales y reduzcan los costos de producción (Cuca et al., 2008).

## **1.2 Nutrición y el sistema inmune**

El sistema inmune consiste en una variedad de células y órganos que interactúan para defender el cuerpo contra patógenos (Humphrey et al., 1993). La nutrición es fundamental para su desarrollo; sin embargo, no está muy clara la cantidad apropiada de nutrientes para su desarrollo correcto debido a que es complejo medir el tamaño del sistema inmune (Humphrey et al., 1993). La nutrición adecuada puede ayudar en disminuir la incidencia de enfermedades mediante el estímulo de la respuesta inmune, un porcentaje de inclusión mayor de todos los nutrientes no siempre es mejor para el sistema inmune, así que es difícil definir los nutrientes específicos que el animal requiere para mejorar sus defensas contra agentes patógenos (Klasing, 2007).

Los animales con bajas reservas nutricionales dirigen el uso de estas reservas lejos de la respuesta inmune para evitar la muerte por inanición a futuro. La respuesta inmune también es dependiente de los cambios climáticos, y el estado fisiológico y conductual del animal (Houston et al., 2007).



Estudios fisiológicos han demostrado que las aves se adaptan al funcionamiento del tracto intestinal de acuerdo a las características del contenido digestivo, por lo tanto a la composición y al valor nutricional del alimento (Nitsan Z, et al., 1991). Las aves ajustan la liberación de enzimas y modifican la velocidad de tránsito del contenido digestivo a fin de maximizar la digestión de los alimentos y la absorción de los nutrientes (Lan et al., 2005). De todas las secciones anatómicas, el intestino delgado es el que se involucra más críticamente en los procesos de absorción de los nutrientes de la dieta. El intestino grueso y en particular los ciegos son regiones muy importantes de colonización microbiana (Koutsos et al., 2006). El epitelio intestinal se puede dividir en 5 regiones principales: la capa de células epiteliales que forma las microvellosidades y vellosidades, la lámina propia, el tejido linfoide asociado al intestino y la capa muscular (Hoer, 2001; Koutsos et al., 2006). En el caso de las microvellosidades (MV) de los enterocitos de las aves, se agrandan en longitud durante la primera semana de vida, apuntando a que el crecimiento del ave pueda estar limitado por el área de superficie del tracto gastrointestinal (TGI) (Hoer, 2001; Koutsos et al., 2006). En las primeras semanas de vida, las aves priorizan el envío de sus nutrientes hacia los órganos con mayor demanda metabólica, por ejemplo, a los órganos responsables de la respuesta inmunitaria (Klasing, 2007). Para favorecer el desarrollo integral del TGI se requiere que el pollo tenga acceso rápido al agua y al alimento.

En México el sorgo es de los granos más utilizados en aves comerciales para proporcionar energía y la pasta de soya como aporte proteico (Cuca et al., 2008). Los investigadores en la industria avícola están en una búsqueda continua de aditivos que reduzcan costos, mejoren los parámetros productivos y el sistema inmune de las aves; ejemplo de ello son las enzimas. La utilización adecuada de dichas enzimas puede mejorar el rendimiento productivo de los animales al hacer más eficiente el uso de los ingredientes que conforman la dieta (Ruíz, 2016), la investigación en el rubro de estos aditivos es de importancia, el mercado global de las enzimas que son utilizadas para la alimentación animal se estimó en un valor de 899.19 millones de dolares en 2014 y se proyecta que alcance 1,371 millones de dólares en 2020 (Ruíz, 2016). Este es un mercado en crecimiento que se debe estudiar más a fondo debido a su importancia económica por la reducción de costos en ingredientes de la dieta de los pollos, eliminación de factores antinutricionales, mejoría de parámetros productivos y estímulo benéfico de la respuesta inmune.

## **1.2 Superdosis de fitasas como estrategia en contra del fitato en la dieta**

Una de las innovaciones en la nutrición de las aves en la última década ha sido el concepto de “Superdosis” de fitasas (Bedford, 2014; Bedford y Walk, 2014; Manobhavan et al., 2016; Cowieson et al., 2011). La dosis de fitasas recomendada en avicultura es de 500-1000 FTU/kg (Esteve-Garcia et al., 2005), la cual se utiliza para liberar el 15% del fósforo disponible en la dieta (Bedford and Walk, 2014).

La definición de Superdosis es utilizar entre tres a cuatro veces la dosis recomendada por el fabricante (Bedford y Walk, 2014), la principal idea de este concepto surgió por el incremento de costos en los ingredientes (Bedford, 2014), ya que el fósforo es el mineral esencial inorgánico más caro en la avicultura (Manobhavan et al., 2016), sin embargo el resultado más relevante relacionado con los parámetros productivos y la salud intestinal es la eliminación de más del 90% del fitato o inositol-hexafosfato (IP6) que está presente en la dieta (Bedford y Walk, 2014). El fitato es la forma principal de almacenamiento de fósforo en las plantas y no es biodisponible (Chung et al., 2013), se encuentra en forma de sales de magnesio, calcio y potasio, a estas sales se les llama fitina (Onyango et al., 2005; Cowieson et al., 2011); la cantidad en la que forma parte de la materia vegetal oscila entre 5 a 25 g/kg, lo que representa un factor antinutricional para los animales monogástricos (Cowieson et al., 2011). El fitato no es del todo indigestible para las aves, se ha visto que gracias a las enzimas endógenas de los animales como las fitasas y fosfatasas alcalinas presentes en la sangre, mucosa intestinal e hígado, el ave puede degradar el fitato a mio-inositol y fósforos libres (Cowieson et al., 2011), la dieta normal de las aves de producción contiene aproximadamente 1% de fitato, que equivale a 0.16-0.31% de fósforo fítico (Bedford, 2014); aunque no hay estudios concluyentes sobre las cantidades de fitato consideradas como un factor antinutricional, se estima que pudieran oscilar entre 0.025-0.05% (Bedford, 2014), debido a esto, más del 50% debe ser hidrolizado, una dosis convencional de 500 FTU/kg libera entre 0.2 a 0.25% del fósforo disponible en el fitato (Shirley y Edwards, 2003). El objetivo primordial de usar una superdosis es que entre el 80-90% del fitato sea hidrolizado (Shirley y Edwards, 2003; Bedford y Walk, 2014).

En estudios anteriores se determinó que una dosis convencional de 500 FTU/kg no era suficiente para eliminar la mayor parte de los factores antinutricionales (Shirley y Edwards, 2003; Bedford y Walk, 2014), esto se debe a que el fitato (IP6) es degradado en ésteres menores, los cuales en su mayoría no pueden ser hidrolizados por las fitasas y fosfatasas alcalinas endógenas del ave (Cowieson et al., 2011); dichos ésteres actúan de manera negativa en el proceso de digestión al igual que el IP6. En conjunto, los efectos negativos del fitato y sus derivados se resumen en: pérdidas endógenas de aminoácidos, nitrógeno, minerales y ácido siálico (Cowieson et al., 2004), inhibición de la alfa amilasa y aumento de la producción de bicarbonato de sodio y su excreción en la luz intestinal, esto aumenta el sodio en el lumen intestinal e interfiere con el transporte dependiente (bomba sodio-potasio) y el transporte activo de nutrientes a las células, afectando a su vez la absorción de aminoácidos (Cowieson et al., 2004). También reducen la actividad de la pepsina, tripsina y otras proteínas cargadas positivamente por atracción electrostática (Vaintraub y Bulmaga, 1991), ante este problema el animal se adapta secretando más ácido clorhídrico y pepsina, lo que ocasiona un gasto energético extra en la digestión y disminuye el rendimiento productivo del animal (Walk et al., 2014), así mismo, tienen un efecto astringente en la pared intestinal donde generan viscosidad por la producción de moco, con la consecuente disminución en la absorción de nutrientes y además, ocasionan lesiones en la pared del intestino (Dos Santos et al., 2013). Por último, han sido reportadas reducciones en la digestibilidad del calcio (Ca), zinc (Zn), magnesio (Mg), sodio (Na) y cobre (Cu) en pollos y cerdos, lo que disminuye la solubilidad del Zn y otros componentes nutricionales (Cowieson et al., 2011; Dos Santos et al., 2013; Shirley y Edwards, 2003), no solamente reducen la digestibilidad de nutrientes, también aumentan la contaminación ambiental por altas excreciones de fósforo en las heces (Manobhavan et al., 2016).

Con estudios anteriores se comprobó que el uso de la superdosis resultaba en una rentabilidad 10:1, 0.2% o más de fósforo disponible y que el pollo mejoraba el índice de conversión alimenticia, la ganancia diaria de peso y el consumo diario de alimento a comparación de una dosis normal de 500 FTU/kg (Dos Santos et al.,2013).

### **1.3 Mecanismo de acción de las fitasas**

El uso de las fitasas comenzó debido a la preocupación que existía por la contaminación que generaba la excreción de fósforo en las excretas en el medio ambiente (Selle y Ravindran, 2007), porque la cantidad de heces acumuladas en producciones intensivas puede llevar a la contaminación de mantos freáticos, debido a que el fitato transporta el fósforo hasta las heces y esto puede resultar en una erosión del suelo (Ibrahim et al., 1999). La fitasa es una mio-inositol hexafosfato fosfohidrolasa que cataliza la hidrólisis del fitato a fósforo inorgánico y derivados de mio-inositol-fosfatos (Gupta et al., 2013), fue estudiada a principios de la década de 1960 y hasta 1991 fue introducida de manera comercial en el mercado (Selle y Ravindran, 2007), es producida actualmente por manipulación genética, a partir de cepas modificadas de *Aspergillus* sp, *Escherichia coli* y *Bacillus* sp. (Selle and Ravindran, 2007), su uso en dietas de pollo de engorda es con el objetivo de aumentar la biodisponibilidad nutricional del fósforo (Chung et al., 2013), la enzima ejerce su acción sobre los fitatos que se encuentran en los productos de origen vegetal, liberando al fósforo y a todos los componentes nutrimentales que estén unidos al complejo como el mio-inositol (Walk et al., 2014). El principal objetivo del uso de fitasas en la producción avícola es la reducción de la contaminación por fósforo y mejorar el aprovechamiento por fósforo fítico y mio-inositol en el animal (Onyango et al., 2005; Cowieson et al., 2011).

La unidad de medición de las fitasas se expresa en FTU/kg, que es la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ortofosfato inorgánico por minuto, de 0.0051 mol/L de fitato de sodio a un pH de 5.5 a 37° C (Engelen et al., 1994). En el mercado se encuentran dos tipos de fitasas; las que hidrolizan al fitato a partir del carbono 3 (*Aspergillus* sp) y las que hidrolizan al fitato a partir del carbono 6 (*E.coli* y *Bacillus* sp)(Onyango et al., 2005), estas últimas se ha visto que son las de mayor efectividad por su termoestabilidad (*Bacillus* sp) y resistencia a la proteólisis (*E.coli*) a comparación con las fúngicas (Igbasan et al., 2000), esta clasificación se basa en la posición del primer fósforo hidrolizado (Gupta et al., 2013). Su actividad ocurre en el proventrículo debido al pH (Selle y Ravindran, 2007; Simons et al., 1990), las fitasas fungales tienen su funcionamiento óptimo en pH de 4.5 a 5.5 y las bacterianas en 4.5, sin embargo la fitasa que produce *E.coli* es la única que resiste la actividad de la pepsina, por lo que es la que se usa y estudia en mayor cantidad en la actualidad (Igbasan et al., 2000; Cowieson et al., 2008).

La superdosis de fitasas funciona en producción, no se ha dilucidado un proceso específico hasta ahora; sin embargo, se involucra la recuperación del balance de la relación calcio fósforo, disminuye el fitato con beneficios concomitantes por pérdidas endógenas y libera fósforo y mio-inositol, este último es probable que ayude a mejorar los parámetros productivos ya que funciona facilitando el transporte de lípidos y nutrientes liposolubles (Cowieson et al., 2011), un estudio utilizando una dosis de 12 000 FTU/kg demostró que aumentaba la concentración de coenzima Q, la cual aumenta las capacidades antioxidantes de las células y vitaminas A y E (Karadas et al., 2010), resultado que podría relacionarse con la liberación de mio-inositol.

Estudios realizados en pollos de engorda alimentados con dietas a base de maíz y soya o sorgo y soya indican que la suplementación con fitasas a distintas dosis mejoran la disponibilidad del fósforo, la utilización de nitrógeno, calcio y zinc y reducen su excreción en heces (Onyango et al., 2005), mejoran el índice de conversión alimenticia, ganancia diaria de peso y el consumo de alimento (Simons et al., 1990; Shirley y Edwards, 2003; Cowieson et al., 2004, 2011; Onyango et al., 2005; Karadas et al., 2010; Chung et al., 2013; Dos Santos et al., 2013; Bedford y Walk, 2014; Walk et al., 2014; Manobhavan et al., 2016).

El uso de superdosis de fitasas ha revelado a lo largo de los últimos años tres grandes beneficios:

- Mayor cantidad de fósforo liberado
- Menos fitato insoluble y más ésteres menores solubles
- Generación de mio-inositol con efectos lipotrópicos similares a vitaminas (Cowieson et al., 2011).

La generación de mio-inositol tiene efectos positivos en los parámetros productivos debido a que facilita el transporte de grasas y nutrientes liposolubles (Cowieson et al., 2011), a nivel sanguíneo se reincorpora con el fósforo generando IP6 nuevamente, el cual funciona como un poderoso antioxidante (Bedford, 2014), tiene un papel fundamental en el mantenimiento de membranas de fosfolípidos y metabolismo de grasas, al igual que en funciones celulares como señalización y crecimiento (Walk et al., 2014), se ha observado que con el uso de dosis mayores de fitasas se obtiene una mejora del índice de conversión alimenticia entre 3 y 4 puntos porcentuales, lo que radica en un valor entre 7-8 dólares de ganancia por tonelada de alimento (Bedford y Walk, 2014).

#### **1.4 $\beta$ -mananos y Respuesta inmune inducida por la alimentación (RIIA).**

La identificación y disminución de factores antinutricionales es fundamental en la avicultura, uno de estos factores son los polisacáridos no amiláceos; complejos de alto peso molecular encontrados en las paredes celulares de las plantas, contienen distintos tipos de fibras como lignina,  $\beta$ -glucanos, arabinoxilanos,  $\beta$ -galactosa y  $\beta$ -manosa (Daskiran et al., 2004). Los  $\beta$ -mananos son polisacáridos no amiláceos, altamente viscosos, hidrosolubles y termo-resistentes, presentes en las paredes celulares de las leguminosas (Muhammad et al, 2015), están compuestos principalmente de  $\beta$ -galactomananos,  $\beta$ -glucomananos y  $\beta$ -glucogalactomananos (Daskiran et al., 2004), se encuentran en algunos ingredientes de la alimentación avícola, como la soya, girasol, canola, ajonjolí y la goma guar (Muhammad et al, 2015). La soya es la más usada por ser la principal fuente de proteína en muchos países y contiene aproximadamente 1% de  $\beta$ -mananos (Hsiao et al., 2006). Estos son factores altamente anti nutricionales en la avicultura debido a la falta de una enzima endógena por parte de las aves (Cho y Kim, 2013). Los  $\beta$ -mananos generan soluciones viscosas y altamente fermentables en tracto digestivo; lo que aumenta el peso del intestino, disminuye la solubilidad de otros nutrientes y favorece el desarrollo de patógenos (Daskiran et al., 2004; Cho y Kim, 2013). Hace tres décadas se descubrió que estos compuestos afectaban negativamente los parámetros productivos (Patel y McGinnis, 1985). Grandes cantidades pueden llegar a bajar la producción de insulina, absorción de glucosa y producción de glucagon, derivado de la falta de absorción de nutrientes (Nunes y Malmjöf, 1992), se ha comprobado que niveles altos de  $\beta$ -mananos disminuyen los parámetros productivos en el pollo de engorda (Sundu et al., 2006; Muhammad et al, 2015).



Se observó que estos compuestos son considerados factores anti-nutricionales que inducen la respuesta inmune inducida por el alimento (RIIA) (Mehri et al., 2010), provocan en el intestino una respuesta miceliar inmune, lo cual tiene un alto costo de energía y de otros nutrientes importantes como los aminoácidos, esta RIIA aumenta el coste de mantenimiento aproximadamente en un 3% y esto genera una pérdida del potencial productivo y de crecimiento (Daskiran et al., 2004). La RIIA como respuesta a los  $\beta$ -mananos es potencialmente una amenaza para los rendimientos zootécnicos y para la uniformidad de los lotes de aves comerciales (Martínez et al., 2007). Los mananos se encuentran en bacterias, hongos y virus, por lo que hay reconocimiento por parte de la respuesta inmune innata, esto provoca un gasto de energía no productiva, incrementa macrófagos, monocitos y producción de citocinas, resultando en una reducción de la efectividad del uso de nutrientes (Hsiao et al., 2006). Los  $\beta$ -mananos pueden ser reconocidos por la mucosa intestinal y considerados por el sistema inmune como Moléculas Asociadas a Agentes Patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns, "PAMP") (Martínez et al., 2007). El sistema inmunitario innato es activado por PAMP de alto peso molecular presentes en ingredientes leguminosos como la soya, estos patrones inducen una respuesta inmunitaria fuerte y costosa (Didierlaurent et al., 2005), el receptor que reconoce estos compuestos es una Lectina tipo C, que detecta ligandos de manosas presentes en un rango amplio de bacterias y hongos, células infectadas por virus y parásitos, este reconocimiento estructural se considera como uno de los más conservados filogénicamente; al ser activado desencadena una respuesta inflamatoria en el intestino (Gordon, 2002).

Los receptores de manosa son parte de la respuesta inmune innata (East, 2002), el reconocimiento de manosa no es una señal de peligro, es una señal para eliminación discreta y antiinflamatoria, las moléculas que presentan manosas están destinadas a tener una vida corta en el espacio extracelular, por lo que este receptor está involucrado en la eliminación de estos compuestos (Gazi y Martinez-Pomares, 2009). La inmunidad innata está mediada principalmente por macrófagos, heterófilos y linfocitos B1 primitivos que producen anticuerpos naturales, su desarrollo es de bajo costo energético, pero su uso es altamente demandante (Klasing, 2007).

Los estudios demuestran que la respuesta inmunitaria inducida por alimentos (RIIA) es una realidad y puede afectar al rendimiento de los pollos de engorda, los  $\beta$ -mananos constituyen un buen modelo para replicar su impacto (Martínez et al., 2007).

### **1.5 $\beta$ -mananasas, mecanismo y beneficios de usarlas en la dieta del pollo de engorda:**

Las  $\beta$ -mananasas son endohidroxilasas (Jackson et al., 2003; Daskiran et al., 2004; Dhawan y Kaur, 2007), producto de fermentación de *Bacillus lentus* (Patel y McGinnis, 1985; Daskiran et al., 2004; Dhawan y Kaur, 2007; Mehri et al., 2010) y *Trichoderma longibrachiatum* (Dhawan y Kaur, 2007; Mehri et al., 2010). Su mecanismo de acción es la ruptura de los  $\beta$ -mananos en moléculas más pequeñas (Daskiran et al., 2004), hidrolizando los enlaces  $\beta$ -D-1,4 manopiranosido presentes en la D-Manosa, generando mananooligosacáridos (MOS): manobiosa y manotriosa (Dhawan y Kaur, 2007).

Hemicell<sup>®</sup> (HT) es un producto producido por ChemGen-USA, ampliamente usado en la alimentación animal de aves y cerdos, está conformado por  $\beta$ -mananasas de *Trichoderma longibrachiatum* y *Bacillus lentus* (Dhawan y Kaur, 2007), son las enzimas que más se han estudiado para contrarrestar los efectos negativos ocasionados por los  $\beta$ -mananos, incluyendo la RIIA (Anderson et al., 2001; Jackson et al., 2003, 2004; Daskiran et al., 2004; Zou et al., 2006; Mehri et al., 2010; Cho y Kim, 2013). Los últimos estudios han determinado que la dosis recomendada por el fabricante es de 100 millones de unidades por tonelada (MU), en donde 1 MU equivale a  $10^6$  unidades de actividad enzimática (Jackson et al., 2003), esta cantidad es igual al 0.04-0.05% de inclusión en la dieta. No se recomiendan dosis mayores debido a que la cantidad de  $\beta$ -mananos en dietas balanceadas es de 0.7-1.2% (Jackson et al., 2003; Hsiao et al., 2006). Esta dosis recomendada se basa en estudios internos de hace 10 años con dietas prácticas conteniendo antibióticos (Jackson et al., 2003). La hidrólisis de los  $\beta$ -mananos libera energía que es aprovechada por los animales, reducen la viscosidad al igual que las fitasas (Lee et al., 2003), suprimen proliferación bacteriana gracias a los MOS resultantes de la hidrólisis; como funcionan como prebióticos favoreciendo el desarrollo de microbiota de tracto intestinal (Shashidhara y Devegowda, 2003), eliminan el efecto negativo en absorción de glucosa y producción de insulina y previenen el gasto energético por la RIIA (Dhawan y Kaur, 2007). Con respecto a los parámetros productivos; HT mejora el índice de conversión alimenticia (ICA) en un 3% (Anderson et al., 2001; Daskiran et al., 2004) y reduce el coeficiente de variación (CV) en un rango de 2-16% (Anderson et al., 2001; Jackson et al., 2003).

En otros estudios se demostró que mejoró la Ganancia de Peso (GDP) y el ICA (Daskiran et al., 2004; Jackson et al., 2004; Sundu et al., 2006; Zou et al., 2006; Mehri et al., 2010; Cho y Kim, 2013).

Por último, se ha discutido que la liberación de MOS funciona como un inmunoestimulante; aumentando la concentración de anticuerpos en suero (Shashidhara y Devegowda, 2003), el peso de órganos linfoides, la concentración de IgM e IgA en suero (Zou et al., 2006), aumenta la longitud de vellosidades intestinales y reduce el espesor de la lámina propia por la disminución de la inflamación local por la RIIA (Mehri et al., 2010).

## **1.6 Justificación**

Con base en estos antecedentes y ante la necesidad de seguir reduciendo costos de producción debido a los valores crecientes de precios de los ingredientes para la dieta del pollo de engorda, surgió la necesidad de evaluar si la combinación de dos enzimas (fitasas y  $\beta$ -mananasas) en dietas sorgo-soya tiene un efecto benéfico en parámetros productivos, inmunológicos y de salud intestinal. En México gran parte de la formulación de las dietas para pollo de engorda es en base a sorgo + pasta de soya (Cuca et al., 2008), por lo que es necesario generar y analizar datos de respuesta de estas dos enzimas.

## **1.7 Hipótesis**

El uso de superdosis de fitasas (1500 FTU/kg) y de  $\beta$ -mananasas (400 g/ton) en dietas sorgo-soya, tienen un efecto positivo en el comportamiento productivo, la inmunidad y la longitud de vellosidades y profundidad de criptas del pollo de engorda Ross 308 ®.

## 1.8 Objetivo General

Determinar el efecto en el comportamiento productivo, la morfología intestinal y la inmunidad en pollos Ross 308® con la adición de dos enzimas (fitasas Axtra®, a razón de 50 g /ton y 150 g/ton y  $\beta$ -mananasas Hemicell® 400g/ton en el alimento) en dietas sorgo-soya.

## 1.9 Objetivos Particulares

- Evaluar los parámetros productivos en pollos de engorda Ross 308® alimentados con dietas sorgo-soya adicionadas con enzimas fitasas y  $\beta$ -mananasas.
- Cuantificar IgA intestinales en pollos de engorda Ross 308® alimentados con dietas sorgo-soya adicionadas con enzimas fitasas y  $\beta$ -mananasas.
- Valorar la respuesta a la vacunación contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorda Ross 308® alimentados con dietas sorgo-soya adicionadas con enzimas fitasas y  $\beta$ -mananasas, mediante la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación.
- Determinar la Relación Heterófilos Linfocitos en sangre mediante la realización de un hemograma en pollos de engorda Ross 308® alimentados con dietas sorgo-soya adicionadas con enzimas fitasas y  $\beta$ -mananasas.
- Calcular el índice morfométrico de órganos linfoides en pollos de engorda Ross 308® alimentados con dietas sorgo-soya adicionadas con enzimas fitasas y  $\beta$ -mananasas.
- Medir la longitud de las vellosidades intestinales, profundidad de criptas, relación criptas vellosidades e índice morfométrico intestinal en pollos de engorda Ross 308® alimentados con dietas sorgo-soya adicionadas con enzimas fitasas y  $\beta$ -mananasas.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1 Instalaciones y cuidados de los animales de experimentación**

El experimento se realizó en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el cual se localiza en la calle de Manuel M. López en la Colonia Santiago Zapotitlán de la Delegación Tláhuac, Ciudad de México, a una altura de 2250 m.s.n.m., en el paralelo 19°17' latitud norte y el meridiano 99°02'30'' longitud oeste (INEGI, 2016), los animales permanecieron en el CEIEPAv desde el primer día hasta finalizar el experimento.

Las pruebas de laboratorio se realizaron en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves y el análisis hematológico e histológico en el Departamento de Patología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Estos se localizan en Av. Universidad 3000 Col. UNAM, CU Delegación Coyoacán 04510, Ciudad de México, México.

## 2.2 Diseño de tratamientos

Los procedimientos de manejo realizados en las aves del presente experimento, fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUA-FMVZ-UNAM).

Se utilizaron 240 pollitos de la estirpe Ross 308® de un día de edad con un peso promedio de 43 gramos, provenientes de una incubadora comercial, fueron alojados en baterías de ambiente controlado de la marca Petersime®, la densidad de población empleada fue de 10 pollos/m<sup>2</sup>, las aves se distribuyeron en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x2, un factor fue con los dos niveles de fitasas Aextra® PHY, 500 FTU/kg y 1500 FTU/kg y el otro factor fue la adición de β-mananasas Hemicell® HT, 4 tratamientos con seis réplicas de 10 aves cada uno. La dieta basal empleada en los tratamientos fue con base en sorgo-soya en harina, la cual fue calculada con el paquete computacional NUTRION®, se muestra su composición en el **Cuadro 1**.



**Cuadro 2.** Composición y análisis calculado de la dieta basal experimental (T1) de iniciación para pollo de engorda (1-21 días de edad).

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta basal</b>
Sorgo	571.45
Pasta de Soya	370.925
Aceite Vegetal	18.525
Carbonato de Calcio	14.75
Ortofosfato	10.35
Sal	3.6
Metionina	3.125
Vitaminas Pollo*	3
L-Lisina	2.85
L-Treonina	0.725
IQ (Antioxidante)**	0.15
Celulosa	0.5
Fítasa	0.05
Total	1000
<b>Análisis calculado</b>	
Energía metabolizable (Kcal/kg)	3010
Proteína (%)	22
Lisina dig. (%)	1.44
Met + Cis dig.(%)	0.9
Arginina (%)	1.347
Sodio (%)	0.182
Calcio total (%)	0.96
Fósforo disponible (%)	0.48

\* Núcleo comercial que aporta: Vit. A 12,000,000 UI, Vit. D3 2,500,000 UIP, Vit. E 15,000 UI, Vit. K3 2,000 mg/kg, Vit. B1 2,250 mg/kg, Vit. B2 7500 mg/kg, Vit. B3 45,000 mg/kg, Vit. B5 12,500 mg/kg, Vit. B6 3,500 mg/kg, Vit. B12 20 mg/kg, Ácido fólico 1,500 mg/kg, Biotina 125 mg/kg.

\*\* BHT y BHQ

A continuación se mencionan los tratamientos:

1. **Tratamiento 1 (T1):** Dieta basal sorgo-soya con 50 g/ton de fitasas Aextra ®
2. **Tratamiento 2 (T2):** Como 1 + 100 g/ton de fitasas Aextra ®.
3. **Tratamiento 3 (T3):** Como 1 + 400 g/ton de  $\beta$ -Mananasas Hemicell ®.
4. **Tratamiento 4 (T4):** Como 2 + 400 g/ton de  $\beta$ -Mananasas Hemicell ®.

El alimento y el agua se ofrecieron *ad libitum* durante todo el experimento.

### 2.3 Parámetros productivos

Se llevaron registros semanales durante 21 días, de peso corporal, ganancia diaria de peso, consumo de alimento e índice de conversión alimenticia. Al cumplir las tres semanas de edad se realizó el pesaje individual de todos los pollos por tratamiento para determinar el coeficiente de variación.

### 2.4 Respuesta inmune humoral

Los pollos de engorda se vacunaron contra la Enfermedad de Newcastle (ENC), se utilizó virus vivo inoculando una gota de la vacuna por vía ocular y 0.5 ml de vacuna virus muerto por vía subcutánea en el tercio medio del cuello, la Inhibición de la Hemoaglutinación es una prueba para medir títulos de anticuerpos vacunales contra los epítopes hemoaglutinantes del Paramixovirus aviar tipo 1 (Czifra et al., 1998). Para determinar si con el uso de Hemicell® existía un efecto inmunoestimulante a nivel sistémico, los pollos se vacunaron contra Enfermedad de Newcastle (ENC) + Influenza Aviar vía subcutánea con vacuna emulsionada (0.5 ml/ave de Newcastle Plus®, Laboratorios Avilab) y ENC por vía ocular (1 gota/ave de Newcastle cepa La Sota®, Laboratorios Avilab) a los 10 días de edad conforme al programa establecido en el CEIEPAv.

Posteriormente fueron seleccionados al azar seis pollos de cada tratamiento, uno por réplica (24 en total), al finalizar el experimento (21 días de edad), se tomaron muestras de sangre como lo describe (Valdivia et al, 2008). Vía la vena yugular, se obtuvieron los sueros y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente determinar títulos de anticuerpos séricos específicos para el virus de la ENC a través de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (Thayer y Beard, 1998) ver **Anexo 1**.

## **2.5 Estudio hematológico**

De los mismos seis pollos, se tomaron muestras de sangre en tubos con anticoagulante EDTA de la vena yugular. Se realizó el conteo leucocitario diferencial en frotis sanguíneos teñidos con Wright, las cuentas totales se determinaron indirectamente por el cálculo de los porcentajes de la célula y de cuentas totales (Campbell, 1995).

## **2.6 IgA intestinal**

De cada tratamiento, se sacrificaron los seis pollos utilizados para la toma de muestra sanguínea, se tomaron 10 cm de duodeno y posteriormente se realizaron lavados con 10 ml de PBS frío y estéril, pasando tres veces el PBS en la fracción del lumen intestinal a presión utilizando una jeringa de 20 ml, se recolectó y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior evaluación con la prueba de ELISA (Gómez, 2009), ver **Anexo 2**.

## **2.7 Peso relativo de los órganos**

Se realizó el pesaje de bazo, bolsa de Fabricio e intestino de las 24 aves sacrificadas; para determinar el índice morfométrico de órganos linfoides y la relación peso intestino (RPI) utilizando una balanza electrónica de precisión, el peso de los órganos fue dividido entre el peso corporal y multiplicado por 100 para determinar el porcentaje del índice morfométrico (Perozo-Marín et al., 2004).

## **2.8 Estudio histológico**

De los pollos sacrificados se tomaron muestras de intestino delgado, desde el final del ventrículo hasta 1 cm anterior al inicio de los ciegos. Se obtuvieron muestras de aproximadamente 4 cm de largo de duodeno, yeyuno e íleon. El procedimiento de análisis histológico se puede observar en el **Anexo 3** (Prophet et al., 1995).

Las mediciones se realizaron con un microscopio óptico (Carl Zeiss ® Standar 25), con los objetivos de 4X y 10 X, auxiliados con un software computacional (Axiovisio versión 4.8®) y fueron realizadas en vellosidades íntegras tal como se muestra en el apéndice de **FIGURAS**.

## 2.9 Análisis estadístico

Previo al análisis estadístico, se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilk para verificar normalidad y de Levene para verificar homocedasticidad en las variables que se evaluaron. Con el fin de obtener homogeneidad de varianzas se realizó una transformación de exponentes de Box-Cox (Kuehl, 2001) para las variables inmunológicas y el índice morfométrico de los órganos. Los resultados de las variables se analizaron mediante un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 2x2 un factor 2 niveles de fitasas, 500 FTU/kg y 1500 FTU/kg y otro factor Con y Sin Hemicell®, conforme al siguiente modelo (Daniel, 2010):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon(ijk)$$

i=1, 2  
j=1, 2  
k= 1, 2, 3, 4, 5, 6

En donde:

$Y_{ij}$ = Variables de respuesta

$\mu$ = Media general

$\alpha_i$ = Efecto del i-ésimo tratamiento (dietas con 500 FTU/kg y con 1500 FTU/kg).

$\beta_j$ = Efecto del j-ésimo tratamiento (Con y Sin Hemicell).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción entre el i-ésimo tratamiento y el j-ésimo tratamiento.

$E_{ijk}$ = Error experimental.

Los resultados de las variables evaluadas, se analizaron con ayuda del software computacional JMP®, versión 8. Se fijó una significancia de  $p < 0.05$  (Daniel, 2010). La variable título de anticuerpos a la ENC fue transformada a logaritmo base 2.

### 3. RESULTADOS

Los resultados de los parámetros indicaron que las variables cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, ver **Anexo x**.

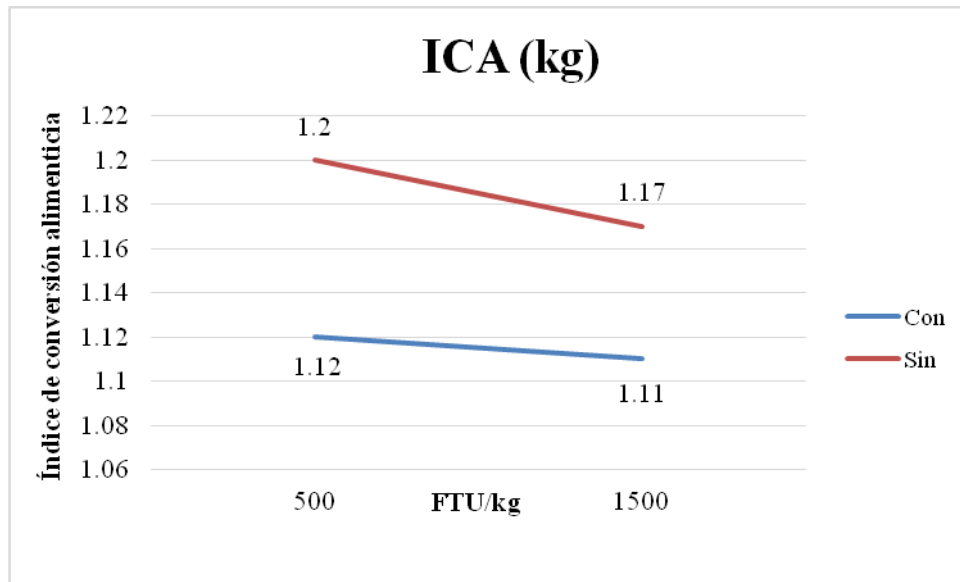
#### 3.1 Comportamiento productivo

Los resultados de las variables productivas se pueden observar en el **Cuadro 2**. No se observó efecto de interacción entre los niveles Fitasas (PHY) y la adición de Hemicell® (HT) ( $p>0.05$ ). En el factor PHY se observó efecto en el ICA ( $p<0.05$ ) y se puede observar su efecto benéfico en la **Figura 1**, siendo menor 0.02 puntos cuando se utiliza una dosis de 1500 FTU/kg (1.14 vs 1.16), sin embargo, no se encontró diferencia significativa ( $p>0.05$ ) en la GDP, peso corporal y CA para el factor PHY. En el factor HT se observó que los pollos que consumieron la enzima tuvieron mejora en los parámetros productivos ( $p<0.05$ ), en peso (940.7 vs 863.5), (**Figura 2**), GDP (42.7 vs 39.1), (**Figura 3**), ICA (1.12 vs 1.19) y CV (4.57 vs 7.77), (**Figura 4**). No se observó diferencia ( $p>0.05$ ) en el consumo de alimento.

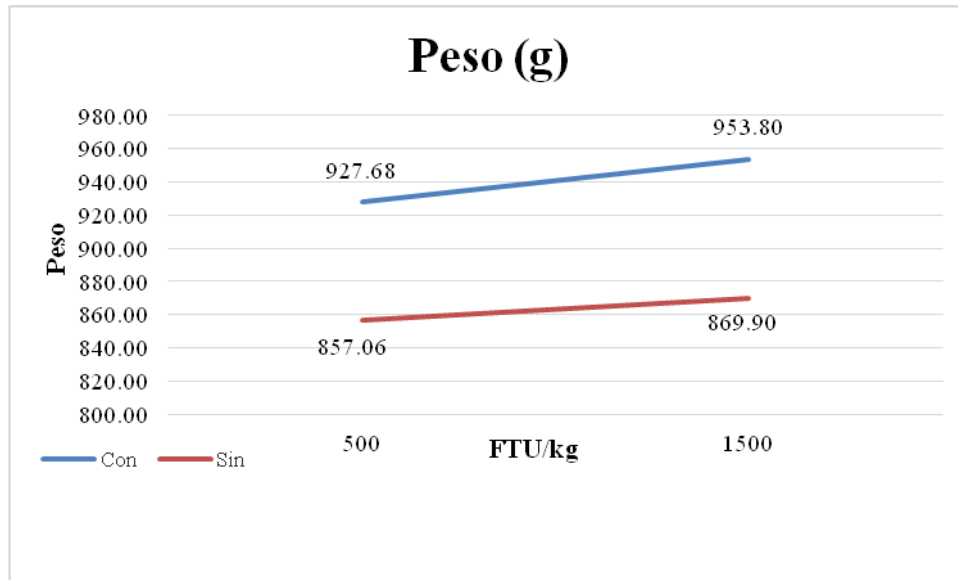
**Cuadro 2.** Variables productivas de los pollos de engorda alimentados con dietas sorgo + soya y adicionadas con fitasas y Hemicell, de 1-21 días de edad.

Fitasa(FTU/kg)	Hemicell	Peso (g)	CA (g)	GDP (g)	ICA (kg)	CV (%)
<b>500</b>	<b>Con</b>	928	1006	42.1	1.120	4.78
	<b>Sin</b>	857	996	38.7	1.210	8.64
<b>1500</b>	<b>Con</b>	954	1017	43.3	1.110	4.36
	<b>Sin</b>	870	992	39.3	1.170	6.90
<b>Fitasa</b>	<b>500</b>	892	1001	40.4	1.160b	6.71
	<b>1500</b>	912	1004	41.3	1.140a	5.63
<b>Hemicell</b>	<b>Con</b>	940a	1011	42.7a	1.120b	4.57b
	<b>Sin</b>	863b	994	39.1b	1.190a	7.77a
<b>p</b>						
<b>Fitasa</b>		0.175	0.890	0.188	<b>0.032</b>	0.133
<b>Hemicell</b>		<b>0.001</b>	0.4710	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
<b>Fitasa*Hemicell</b>		0.630	0.750	0.645	0.230	0.379
<b>EEM</b>		9.8	16.8	0.46	0.007	-

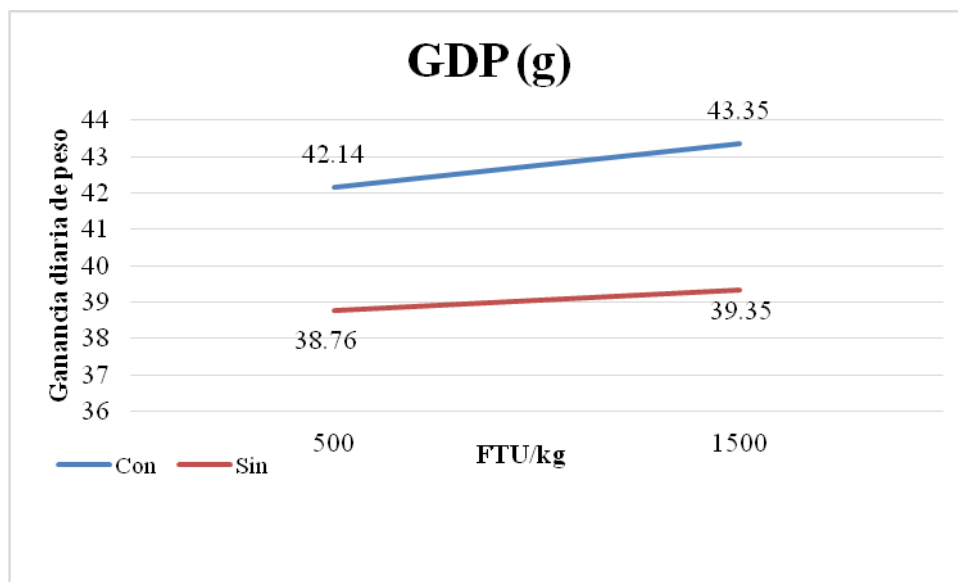
La ausencia de literales entre las medias de cada columna indica que no existen diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). EEM: Error estándar de la media, CA: Consumo de alimento, GDP: Ganancia diaria de peso, ICA: Índice de conversión alimenticia, CV: Coeficiente de variación.



**Figura 1.** Efecto del Hemicell y Fitasas en el ICA de los pollos a las tres semanas de edad.

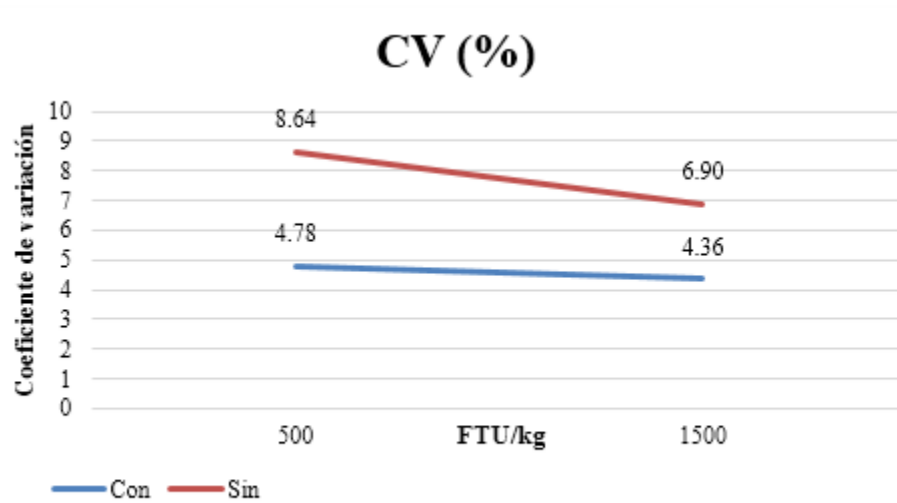


**Figura 2.** Efecto de Hemicell en el peso de los pollos a las tres semanas de edad.



**Figura 3.** Efecto de Hemicell en la ganancia diaria de peso de los pollos a las tres semanas de edad.





**Figura 4.** Efecto de Hemicell en el coeficiente de variación de los pollos a las tres semanas de edad.

### 3.2 Estudios inmunológicos

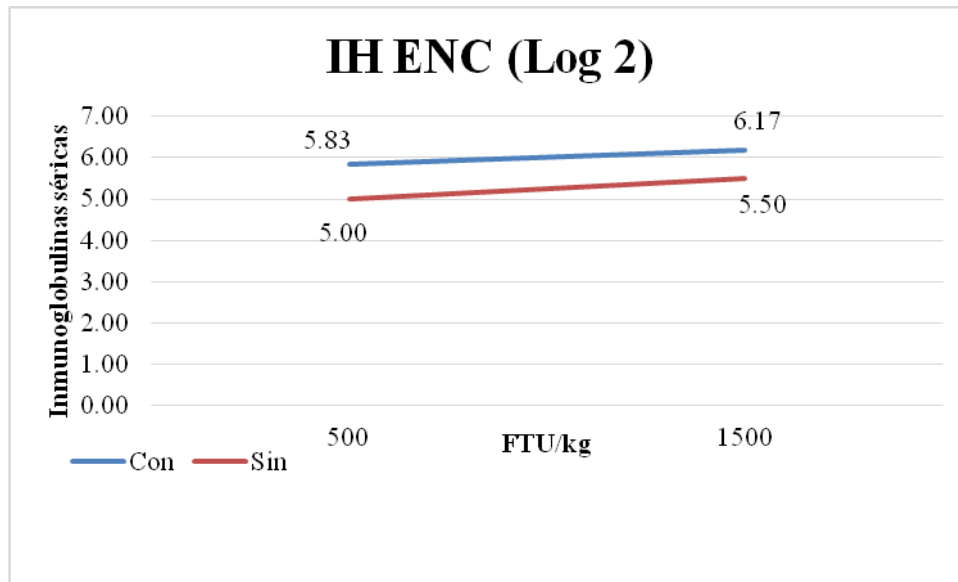
Los resultados de las variables inmunológicas se pueden observar en el **Cuadro 3**. No se observó efecto de interacción entre factores ( $p > 0.05$ ), en los títulos de anticuerpos séricos a la ENC; las dietas que contenían  $\beta$ -mananasas (Hemicell) mostraron diferencia ( $p < 0.05$ ), con una mayor concentración de inmunoglobulinas en suero (6.00 vs 5.25), se observa su efecto en la **Figura 5**.

En los valores de IgA secretora intestinal se observó efecto ( $p < 0.05$ ), siendo mayor la concentración en los tratamientos que contenían Hemicell® en un 50% (523.46 vs 267.99) respecto a la dieta sin Hemicell®, se observa su efecto en la **Figura 6**.

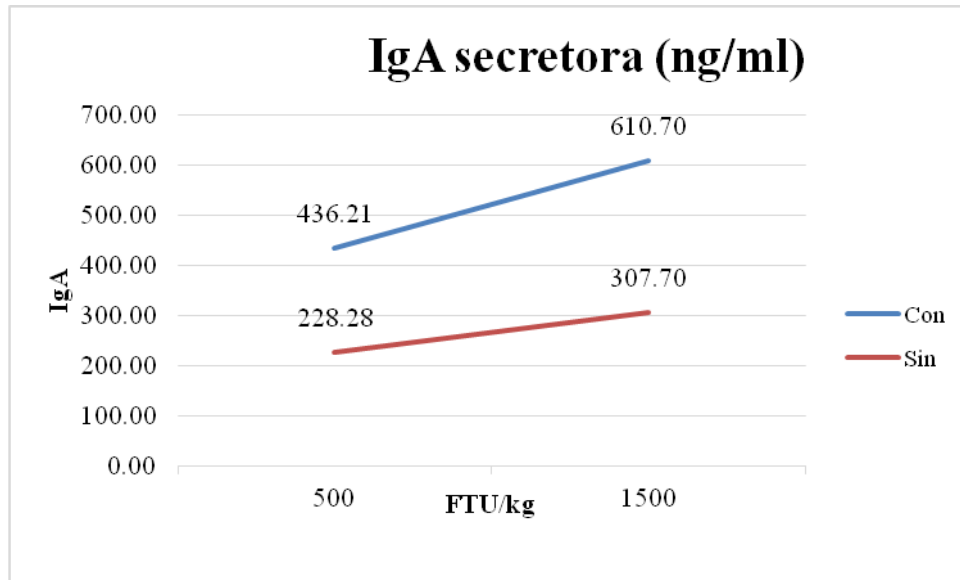
**Cuadro 3.** Respuesta inmune humoral en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo + soya y adicionadas con fitasas y Hemicell, de 1-21 días de edad.

Fitasa (FTU/kg)	Hemicell	IgA intestinal (ng/ml), DO 405 nm	IH ENC, Log 2
<b>500</b>	<b>Con</b>	436.2	5.83
	<b>Sin</b>	228.2	5.00
<b>1500</b>	<b>Con</b>	610.7	6.17
	<b>Sin</b>	307.7	5.50
<b>Fitasa</b>	<b>500</b>	332.2	5.42
	<b>1500</b>	459.2	5.83
<b>Hemicell</b>	<b>Con</b>	523.5a	6.00a
	<b>Sin</b>	267.9b	5.25b
<b>P</b>			
<b>Fitasa</b>		0.667	0.223
<b>Hemicell</b>		<b>0.002</b>	<b>0.035</b>
<b>Fitasa*Hemicell</b>		0.123	0.804
<b>EEM</b>		55.5	0.23

La ausencia de literales entre las medias de cada columna indica que no existen diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). IH= Inhibición de la Hemoaglutinación, ENC= Enfermedad de Newcastle, DO= Densidad Óptica, EEM= Error estándar de la media



**Figura 5.** Efecto de Hemicell en la concentración de inmunoglobulinas séricas de los pollos a las tres semanas de edad.



**Figura 6.** Efecto de Hemicell en la concentración de IgA secretora de los pollos a las tres semanas de edad.

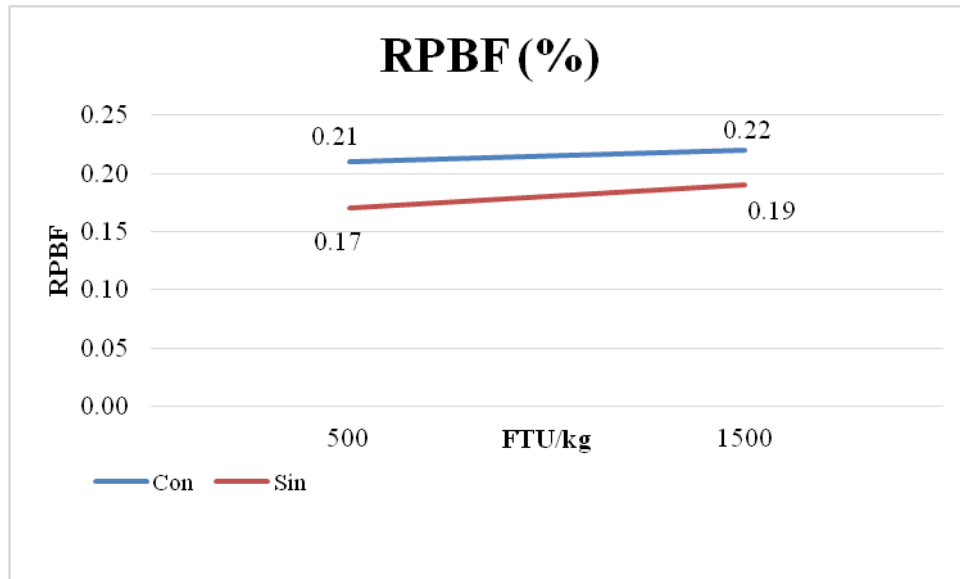
### 3.3 Peso relativo de los órganos

Los pesos y pesos relativos de bazo (PRB), bolsa de Fabricio (PRBF) e intestino (PRI) se observan en el **Cuadro 4**. No se observó efecto de interacción entre factores ( $p > 0.05$ ). Se presentaron diferencias ( $p < 0.05$ ) en todas las variables cuando se utilizó Hemicell®; en peso de intestino y PRI (55.00/6.17 vs 52.08/6.28), bazo y PRB (1.03 /0.11 vs 0.58/0.07) y bolsa de Fabricio y PRBF (2.03/0.22 vs 1.54/0.18), se puede apreciar su efecto benéfico en las figuras 7, 8 y 9. En el factor fitasas no se observó diferencia estadística significativa en las variables evaluadas ( $p > 0.05$ ).

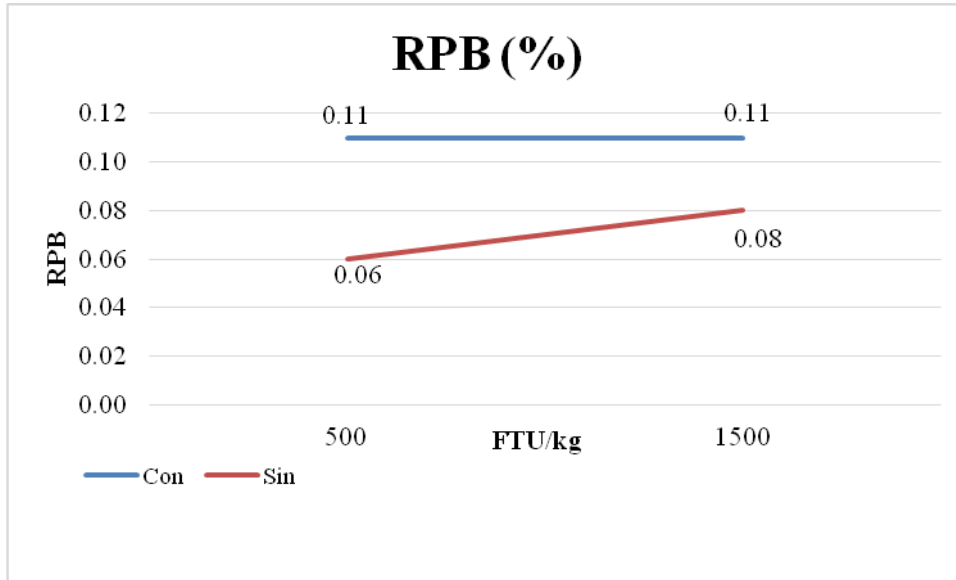
**Cuadro 4.** Peso e Índice morfométrico de órganos de los pollos de engorda alimentados con dietas sorgo + soya y adicionadas con fitasas y Hemicell, de 1-21 días de edad.

Fitasa (FTU/kg)	Hemicell	PI (g)	PRI (%)	PB (g)	PRB (%)	PBF (g)	RPBF (%)
<b>500</b>	<b>Con</b>	53.67	5.84	0.98	0.11	1.90	0.21
	<b>Sin</b>	51.33	6.50	0.48	0.06	1.40	0.17
<b>1500</b>	<b>Con</b>	56.33	5.77	1.07	0.11	2.20	0.22
	<b>Sin</b>	52.83	6.05	0.68	0.08	1.67	0.19
<b>Fitasa</b>	<b>500</b>	52.50	6.17	0.73	0.09	1.65	0.19
	<b>1500</b>	54.58	5.91	0.88	0.09	1.91	0.21
<b>Hemicell</b>	<b>Con</b>	55.00a	5.81a	1.03a	0.11a	2.03a	0.22a
	<b>Sin</b>	52.08b	6.28b	0.58b	0.07b	1.54b	0.18b
<b>P</b>							
<b>Fitasa</b>		0.075	0.404	0.059	0.116	0.057	0.234
<b>Hemicell</b>		<b>0.003</b>	<b>0.006</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.026</b>
<b>Fitasa*Hemicell</b>		0.510	0.140	0.384	0.285	0.946	0.947
<b>EEM</b>		0.610	-	0.044	-	0.086	-

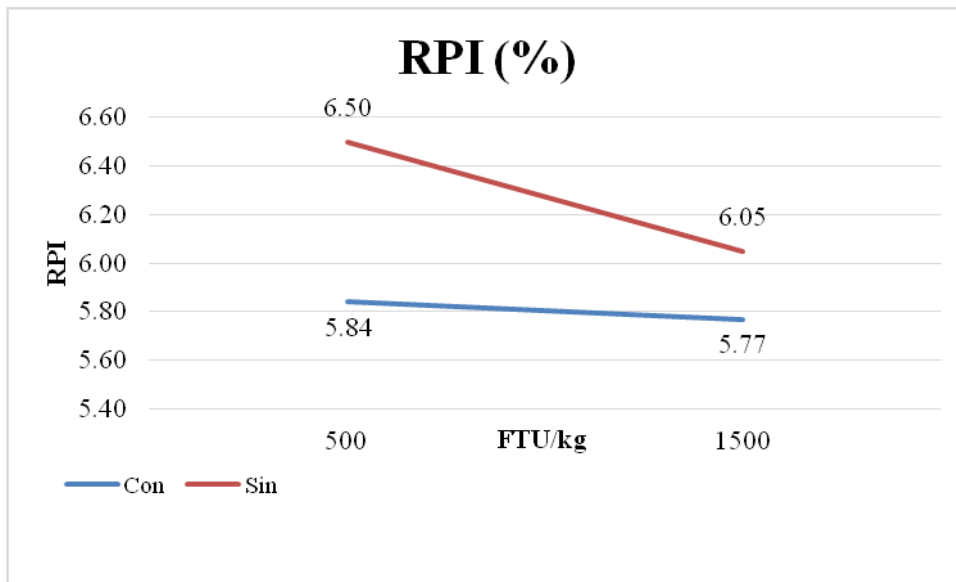
La ausencia de literales entre las medias de cada columna indica que no existen diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). PI= Peso de intestino, RPI= Relación Peso Intestino, PB= Peso bazo, RPB= Relación Peso Bazo, PBF= Peso bolsa de Fabricio, RPBF= Relación Peso Bolsa de Fabricio, EEM= Error estándar de la media



**Figura 7.** Efecto de Hemicell en la RPBF de los pollos a las tres semanas de edad.



**Figura 8.** Efecto de Hemicell en la RPB de los pollos a las tres semanas de edad.



**Figura 9.** Efecto de Hemicell en la RPI de los pollos a las tres semanas de edad.

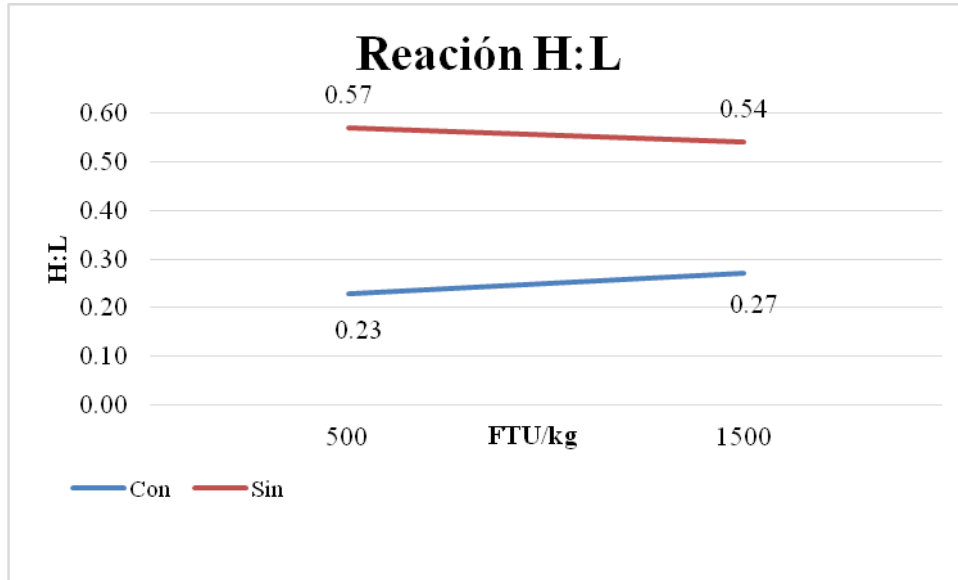
### 3.4 Relación Heterófilos Linfocitos (RHL)

Los resultados de la RHL se muestran en el **Cuadro 5**. No se observó efecto de interacción entre factores ( $p>0.05$ ). El perfil celular mostró diferencias significativas ( $p<0.05$ ) en heterófilos, linfocitos y RHL, las dietas con  $\beta$ -mananasas (Hemicell) tuvieron menor cantidad de heterófilos (2.67 vs 4.20), una mayor cantidad de linfocitos (10.66 vs 7.89) y la RHL se redujo un 55% (0.25 vs 0.56), se puede observar su efecto en la **Figura 10**. No se observó diferencia estadísticamente significativa en el perfil celular con el factor fitasas ( $p>0.05$ ). No se observó efecto a factor en las variables: Leucocitos, Eosinófilos, Basófilos y Monocitos (Datos no incluidos).

**Cuadro 5.** Análisis de células del sistema inmune por medio de un hemograma de los pollos de engorda alimentados con dietas sorgo + soya y adicionadas con fitasas y Hemicell, de 1-21 días de edad.

Fitasa (FTU/kg)	Hemicell	Heterófilos ( $\times 10^9/L$ )	Linfocitos ( $\times 10^9/L$ )	Relación H:L
<b>500</b>	<b>Con</b>	2.38	10.20	0.23
	<b>Sin</b>	4.65	8.58	0.57
<b>1500</b>	<b>Con</b>	2.95	11.11	0.27
	<b>Sin</b>	3.75	7.20	0.54
<b>Fitasa</b>	<b>500</b>	3.52	9.39	0.40
	<b>1500</b>	3.35	9.16	0.41
<b>Hemicell</b>	<b>Con</b>	2.67a	10.66a	0.25a
	<b>Sin</b>	4.20b	7.89b	0.56b
<b>P</b>				
<b>Fitasa</b>		0.117	0.277	0.724
<b>Hemicell</b>		<b>0.009</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
<b>Fitasa*Hemicell</b>		0.804	0.804	0.239
<b>EEM</b>		0.27	0.77	-

La ausencia de literales entre las medias de cada columna indica que no existen diferencias estadísticas significativas ( $p<0.05$ ). Relación H:L= Relación Heterófilos Linfocitos, EEM= Error estándar de la media



**Figura 10.** Efecto de Hemicell en la relación H:L de los pollos a las tres semanas de edad.

### 3.5 Estudio histológico

En el análisis histológico realizado en los cuatro tratamientos, la cantidad de infiltrado inflamatorio fue leve, otros cambios relevantes fueron la hiperplasia epitelial y de células caliciformes, así como la fusión de vellosidades la cual se presentó en grados variables en los diferentes tratamientos, sin presentar cambios relevantes entre tratamientos.

#### 3.5.1 Duodeno

Los resultados del análisis histológico en duodeno, se muestran en el **Cuadro 6**. Se observó efecto de interacción Fitasas x  $\beta$ -mananasas (Hemicell) en longitud de vellosidad (LV), profundidad de cripta (PC) y relación vellosidad cripta (VCR), ( $p < 0.05$ ).

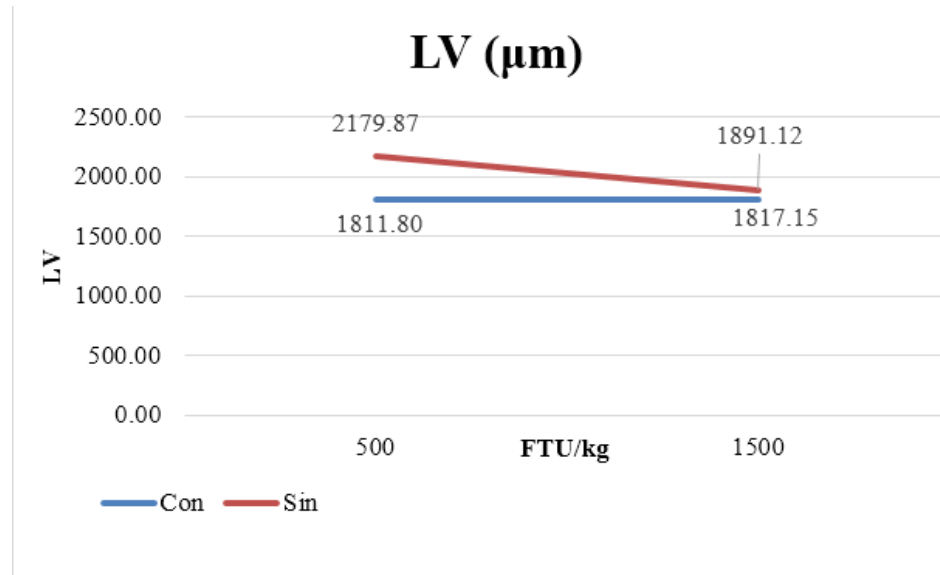
La interacción Hemicell (HT) x Fitasas (PHY) se observa en las **figuras 11, 12 y 13**. En la LV al día 21 de edad, se observa que en el T4, las vellosidades intestinales en dietas con HT aumentaron su longitud conforme se incrementó la dosis de fitasas ( $p<0.05$ ), en comparación con los demás resultados, la dosis recomendada por el fabricante utilizada en el T1, fue la que presentó mayor LV, se vio disminuida en el T3 con la adición de HT y en el T2 con la adición de una superdosis de PHY sin HT ( $p<0.05$ ). En la PC, se observó interacción entre  $\beta$ -mananasas y fitasas ( $p<0.05$ ), cuando se incrementó la dosis de fitasas en dietas con Hemicell® disminuyó la PC. No se observó efecto individual de Hemicell® y Fitasas para PC ( $p>0.05$ ). La VCR tuvo un efecto de interacción similar a la LV, ya que se calcula dividiendo la LV entre la PC, por lo que en dietas con  $\beta$ -mananasas la VCR aumentó conforme se añadió mayor cantidad de fitasas ( $p<0.05$ ). T3 y T2 se comportaron de la misma manera, con una menor VCR a comparación de T1 y T4 ( $p<0.05$ ).

**Cuadro 6.** Cambios histológicos en Duodeno de los pollos de engorda alimentados con dietas sorgo + soya y adicionadas con fitasas y Hemicell, de 1-21 días de edad

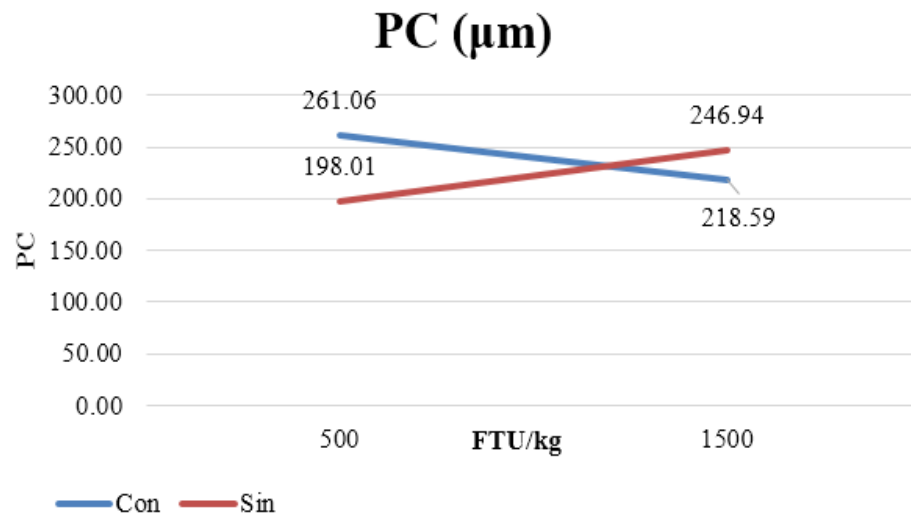
<b>Fitasa (FTU/kg)</b>	<b>Hemicell</b>	<b>LV</b>	<b>PC</b>	<b>VCR</b>
<b>500</b>	<b>Con</b>	1811.80b	261.06	6.99b
	<b>Sin</b>	2179.87a	198.01	11.17a
<b>1500</b>	<b>Con</b>	1817.15ab	218.59ab	8.39ab
	<b>Sin</b>	1891.12b	246.94	7.77b
<b>Fitasa</b>	<b>500</b>	1995.84a	229.54	9.08a
	<b>1500</b>	1854.14b	232.76	8.08b
<b>Hemicell</b>	<b>Con</b>	1814.48b	239.83	7.69b
	<b>Sin</b>	2035.49a	222.47	9.47a
<b>P</b>				
<b>Fitasa</b>		<b>0.001</b>	0.754	<b>0.049</b>
<b>Hemicell</b>		<b>0.001</b>	0.103	<b>0.005</b>
<b>Fitasa*Hemicell</b>		<b>0.002</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
<b>EEM</b>		23.012	7.191	-

La ausencia de literales entre las medias de cada columna indica que no existen diferencias estadísticas significativas ( $p<0.05$ ). LV= Longitud de Vellosidad, PC= Profundidad de la Cripta, VCR= Relación Vellosidad Cripta, EEM= Error estándar de la media

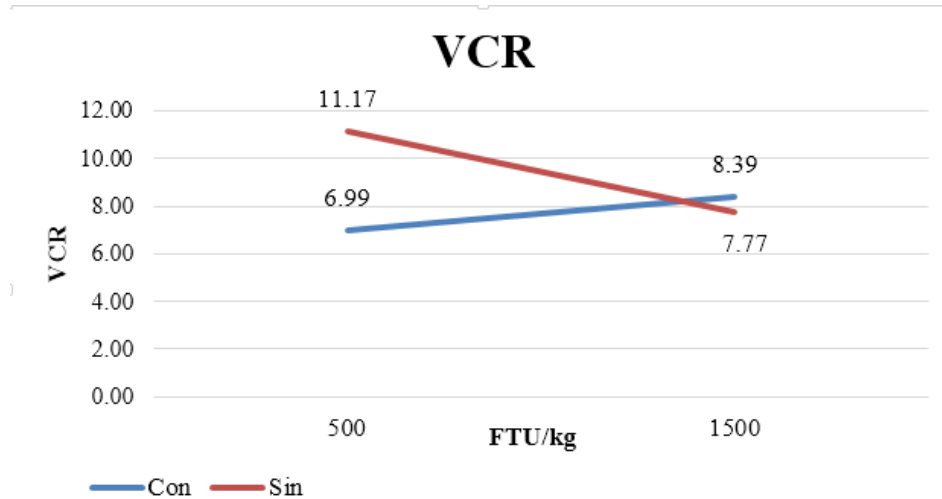




**Figura 11.** Interacción Fitasas x β-mananasas en la longitud de vellosidades, en duodeno al día 21 de edad.



**Figura 12.** Interacción Fitasas x β-mananasas en la profundidad de la cripta, en duodeno al día 21 de edad.



**Figura 13.** Íleon T4 Interacción Fitasas x  $\beta$ -mananasas en la relación vellosidad cripta, en duodeno al día 21 de edad.

### 3.5.2 Yeyuno e Íleon

Los resultados del análisis histológico en yeyuno e íleon, se muestran en el **Cuadro 7** y **Cuadro 8** respectivamente. No se observó diferencia estadística a favor en los factores de fitasas y Hemicell <sup>®</sup>, ni efecto de interacción en LV, PC y VCR en yeyuno e íleon ( $p>0.05$ ).

Los cortes histológicos de duodeno se pueden observar en la **Figura 11** (T1), **Figura 12** (T2), **Figura 13** (T3) y **Figura 14** (T4), los cortes histológicos de yeyuno se pueden observar en la **Figura 15** (T1), **Figura 19** (T2), **Figura 23** (T3) y **Figura 27** (T4) y los cortes histológicos de íleon se pueden observar en la **Figura 16** (T1), **Figura 19** (T2), **Figura 23** (T3) y **Figura 27** (T4).

**Cuadro 7.** Cambios histológicos en Yeyuno de los pollos de engorda alimentados con dietas sorgo + soya y adicionadas con fitasas y Hemicell, de 1-21 días de edad

<b>Fitasa (FTU/kg)</b>	<b>Hemicell</b>	<b>LV</b>	<b>PC</b>	<b>VCR</b>
<b>500</b>	<b>Con</b>	1426.45	220.84	6.48
	<b>Sin</b>	1371.97	215.77	6.40
<b>1500</b>	<b>Con</b>	1316.46	222.31	6.00
	<b>Sin</b>	1435.26	208.93	6.91
<b>Fitasa</b>	<b>500</b>	1399.21	218.31	6.44
	<b>1500</b>	1375.86	215.62	6.46
<b>Hemicell</b>	<b>Con</b>	1371.46	221.57	6.24
	<b>Sin</b>	1403.61	212.35	6.65
<b>P</b>				
<b>Fitasa</b>		0.586	0.731	0.961
<b>Hemicell</b>		0.455	0.244	0.223
<b>Fitasa*Hemicell</b>		0.064	0.594	0.142
<b>EEM</b>		29.84	5.432	-

La ausencia de literales entre las medias de cada columna indica que no existen diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). LV= Longitud de Velloidad, PC= Profundidad de la Cripta, VCR= Relación Velloidad:Cripta, EEM= Error estándar de la media

**Cuadro 8.** Cambios histológicos en Íleon de los pollos de engorda alimentados con dietas sorgo + soya y adicionadas con fitasas y Hemicell, de 1-21 días de edad

<b>Fitasa (FTU/kg)</b>	<b>Hemicell</b>	<b>LV</b>	<b>PC</b>	<b>VCR</b>
<b>500</b>	<b>Con</b>	897.29	191.01	4.73
	<b>Sin</b>	923.96	171.71	5.42
<b>1500</b>	<b>Con</b>	913.17	231.27	3.99
	<b>Sin</b>	987.18	210.46	4.71
<b>Fitasa</b>	<b>500</b>	910.62	181.35	5.07
	<b>1500</b>	950.18	220.86	4.34
<b>Hemicell</b>	<b>Con</b>	905.23	211.14	4.36
	<b>Sin</b>	955.57	191.08	5.06
<b>P</b>				
<b>Fitasa</b>		0.227	0.091	0.101
<b>Hemicell</b>		0.128	0.078	0.099
<b>Fitasa*Hemicell</b>		0.464	0.921	0.536
<b>EEM</b>		22.44	5.26	-

La ausencia de literales entre las medias de cada columna indica que no existen diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). LV= Longitud de Velloidad, PC= Profundidad de la Cripta, VCR= Relación Velloidad:Cripta, EEM= Error estándar de la media

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Peso y Ganancia diaria de peso (GDP)

La mejora en el peso y la ganancia diaria de peso por el factor  $\beta$ -mananasa (HT) se atribuye a que el uso de las enzimas en dietas sorgo-soya ocasiona una degradación de los  $\beta$ -mananos presentes en la estructura celular de la pasta de soya, la cual es un ingrediente altamente utilizado en la alimentación del pollo de engorda, son polisacáridos no amiláceos que actúan como factores antinutricionales y gracias a esta degradación se evita el efecto negativo que tienen; se reduce la viscosidad intestinal y aumenta la absorción de nutrientes, eliminan el gasto energético que sucede debido a la respuesta inmune inducida por el alimento (RIIA) y genera una mayor disponibilidad de energía como resultado de la ruptura de los compuestos. Estudios anteriores (Daskiran et al., 2004; Jackson et al., 2004; Zou et al., 2006; Martínez et al., 2007; Cho y Kim, 2013) coinciden con los resultados obtenidos, utilizando la dosis sugerida por el fabricante (400 g/ton – 0.04% en dieta); en estos estudios se observó una mejora en el crecimiento entre 3 al 7% dependiendo de la dieta de los animales. En el presente estudio se determinó una mejora del 8.9% en el peso y la GDP cuando se usó HT. Mehri et al. (2010) no observaron diferencias significativas en los parámetros productivos usando dosis de 0.05, 0.07 y 0.09%, sin embargo tuvo mejora en otras variables como el consumo de alimento, las variables inmunológicas y la morfología intestinal.

No se observó diferencia en estas variables con la adición de fitasas, esto coincide con algunos estudios (Karadas et al., 2010; Chung et al., 2013; Dos Santos et al., 2013) que determinaron que con la adición de superdosis de fitasas el único parámetro productivo que se veía afectado era el índice de conversión alimenticia (ICA). En otros estudios (Simons et al., 1990; Shirley y Edwards, 2003; Walk et al., 2014; Manobhavan et al., 2016) observaron un efecto en peso y GDP, asociado con la destrucción del fitato (IP6) y el consecuente aumento de absorción de nutrientes. Walk et al. (2014) asociaron la mejora en los parámetros productivos con el incremento de la concentración de mio-inositol en el tracto digestivo, derivado de la destrucción del IP6 y sus ésteres inferiores.

## **4.2 Índice de conversión alimenticia (ICA)**

En el factor Fitasas se observó efecto a favor en el ICA. Esto coincide con la mayoría de los estudios revisados (Simons et al., 1990; Shirley y Edwards, 2003; Karadas et al., 2010; Cowieson et al., 2011; Chung et al., 2013; Dos Santos et al., 2013; Walk et al., 2014). Conforme aumenta la dosis de fitasas mejora el ICA, la explicación de este resultado se debe a que una dosis convencional de fitasas (500 FTU/kg) es insuficiente para eliminar por completo los factores antinutricionales derivados del fitato (IP6), al degradarse el IP6 se generan ésteres menores, como el IP5, IP4 e IP3; los efectos de estos compuestos consisten en el secuestro de cationes como el zinc, calcio, magnesio, cobre y algunos aminoácidos, también ocasionan una disminución en la actividad de las enzimas proteolíticas como la tripsina y quimiotripsina por su acción quelante de moléculas como el zinc y otros minerales, que sirven como cofactores de estas enzimas.

Al usar una superdosis de fitasas, se logra una degradación del 90% de estos componentes de la dieta (Bedford y Walk, 2014), estudios recientes (Karadas et al., 2010; Walk et al., 2014) han determinado que una de las explicaciones ante este resultado es el aumento en la concentración de mio-inositol, resultante de la degradación total del IP6; el efecto que tiene este compuesto es lipotrópico, similar al de las vitaminas, que facilita el transporte de grasas y nutrientes liposolubles. A nivel sanguíneo el inositol se reincorpora al fósforo generando IP6, que funciona como un poderoso antioxidante al reducir la concentración de fitato en dieta lo que permite la acción adecuada de las enzimas proteolíticas del tracto digestivo y ahorra el gasto energético que se produce en el animal por la adaptación del proventrículo a la mala eficiencia de digestibilidad proteica.

En el factor  $\beta$ -mananasas (HT) se observó diferencia en el ICA, esto coincide con estudios anteriores (Daskiran et al., 2004; Jackson et al., 2004; Cho y Kim, 2013) donde además de mejorar la ganancia de peso, al utilizar  $\beta$ -mananasas en dietas para pollo de engorda puede mejorar el ICA. Jackson et al. (2004) reportaron una reducción de 0.067 g, lo que coincide con este estudio, en donde se observó una disminución de 0.07g al utilizar la dosis recomendada por el fabricante, esto se explica de la misma manera que en la ganancia de peso corporal, HT ocasionó una ruptura de moléculas que permitió un aprovechamiento mayor energético al igual que una mayor absorción nutricional debido a la reducción de factores antinutricionales en el intestino.

### 4.3 Consumo de alimento

No se observó efecto para ningún tratamiento; la presentación del alimento fue en harina, esto se debe a que a lo largo de décadas de investigación, se concluyó que una estrategia valiosa para reducir el número de casos de síndrome ascítico en pollo de engorda, además de la selección genética, fue reducir el consumo de alimento (Singh et al., 2011), por lo que un aumento en este parámetro no es necesariamente benéfico; se considera un efecto positivo obtener los mismos o mejores resultados en parámetros productivos con menor consumo de alimento, en el caso del factor fitasas esto coincide con estudios anteriores (Karadas et al., 2010; Chung et al., 2013; Dos Santos et al., 2013; Walk et al., 2014) en donde no se observó efecto en el consumo de alimento al utilizar dosis de 500 a 1500 FTU/kg. En otros estudios se observó aumento en el consumo de alimento (Simons et al., 1990; Shirley y Edwards, 2003; Manobhavan et al., 2016). Shirley y Edwards (2003) observaron un aumento cuadrático del dicho consumo en relación con el incremento de la dosis de fitasas hasta 12 000 FTU/kg en dietas deficientes en fósforo; este estudio fue fundamental para considerar evaluar nuevamente la cantidad recomendada de fitasas en la industria avícola. Manobhavan et al. (2016) observaron diferencia en el consumo de alimento usando dosis de 2500 FTU y 5000 FTU a las tres semanas de edad. Estos estudios sugieren que para observar un efecto en el consumo de alimento se deben utilizar dosis mayores de 2000 FTU/kg. Se ha visto en estudios anteriores que el uso de Hemicell® no tiene efecto en el consumo de alimento (Daskiran et al., 2004; Zou et al., 2006; Martínez et al., 2007; Mehri et al., 2010; Cho y Kim, 2013). Jackson et al. (2004) reportaron que no había efecto en el consumo de alimento a los 21 días, sin embargo se observó efecto a los 42 días, en ambos casos usando dieta en pellets.

De acuerdo al análisis del presente estudio y la literatura consultada, se concluyó que el efecto en el consumo de alimento usando las dos enzimas estuvo determinado por la presentación del mismo, en estudios en donde se utilizó alimento en pellets, se observó un aumento de este parámetro, mientras que en alimentos en presentación de harina no se observó un efecto significativo.

#### **4.4 Coeficiente de variación (CV)**

Se observó diferencia estadística significativa para las dietas que tenían  $\beta$ -mananasas, este factor es importante, debido a que una parvada con mayor uniformidad puede tener un manejo zootécnico adecuado de iluminación y nutrición principalmente (Zuidhof et al., 2014). En estudios anteriores se determinó que el uso de Hemicell® podía reducir entre 2.7 a 3% el CV (Anderson et al., 2001; Martínez et al., 2007), lo que coincide con el presente trabajo, en el que se determinó que con HT era significativamente menor en un 3.2% comparado con las dietas sin la enzima. Jackson et al. (2004) determinaron que no había cambios significativos en la uniformidad de los pollos utilizando las  $\beta$ -mananasas utilizando un desafío contra coccidias, sin coccidiostatos ni antibióticos promotores de crecimiento, a pesar de la presencia del microorganismo se observó una uniformidad elevada, por lo que se concluyó que Hemicell® favorecía la salud intestinal. No se observó significancia en el factor fitasas, en los estudios consultados no se tomó en cuenta esta variable para determinar el efecto de la enzima.



## 4.5 Estudios inmunológicos

Se observó diferencia en el factor Hemicell®, los pollos que en su dieta contenían  $\beta$ -mananasas tuvieron un título mayor de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle (ENC), mayor concentración de IgA secretora en intestino delgado y aumento en el peso y el índice morfométrico de órganos linfoides. No se encontraron estudios que hayan evaluado el efecto de Hemicell® en la concentración de IgA secretora en intestino delgado. Los resultados de este experimento se pueden explicar debido a que los  $\beta$ -mananos son degradados a mananooligosacáridos (MOS), el estudio de los MOS ha determinado que son inmunoestimulantes y pueden aumentar significativamente el nivel de anticuerpos maternos en pollos de engorda, esto debido a una estimulación de tejido linfoide asociado al intestino (GALT), que reconoce los MOS como PAMP. (Shashidhara y Devegowda, 2003). El incremento de IgA secretora se atribuye a la ocupación de receptores de manosa por parte de los MOS (Halas y Nochtá, 2012), liberados de la ruptura de los  $\beta$ -mananos. Además del incremento de IgA secretora, se observó un efecto positivo en la producción de anticuerpos, que es 0.75 puntos mayor a diferencia de las dietas sin Hemicell®. Hay dos posibles mecanismos de acción de los MOS en el sistema inmune: El primero es su unión con una colectina, que es una proteína que se une con manosas en el suero que funciona como un agente opsonizante. El segundo involucra el incremento en la producción de anticuerpos anti-mananos, dirigidos hacia los epítopes de oligosacáridos presentes en los microorganismos patógenos, los cuales podrían ingresar en la sangre estimulando así la respuesta inmune sistémica (Halas y Nochtá, 2012); este mecanismo explica el resultado de un incremento en la producción de inmunoglobulinas séricas y locales (IgA).

La determinación del índice morfométrico de órganos linfoides constituye una herramienta útil en determinar la respuesta inmune del ave (Perozo-Marín et al., 2004), en el presente estudio se determinó que el uso de  $\beta$ - mananasas en dietas aumentó el índice morfométrico de bazo y bolsa de Fabricio, un tamaño mayor del bazo y la bolsa de Fabricio puede estar correlacionado con una producción mayor de IgY (Zhang et al., 2006). El bazo es el principal órgano linfoide secundario y es de gran importancia en todas las respuestas inmunológicas, su tamaño está determinado por características genéticas y desafíos ambientales (Zhang et al., 2006). Zou et al., (2006) evaluaron estos parámetros inmunológicos con excepción de IgA secretora en intestino, los resultados entre ambos experimentos coincidieron en el efecto de las  $\beta$ -mananasas en las variables, se observó que usando Hemicell® aumentaba la concentración de IgM, sin cambios significativos en IgY e IgA en suero, cuando se usan dosis de 0.05 y 0.075%. El índice morfométrico de órganos linfoides también aumentó con el uso de  $\beta$ -mananasas en el bazo y la bolsa de Fabricio.

La pérdida de peso que acompaña a la atrofia y regresión de los órganos linfoides constituye un indicador muy sensible al estrés en las aves, dichos efectos son particularmente evidentes en animales jóvenes en los cuales el sistema inmunológico se encuentra en plena etapa de desarrollo y maduración (Sandoval et al., 2000). Se encontró un estudio en donde no se observó un efecto positivo en los parámetros inmunológicos utilizando Hemicell®, pero este fue en gallinas de postura (Zangeneh y Torki, 2011). Sin embargo, Zangiabadi y Torki (2010) observaron efecto de Hemicell en los anticuerpos determinados mediante IH para ENC, al presentar títulos mayores con respecto de las dietas sin la enzima.

Esto fue atribuido de la misma manera a la generación de MOS por la ruptura de los  $\beta$ -mananos. Los MOS actúan de manera benéfica en casi todas las variables zootécnicas, son dependientes del estado de salud del animal y de la dosis que se administre, la mayoría de estudios concluye que el beneficio del uso de MOS en la dieta de cerdos y aves es mayor cuando se tienen dietas con desafíos, contrario a cuando se manejan los experimentos en condiciones de elevada higiene; también se habla de una disminución de su efecto en parámetros zootécnicos mientras más cercano esté el ejemplar de su potencial genético (Halas y Nochta, 2012).

#### **4.6 Relación Heterófilos Linfocitos (RHL)**

En el factor HT, la RHL tuvo un 55% de reducción comparado con las dietas que no tenían la enzima, indicando una disminución de estrés; en los cuadros de estrés el recuento absoluto y relativo de los componentes de la serie blanca se altera significativamente, la RHL en la fase inicial del estrés en las aves, se observa con heterofilia y linfopenia, los incrementos se asocian a cuadros de estrés agudos e inmunosupresión (Sandoval et al., 2000). El resultado del presente trabajo coincide con el primer estudio en donde se reportó el efecto de Hemicell® sobre la RHL (Mehri et al., 2010), en donde se observó que a los 35 días de edad disminuía en un 38% al utilizar una proporción de 0.05 y 0.09% de  $\beta$ -mananasas en la dieta. Muhhamad et al. (2014) observaron efecto en RHL utilizando  $\beta$ -mananasas, no se especifica si se usó Hemicell® ni en qué dosis se administraron, pero se observó reducción de este parámetro en un 15% y se asoció al aumento de inmunidad en los pollos.

El incremento de linfocitos en sangre por efecto de los MOS se ha analizado más en cerdos, Davis et al. (2001) observaron un número mayor en linfocitos con la administración de MOS (1g/kg) en la dieta de cerdos, al igual que Nochta et al. (2009), esto lo atribuyeron a una respuesta indirecta a los cambios ocurridos en la respuesta inmune local del tracto gastrointestinal en cerdos, al utilizar dosis bajas, se menciona que dosis arriba de 1 g/kg no tuvieron efecto o tuvieron un efecto negativo, siendo animales monogástricos, podemos realizar una hipótesis de que el efecto que ocurre en los pollos es similar.

#### **4.7 Análisis Histológicos y Peso Relativo de Intestino**

No se encontraron estudios que utilizaran la combinación de ambas enzimas, la única interacción en el presente estudio se observó a nivel del duodeno, en donde el análisis estadístico determinó una interacción entre ambas enzimas al utilizar una superdosis de fitasas (1500 FTU/kg) y la dosis recomendada por el fabricante de  $\beta$ -mananasas (400 g/ton); en longitud de vellosidades (LV), profundidad de criptas (PC) y relación vellosidad cripta (VCR), los resultados expresaron que con estas dosis se obtenían mejores números aparentemente, que usando una dosis convencional de fitasas (500 FTU/kg) con Hemicell®. El efecto observado en los tratamientos fue que al incrementar la dosis de fitasas utilizando HT aumentaba la LV, disminuía PC y por ende incrementaba la VCR, lo que esto expresa hipotéticamente es una mayor capacidad digestiva.

Se ha determinado que el estudio de la morfología microscópica del intestino delgado y el cálculo de la VCR es una herramienta útil para deducir esta capacidad (Paiva et al., 2014; Montagne et al, 2003), la altura de la vellosidad se correlaciona positivamente con la ganancia de peso y el consumo de materia seca, debido a mayor capacidad de absorción por una gran cantidad de enterocitos maduros en los ápices de la vellosidad. La profundidad de la cripta está asociada con el intercambio celular, que puede ser en respuesta de la destrucción celular, inflamación y desprendimiento celular (Paiva et al., 2014), por lo tanto, incrementos en la altura de vellosidades y disminución en la profundidad de las criptas resultan en elevada VCR; una disminución en la VCR se considera como indicador de deterioro en la capacidad digestiva y viceversa (Montagne et al., 2003; Xu et al., 2003). Vellosidades más pequeñas indican menor superficie de absorción, debido a que las células que se pierden son enterocitos maduros. (Montagne et al, 2003), sin embargo, un mayor LV no necesariamente significa mayor cantidad de nutrientes absorbidos, debido a que el aumento en el LV puede deberse al mecanismo adaptativo del organismo para intentar obtener mayor cantidad de nutrientes a falta de estos, cuyo resultando en un gasto extra energético (Thompson y Applegate, 2006), por lo que este parámetro se debe correlacionar con las variables productivas. El efecto de interacción se observó en el T4, el cual presentó los mejores parámetros productivos e inmunológicos, por lo que se infiere que la combinación de superdosis de fitasas con  $\beta$ -mananasas tuvieron un efecto positivo a nivel intestinal al eliminar en su mayoría los factores antinutricionales de la dieta como el fitato y los  $\beta$ -mananos, lo que redujo la viscosidad intestinal permitiendo una mejor absorción, al liberar energía de la ruptura de estas moléculas, lo que favorece la microbiota residente por la ocupación de receptores de manosa e incrementa la cantidad de mio-inositol en sangre.

No se observó efecto en las porciones restantes de intestino delgado, la ausencia de efecto en yeyuno es significativa, debido a que este es el sitio en donde ocurre la mayor absorción de nutrientes (Thompson y Applegate, 2006), el íleon no es el sitio primario de absorción, por lo que no responde a la misma velocidad que el duodeno o el yeyuno ante el estímulo de la falta o sobra de nutrientes (Thompson y Applegate, 2006). Se observó que una dosis convencional de fitasas, sin HT resultaba en mayor LV y VCR a nivel de duodeno, el aumento de tamaño en las vellosidades y la profundidad de las criptas puede explicarse debido al reducido intercambio y migración celular, que resulta en la retención de células epiteliales (Thompson y Applegate, 2006); al comparar los resultados entre tratamientos, podemos observar, como se discutió anteriormente, que las dietas que contenían Hemicell® presentaron mejoría de parámetros productivos e inmunológicos, sin embargo este resultado no concuerda con los parámetros de LV, PC y VCR, ya que las dietas con  $\beta$ -mananasa presentaron un número menor comparado con las dietas sin la enzima. Los resultados que se obtuvieron con el uso de fitasas concuerdan con lo reportado por Wu et al. (2004), que observó que una dosis de 500-1000 FTU/kg tenía un incremento en vellosidades intestinales a comparación de una dieta sin fitasas; en el presente estudio no se utilizó una dieta sin fitasas, por lo que no se puede comparar apropiadamente este parámetro, sin embargo, Fernando et al. (2015) no observaron cambio aparente en la morfología intestinal utilizando dosis de 500 FTU/kg, pero asoció los beneficios del uso de fitasas observados en otros estudios debido a la reducción de factores antinutricionales y el aumento de biodisponibilidad de nutrientes, sin cambio aparente de morfología microscópica.

Emami et al. (2013) observaron que el uso de fitasas mejoraba la LV y la VCR en duodeno, yeyuno e íleon a los 28 días de edad, asociado a la alteración de la microbiota residente, también observaron mejora en la inmunidad cuando utilizaba fitasas a 500 FTU/kg en conjunto con ácidos orgánicos, esto difiere del presente estudio en el que no se encontró efecto de fitasas en respuesta inmune, sin embargo hizo falta una evaluación en respuesta inmune con una dieta testigo sin la enzima para evaluar de manera más acertada este efecto, la mejoría de parámetros inmunológicos en ese estudio fue asociada al aumento de disponibilidad de aminoácidos y minerales como Zn, Cu, Cr y Se, que son necesarios para una efectiva respuesta inmune (Klasing, 2007). Nourmohammadi et al. (2017) observaron efecto en la profundidad de criptas utilizando 1000 FTU/kg, sin cambios significativos en LV y VCR, asociado también a los cambios en el balance de la microbiota residente. Se observó efecto negativo de  $\beta$ -mananasas en la LV y VCR del duodeno de los pollos, los resultados fueron menores a comparación de las dietas que contenían solamente fitasas, este resultado no concuerda con lo reportado por Muhammad et al. (2015) y Mehri et al. (2012), quienes determinaron que el uso de  $\beta$ -mananasas tenía efecto en la LV, sin embargo, la dosis en la que se observó el efecto fue a 900 g/ton, más del doble de la usada en el presente estudio (400 g/ton), los resultados se correlacionaron con la mejora de parámetros productivos, debido al aumento de superficie de absorción y a la reducción de viscosidad e inflamación, que fue determinada mediante la medición del espesor de la lámina propia y el número de células de Goblet.

Ayoola et al. (2015) determinaron que el uso de  $\beta$ -mananasas aumentó la longitud de vellosidades, profundidad de criptas y redujo el espesor de la lámina propia a los 28 días, sin efecto a los 7 y 14 días, al usar la dosis recomendada por el fabricante y asocia el resultado con la alteración del sustrato en el tracto digestivo, que cambia la fermentación de la microbiota residente, este estudio fue realizado en pavos y exclusivamente midieron la morfología del yeyuno. La microbiota intestinal tiene una función fundamental en el intestino de los pollos, si no se proporcionan los nutrientes adecuados puede ser tanto benéfica como perjudicial, esto se debe a que las bacterias del tracto gastrointestinal consumen energía de los nutrientes que pudiera aprovechar el ave, sin embargo, si proporcionamos ingredientes que no son digeribles por el animal y que las bacterias utilicen exclusivamente, por ejemplo: oligosacáridos como los fructooligosacáridos (FOS) y MOS, entre otros. La ruptura de esas moléculas puede significar un mayor aprovechamiento de energía para el animal, lo que permitiría utilizar la energía de la dieta además de la que generan los microorganismos (Lan et al., 2005). Como se mencionó anteriormente, las  $\beta$ -mananasas rompen los  $\beta$ -mananos en moléculas más pequeñas (MOS), que además de ser inmunoestimulantes, también son carbohidratos fermentables, la cantidad de carbohidratos fermentables tiene un efecto trófico en vellosidades intestinales (Montagne et al., 2003) porque aceleran la proliferación del epitelio intestinal ya que los ácidos grasos de cadena corta, resultantes de la fermentación de los carbohidratos mediante la microbiota intestinal, incrementan la producción del péptido similar al glucagon del plasma (GLP-2 por sus siglas en inglés), y del mRNA pro-glucagon que aumenta la expresión del transportador de glucosa (GLUT2) y la expresión de proteínas (Lan et al., 2005).



Recientemente se ha determinado que los MOS no tienen un funcionamiento típico de un prebiótico, que por definición es un ingrediente de la dieta que no es digerible y estimula el crecimiento y/o actividad de bacterias benéficas en el tracto digestivo, y promueven la salud general e intestinal. (Gibson et al., 1995); el funcionamiento que se ha observado de los MOS no es solamente su utilización por parte de la microbiota normal a diferencia de los FOS, sino la saturación de receptores de manosa que ocuparían diversos patógenos a nivel de tracto digestivo (Halas y Nochta, 2012), este efecto favorece el desarrollo de microbiota normal de manera indirecta como *Bifidobacterium* sp. y *Enterobacter* sp., las cuales pueden producir ácidos grasos de cadena corta y reducir el pH del tracto digestivo, lo que en conjunto incrementa la VCR por aumento de la digestibilidad proteica (Iji et al., 2001). El incremento de soluciones viscosas en el intestino está asociado con el desprendimiento celular epitelial de las vellosidades, lo que genera un mayor intercambio celular en las criptas por aumentar la profundidad de las mismas y disminuir el largo de la vellosidad. (Montagne et al., 2003). Los resultados obtenidos en este estudio no concuerdan con la anterior explicación, ya que no hubo aumento en la LV ni disminución en PC por efecto de las  $\beta$ -mananasas, la profundidad de criptas fue mayor en los pollos con HT, es posible como se mencionó anteriormente, que al alcanzar el máximo potencial genético no se observa un efecto positivo por parte de los MOS, en este estudio se concluyó que los pollos con  $\beta$ -mananasas y fitasas alcanzaron su máximo potencial genético, en comparación con los parámetros productivos expresados en el manual de Ross 308® (AVIAGEN 2017), se observó que el peso a las tres semanas de edad de un pollo de engorda Ross 308® es de 951 g, comparado con las dietas con Hemicell®:

T3= 927.68 y T4= 953.80, por lo que el organismo no tuvo la necesidad de modificar la morfología intestinal para obtener la mayor cantidad de nutrientes, ya que tuvo cambios mayores a nivel de contenido intestinal y metabólico que no fueron determinados en este experimento.

Los resultados del experimento mostraron diferencias en el peso del intestino y en la RPI, en dietas con HT se observó un peso mayor de intestino y una menor RPI, no se encontraron estudios que tomaran en cuenta estos parámetros con el uso de  $\beta$ -mananasas, se menciona que el peso del intestino no está relacionado con la digestibilidad de nutrientes, será mayor, mientras mayor sea el peso corporal. (Yang et al., 2013).

En el factor fitasas no se observó diferencia estadística significativa en peso y RPI, este resultado no coincide con lo reportado por Wu et al., (2004), que determinaron que 500 FTU/kg disminuyó 11.4% la RPI, lo cual fue asociado con la reducción de viscosidad en el intestino por disminución de la cantidad de fitato en la dieta, no se pudo observar un efecto específico en este parámetro por parte de las fitasas, ya que no hubo una dieta testigo sin la enzima, sin embargo no se observó diferencia entre una dosis convencional y una Superdosis. Utilizando estos datos podemos explicar que al disminuir la viscosidad en el lumen intestinal, ocasionada por los  $\beta$ -mananos, hubo una reducción de la RPI. Por otro lado, al comparar los resultados del análisis histológico con la RPI, podemos correlacionar una mayor RPI en dietas con fitasas y sin HT, no por una mayor viscosidad intestinal, sino por vellosidades más largas, esto se explica debido a que al aumentar la proliferación epitelial, también aumenta el peso relativo del intestino (Lan et al., 2005).

## 5. CONCLUSIONES

Con la información obtenida en este trabajo se puede concluir:

### **Parámetros Productivos**

1: Los pollos tratados con Hemicell® presentaron mejora en los parámetros productivos (peso, ganancia diaria de peso e índice de conversión alimenticia), tuvieron una mayor uniformidad en los pesos a los 21 días, determinada mediante el coeficiente de variación y disminuyeron el peso relativo del intestino.

2: Los pollos con Superdosis de fitasas mejoraron el índice de conversión alimenticia, sin ocasionar un efecto en los otros parámetros productivos

### **Inmunidad**

1: Los pollos tratados con Hemicell® recibieron estímulo del sistema inmune; incrementaron los niveles de inmunoglobulinas en suero, IgA secretora intestinal, el índice morfométrico de órganos linfoides y redujeron la relación Heterófilos:Linfocitos.

2: El uso de dosis mayores de fitasas no tuvo efecto en el sistema inmune.

### **Histología**

1: Existe un efecto de interacción entre fitasas y  $\beta$ -mananasas a nivel del duodeno, cuando la dieta contenía Hemicell®; aumentó la longitud de vellosidades intestinales y disminuyó la profundidad de las criptas conforme se incrementó la dosis de fitasas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D., McNaughton, J. L., Hsiao, H. Y. and Fodge, D. W. (2001) 'Improvement of Body Weight Uniformity in Broilers, Turkeys, Ducks and Pigs by use of the *Bacillus lentus mannanase* (Hemicell®).' *International Poultry Scientific Forum*.
- AVIAGEN (2017) *Ross 308–Broiler Performance Objectives*. Huntsville: Aviagen Group.
- Ayoola, A. A., Malheiros, R. D., Grimes, J. L., Ferket, P. R. (2015) 'Effect of Dietary Exogenous Enzyme Supplementation on Enteric Mucosal Morphological Development and Adherent Mucin Thickness in Turkeys.' *Frontiers in Veterinary Science*, 2(October) pp. 1–8.
- Bedford, M. (2014) 'Beneficios de suministrar fitasa en grandes dosis.' *AB Vista* pp. 37–41.
- Bedford, M. and Walk, C. L. (2014) *Optimising superdosing of phytase in poultry*. [En línea] [Consultado el 25 de Octubre del 2016] <http://www.wattagnet.com/articles/20312-optimising-superdosing-of-phytase-in-poultry>.
- Campbell, T. A. (1995) *Avian Hematology*. Press/Ames (ed.). 2nd ed., Iowa State University.
- Cho, J. H., Kim, I. H. (2013) 'Effects of beta-mannanase supplementation in combination with low and high energy dense diets for growing and finishing broilers.' *Livestock Science*. Elsevier, 154(1–3) pp. 137–143.
- Chung, T. K., Rutherford, S. M., Thomas, D. V., Moughan, P. J. (2013) 'Effect of two microbial phytases on mineral availability and retention and bone mineral density in low-phosphorus diets for broilers.' *British poultry science*, 54(3) pp. 362–73.
- Cowieson, A. J., Ravindran, V., Selle, P. H. (2008) 'Influence of Dietary Phytic Acid and Source of Microbial Phytase on Ileal Endogenous Amino Acid Flows in Broiler Chickens.' *Poultry Science*, 87 pp. 2287–2299.
- Cowieson, a. J., Wilcock, P., Bedford, M. R. (2011) 'Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics.' *World's Poultry Science Journal*, 67(2) pp. 225–236.
- Cowieson, a J., Acamovic, T., Bedford, M. R. (2004) 'The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens.' *British poultry science*, 45(1) pp. 101–108.
- Cuca, M. G., Ávila, E., Pro, A. (2008) *Alimentación de las aves*. 8va ed., Estado de México, México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Czifra, G., Meszaros, J., Horvath, E., Moving, V., Engstrom, B. E. (1998) 'Detection of NDV-specific antibodies and the level of protection provided by a single vaccination in young chickens.' *Avian pathology*, 27(6) pp. 562–565.
- Daniel, W. W. (2010) *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Limusa Wiley (ed.). 4a ed, México.
- Daskiran, M., Teeter, R. G., Fodge, D., Hsiao, H. Y. (2004) 'An evaluation of endo- -D-mannanase (Hemicell) effects on broiler performance and energy use in diets varying in -mannan content.' *Poultry Science*, 83(4) pp. 662–668.
- Davis, M. E., Maxwell, C. V, Erf, G. F., Brown, D. C., Wistuba, T. J. (2001) 'Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs 1' pp. 1882–1891.

- Dhawan, S., Kaur, J. (2007) 'Microbial mannanases: an overview of production and applications.' *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(4) pp. 197–216.
- Didierlaurent, A., Simonet, M., Sirard, J.-C. (2005) 'Innate and acquired plasticity of the intestinal immune system.' *Cellular and Molecular Life Sciences*, (62) pp. 1285–1287.
- East, L. (2002) 'The mannose receptor family.' *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1572(2–3) pp. 364–386.
- Emami, N. K., Naeini, S. Z., Ruiz-feria, C. A. (2013) 'Growth performance , digestibility , immune response and intestinal morphology of male broilers fed phosphorus deficient diets supplemented with microbial phytase and organic acids.' *Livestock Science*. Elsevier, 157(2–3) pp. 506–513.
- Engelen, A. J., Van Der Heeft, F. C., Ransdorp, P. H. G., Smith, E. L. C. (1994) 'Simple and rapid determination of phytase activity.' *AOAC, Int*(77) pp. 760–764.
- Esteve-Garcia, E., Perez-Vendrell, A. M., Broz, J. (2005) 'Phosphorus equivalence of a Consensus phytase produced by *Hansenula polymorpha* in diets for young turkeys.' *Archives of animal nutrition*, 59(1) pp. 53–59.
- Fernando, V., Roll, B., Gonçalves, I. E. (2015) 'Phytate-phosphorus and phytase contents on the relative weight of organs , intestinal morphometry and performance of broilers.'
- Gazi, U., Martinez-Pomares, L. (2009) 'Influence of the mannose receptor in host immune responses.' *Immunobiology*. Elsevier, 214(7) pp. 554–561.
- Gibson, G. L. E. Y. R., Roberfroid, M. B., Louvain, C. De (1995) 'Critical Review Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics,' (Agosto 1994).
- Gómez, V. G. G. (2009) *Modulación nutricional de la inmunidad en pollo de engorda mediante el empleo de un estimulante (paredes de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*)*. [Tesis de Doctorado] Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gordon, S. (2002) 'Pattern recognition receptors: Doubling up for the innate immune response.' *Cell*, 111(7) pp. 927–930.
- Gupta, R. K., Gangoliya, S. S., Singh, N. K. (2013) 'Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains.' *Journal of Food Science and Technology*, 52(2) pp. 676–684.
- Halas, V., Nochta, I. (2012) 'Mannan Oligosaccharides in Nursery Pig Nutrition and Their Potential Mode of Action' pp. 261–274.
- Hoer, J. (2001) 'Intestinal integrity and the impact of losing it.' *World Poultry Elsevier*, 17(7) pp. 16–18.
- Houston, A., McNamara, J., Barta, Z., Klasing, K. (2007) 'The effect of energy reserves and food availability on optimal immune defence.' *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*, 274(1627) pp. 2835–2842.
- Hsiao, H.-Y., Anderson, D. M., Dale, N. M. (2006) 'Levels of -Mannan in Soybean Meal.' *Poultry Science*, 85(8) pp. 1430–1432.
- Humphrey, B., Humphrey, B. D., Koutsos, E. A., Klasing, K. C. (1993) 'Requirements and priorities of the immune system for nutrients' pp. 1–10.
- Ibrahim, S. A. M., Jacob, J. I. and Blair, R. (1999) 'Phytase Supplementatign To Reduce Phosphorus Excretion of Broilers.' *Poultry science*, 8(4) pp. 414–425.

- Igbasan, F. a, Männer, K., Miksch, G., Borriss, R., Farouk, A., Simon, O. (2000) 'Comparative Studies on the in Vitro Properties of Phytases From Various Microbial Origins.' *Archives of animal nutrition*, 53(September) pp. 353–373.
- Iji, P. A., Saki, A. A., Tivey, D. R. (2001) 'Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide,' 1192(March) pp. 1186–1192.
- INEGI. Cuaderno Estadístico Delegacional, Tláhuac, Ciudad de México. CDMX: Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2016: 3, 12.
- Jackson, M. E., Anderson, D. M., Hsiao, H. Y., Mathis, G. F., Fodge, D. W. (2003) 'Beneficial effect of beta-mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimerla* sp. and *Clostridium perfringens*.' *Avian Dis*, 47(3) pp. 759–763.
- Jackson, M. E., Geronian, K., Knox, a, McNab, J., McCartney, E. (2004) 'A dose-response study with the feed enzyme beta-mannanase in broilers provided with corn-soybean meal based diets in the absence of antibiotic growth promoters.' *Poultry science*, 83 pp. 1992–1996.
- Karadas, F., Pirgozliev, V., Pappas, A. C., Acamovic, T., Bedford, M. R. (2010) 'Effects of different dietary phytase activities on the concentration of antioxidants in the liver of growing broilers.' *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(4) pp. 519–526.
- Klasing, K. C. (2007) 'Nutrition and the immune system.' *British poultry science*, 48(5) pp. 525–537.
- Koutsos, E. A., Arias, V. J., Obispo, S. L. (2006) 'Intestinal Ecology : Interactions Among the Gastrointestinal Tract , Nutrition , and the Microflora.'
- Kuehl, R. O. (2001) *Diseños de Experimentos*. 2a edición, México: Thomson Learning.
- Lan, Y., Verstegen, M. W. A., Tamminga, S., Williams, B. A. (2005) 'The role of the commensal gut microbial.' *Poul Sci*, 61 pp. 95–104.
- Lee, J. T., Bailey, C., Cartwright, a L. (2003) 'beta-Mannanase ameliorates viscosity-associated depression of growth in broiler chickens fed guar germ and hull fractions.' *Poultry science*, 82 pp. 1925–1931.
- Manobhavan, M., Elangovan, A. V., Sridhar, M., Shet, D., Ajith, S., Pal, D. T., Gowda, N. K. S. (2016) 'Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility and bone characteristics in broilers fed corn-soya-based diets.' *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(1) pp. 93–100.
- Martínez, M. A., Christophe, B., Poulsen, K. (2007) 'El Uso de  $\beta$  -mananasa para Controlar el Impacto de la Respuesta Inmunitaria Inducida por Alimentos ( RIIA ) y sus Implicaciones en la Avicultura Comercial.'
- Mehri, M., Adibmoradi, M., Samie, A., Shivazad, M. (2010) 'Effects of beta-Mannanase on broiler performance, gut morphology and immune system.' *African Journal of Biotechnology*, 9(37) pp. 6221–6228.
- Montagne, L., Pluske, J. R., Hampson, D. J. (2003) 'A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals.' *Animal Feed Science and Technology*, 108(1–4) pp. 95–117.
- Muhammad, S., Fawwad, A., Mansoor, J., Shahbaz, A. (2015) 'Effect of  $\beta$  -Mannanase on Broiler's Performance.' *Scholarly Journal of Agricultural Science*, 5(7) pp. 237–246.

- Muhhamad, I., Talat, N. P., Muhammad, A. (2014) 'Effect of  $\beta$ -Mannanase on Broilers Performance at Different Dietary Energy Levels.' *Global Veterinaria*, 12(5) pp. 622–626.
- Nitsan Z, Ben-Avraham, Z. Z., N. I. (1991) 'Growth and development of digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching.' *Br Poultry Sci*, 32 pp. 515–523.
- Nochta, I., Tuboly, T., Halas, V., Babinszky, L. (2009) 'Effect of different levels of mannan-oligosaccharide supplementation on some immunological variables in weaned piglets,' 93 pp. 496–504.
- Nourmohammadi, R., Afzali, N., Nourmohammadi, R., Afzali, N. (2017) 'Effect of Citric Acid and Microbial Phytase on Small Intestinal Morphology in Broiler Chicken Effect of citric acid and microbial phytase on small intestinal morphology in broiler chicken,' (January).
- Nunes, C. S., MalmLöf, K. (1992) 'Effects of guar gum and cellulose on glucose absorption, hormonal release and hepatic metabolism in the pig.' *The British journal of nutrition*, 68(1992) pp. 693–700.
- Onyango, E. M., Bedford, M. R., Adeola, O. (2005) 'Efficacy of an evolved Escherichia coli phytase in diets of broiler chicks.' *Poultry science*, 84(2) pp. 248–255.
- Paiva, D., Walk, C., McElroy, A. (2014) 'Dietary calcium, phosphorus, and phytase effects on bird performance, intestinal morphology, mineral digestibility, and bone ash during a natural necrotic enteritis episode.' *Poultry Science*, 93(11) pp. 2752–2762.
- Patel, M. B., McGinnis, J. (1985) 'The effect of autoclaving and enzyme supplementation of guar meal on the performance of chicks and laying hens.' *Poultry science*, 64(6) pp. 1148–1156.
- Perozo-Marín, F., Nava, J., Mavárez, Y., Arenas, E., Serje, P. (2004) 'Morphometric Characterization of Ross Line Broiler Chickens Lymphoid.' *Revista Científica FCV-LUZ*, XIV pp. 217–225.
- Prophet, E., Mills, B., Arrington, J., Sobón, L. (1995) *Métodos histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, Washington DC, Registro de Patología de los estados Unidos de América (ARP) e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 1995:55-57.
- Quintana, J. A. (2013) *Avitecnia: Manejo de las aves domésticas más comunes*. Trillas (ed.). 4a ed., México.
- Ruíz, B. (2016) *El porqué de las enzimas en la salud intestinal*. [En línea] [Consultado el 16 de Junio del 2016] Disponible en: [http://www.wattagnet.com/articles/27087?utm\\_source=KnowledgeMarketing&utm\\_medium=Enewsletter Groups&utm\\_term=El porqué de las enzimas en la salud intestinal&utm\\_content=16\\_06\\_16\\_ABL&utm\\_campaign=Aves y Balanceados Latinoamerica&eid=213558427&bid=1435781#](http://www.wattagnet.com/articles/27087?utm_source=KnowledgeMarketing&utm_medium=Enewsletter%20Groups&utm_term=El%20porqu%C3%A9%20de%20las%20enzimas%20en%20la%20salud%20intestinal&utm_content=16_06_16_ABL&utm_campaign=Aves%20y%20Balanceados%20Latinoamerica&eid=213558427&bid=1435781#).
- Sandoval, G. L., Zbinden, C., Revidatti, J. C., Fernández, F., Ricardo, J. *Relación heterófilo/linfocito e índice morfométrico bursal como indicadores de estrés crónico en pollos parrilleros*. [En línea] [Consultado el 20 de Junio del 2016] Unne. Argentina. 2002. Disponible en: <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2002/04-Veterinarias/V-044.pdf> Accesado en: 20/09/2010. Depto, B., Básicas, C., Granja, C. y Producción, D. (2000).

- Dos Santos, T. T., Srinongkote, S., Bedford, M. R., Walk, C. L. (2013) 'Effect of high phytase inclusion rates on performance of broilers fed diets not severely limited in available phosphorus.' *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(2) pp. 227–232.
- Selle, P. H., Ravindran, V. (2007) 'Microbial phytase in poultry nutrition.' *Animal Feed Science and Technology*, 135(1–2) pp. 1–41.
- Shashidhara, R. G., Devegowda, G. (2003) 'Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity.' *Poultry science*, 82(8) pp. 1319–25.
- Shirley, R. B., Edwards, H. M. (2003) 'Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance.' *Poultry science*, 82(4) pp. 671–680.
- Simons, P. C., Versteegh, H. a, Jongbloed, a W., Kemme, P. a, Slump, P., Bos, K. D., Wolters, M. G., Beudeker, R. F., Verschoor, G. J. (1990) 'Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs.' *The British journal of nutrition*, 64(2) pp. 525–540.
- Singh, P. K., Shekhar, P., Kumar, K. (2011) 'Nutritional and managemental control of ascites syndrome in poultry,' 2(August) pp. 117–123.
- Sundu, B., Kumar, A. and Dingle, J. (2006) 'Response of broiler chicks fed increasing levels of copra meal and enzymes.' *International Journal of Poultry Science*, 5(1) pp. 13–18.
- Thayer, S. G., Beard, C. W. (1998) *Serologic procedures. In: Swayne, D.E, Ed., A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens.* American Association of Avian Pathologists (ed.). 4th Editio, Philadelphia.
- Thompson, K. L., Applegate, T. J. (2006) 'Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers.' *Poultry science*, 85(9) pp. 1535–1540.
- UNA (2016) *Unión Nacional de Avicultores*. [En línea] [Consultado el 7 de Junio del 2016] Disponible desde: <http://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos>.
- Vaintraub, I. a., Bulmaga, V. P. (1991) 'Effect of phytate on the in vitro activity of digestive proteinases.' *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(5) pp. 859–861.
- Valdivia (2008) *Toma, Conservación y Envío de Muestras para el Laboratorio Clínico Veterinario*. Primera ed, México.
- Walk, C. L., Santos, T. T., Bedford, M. R. (2014) 'Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers.' *Poultry science*, 93(5) pp. 1172–7.
- Wu, Y. B., V, R., Thomas, D. G. (2004) 'Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus.' *British Poultry Science*, 45(1) pp. 76–84.
- Xu, Z. R., Hu, C. H., Xia, M. S., Zhan, X. A., Wang, M. Q. (2003) 'Effects of Dietary Fructooligosaccharide on Digestive Enzyme Activities , Intestinal Microflora and Morphology of Male Broilers' pp. 1030–1036.
- Yang, H. M., Wang, W., Wang, Z. Y., Wang, J., Cao, Y. J., Chen, Y. H. (2013) 'Comparative study of intestine length , weight and digestibility on different body weight chickens,' 12(32) pp. 5097–5100.



- Zangeneh, S., Torki, M. (2011) 'Effects of B -Mannanase Supplementing of Olive Pulp-Included Diet on Performance of Laying Hens , Egg Quality Characteristics , Humoral and Cellular Immune Response and Blood Parameters,' 7(4) pp. 391–398.
- Zangiabadi, H., Torki, M. (2010) 'The effect of a  $\beta$  -mannanase-based enzyme on growth performance and humoral immune response of broiler chickens fed diets containing graded levels of whole dates' pp. 1209–1217.
- Zhang, H. M., Hunt, H. D., Kulkarni, G. B., Palmquist, D. E., Bacon, L. D. (2006) 'Lymphoid organ size varies among inbred lines 6(3) and 7(2) and their thirteen recombinant congenic strains of chickens with the same major histocompatibility complex.' *Poultry science*, 85(5) pp. 844–53.
- Zou, X. T., Qiao, X. J., Xu, Z. R. (2006) 'Effect of beta-mannanase (Hemicell) on growth performance and immunity of broilers.' *Poultry science*, 85 pp. 2176–2179.
- Zuidhof, M. J., Holm, D. E., Renema, R. A., Jalal, M. A., Robinson, F. E. (2014) 'Effects of broiler breeder management on pullet body weight and carcass uniformity.'

## 7. ANEXOS

### 7.1 Anexo 1

#### **Inhibición de la hemoaglutinación**

En una microplaca fondo en “U” o “V” se colocan 25µl de PBS en cada uno de los 96 pozos. Se transfieren 25 µl de la dilución 1:5 de cada muestra a analizar a la columnas 1 de la microplaca. Todos los sueros se trabajaran en orden secuencial. Los sueros control positivo y control negativo se procesan de la misma manera. Se realizan diluciones dobles seriadas transfiriendo 25 µl de la columnal hasta a la columna 3 para obtener las diluciones 1:10, 1:20 y 1:40. Posteriormente se agregan 25 µl de antígeno de ENC conteniendo 4 unidades hemoaglutinantes a cada pozo, se realizará una segunda titulación del antígeno a partir de la suspensión de antígeno que se empleó en la prueba, para confirmar que contiene las 4 UH requeridas (control de antígeno). Tapar la microplaca y agitar por unos segundos, e incubar a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos. Se adiciona 50 µl de una suspensión de glóbulos rojos al 0.5%, se agita nuevamente y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realiza la lectura cuando el control de glóbulos rojos haya formado un botón bien delimitado en el fondo del pozo. Interpretación de resultados Para validar esta prueba el control de antígeno debe presentar las 4 UH, el control de suero negativo no debe presentar un título de inhibición de la hemoaglutinación mayor a 1:4 y el suero control positivo presentará un título con una diferencia no mayor a una dilución del título previamente establecido. Los títulos de los sueros se determinarán tomando como referencia la dilución más alta del suero donde se observe al 100% de inhibición hemoaglutinante. Se considerará como positivo todos aquellos sueros que muestren una inhibición franca en la dilución 1:10.

## 7.2 Anexo 2

### ELISA

Las placas de 96 pozos (Nunc, Fisher Scientific Rochester Site, US) de fondo plano, se cubrieron con IgA (Chicken IgA ELISA Quantification Kit Bethl Laboratories Inc PO Box 850 Montgomery TX 77356) de pollo previamente reconstituida en buffer de carbonatos (0.05M pH 9.6) toda la noche a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS adicionado de Tween-20 al 0.05%, se añadió solución de bloqueo PBS-leche descremada al 0.5%, Sacarosa 0.2%, se lavaron y se depositaron las muestras de los lavados intestinales y se incubaron 1 h a 37°C. Posteriormente se retiraron las muestras y las placas se lavaron cinco veces con PBS Tween 20 al 0.05%. Se añadió el conjugado HRP (goat anti-chicken IgA-HRP, Bethyl Laboratories Inc PO Box Montgomery TX 77356) incubándose 1 h a 37°C, nuevamente se realizaron cinco lavados con PBS Tween 20 al 0.05%, posteriormente se añadió el sustrato ABTS y se incubó durante 20 minutos a 37°C, la reacción se detuvo con la adición de solución de paro ( $H_2SO_4$  2M) y se realizó la lectura de absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA Biotek® EL X800.

### **7.3 Anexo 3**

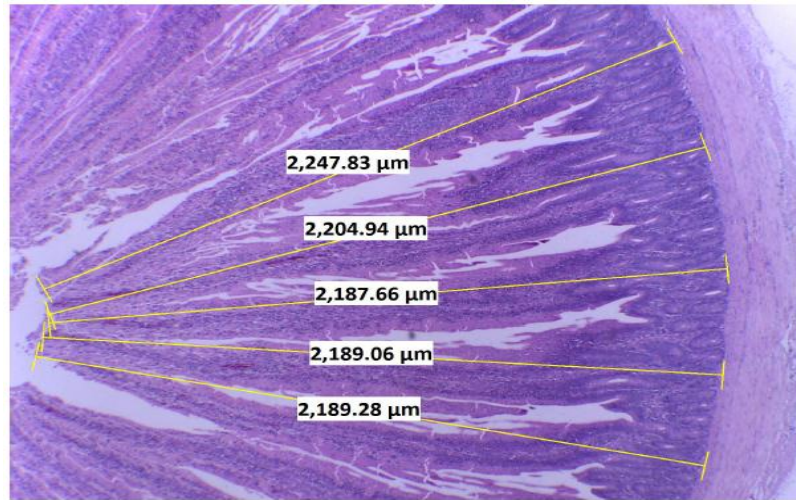
#### **Análisis Histológico**

Cada muestra fue cortada longitudinalmente por la luz del órgano para exponer la mucosa. Una vez realizado el corte los órganos se colocaron en tarjetas de cartón, con la túnica serosa del intestino en contacto con la tarjeta y, por lo tanto, la túnica mucosa libre para mayor superficie de contacto con el formol, mejor fijación del órgano y preservar la integridad de las vellosidades intestinales. Posterior al montaje, la tarjeta se introdujo en frascos con formalina amortiguada al 10% para su fijación, procesamiento y corte

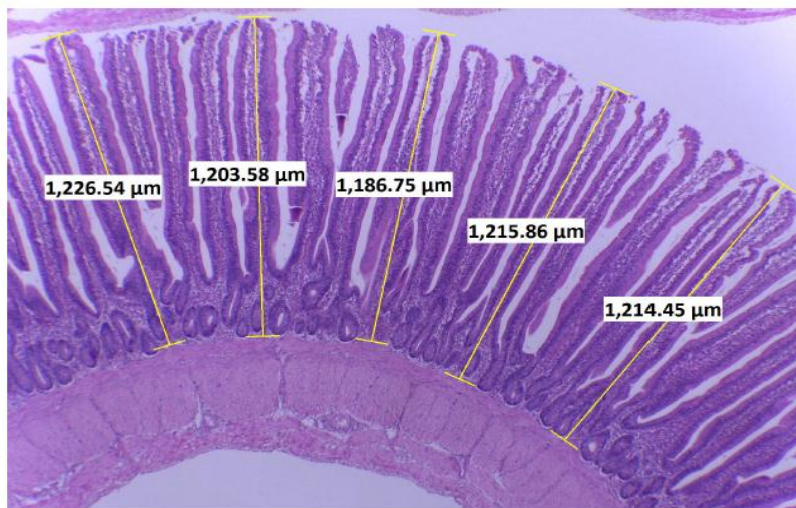
Se realizó un corte transversal de los segmentos de intestino obtenidos. Las muestras se procesaron según el método convencional de inclusión en parafina posteriormente estos cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Se obtuvo en promedio 30 vellosidades y 30 criptas por tratamiento; se midió el largo de las vellosidades, profundidad de criptas, se calculó la relación vellosidad:cripta dividiendo el largo de la vellosidad entre la profundidad de la cripta y se realizó el análisis microscópico de cambios histológicos e infiltración de células del sistema inmune, todo se seleccionó de manera aleatoria.

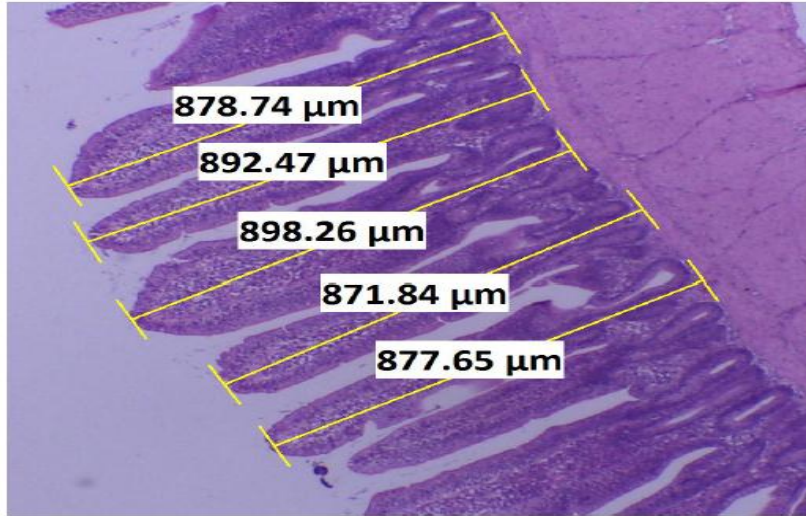
## 8. FIGURAS



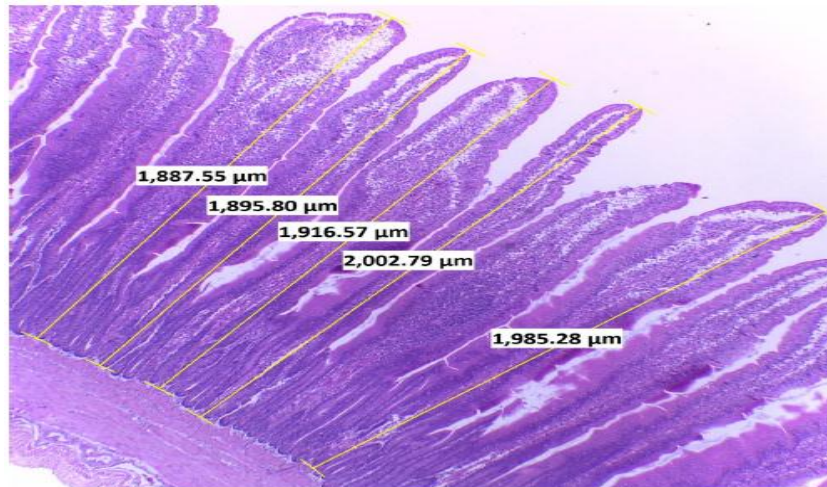
**Figura 14.** Vellosidades intestinales Duodeno T1



**Figura 15.** Vellosidades intestinales Yeyuno T1

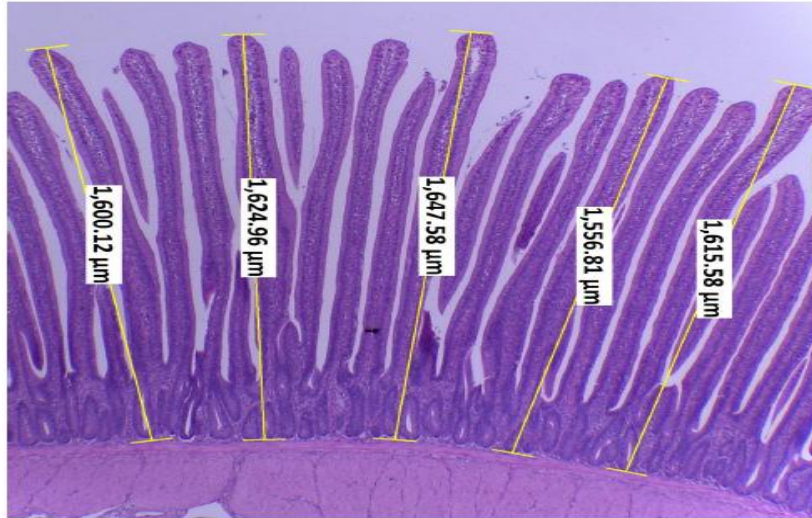


**Figura 16.** Vellosidades intestinales Íleon T1.

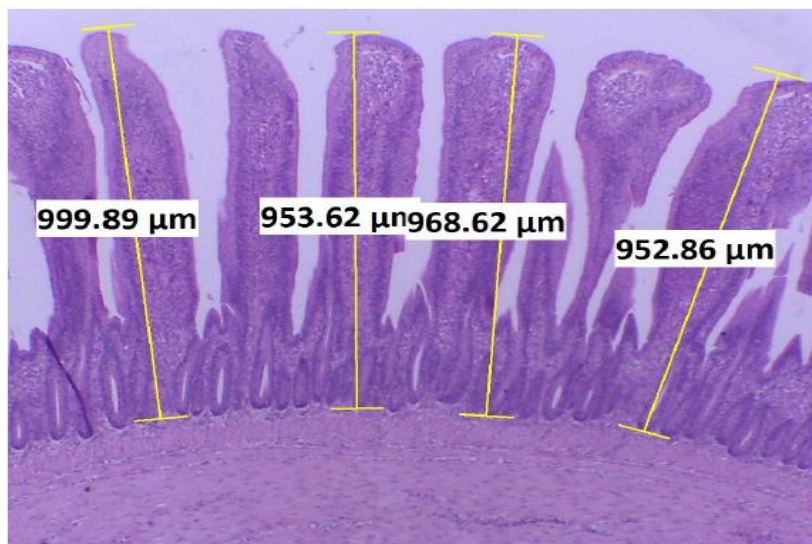


**Figura 17.** Vellosidades intestinales Duodeno T2

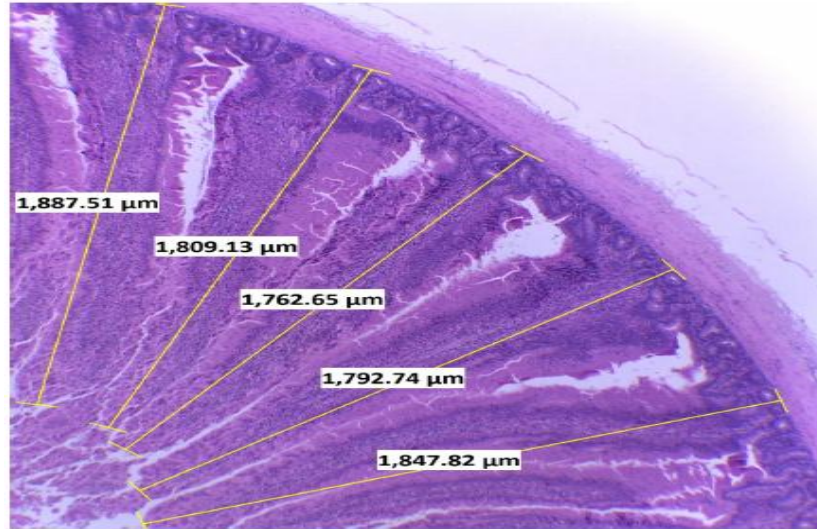




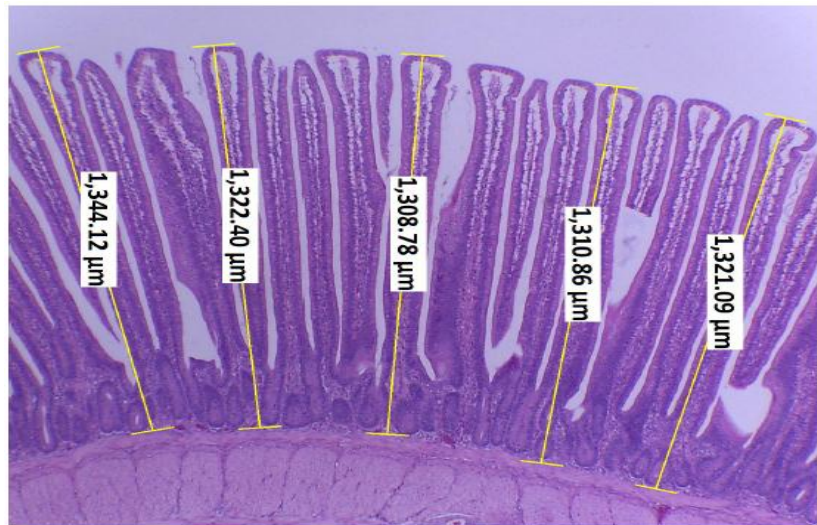
**Figura 18.** Vellosidades intestinales Yeyuno T2



**Figura 19.** Vellosidades intestinales Íleon T2

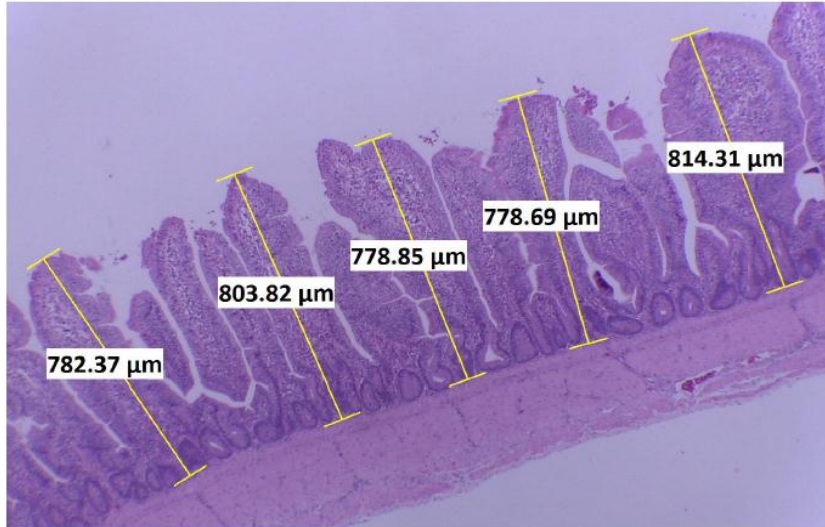


**Figura 20.** Vellosidades intestinales Duodeno T3

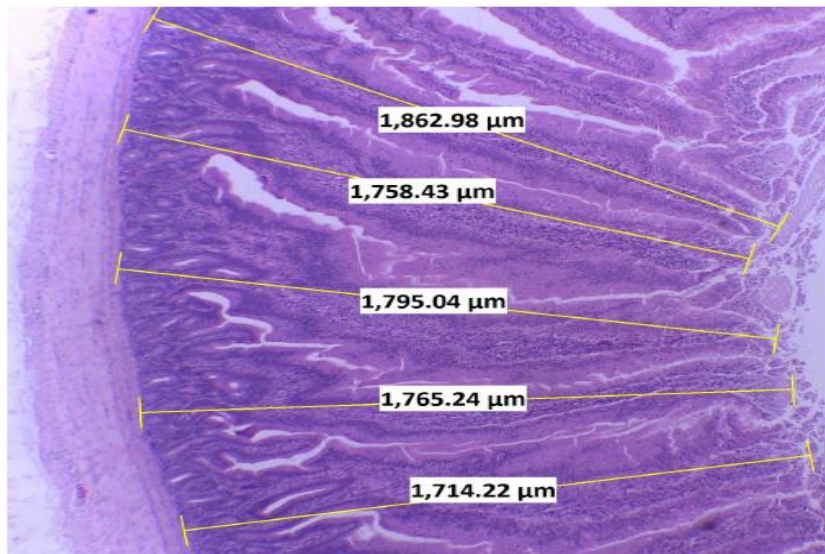


**Figura 21.** Vellosidades intestinales Yeyuno T3

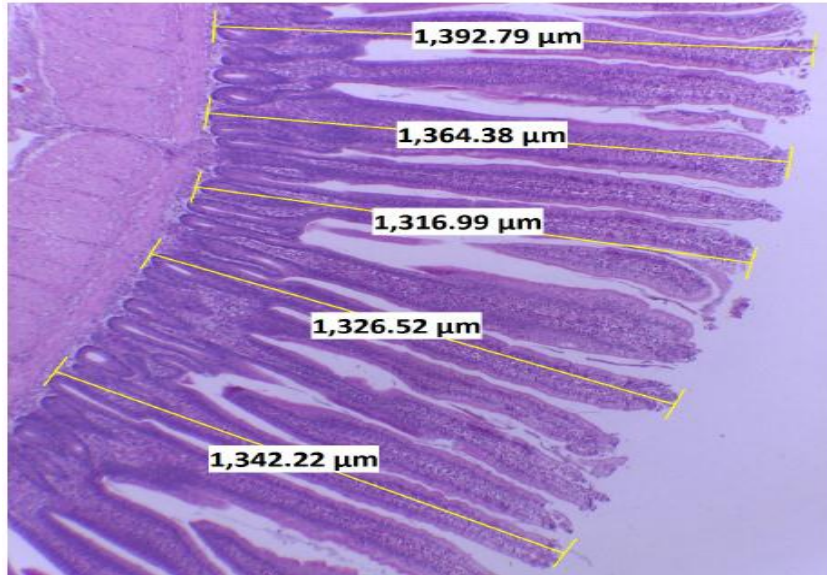




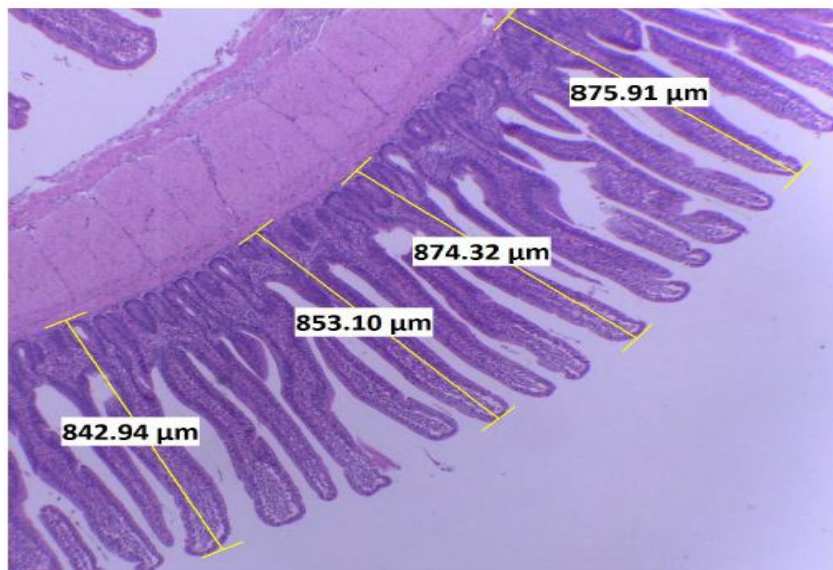
**Figura 22.** Vellosidades intestinales Ileon T3



**Figura 23.** Vellosidades intestinales Duodeno T4



**Figura 24.** Vellosidades intestinales Yeyuno T4



**Figura 25.** Vellosidades intestinales Íleon T4