

01674

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CARACTERIZACIÓN Y PUREZA DE VESÍCULAS DE MEMBRANA DEL BORDE DEL
CEPILLO COMO INDICADOR DE LA INTEGRIDAD DEL EPITELIO INTESTINAL:
VALORACIÓN DE DOS ALIMENTOS FUNCIONALES EN POLLOS DE ENGORDA.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

PRESENTA

VERÓNICA DÁVILA RAMÍREZ

TUTOR: Antonio Díaz Cruz.

COMITÉ TUTORAL: Billy Hargis

Ma. del Pilar Castañeda S.

m. 345646



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Verónica Dávila
Ramírez

FECHA: 10 - 09 - 03

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

A

“MI ALMA MATER”
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN
ANIMAL: AVES

POSGRADO: MEDICINA

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA

DR. ANTONIO DÍAZ
DRA. PILAR CASTAÑEDA

RESUMEN

VERÓNICA DÁVILA RAMÍREZ. Caracterización y Pureza de las Vesículas de Membrana del Borde del Cepillo como Indicador de la Integridad del Epitelio Intestinal: Valoración de dos Alimentos Funcionales en Pollos de Engorda. **(Bajo la supervisión del Comité tutorial: MVZ MC Antonio Díaz Cruz, MVZ MPA PhD Ma del Pilar Castañeda Serrano, DVM. MSc. PhD Billy M. Hargis).**

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar y purificar las membranas del borde del cepillo como un indicador de la integridad del epitelio intestinal al administrar un alimento funcional (AF, dieta convencional suplementada con un prebiótico). Se realizaron 3 dietas a base de sorgo-soya: a) dieta basal (grupo testigo), b) dieta basal adicionada con 0.2% de Inulina Bacteriana-prebiótico (AF-IB), c) dieta basal adicionada con 0.2% de Inulina Vegetal (AF-IV). Estas dietas fueron administradas *ad libitum* durante 49 días consecutivos a partir del día 1 de edad. Para este fin se utilizaron pollos de engorda (Ross x Ross) divididos en tres tratamientos con seis replicas de 10 aves cada una. Las vesículas de membrana del borde del cepillo (VMBC) fueron aisladas a partir de muestras intestinales a los 7 y 14 días de edad para evaluar actividad enzimática intestinal de maltasa y sacarasa. La determinación de la integridad de la mucosa (IMI) y el peso relativo intestinal (PTI) fueron evaluados a los 7 y 14 días de edad. También se utilizaron 22 pollos por grupo con 3 réplicas (n=198) para evaluar el peso corporal (PC), evaluado semanalmente desde la 1ra semana de edad hasta la 6ª semana, el tiempo de tránsito gastrointestinal (TTGI) fue evaluado a los 10, 15, 24 y 30 días de edad. Adicionalmente, al día 49 de edad, las aves fueron sacrificadas para evaluar el rendimiento de la canal y el grado de pigmentación a las 24 horas postmortem. La actividad en las VMBC de la sacarasa en duodeno fue mayor a los 7 días de edad y a los 14 días en ileon en aves alimentadas con el AF-IV comparado con el grupo testigo. La actividad de la maltasa en duodeno e ileon a los 7 días fue mayor respecto al grupo testigo y sólo en duodeno a los 14 días de edad la actividad de la sacarasa fue mayor ($P < 0.05$). La administración del AF-IB generó un mayor desarrollo de la mucosa intestinal (IMI) a los 7 días de edad en duodeno y a los 14 días de edad en ileon ($P < 0.05$). En el análisis del PRI no se observó ninguna diferencia estadística entre tratamientos. El grupo alimentado con el AF-IV mostró un mayor TTGI. En el PC se observó diferencia a la 4ª semana de edad en el grupo adicionado con un AF-IB que presentó el PC más bajo y el testigo el PC más alto. El IC en el tratamiento testigo fue significativamente mayor a la 4ª y 5ª semana de edad. No se observó diferencia en la pigmentación o en el rendimiento de la canal. Sin embargo, todos los tratamientos presentaron valores óptimos para su venta en el mercado mexicano. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la utilización de las VMBC puede ser una herramienta útil en la evaluación de la función intestinal y del efecto de los aditivos, suplementos y fármacos incluidos en la dieta.

Palabras claves: Prebióticos, Enterocito, Calidad de la Canal, Actividad enzimática, Maltasa, Sacarasa, Pigmentación.

ABSTRACT

Characterization and purity of the brush border membrane vesicles as indicator of integrity from intestinal epithelium: Evaluation of two functional foods en broiler chickens.

Characterization and purification of the brush border membrane vesicles as indicator of the integrity from intestinal epithelium from broiler chickens fed with a functional food (FF, base diet supplemented with a prebiotic) was the objective of the present study. Three diets sorghum-soybean were made: a) basal diet (control group), b) basal diet supplemented with 0.2% of Bacteria Inulin (FF-BI) c) basal diet supplemented with 0.2% of Vegetal Inulin (FF-VI). These diets were administered *ad libitum* for 49 days. Broiler chicks 1 day-old were divided in groups of 10 each, with 6 replicates by group (n=180). The brush border membranes vesicles were isolated from intestinal samples at 7 and 14 days old in order to evaluate the intestinal enzymatic activity of maltose and sacarose. The mucose integrity determination (MID) and the relative intestinal weight (RIW) were evaluated ay 7 and 14 days old. Twenty-two broiler chickens by group with 3 replicates (n=198) were used also, in order to evaluate weekly the body weight from the first one to the 6th. The intestinal transit time (ITT) was evaluated at 10, 15, 24 and 30 days old. Additionally, at 49 days old the birds were processed in order to evaluate the yield carcass and the pigmentation level at 24 hrs post-mortem. The brush border membrane vesicles activity of sacarose in duodenum was higher at 7 and 14 days in ileum in birds fed with FF-VI than the control group. The maltose activity in duodenum and ileum at 7 was higher than the control group and only in duodenum at 14 days old the sacarose activity was higher (P<0.05). The FF-BI administration produced a higher development of the intestinal mucose (MID) at 7 days old in duodenum and 14 days old in ileum (P<0.05). The RIW did not show significant difference between treatments. The group fed with FF-VI showed a higher ITT. The body weight showed a difference at 4th week of age in the group fed with FF-BI, showing the lower weight and the control group the higher one. The feed conversion ratio was significantly higher at 4th and 5th week of age. The pigmentation level and the yield carcass did not show significant difference. However all the treatments presented optimal values for the Mexican market. The results obtained in the present study suggest that brush border membrane vesicles could be an useful tool in the intestinal function evaluation and the effect of additives, supplements and pharmacological products included in the diet.

Key Words: Prebiotics, Enterocyte, Carcass quality, Enzimatical activity, Maltase, Sucrosa, Pigmentation.

CONTENIDO	página
Resumen	I
Contenido	II
Abstract	III
Siglas y abreviaturas	IV
Agradecimientos	V
Introducción	1
Alimentos funcionales	2
Importancia del uso de AF en la nutrición del pollo de engorda.	4
El Tracto Gastrointestinal y los Alimentos Funcionales	7
Vesículas de Membrana del Borde del Cepillo.	7
Justificación	10
Hipótesis	11
Objetivo General	11
Objetivos Particulares	11
Material Y Métodos	12
Análisis estadístico	14
Resultados	19
Discusión	22
Conclusiones	28
Referencias	29
Cuadros y figuras	34

SIGLAS Y ABREVIATURAS.

AE	Actividad Enzimática
AF	Alimento Funcional
AF-IB	Alimento Funcional Suplementado con Inulina Bacteriana
AF-IV	Alimento Funcional Suplementado con Inulina Vegetal
AGCC	Ácidos Grasos de Cadena Corta
GP	Ganancia de Peso
IC	Índice de Conversión
IMI	Integridad de la Mucosa Intestinal
MI	Mucosa Intestinal
MBC	Membrana del Borde del Cepillo
PC	Peso Corporal
PRI	Peso Relativo Intestinal
RC	Rendimiento en Canal
TGI	Tracto Gastrointestinal
TTGI	Tiempo de Tránsito Gastrointestinal
UPC	Uniformidad de Peso Corporal
V/P	Número de Veces de Pureza
VMBC	Vesículas de Membrana del Borde del Cepillo

Figuras y Anexos	Paginas
Figura 10. Vesículas de membrana del borde del cepillo	X
Figura 1.- Efecto de la administración de un AF adicionado con prebiótico (inulina bacterina e inulina vegetal) sobre el epitelio duodenal de pollos de engorda a los 7 y 14 días de edad.	XI
Figura 2.- Efecto de la administración de un AF adicionado con prebiótico (inulina bacterina e inulina vegetal) en el epitelio del íleon de pollos de engorda a los 7 y 14 días de edad.	XII
Figura 3.- Actividad enzimática en la membrana del borde del cepillo de sacarasa y maltasa en duodeno de pollos de 7 días de edad alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiótico.	XII
Figura 4.- Actividad enzimática en la membrana del borde del cepillo de sacarasa y maltasa en íleon de pollos de 7 días de edad alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiótico.	XIV
Figura 5.- Actividad enzimática en la membrana del borde del cepillo de sacarasa y maltasa en duodeno de pollos de 14 días de edad alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiótico	XV
Figura 6.- Actividad enzimática en la membrana del borde del cepillo de sacarasa y maltasa en íleon de pollos de 14 días de edad alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiótico.	XVI
Figura 7.- Efecto de la administración de un alimento funcional adicionado con prebiótico sobre el peso corporal de pollos de engorda alimentados durante 6 semanas de edad.	XVII
Figura 8.- Efecto de la administración de un alimento funcional adicionado con prebiótico en el índice de conversión alimenticia en pollos de engorda por un periodo de 6 semanas de edad.	XVIII
Figura 9. Anatomía del epitelio intestinal	XIX

Cuadros	Paginas
Cuadro 1.-peso relativo intestinal en pollos de engorda alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiótico.	I
Cuadro 2. Actividad de la nucleotidasa como indicador de la pureza de las vmbc en duodeno e ileon a los 7 y 14 días de edad en pollos alimentados con un alimento funcional.	II
Cuadro 3. Actividad de atpasa $na^+ - k^+$ como indicador de la pureza de las vmbc en duodeno e ileon a los 7 y 14 días de edad en pollos alimentados con un alimento funcional.	III
Cuadro 4. Actividad de las disacaridasas (maltasa y sacarasa) como indicador de la pureza de las vmbc en pollos alimentados con un alimento funcional	VI
Cuadro 5. Uniformidad en parvadas de pollos de engorda a los 21 y 35 días de edad alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiotico	V
Cuadro 6. Tiempo de tránsito gastrointestinal en pollos de engorda alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiotico	VI
Cuadro 7. Rendimiento de la canal, pechuga, pierna y muslo de pollos alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiotico.	VII
Cuadro 8. Valores de pigmentación en canales de pollo 24 hr postmortem provenientes de aves alimentadas con un alimento funcional adicionado con prebiotico.	VIII
Cuadro. 9. Dieta de iniciación cuadro	IX
Cuadro.10. Dieta de finalización	IX

INTRODUCCIÓN

El uso de antibióticos a dosis sub-terapéuticas en animales de producción intensiva (cerdos, bovinos, pavos y pollos) tiene como objetivo aumentar la ganancia de peso y mejorar la conversión alimenticia. Durante los últimos 50 años se han utilizado más de un millón de toneladas de antibióticos en la biosfera, de los cuales se estima que el 50% se ha empleado en la industria agropecuaria con fines terapéuticos, profilácticos y como promotores del crecimiento. Se ha estimado que en 1997, la Unión Europea utilizó 1,575,000 toneladas de antibióticos como promotores de crecimiento¹. El uso indiscriminado de antibióticos ha generado una gran controversia en todo el mundo, debido al descubrimiento de cepas bacterianas resistentes a una gran gama de drogas antibacterianas.

En estudios recientes se ha demostrado la presencia de mecanismos genéticos de transferencia de resistencia en la microflora intestinal de animales y humanos¹. Por esta razón, la producción animal ha sido considerada como un ambiente favorable para la generación y distribución de genes bacterianos de resistencia a antibióticos². Lo anterior se basa en los reportes de aislamientos de cepas multi-resistentes en alimentos de origen animal, así como en el medio ambiente (agua, suelo, aire, etc.) de las granjas. Un caso alarmante fue el aislamiento de cepas de *Salmonella thyphimurium* y *Campilobacter spp.* resistentes a las fluoroquinolonas a partir de animales en producción y en canales de pollos³. Una alternativa para controlar la resistencia a drogas antibacterianas, implementada por varias autoridades en el mundo ha consistido en la restricción o prohibición del uso de antibióticos en la producción animal, provocando un efecto devastador para esta industria, aumentándose la presentación de enfermedades en los animales y generando un efecto catastrófico en el bienestar animal⁴. Por lo tanto, el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la producción animal será una práctica que desaparecerá en todo el mundo, por lo que se requiere de nuevas formas de producción.

Una alternativa que sustituye la dependencia hacia los antibióticos y que recobraría la confianza de los consumidores, es el uso de la biotecnología en la alimentación animal.

Los recientes avances en biotecnología apoyan la hipótesis de que la dieta modula varias funciones del organismo importantes para mantener y mejorar la salud, además de proveer los nutrientes necesarios para el desarrollo de los individuos⁵. En este concepto se basa el desarrollo de AF suplementados con productos bióticos enfocados a mejorar y corregir la salud del consumidor.

Alimentos Funcionales

Un alimento funcional (AF) es un alimento convencional suplementado con uno o varios componentes bióticos (probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos omega-3, etc.) que tienen efectos favorables en las funciones normales del organismo, además de poseer los efectos nutricionales de una dieta estándar⁶.

Uno de los productos bióticos más usados en la formulación de los AF son los probióticos, los cuales son cultivos bacterianos activos de la microflora intestinal benéfica que se adicionan al alimento, y que aportan beneficios al huésped. Con ellos se favorece un balance en la microflora intestinal. Un ejemplo de cultivos bacterianos son los *Lactobacillos acidophilus* los cuales son la primera línea de defensa contra organismos invasores y oportunistas como las levaduras⁵.

Otra herramienta usada para la formulación de AF es la inclusión de prebióticos, éstos son ingredientes que se administran en la dieta que no pueden ser digeridos por el huésped, por lo tanto, su efecto benéfico se debe a la estimulación selectiva de especies bacterianas benéficas del sistema digestivo, al favorecer el crecimiento y actividad de estas especies sobre otros microorganismos no benéficos en el huésped. Uno de los prebióticos más estudiado hasta el momento es la inulina⁶.

La inulina es un polisacárido comúnmente presente en más de 36,000 especies de plantas en diferentes porcentajes. La inulina se encuentra almacenada en vegetales y plantas tales como el plátano, ajo, cebolla y chicoria⁷. La mayoría de la inulina comercialmente disponible es sintetizada a partir de la sacarosa o extraída de la raíz de chicoria⁷. Al producto con un grado de polimerización de 2 a 60 unidades de fructosa unidas por enlaces glucosídico β (2-1) con una unidad terminal de glucosa se le llama inulina (Raftilina) y cualquier oligofructosa producida por la hidrólisis de la inulina es llamada Raftilosa (menos de 10 unidades)^{6,7,8}. Este fructano no puede ser hidrolizado por las enzimas del sistema digestivo de monogástricos y es utilizado por las bacterias que habitan el lumen intestinal. Este sustrato favorece selectivamente el crecimiento de poblaciones bacterianas benéficas^{6,7}.

Actualmente se desconocen los mecanismos exactos a través de los cuales los AF mejoran la salud de los individuos⁹. Se han desarrollado varias técnicas para poder medir la respuesta del organismo hacia ciertos elementos de la dieta, pero en la actualidad todavía se carecen de herramientas biológicas que demuestren el efecto biológico del intestino al proporcionar un AF adicionado con probiótico o prebiótico.

El tracto gastrointestinal (TGI) digiere el alimento en componentes absorbibles a través de procesos mecánicos y bioquímicos. Los carbohidratos de la dieta son categorizados como digestibles y no digestibles. Los carbohidratos digestibles son digeridos por enzimas como por ejemplo, la amilasa pancreática en el lumen intestinal o por las disacaridasas adheridas a la mucosa del epitelio intestinal que los hidrolizan a monosacáridos absorbibles. La amilasa pancreática actúa hidrolizando los almidones (polisacárido) en disacáridos como la maltosa que a su vez son hidrolizados a monosacáridos por las enzimas del borde del cepillo de la pared intestinal como la maltasa⁶. Los carbohidratos no digestibles, no son digeridos en el TGI por lo que se consideran el componente primario en la fibra de la dieta. La mayoría de los carbohidratos no digestibles forman parte de la pared celular de las plantas, entre los cuales destaca la celulosa (polímero de glucosas con enlace $\beta(1-4)$) por ser el componente de mayor cantidad. Otros carbohidratos no digestibles son los heteropolisacáridos tales como: la hemicelulosa, pectinas, gomas, oligofructosa e inulina. Estos carbohidratos son el sustrato energético primario para el crecimiento de microorganismos en el intestino; además de contribuir con la formación de las heces y poseer efecto laxante⁶. Existen otros productos como los resultados del metabolismo microbiano los cuales incluyen el amonio y ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los AGCC son utilizados por las células del epitelio intestinal (enterocitos) como fuente de energía. Recientes investigaciones se han enfocado en el efecto potencial de los AGCC en la salud del intestino y su posible papel en la prevención de las enfermedades gastrointestinales¹⁰. De todos los AGCC el butirato ha sido el más estudiado. Éste ácido se asocia con el efecto protector de la mucosa intestinal ya que facilita la diferenciación celular y el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal¹¹.

Recientemente, Cummings *et al*¹², reportaron el efecto de varios sustratos bacterianos incluyendo la inulina, oligofructosa, pectina, polidextrosa en la producción de AGCC. Estos estudios sugieren que las bacterias intestinales benéficas alimentadas con un sustrato específico (prebiótico), presentan la ventaja de una mayor proliferación celular, comparada con el resto de las bacterias del sistema gastrointestinal. Estudios *in vitro* e *in vivo* con prebióticos, han demostrado que algunos de estos tienen la capacidad de reducir el pH del contenido intestinal, incrementar la cantidad de AGCC, favorecer la síntesis de metabolitos bacterianos y restaurar la ecología intestinal en los individuos. Además estos factores tienen la capacidad de regular el desarrollo de la mucosa intestinal^{5,13,14}.

Los efectos generados por la administración de prebióticos en la dieta considerados para este trabajo son los siguientes:

- La modulación de la fisiología intestinal, especialmente las funciones que se asocian con el balance de la microflora intestinal.
- El control de nutrientes.
- El tiempo de tránsito gastrointestinal.
- La motilidad intestinal¹⁵.

Importancia del uso de AF en la nutrición del pollo de engorda.

Gran parte de los nutriólogos del área avícola coinciden en que la absorción de nutrientes es un factor limitante potencial en la supervivencia, desarrollo y conversión alimenticia del pollo de engorda. Esta opinión ha sido reforzada por los estudios sobre el desarrollo y función del sistema digestivo de las aves. Donde se demuestra que durante las semanas 1 y 2 de vida del pollo de engorda, la velocidad a la que se desarrolla el TGI es mucho mayor comparada con otros órganos, lo cual depende esencialmente del potencial genético del ave, de ahí que, el daño a la mucosa intestinal puede aumentar significativamente los requerimientos de mantenimiento, lo que disminuye la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento del ave. Por lo tanto, las microvellosidades de los enterocitos incrementan en longitud durante la primera semana de vida, lo que sugiere que el crecimiento inicial del ave puede estar limitado por el área de superficie del TGI. Por lo tanto, el desarrollo gastrointestinal es afectado por las restricciones alimenticias o ayunos¹⁶.

Además, la gran exigencia de la selección genética ha alterado la actividad enzimática digestiva, ya que se ha reportado que la actividad de la amilasa pancreática y quimiotripsina ha disminuido significativamente en razas ligeras en comparación con las razas pesadas. La secreción de enzimas digestivas podría ser un factor que limite la cantidad de alimento ingerido, digerido y el subsiguiente desarrollo de las aves¹⁷. La viscosidad del contenido intestinal es otro factor que afecta la digestibilidad de nutrientes, la cual se relaciona directamente con el tiempo de tránsito gastrointestinal. Existe una gran variedad de factores que pueden alterar el proceso del tránsito a través del tracto gastrointestinal, como las grasas, las drogas, la obstrucción ileal, la irradiación, el grado de excitación, la edad, la temperatura ambiental y la microbiota intestinal.

En la actualidad se sabe que la dieta es el factor más importante que afecta el tránsito de la ingesta a través del tracto gastrointestinal y que los cambios en este flujo podrían generar modificaciones del metabolismo de nutrientes en el lumen intestinal¹⁸.

Cuando se utilizan AF en la alimentación animal, se mejora la productividad de las especies, esto se logra al modificar la ecología gastrointestinal, además de disminuir la cantidad de microorganismos patógenos en el sistema gastrointestinal debido a la generación de un ambiente restrictivo caracterizado por la producción de metabolitos bacterianos secundarios, por la

presencia de AGCC, por la disminución del pH y por la producción de sustancias bactericidas. Se ha observado que la aplicación de cultivos de microflora normal intestinal en aves recién nacidas, facilita el rápido establecimiento de la microflora en el sistema intestinal, manteniendo un buen estado de salud en las aves y con ello un incremento en los parámetros de producción¹⁹. El establecimiento de esta microflora intestinal en el sistema digestivo del ave, siempre está relacionado con el incremento en la concentración de ácidos grasos y la subsiguiente disminución en el pH intestinal, pero además, se han observado cambios estructurales e histológicos en la mucosa cecal^{20,21,22}.

Lupton *et al*²³ sugieren que la fermentación de carbohidratos no digeribles en el intestino grueso del ave, puede ser un factor importante en la determinación de la proliferación de las células de la mucosa intestinal. Estos cambios en la mucosa han sido asociados con un buen estado de salud y con un incremento de los parámetros productivos del ave. Bi Yu *et al*¹⁹ demostraron un aumento significativo en los parámetros productivos de pollos de engorda en el periodo crítico de desarrollo (0 a 3 semanas), al administrar prebióticos a pollos de un día de edad.

Se ha reportado que la falta de desarrollo de las vellosidades y criptas intestinales esta relacionado con pobre absorción de nutrientes en cerdos²⁴. El uso de AF suplementados con prebióticos y probióticos favorecen la función e integridad de las células de la mucosa intestinal (enterocitos), encargadas de la absorción de nutrientes y de la exclusión de microorganismos patógenos, lo que mejora significativamente la absorción de los nutrientes, lo cual puede verse reflejado en un aumento de los parámetros de producción²⁵.

Cuando se tiene un tracto digestivo sano puede verse reflejado en una alta ganancia de peso, además de una mejora en el rendimiento de la canal y en los niveles de pigmentación.

a) Pigmentación.

Pocas propiedades de un alimento son tan importantes como el color para los consumidores²⁶. La pigmentación en el pollo de engorda en México es de suma importancia, ya que existe una tendencia marcada de los consumidores a preferir productos avícolas altamente pigmentados²⁷. Es una creencia común que las aves con una tonalidad amarilla o dorada son más sanas, y criadas bajo condiciones tradicionales²⁸. Una falta de coloración es signo de inmadurez, descomposición, procesamiento inadecuado o adulteración²⁶. La pigmentación se puede conceptuar como la deposición de un pigmento capaz de afectar las propiedades de reflejar la luz de un objeto, y por lo tanto, de alterar el color. Este proceso se considera como un mecanismo biológico en donde el pigmento presente en la dieta es absorbido por el intestino, transportado por la sangre y depositado en la piel o en la yema del huevo²⁶. La mayoría de los pigmentos en la industria avícola (carotenoides) deben ser saponificados en el tracto gastrointestinal para que puedan ser absorbidos fácilmente por el

intestino^{29,30}. El sitio principal de absorción se lleva a cabo en el asa duodenal y en la parte superior y media del íleon^{31,32}.

En el pollo de engorda los carotenoides se movilizan y se depositan hacia la piel, los tejidos grasos y los tarsos²⁹. Una piel no pigmentada se correlaciona con niveles bajos de absorción de pigmento y se observa en aquellas aves que tienen o han padecido enfermedades gastrointestinales²⁷.

b) Rendimiento de la canal.

El procesamiento del pollo de engorda y el rendimiento en canal son consideraciones económicas importantes en la industria avícola. El rendimiento expresado se basa en la cantidad de carne para la venta en relación con el peso vivo³³. Otro aspecto importante en cuanto al rendimiento de canales de pollo de engorda, concierne al desarrollo de productos con valor agregado. La producción de productos de este tipo ha mostrado un rápido crecimiento en la industria avícola la pechuga, pierna y muslo son las regiones musculares de mayor valor y utilización, por tanto un incremento en el tamaño del ave resultará en un incremento en el porcentaje de pechuga; el peso, volumen y dimensiones de las diferentes partes de la pechuga están directamente relacionadas con el peso de la canal³⁴. El desarrollo de productos con valor agregado ha causado un crecimiento en la industria avícola. La creciente demanda por parte de los consumidores por productos cómodos y de fácil preparación ha estimulado el procesamiento ulterior del pollo de engorda. Sin embargo, la manufactura de este tipo de productos exige uniformidad en el despiezado y además de altos rendimientos.

Para entender el efecto de los AF sobre los cambios fisiológicos de la mucosa intestinal, es importante desarrollar un modelo animal capaz de evaluar los cambios en el tracto gastrointestinal

El Tracto Gastrointestinal y los Alimentos Funcionales.

La función de este sistema incluye la digestión, absorción y protección para el huésped, ya que el TGI es la única primera barrera biológica que separa el medio externo del interno (órganos y sistemas)¹⁶.

La función principal del TGI es la de digerir y absorber los nutrientes para reunir las demandas requeridas para procesos metabólicos, crecimiento y desarrollo^{10,16}. Además la MI provee una defensa protectora al huésped que es constantemente desafiada por antígenos provenientes del alimento y microorganismos patógenos presentes en el lumen³⁵. Protección potencial contra agentes dañinos es provista por varios factores como la saliva, ácido gástrico, peristálsis, capa mucosa, proteólisis intestinal, biota intestinal y la membrana epitelial con funciones complejas intercelulares³⁶.

Los alimentos funcionales son consumidos para obtener un efecto benéfico en la salud (homeostasis) o como parte de un plan de dieta para disminuir el riesgo de enfermedades crónicas. Estos alimentos pueden ejercer su efecto directamente en el TGI¹⁰.

Vesículas de Membrana del Borde del Cepillo.

La mucosa del intestino delgado presenta características que aumentan el área de superficie epitelial para la absorción. Estas incluyen pliegues en la mucosa (válvulas conniventes), vellosidades y microvellosidades (Figura 9A). La mayor parte del epitelio celular que cubre las vellosidades está compuesta por enterocitos (Figura 9B). Los enterocitos participan activamente en la dinámica del ecosistema en el TGI del huésped. Éstas células están involucradas en procesos fisiológicos tales como digerir los nutrientes, respuesta inmune e interacciones microbiota-huésped. Las células de la MI tienen como objetivo permitir la absorción de macromoléculas y evitar la entrada de bacterias que se encuentran en el lumen a altas concentraciones³⁶. Los cuales al madurar aumentan la superficie de absorción por presentar microvellosidades en su superficie apical o borde del cepillo³⁷. Poco antes de nacer el pollo presenta enterocitos redondos e inmaduros, sin embargo inmediatamente después de nacer los enterocitos crecen rápidamente alargándose y desarrollando una pronunciada polaridad y definen el borde del cepillo (MBC) o membrana apical, membrana basal y membrana basolateral (Figura 9C)³⁸.

La MBC intestinal constituye la barrera física que debe ser atravesada por los nutrientes concentrados en el lumen intestinal. Las membranas son estructuras de lípidos, carbohidratos y proteínas cuyos componentes se mantienen unidos formando una bicapa por medio de enlaces no covalentes. En la MBC se ha demostrado todo un dispositivo de enzimas, que degradan las

sustancias de la dieta, y sistemas de transporte que incorporan los productos de la digestión. Entre las enzimas se encuentran: a) la fosfatasa alcalina que hidroliza compuestos fosfatados y se localiza en la profundidad de la membrana de la microvellosidad; b) disacaridasas, que desdoblan disacáridos como la sacarosa y maltosa en monosacáridos y se encuentran unidas a la parte más externa de la microvellosidad; y c) aminopeptidasas, que liberan un aminoácido terminal de un péptido de cadena corta y sobresalen desde la membrana hacia el citoplasma. Estas enzimas permiten la digestión cerca de la mucosa, lo que facilita la absorción de nutrientes a través del enterocito, ya que primero debe atravesar la membrana del borde del cepillo para poder ingresar al citoplasma del enterocito y finalmente salir por la membrana basolateral hacia la circulación³⁹.

A pesar de las investigaciones realizadas hasta el momento todavía se desconoce la influencia que tiene la ecología intestinal sobre la asimilación los AF en las diferentes etapas de desarrollo del pollo de engorda, por lo cual el estudio de la fisiología del enterocito podría ser una alternativa para estudiar el efecto de los componentes de la dieta y la actividad enzimática, ya que se conoce muy poco de la digestión luminal, digestión membranosa y los mecanismos de absorción⁴⁰.

De tal manera que, el estudio de las vesículas de membrana del borde del cepillo (VMBC) puede ser una herramienta viable en el estudio de la fisiología del enterocito. Las VMBC son formadas por medio de la fuerza centrífuga, la cual rompe la membrana que forma al enterocito y deja libre la membrana del borde del cepillo, esta membrana tiende a cerrarse formando una vesícula, que deja expuestas las microvellosidades hacia el exterior (Figura 10). La preparación de las VMBC datan desde 1960, y desde entonces se estudió el proceso de transporte membranar utilizando epitelio intestinal y renal para la preparación de las VMBC⁴¹. Las cuales han sido utilizadas para diversos estudios debido a que contienen adheridas varias enzimas hidrolíticas (sacarasa, maltasa, amino peptidasa, fosfatasa alcalina, etc.), además de sistemas de transporte que se llevan a cabo en esta membrana, los cuales son importantes para la digestión y absorción de nutrientes como D-glucosa, D-fructosa, L-aminoácidos, fosfato inorgánico y sodio^{42,43}. Se cree que el exceso de ácidos grasos presentes en el lumen intestinal interfieren directamente en el sistema de transporte localizado en la membrana del borde del cepillo intestinal, por lo que estudios auxiliados con las VMBC, describieron el efecto de sistemas de transporte como: Na⁺ - glucosa, Na⁺ - aminoácidos y sistemas de cotransporte⁴⁴. Así como varios estudios sobre los sistemas de transporte en aves como: cloro, hexosa, L-lisina, triptofano; y como la actividad de lipasa, de la ATPasa Na⁺-K⁺ y fosfolipasa^{39,45,46,47,48}.

El primer procedimiento descrito se basó en el uso de EDTA, el cual fue utilizado por Eichholz y Crane⁴⁹ para el aislamiento total del borde del cepillo⁴¹. En la segunda generación de vesículas, se utilizó la precipitación diferencial de membranas intracelulares y basolaterales con calcio y magnesio, en ambas se observaron resultados similares⁴². En varias especies animales se ha reportado el uso de las VMBC para realizar diferentes estudios, por ejemplo en el hombre se han tomado biopsias de tejido intestinal para conocer la composición proteínica de esta membrana y su actividad enzimática, así como establecer defectos o anomalías, y diagnosticar la pérdida de las sales biliares por heces⁵⁰. Además las VMBC se han utilizado para evaluar mecanismos de transporte de varios elementos, como la glucosa y la colina en la membrana intestinal en conejos⁵¹. En cerdos se han utilizado como modelo para estudiar el daño tisular por agentes virales, así como un modelo para conocer el mecanismo normal de transporte de glucosa⁵². También en cerdos se han realizado estudios utilizando las VMBC para medir el comportamiento de la serotonina, ya que la membrana del enterocito presenta receptores para esta hormona, la cual tiene efecto en la motilidad gastrointestinal y en el transporte de electrolitos⁵³. En los pollos se han utilizado para conocer la actividad hidrolítica del fitato por la fitasa en las MBC, y el mecanismo por el cual es absorbida la glucosa a través del intestino^{54,55}.

2.1 Ventajas de la utilización de las VMBC

Es un procedimiento rápido (6 Hrs.), y accesible ya que la mayoría de los reactivos necesarios son parte de un laboratorio de bioquímica, por lo que es una técnica relativamente barata y fácil de implementar. Se puede utilizar material fresco o congelado y permite una rápida producción de una gran cantidad de VMBC. Así mismo resultan ser una opción para evaluar estudios de transporte, funciones biológicas, utilizando varios tratamientos clínicos, así como para conocer otras propiedades de la MBC hasta el momento desconocidas en diferentes especies animales^{43,51}.

Es decir, las VMBC podrían ser una herramienta útil para conocer los mecanismos por los cuales los componentes de una dieta pueden modificar la ecología del TGI, debido a que las VMBC poseen varias enzimas hidrolíticas y un sistema de transporte amplio que son de importancia para la absorción de nutrientes, lo cual amplía el área de aplicación de las VMBC, como sería el evaluar la actividad de una enzima específica de membrana, además de proporcionar un tratamiento en el alimento^{46,48,54,56}.

JUSTIFICACIÓN

Una buena salud del sistema gastrointestinal significa una alta eficiencia, por lo que el uso de alimentos funcionales (suplementados con probióticos, prebióticos o simbióticos) es una nueva herramienta nutricional para modular la ecología intestinal y con esto promover el desarrollo del sistema gastrointestinal, un buen desempeño y un estado de salud.

Avances en biotecnología apoyan la hipótesis de que la dieta modula varias funciones importantes del organismo⁵⁷. Actualmente en varias partes del mundo, se diseñan dietas que además de satisfacer las necesidades básicas del organismo, promuevan un estado de bienestar y al mismo tiempo disminuyan el riesgo de algunas enfermedades, sin embargo todavía se desconocen muchos de los mecanismos por los cuales estas dietas ejercen su efecto.

Se menciona que la adición de prebióticos en el alimento mejora la uniformidad como los parámetros productivos en pollos de engorda (cómo ganancia de peso, conversión alimenticia, etc.) sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales se obtienen estos resultados. Por lo tanto, las VMBC pueden ser una herramienta útil para observar los mecanismos por los cuales los AF logran su acción. Por lo tanto, es necesario caracterizar las VMBC, es decir estandarizar una técnica para el aislamiento de las vesículas así como obtener niveles altos de pureza de las mismas.

HIPÓTESIS

La evaluación de la actividad enzimática, función e integridad de la mucosa intestinal en las VMBC podría ser una herramienta útil para evaluar el efecto de los aditivos en la dieta, principalmente alimentos funcionales adicionados con un prebiótico.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y purificar las VMBC, como una herramienta de evaluación de la integridad anatómica y fisiológica del enterocito, en pollos de engorda alimentados con un alimento funcional.

Objetivos Particulares

- Estandarizar una técnica *in vitro* para la obtención de las VMBC.
- Establecer un modelo *in vitro* para evaluar la pureza y concentración de las VMBC.
- Determinar la actividad enzimática en el intestino del ave (duodeno e ileon) alimentada con un AF utilizando las VMBC.
- Determinar en una prueba biológica la actividad anatómica de la mucosa intestinal de pollos neonatos alimentados con un AF.
- Determinar la ganancia de peso y la uniformidad de pesos de pollos de engorda, alimentados con un AF.
- Determinar el efecto de la alimentación con un AF en el rendimiento de la canal al final del ciclo de engorda.
- Determinar el efecto del AF sobre el grado de pigmentación en pollos de engorda procesados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron dos experimentos.

Experimento I

Objetivo.- Determinar el efecto del alimento funcional en pollos de engorda durante las 2 primeras semanas de vida, sobre el desarrollo e integridad de la mucosa intestinal además de evaluar la actividad enzimática de las disacaridasas en duodeno e íleon.

Diseño Experimental.- Se utilizaron ciento ochenta ($n = 180$) pollos de engorda (Ross x Ross) de un día de edad, provenientes de una incubadora comercial. Fueron divididos en 3 grupos A) Dieta basal (grupo testigo), B) AF-IB (dieta basal + 0.2% de prebiótico Inulina bacteriana) y C) AF-IV (dieta basal + 0.2% de prebiótico Inulina vegetal) de 6 replicas con 10 pollos cada uno. Estos se alojaron en baterías eléctricas, en una nave del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en la calle de Salvador Díaz Mirón S/N, Colonia Santiago Zapotitlán, Delegación Tláhuac, CP. 13209, México D.F. Localizado a 2236 m.s.n.m, en los paralelos 19° 17' 30" latitud norte y 98° 57' 30" longitud oeste. Presenta un clima templado subhúmedo, con una temperatura anual de 16° C, donde el mes más frío es enero y el más caluroso mayo. La precipitación pluvial media es de 600 a 800 mm⁷³.

A los 7 días de edad se sacrificaron 6 pollos de cada grupo y a los 14 días 4 pollos para caracterizar las VMBC y tomar muestras para histología. Para la caracterización de las VMBC en ambos sacrificios se realizaron mezclas de 3 y 2 aves a los 7 y 14 días respectivamente (Ver esquema del experimento 1).

Dietas basales.- Los pollos fueron alimentados desde el 1er día de edad y hasta el final del experimento con una dieta basal de iniciación formulada con base sorgo-soya (Cuadro 9). La dieta fue balanceada de acuerdo a las recomendaciones del NRC1994⁷⁶ pero sin antibióticos. El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum* en todos los grupos.

Dieta adicionada con Prebiótico.- En la dieta basal se adicionó el prebiótico inulina a una concentración de 0.2%. La inulina bacteriana es un producto no tóxico, de origen bacteriano (una innovación) proporcionada por el Dr Agustín López Munguía del Instituto de Biotecnología de la UNAM y la inulina vegetal es de origen vegetal (Producto Comercial USA). Donde el alimento funcional adicionado con inulina bacteriana corresponde (AF-IB) y Alimento funcional adicionado con inulina vegetal a (AF-IV).

Determinación de peso relativo intestinal (PRI).- Para evaluar el PRI como un indicador del desarrollo de la mucosa intestinal, antes del sacrificio se pesó al pollo e inmediatamente después del sacrificio, el tracto intestinal fue separado cuidadosamente a partir de la porción del cardias en la inserción del ventrículo gástrico muscular y hasta su finalización en la cloaca junto con el páncreas sin la Bolsa de Fabricio, se pesó en una balanza digital y se anotó junto al peso corporal correspondiente. Se tomaron los pesos de 18 aves por tratamiento a los 7 días de edad y a los 14 días se pesaron 12 aves por tratamiento.

Determinación de la integridad de la mucosa (IMI).- Inmediatamente después del sacrificio, se colectaron muestras de porciones de aproximadamente 3 cm de duodeno e ileon que posteriormente fueron fijadas en solución de formalina amortiguada al 10%. Estas muestras fueron procesadas con las técnicas de rutina de histología. Secciones de (~5 µm) fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Los cortes histológicos fueron evaluados en un microscopio óptico. El largo de las vellosidades fue medido con una cuadrícula micrométrica y se evaluó la mucosa en 5 puntos distintos seleccionados al azar (n = 5) en 6 pollos por lo que n = 30 observaciones.

Caracterización de las vesículas (CV) - A los 7 y 14 días de edad se sacrificaron pollos para la aislar las VMBC. Una vez sacrificadas las aves se extrajo el intestino completo (sin páncreas) para ser pesado, posteriormente se tomaron dos secciones, la primera fue el asa duodenal, la segunda sección fue el ileon. De estas secciones se obtuvo la mucosa para aislar las VMBC por medio de la técnica modificada de Kessler (Anexo). Primero se obtuvo un homogenado inicial y después de varios procesos de centrifugación diferencial se obtuvieron las VMBC (ver diagrama de anexo). Las preparaciones de las VMBC de todos los tratamientos siempre fueron el mismo día y bajo las mismas condiciones. Después del aislamiento de las VMBC éstas fueron almacenadas por un periodo de 2 semanas a -75°C en aliquotas.

La caracterización de en las VMBC fueron realizadas en el edificio de Posgrado de la Facultad de Medicina, en el Laboratorio 34 y en el Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ.

Determinación de la actividad enzimática (AE).- La AE se evaluó en las VMBC previamente aisladas. La técnica utilizada es la citada por Dahlqvist⁶⁹ para medir la actividad de las disacaridasas. Es decir para medir la actividad de la sacarasa se utilizó como sustrato la sacarosa y para medir la maltasa se utilizó la maltosa, la técnica está basada en la lectura del número de glucosas presentes en la preparación después de un periodo determinado de incubación con el sustrato.

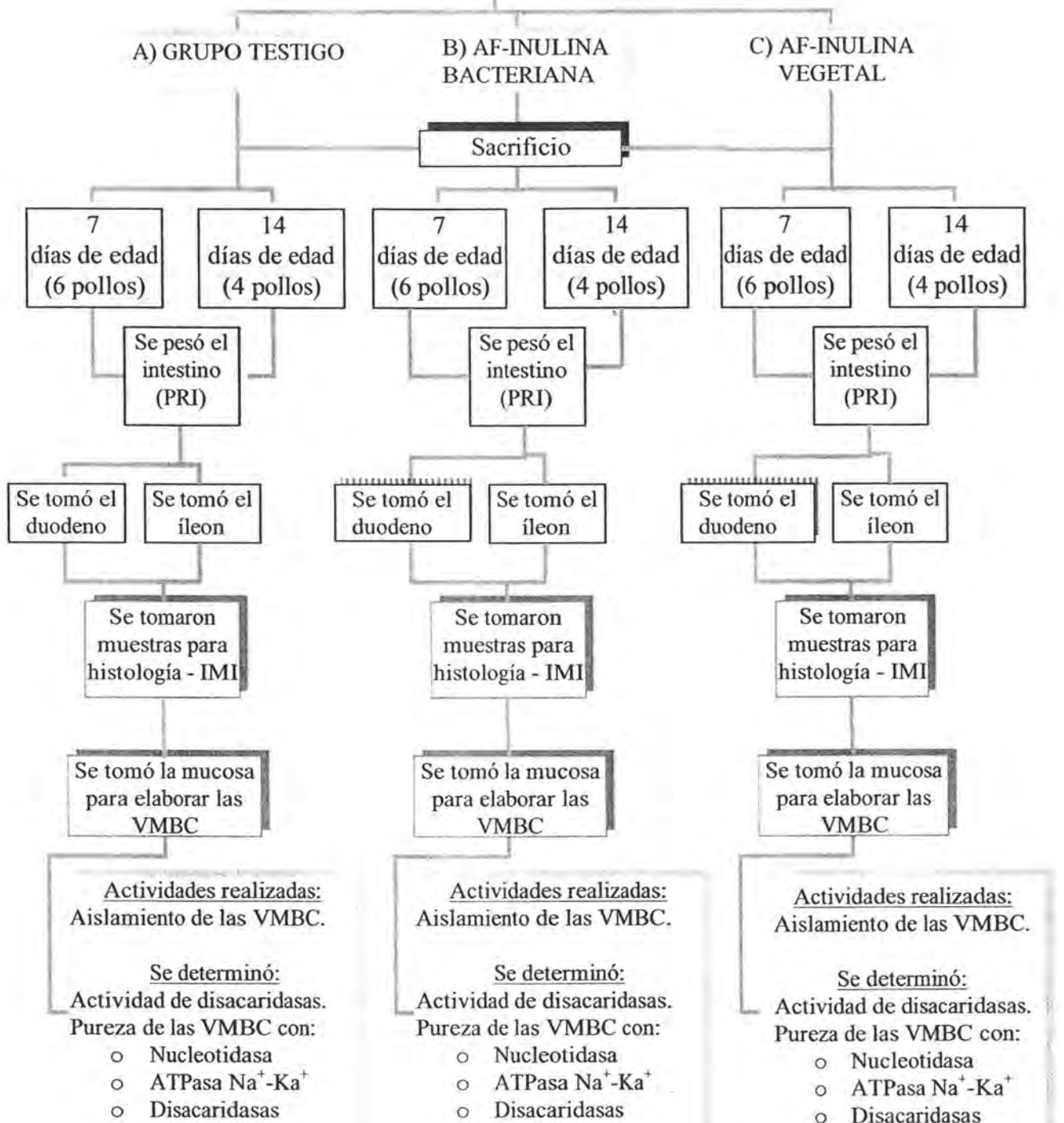
Todas las determinaciones de actividad enzimática fueron realizadas en el departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ, en los laboratorios de Virología y Biología Molecular.

Determinación de la pureza de las vesículas.- Se determinó por medio de la lectura de la actividad de las enzimas nucleotidasa y ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Ambas son indicadores de pureza por localizarse en la membrana basolateral del enterocito. También se determinó con la actividad de la maltasa y sacarasa donde, la purificación de las disacaridasas es el rango de la actividad específica en las VMBC finales con relación a la actividad presentada en el homogenado. La determinación de la proteína fue realizada según la técnica citada por Bradford^{70,71,72}.

Análisis estadístico

Los datos de ambos experimentos fueron analizados utilizando el programa estadístico SAS⁷⁵ ® Versión 8 para lo cual, las diferencias entre tratamientos en cuanto al TTGI, PC, UPC, IMI, PTI, IC, RC, GP y actividad enzimática fueron determinadas por análisis de varianza (ANDEVA) usando un modelo proc glm general lineal. Las diferencias de medias entre grupos fueron determinadas usando la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

TRATAMIENTOS



ESQUEMA DEL EXPERIMENTO 1

Experimento 2.

Objetivo.- Determinar el efecto del alimento funcional en pollos de engorda durante un ciclo completo de producción (7 semanas de edad).

Evaluando el peso corporal, índice de conversión, uniformidad, tiempo de tránsito gastrointestinal, rendimiento en canal y pigmentación.

Diseño Experimental.- Se utilizaron ciento noventa y ocho (n=198) pollos de engorda (Ross x Ross) de un día de edad provenientes de una incubadora comercial. Fueron divididos en 3 grupos A) Dieta basal (grupo testigo), B) AF-IB (dieta basal + 0.2% de prebiótico Inulina bacteriana) y C) AF-IV (dieta basal + 0.2% de prebiótico Inulina vegetal) de 22 pollos cada uno con 3 réplicas. Los cuales fueron criados en piso, en una nave del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la Universidad Nacional Autónoma de México (Igual que el experimento I).

Todos los pollitos fueron pesados individualmente a su llegada y posteriormente cada semana, al igual que el alimento. El tiempo de tránsito gastrointestinal se evaluó a los 10, 15, 24 y 30 días de edad. Los niveles de pigmentación como el rendimiento de canal fueron evaluados al final del ciclo productivo (Ver esquema del experimento 2).

Dietas basales.- Los pollos fueron alimentados desde el día de edad y hasta el final del experimento con una dieta basal dividida en a) iniciación (0-3 semanas) y b) finalización (4-7 semanas) formulada con base sorgo-soya (Cuadros 9 y 10). La dieta fue balanceada de acuerdo a las recomendaciones del NRC1994⁷⁶ pero sin antibióticos. El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum* en todos los grupos.

Dieta adicionada con Prebiótico.- En la dieta basal se adicionó el prebiótico inulina a una concentración de 0.2%. La inulina bacteriana es un producto no tóxico, de origen bacteriano (una innovación) proporciona (Igual que el experimento 1).

Determinación del peso corporal (PC).- Para calcular el peso promedio de los pollos en cada tratamiento, todos los pollos de cada grupo fueron pesados en una balanza digital con rangos de un gramo, los pesos fueron expresados en gramos cada día de evaluación. La evaluación se realizó semanalmente desde la semana 1 hasta la 6.

Determinación del índice de conversión (IC).- El IC se obtuvo al final de la producción utilizando los datos de PC y los consumos de alimento previamente recolectados.

Determinación de la uniformidad de los pesos corporales (UPC).- La uniformidad por los tratamientos se expresó como el porcentaje de aves con pesos corporales dentro de un $\pm 10\%$ de desviación con respecto al promedio. Además, se analizó la variabilidad del peso corporal, a través del porcentaje del coeficiente de variación como medida de uniformidad (Manual Ross 308).

Determinación del tiempo de tránsito gastrointestinal (TTG).- El TTG se determinó a través de la diferencia de tiempo entre la ingesta de un marcador por vía oral. Los pollos se alojaron en un corral con cama limpia y se dietaron una hora antes de la administración del marcador. Al momento de la administración del marcador se anotó la hora y se observó hasta que el último pollo excretó el óxido férrico en heces anotando también esta hora. El tiempo de cada uno se expresó como media aritmética \pm desviación estándar. Como marcador se utilizó óxido férrico (200 mg/kg PV) en cápsulas de gelatina, administradas por vía oral.

Determinación del rendimiento de la canal (RC).- El rendimiento de la canal se evaluó por medio del pesaje de los pollos antes de salir de la granja (peso vivo) en relación al peso de canales evisceradas después del procesamiento. El rendimiento de pechuga, pierna y muslo se evaluó pesando la pechuga al deshuese, así como la pierna y muslo en relación al peso vivo. Los cuales se expresan como porcentaje, $n = 15$.

Determinación del grado de pigmentación (GP).- Los valores de pigmentación se midieron en el área de la vena de la grasa (apterilo lateral) a los 50 días de edad, se utilizó un colorímetro de reflectancia Minolta (CR-300) con el sistema CIELab que mide las variables de luminosidad (L), enrojecimiento (a^*) y amarillamiento (b^*). La determinación de la pigmentación se realizó en las canales mantenidas en hielo 24 horas postmortem, en la misma zona (50 días del ciclo de producción), $n = 15$.

TRATAMIENTOS

A) TESTIGO

B) AF-INULINA
BACTERIANA

C) AF-INULINA
VEGETAL

22 Pollos pesados al
día 1 de edad

22 Pollos pesados al
día 1 de edad

22 Pollos pesados al
día 1 de edad

Pesado semanal de:

Peso corporal
Alimento

Para obtener:
Índice de
Conversión y
Uniformidad

Tiempo de Tránsito
gastrointestinal:

Se tomó a la edad de:
10 días en 18 pollos
15 días en 12 pollos
24 días en 12 pollos
30 días en 9 pollos

Parámetros de Calidad en:

Canal: Comparación de peso
vivo (PV) con pero eviscerado
Pechuga: Comparación de PV
con pechuga deshuesada
Pierna y muslo: Comparación
de PV con carne al deshuese
(n=15)

Pigmentación

Se evaluó después
del sacrificio (49
días de edad) y de
24 horas en
refrigeración.
(n=15)

ESQUEMA DEL EXPERIMENTO 2

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio se presentan en dos secciones:

- 1) Experimento I
- 2) Experimento II.

1) Resultados observados en el experimento I.

1.1 Determinación del Peso Relativo Intestinal (PRI)

No se observó ningún efecto de la administración de un AF adicionado con prebiótico en el PRI en pollos de engorda a los 7 y 14 días de edad entre los tratamientos respecto al testigo ($p < 0.05$) (Cuadro 1).

1.2 Evaluación de la integridad de la mucosa intestinal (IMI)

Duodeno.- Al día 7 de edad, en la determinación de la IMI en las aves (Figura 1) del grupo alimentado con el AF-IB se observó un mejor desarrollo ($p < 0.05$) de la mucosa intestinal del duodeno, comparado con el grupo testigo. A los 14 días de edad, no se presentaron cambios significativos en el desarrollo de la mucosa intestinal de duodeno.

Ileon.- A los 7 días de edad (Figura 2), no existió diferencia estadística entre ningún tratamiento ($p < 0.05$). Sin embargo, a los 14 días el grupo alimentado con un AF-IB presentó el mayor desarrollo de la mucosa intestinal y el grupo alimentado con AF-IV presentó el valor más bajo ($p < 0.05$). El grupo testigo presentó un desarrollo similar a ambos tratamientos con AF.

1.3 Aislamiento de las VMBC

1.3.1 Actividad enzimática

1.3.1.1 Actividad enzimática de la maltasa

La actividad enzimática de maltasa en las VMBC a los 7 días de edad en duodeno mostró una mayor actividad (no significativa) en el grupo tratado con un AF-IB (Figura 3). Sin embargo, en ileon la actividad de maltasa a los 7 días de edad fue significativamente mayor para el tratamiento alimentado con un AF-IB comparado con el testigo y la menor actividad la presentó el tratamiento del AF-IV (Figura 4).

La actividad de maltasa en duodeno e ileon a los 14 días de edad fue mínima y no presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Figuras 5 y 6).

1.3.1.2 Actividad enzimática de la sacarasa

En las VMBC se observó una mayor actividad enzimática de sacarasa a los 7 días de edad en duodeno después de la suplementación del AF-IV (Figura 3). Sin embargo, en íleon no mostró lecturas de actividad a esta misma edad. (Figura 4)

A los 14 días de edad la actividad enzimática de sacarasa en las VMBC de duodeno fue mayor en el tratamiento del AF-IB comparado con el testigo (Figura 5) y el tratamiento del AF-IV mostró la actividad más baja. Sin embargo, la actividad del tratamiento AF-IB disminuyó en la sección del íleon, donde presentó la menor actividad respecto a los demás tratamientos. El tratamiento del AF-IV fue similar al grupo testigo (Figura 6).

1.3.2 Pureza de las VMBC

1.3.2.1 Actividad de la Nucleotidasa

A los 7 días se observaron valores de enriquecimiento de 10.9 v/p en el grupo testigo y en el grupo del AF-IB de 11 en duodeno, mientras que el grupo del AF-IV presentó un valor de enriquecimiento de 6.5. En íleon los valores aumentaron en todos los tratamientos los cuales fueron de 10.7, 37.6 y 74 en los tratamientos testigo, AF-IB y AF-IV respectivamente (Cuadro 2).

A los 14 días de edad se observaron valores de pureza en duodeno de 7, 10 y 6 en los grupos testigo, AF-IB y AF-IV respectivamente. De igual manera que a los 7 días de edad los valores aumentaron en todos los tratamientos en la sección del íleon (Cuadro 2).

1.3.2.2 Actividad de la ATPasa Na^+-K^+

A los 14 días de edad la pureza con la actividad de ATPasa Na^+-K^+ fue alta con valores de 30 a 120 v/p, ya que no se recuperó la actividad en el preparado de las VMBC, lo que indica pureza. Sin embargo, en íleon se obtuvieron los valores de 2, 4 y 2 en los tratamientos testigo, AF-IB y AF-IV respectivamente (Cuadro 3). Se observó un fenómeno similar a los 14 días de edad, con valores mayores en duodeno y bajos en íleon.

1.3.2.3 Actividad de las disacaridasas

En el cuadro 4 se muestran los valores de disacaridasas, como la actividad de la maltasa a los 7 días de edad en duodeno con valores de 11.8, 27 y 7.7 de los tratamientos testigo, AF-IB y AF-IV respectivamente. Sin embargo existió una disminución en la actividad a los 14 días de edad, donde se observaron valores de 0.04, 0.60 y 2.00 de la maltasa respectivamente.

La sacarasa no presentó actividad en duodeno a los 7 días de edad para los tratamientos testigo y el F-IB, ya que el tratamiento del AF-IV presentó un valor de 38 v/p. A los 14 días de edad

aumentó abruptamente la actividad de la enzima sacarasa en los tratamientos de los AFs con 860 v/p en el tratamiento del AF-IB y 131.7 en AF-IV y con sólo 5.5 en el testigo.

La actividad de maltasa en ileon a los 7 días de edad mostró mayor actividad en los AFs respecto al testigo. Sin embargo existió una disminución a los 14 días.

La sacarasa en ileon a los 7 días no presentó actividad. Esta se presentó hasta los 14 días, donde fue mayor en el tratamiento con el AF-IV y el grupo testigo respecto al AF-IB.

2) Resultados observados en el experimento II.

2.1 Índice de Conversión

En el presente estudio solo se obtuvieron diferencias en el IC hasta la cuarta y quinta semanas de edad ($p < 0.05$). Donde el tratamiento testigo presentó el IC mayor respecto a los tratamientos de los AF-IB y AF-IV, mientras que a la sexta semana no se observó diferencia significativa entre tratamientos (Figura 8).

2.2 Peso corporal

En este experimento, no existió diferencia ($p > 0.05$) entre los PC de los dos grupos a los días 1, 7, 14, 21, 42 y 49 de evaluación (Figura 7). Sólo a los 28 días de edad el grupo tratado con el AF-IB presentó el menor peso y el testigo el mayor peso ($p < 0.05$).

2.2.1 Uniformidad

No se observó modificación en la uniformidad de la parvada con la administración de un AF. A los 21 días de edad presentaron valores de 52.91, 44.59 y 66.66 % en los tratamientos testigo, AF-IB, AF-IV respectivamente (Cuadro 5). A los 35 días de edad se presentaron los valores más altos de uniformidad en todos los tratamientos con 70.14, 61.64 y 70.42% en los tratamientos testigo, AF-IB, AF-IV respectivamente, donde los valores se acercan bastante al 80% que es aceptados como bueno.

2.3 Tránsito gastrointestinal

En el cuadro número 6 se muestran los resultados del tiempo de tránsito gastrointestinal, donde se puede observar que a los 10 días de edad la administración del AF-IV provocó un tránsito gastrointestinal significativamente mayor respecto al grupo testigo y con el AF-IB, mientras que a los 15 días de edad los tratamientos con AF provocaron un tránsito significativamente mayor que el testigo. Sin embargo, a los 24 días de edad, no se observa diferencia significativa entre

tratamientos. A los 30 días el grupo testigo y el tratamiento AF-IV muestran mayores tiempos de retención siendo significativamente diferentes al tratamiento AF-IB.

2.4 Rendimiento en canal

No se observaron diferencias significativas en el rendimiento de la canal, pechuga, pierna y muslo entre tratamientos al administrar un alimento funcional (Cuadro 7).

2.5 Pigmentación

No se observó diferencia ($p > 0.05$) entre los niveles de amarillamiento y enrojecimiento en canales enhieladas 24 horas postmortem entre tratamientos adicionados con un alimento funcional (Cuadro 8).

DISCUSIÓN

Cuando se utilizan AF en la alimentación animal, se mejora la productividad de las especies (por ejemplo: ganancia de peso, conversión alimenticia, etc.). Esto se logra al modificar la ecología TGI y al promover el mejor aprovechamiento de los nutrientes de la dieta, además de disminuir la cantidad de microorganismos patógenos en el TGI al generarse un ambiente restrictivo para estos microorganismos.

Los AF tienen la característica de modular varias funciones del sistema gastrointestinal, principalmente por que estimulan la proliferación de la microflora intestinal benéfica^{5,6,13,14,25,58,59}. Las comunidades bacterianas del sistema gastrointestinal son tan poderosas metabólicamente como cualquier otro "órgano" del cuerpo, por lo que una microflora bien desarrollada y funcional, ayudará a mantener la integridad y función del sistema digestivo⁶⁰.

En el periodo inmediato al nacimiento el intestino aumenta en peso más rápidamente que la masa corporal por completo. Este proceso relativamente de rápido crecimiento alcanza un máximo a los 6-8 días de edad⁶¹. En el presente estudio no se observó diferencia en el PRI entre los tratamientos, lo cual pudo ser debido a que los tiempos del desarrollo intestinal se encuentran bien definidos por línea genérica o bien que la microflora benéfica tardó en establecerse en el TGI. Furuse y Yolota⁶² encontraron que el peso intestinal se incrementaba significativamente en los grupos de pollos con microflora intestinal en comparación con pollos libres de gérmenes. Este resultado lo atribuyeron a que la microflora produce ácidos grasos volátiles, los cuales pudieron haber estimulado el crecimiento de la mucosa y por tanto aumentado el peso intestinal. Tamine⁶³ et al, confirma esta hipótesis al observar que los ácidos grasos volátiles producidos a través de la acción de la microflora estimula el crecimiento de la mucosa ruminal.

tratamientos. A los 30 días el grupo testigo y el tratamiento AF-IV muestran mayores tiempos de retención siendo significativamente diferentes al tratamiento AF-IB.

2.4 Rendimiento en canal

No se observaron diferencias significativas en el rendimiento de la canal, pechuga, pierna y muslo entre tratamientos al administrar un alimento funcional (Cuadro 7).

2.5 Pigmentación

No se observó diferencia ($p > 0.05$) entre los niveles de amarillamiento y enrojecimiento en canales enhieladas 24 horas postmortem entre tratamientos adicionados con un alimento funcional (Cuadro 8).

DISCUSIÓN

Cuando se utilizan AF en la alimentación animal, se mejora la productividad de las especies (por ejemplo: ganancia de peso, conversión alimenticia, etc.). Esto se logra al modificar la ecología TGI y al promover el mejor aprovechamiento de los nutrientes de la dieta, además de disminuir la cantidad de microorganismos patógenos en el TGI al generarse un ambiente restrictivo para estos microorganismos.

Los AF tienen la característica de modular varias funciones del sistema gastrointestinal, principalmente por que estimulan la proliferación de la microflora intestinal benéfica^{5,6,13,14,25,58,59}. Las comunidades bacterianas del sistema gastrointestinal son tan poderosas metabólicamente como cualquier otro "órgano" del cuerpo, por lo que una microflora bien desarrollada y funcional, ayudará a mantener la integridad y función del sistema digestivo⁶⁰.

En el periodo inmediato al nacimiento el intestino aumenta en peso más rápidamente que la masa corporal por completo. Este proceso relativamente de rápido crecimiento alcanza un máximo a los 6-8 días de edad⁶¹. En el presente estudio no se observó diferencia en el PRI entre los tratamientos, lo cual pudo ser debido a que los tiempos del desarrollo intestinal se encuentran bien definidos por línea genérica o bien que la microflora benéfica tardó en establecerse en el TGI. Furuse y Yolota⁶² encontraron que el peso intestinal se incrementaba significativamente en los grupos de pollos con microflora intestinal en comparación con pollos libres de gérmenes. Este resultado lo atribuyeron a que la microflora produce ácidos grasos volátiles, los cuales pudieron haber estimulado el crecimiento de la mucosa y por tanto aumentado el peso intestinal. Tamine⁶³ et al, confirma esta hipótesis al observar que los ácidos grasos volátiles producidos a través de la acción de la microflora estimula el crecimiento de la mucosa ruminal.

En el presente estudio, la administración (durante las 2 primeras semanas de vida) de AF (AF-IB y AF-IV) en pollos de engorda, estimuló un mayor desarrollo de las vellosidades duodenales a los 7 días de edad, mientras que a los 14 días de edad las vellosidades del íleon en los grupos tratados con el AF-IB mostraron un mayor tamaño en relación al grupo tratado con el AF-IV.

Los resultados del presente estudio sugieren que la administración del AF-IB genera cambios en la microflora intestinal, esta modulación de las poblaciones intestinales podría generar la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que a su vez nutren al epitelio intestinal, lo cual genera un desarrollo temprano de las vellosidades intestinales. Sin embargo, este efecto en la IMI no se observó en el grupo tratado con el AF-IV, lo cual puede ser atribuido a la dosis utilizada. La inulina bacteriana es una innovación tecnológica desarrollada en el presente estudio y esta es la primera vez que se utiliza en aves, se utilizó a dosis bajas y se observaron problemas en el mezclado por el tipo de presentación. Tal vez por el mismo motivo no existió diferencia estadística de ambos AF con el grupo testigo en desarrollo de las vellosidades en íleon. La consecuencia de diferencias también puede ser atribuido por el corto tiempo de observación ya que Nava²⁰ observó vellosidades más largas a los 20 días utilizando un AF adicionado con un prebiótico. Al ser la primera que se utiliza en aves, no existen punto de comparación, por lo que se sugieren efectuar futuros estudios para comparar y desarrollar la concentración de la dosis adecuada, además se observaron problemas en el mezclado por el tipo de presentación.

La pared intestinal es la única barrera física entre el medio interno y externo. Su función es metabolizar los nutrientes y eliminar aquellos que no lo son, como también los componentes tóxicos o patógenos. En este órgano se lleva a cabo la digestión mucosa, a través de un sistema de hidrolítico llevados a cabo por las enzimas ancladas al borde del cepillo³⁸. Los pollos comparados con los mamíferos poseen una alta capacidad de degradar los disacáridos en la mucosa intestinal inmediatamente después de nacer, por poseer el complejo maltasa-sacarasa. En el presente estudio de las VMBC se observó una mayor actividad enzimática de sacarasa en duodeno a los 7 días de edad y en íleon a los 14 días de edad en los pollos alimentados con el AF-IV. Una mayor actividad de la maltasa fue observada en íleon a los 7 días de edad y una mayor actividad de sacarasa en duodeno a los 14 días de edad en pollos alimentados con el AF-IB. Estos resultados son similares a lo reportado por Sklan *et al*⁴⁸ quienes observaron actividad de maltasa en pollos a los 20 y 40 días de edad. Sin embargo, la actividad registrada en sus trabajos fue de 21.64 glucosa $\mu\text{g prot min}^{-1}$ duodeno y de 19.32 glucosa $\mu\text{g prot min}^{-1}$ en íleon, lo cual difiere a lo observado en este trabajo y pudo deberse a la diferencia de edad. Varios investigadores reportan que la mayor actividad enzimática de la maltasa se lleva a cabo en el duodeno, seguida por la producción en íleon, con la actividad reportada como la más baja en

yeyuno. Sin embargo, De la Horra *et al*⁶⁶ reportaron que la actividad de sacarasa fue mayor en íleon que en duodeno en pollos de 10 semanas de edad. Vázquez *et al*⁶⁵, reportan que al utilizar las VMBC encontraron actividad enzimática de sacarasa en yeyuno en pollos a los 2 días de edad. Torras *et al*⁶⁶, observaron actividad de la sacarasa desde la primera semana de edad en yeyuno. Cano también aisló VMBC en yeyuno de pollos de 4 a 6 semanas de edad donde observó actividad de la sacarasa.

La mayoría de los estudios reportados con las VMBC han utilizado el yeyuno para sus preparaciones, lo cual hizo difícil encontrar puntos de comparación para este estudio. En el presente estudio se decidió evaluar el duodeno por ser la sección donde existen altas concentraciones de enzimas digestivas y el íleon por ser la sección que recibe el reflujo presente en el pollo proveniente de los ciegos y de la cloaca.

Al aislar las VMBC es necesario conocer el nivel de pureza de estas, para presentar un grado de confiabilidad en los resultados reportados de su actividad enzimática. Sin embargo, ninguna de las referencias consultadas menciona un nivel de pureza como mínimo para acreditar o desacreditar las lecturas de actividad enzimática reportada por las VMBC. En general, los datos reportados establecen como 8 v/p como bueno y como 10 v/p como excelente cuando se trata de actividad de disacaridasas y valores de 1 a 2 v/p cuando se trata de enzimas localizadas en la membrana basolateral. Como en el aislamiento de la VMBC el objetivo es obtener la membrana apical, el nivel 9 v/p está describiendo que se aumentó 9 veces la concentración original del homogenado inicial y por ende los valores muy bajos o nulos en la preparación de las VMBC son una excelente señal de que las MBC no se encuentran contaminadas con las membranas basolaterales. Vázquez⁶⁵ reportó un valor de 5 v/p en la purificación de la VMBC como un indicador de baja contaminación utilizando la ATPasa. Ulrico *et al*, reportó un nivel de 31 v/p con la actividad de la sacarasa. A diferencia de Garriga y Moretó³⁹ que reportaron valores de 9 v/p como buen nivel de pureza. En el presente estudio se obtuvieron niveles de pureza entre 2 y 4 v/p en la actividad de ATPasa en íleon y de 30 a 120 v/p para la actividad en duodeno, lo cual es un indicador de poca presencia de la membrana basolateral en la preparación final de las VMBC. Los valores de nucleotidasa fluctuaron entre 11.0 v/p en el grupo AF-IB hasta 6.5 v/p en el AF-IV en duodeno a los 7 días de edad, lo cual indica poca homogeneidad en el nivel de pureza entre los tratamientos. Lo mismo se observó en la lectura obtenida en el íleon. Los valores bajos de pureza indican poca contaminación, sin embargo esta falta de homogeneidad entre tratamientos puede afectar la interpretación de las lecturas obtenidas de la actividad enzimática de las disacaridasas en los grupos alimentados con un alimento funcional adicionado con un prebiótico. También como indicador de pureza se obtuvieron valores bastante altos (de 11 a 27) en duodeno

con maltasa y en ileon con sacarasa a los 7 y 14 días de edad respectivamente en el presente estudio. Sin embargo, la actividad de la maltasa a los 14 días de edad no mostró valores satisfactorios de pureza en el preparado final, ya que los valores no fueron bajos. Otro problema observado en el presente estudio fue la falta de homogeneidad de la pureza entre los tratamientos. Esta leve contaminación puede estar relacionada al proceso de adaptación de la técnica, ya que la técnica esta dirigida a extraer VMBC del epitelio intestinal del conejo.

Según Max *et al*⁵⁵, para obtener una mayor purificación del preparado final de las VMBC es necesario dietar a los pollos por lo menos una hora antes del sacrificio, manejo que no se realizó en este ensayo y pudo verse asociado a la falta de pureza. También Prabhu *et al*⁴², mencionan que la técnica de Kessler⁵¹ en la cual se basó este trabajo no es la adecuada para obtener membranas del intestino de pollo, ya que presenta muchas dificultades para obtener niveles altos de pureza, lo cual fue observado en el presente estudio. Las técnicas usadas para el aislamiento de las VMBC del pollo han sido adaptadas con pocas modificaciones de los métodos desarrollados por Foster y citadas por Dávila⁶⁶ para el aislamiento de organelos de la mucosa intestinal de rata, así como trabajos reportados por Crane⁶⁷ realizados en conejos. Lo cual causa dificultades en la obtención de VMBC en otras especies como pollo⁵⁵. Actualmente se están desarrollando técnicas para la obtención de estas membranas en cada una de las especies, para conocer sus procesos y mecanismos de digestión y absorción, donde el aislamiento de las VMBC sea más práctico y con altos niveles de pureza. Una propuesta para cumplir con los puntos antes mencionados es el realizado por Prabhu⁴², sin embargo de nuevo sus modelos experimentales son la rata y el conejo.

Soriano⁴⁶ utilizó la técnica de Kessler⁵¹ como técnica estándar para el aislamiento de las VMBC en pollos, en la cual utilizó la precipitación con Mg^+ y reportó que obtuvo buenos resultados. En el presente estudio se decidió utilizar la precipitación con calcio, debido a que varios autores reportaron la comparación del aislamiento de las VMBC precipitadas con Ca^+ y con Mg^+ , concluyendo que las membranas preparadas con calcio son menos contaminadas por la membrana basolateral que las preparadas con magnesio⁴¹.

La administración del AF no generó cambios en la ganancia de peso corporal entre el grupo testigo y los grupos del AF durante todo el desarrollo de la prueba. Sin embargo, la administración del AF-IB mejoró la uniformidad de la parvada al día 28 de edad, con diferencias significativas. Por lo tanto la inclusión de un AF en la dieta adicionado con un prebiótico (IB e IV) no presentan efectos adversos sobre el PC ni tampoco efectos tóxicos.

El TGI tiene la función más importante durante los primeros días de vida del pollo, ya que es el órgano proveedor de todos los nutrientes para el desarrollo del individuo. Particularmente en los pollos de engorda, existe el concepto universal de que “un buen inicio significa un bien final”, y bajo este esquema, la uniformidad del peso corporal es un excelente indicador de la salud y el manejo de la parvada. Además, en las plantas de procesamiento automatizadas, la uniformidad juega un papel primordial en la línea de producción. Sin embargo, la selección genética y algunas prácticas de manejo influyen negativamente en la uniformidad, unos de los ejemplos más comunes, es la combinación de huevos fértiles de lotes de reproductoras (diferentes edades) en la planta incubadora²⁰.

Estudios manométricos en mamíferos ha demostrado que después de la ingestión de carbohidratos fermentables (como la inulina) o la infusión rectal de lactosa o AGCC, se presenta una disminución en el tono gástrico, permitiendo un mayor volumen de expansión.⁸⁸

En el presente estudio, se observó que la administración de un AF-IV aumentó el TTGI al día 10 de edad. También se observó que la administración de AFs (IB e IV) aumento el TTGI significativamente a los 15 días de edad. Sin embargo, a los 24 días de edad todos los tratamientos presentaron TTGI similares. A los 30 días de edad el grupo testigo y el AF-IV presentaron un mayor TTGI. El aumento del TTGI en este estudio, puede estar relacionado con la actividad de la microflora intestinal (número de microorganismos) junto con su metabolismo, debido a que los microorganismos presentes en el TGI pueden liberar como producto final de su metabolismo AGCC , que entran a la circulación portal y pueden estimular a la musculatura del tracto intestinal superior⁶⁸. En las aves alimentadas con un AF el tiempo de retención del alimento TTGI en el sistema intestinal fue mayor en las primeras 2 semanas, es decir, el alimento permaneció por más tiempo en el lumen del sistema gastrointestinal. Fenómeno que permite una mejor digestión física y química de los alimentos (al permitir mayor tiempo de acción de las enzimas endógenas y bacterianas). Lo cual se puede asociar con una mayor absorción de nutrientes a través de la mucosa intestinal.

La administración de un AF suplementado con inulina bacteriana o vegetal, además de estimular un aumento en el TTGI y un mejor desarrollo de la MI (vellosidades más largas), se asocia a una disminución en el índice de conversión a los 28 y 35 días de edad, al comparar estos parámetros con el grupo testigo.

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos al utilizar un alimento funcional respecto al rendimiento en canal de pechuga pierna y muslo, sin embargo, esta es la primera vez que se miden rendimientos utilizando AF en pollos Ross X Ross, por lo

tanto, no existen puntos de comparación para los resultados obtenidos en este trabajo. Se tiene un reporte realizado por Chen *et al*³⁴ quienes obtuvieron rendimientos de 76 y 78.9% en canal a las 6 y 7 semanas de edad en cuatro diferentes cruces de líneas (Arbor Acres x Arbor Acres, Hubbard x Hubbard, Indian River x Indian River , Arbor Acres x Indian River, de igual manera los porcentajes de pechuga, pierna y muslo publicados por Chen *et al*³⁴, fueron de 25 y 26.2% a las 6 y 7 semana en pechuga y 20.5 y 21.0 para pierna y muslo a las 6 y 7 semanas, sin embargo, por ser líneas diferentes a las utilizadas en este trabajo no pueden ser comparadas. Sin embargo, se observaron valores bastante aceptables para su venta en el mercado mexicano.

En la pigmentación final del pollo tampoco se encontraron diferencias, lo cual se puede explicar ya que los datos del crecimiento de las vellosidades intestinales tampoco se encontraron diferencia, al igual que en los pesos intestinales y corporales además de la actividad enzimática. Es importante mencionar que los valores de pigmentación no mostraron diferencia significativa entre tratamientos, observándose valores de amarillamiento mayores a 45 y de enrojecimiento entre 2 y 5, lo cual es indicativo de una excelente pigmentación que cumple los requerimientos comerciales más exigentes en el mercado avícola nacional⁷⁴.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio sugieren que la obtención de las VMBC fue una herramienta útil para evaluar el efecto de un AF en la fisiología de la MI. Esta técnica puede utilizarse en la evaluación de pigmentos, vitaminas, anticoccidianos, etc. lo cual favorecerá tanto el desarrollo de los AF como la evaluación del correcto funcionamiento del TGI, lo cual redituará en un mejor comportamiento productivo.

La caracterización y purificación de las VMBC por medio de la técnica de Kessler no debe ser utilizada en pollos ya que los niveles de pureza no fueron óptimos. Por lo que debe realizarse mayor investigación en técnicas de aislamiento, como las propuestas por Garriaga, ya que las VMBC son fáciles de obtener y pueden proveer valiosa información en esta área.

Tales conocimientos pueden ser aplicados en el estudio y desarrollo de dietas para pollos, donde la biotecnología es una opción viable como sustituto de productos utilizados como promotores de crecimiento con base en antibióticos en la producción animal.

Es necesario realizar mayor número de estudios en la evaluación productiva de dosis de la inulina bacteriana en pollos de engorda.

REFERENCIAS

1. Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2001 oct;4(5):493-9. Review.
2. Franklin A. Current Status of antibiotic resistance in animal production. *Acta Vet Scand* 1999;(suppl)92:23-28.
3. Griggs DJ, Hal MC, Jin YF, Piddock LJ. Quinolone resistance in veterinary isolates of salmonella. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:1173-1189.
4. McKellar Q.A. Antimicrobial resistance a veterinary perspective. *BMJ* 1998;317:610-611.
5. Roberfroid MB. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr* 2000;71(suppl):1660s-1664s.
6. Roberfroid MB. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *J Nutr* 1999;129:1398S-1401S
7. Niness RK. Inulin and oligofructose: what are they?. *J Nutr* 1999;129:1402S-1406S.
8. Rao AV. Dose-Response effects of inulin and oligofructose on intestinal Bifidogenesis effects. *J Nutr* 1999;129:1442S-1445S.
9. Gerdes S. Functional dairy products. France: John Libbey. 2000.
10. Schneeman BO. Gastrointestinal physiology and functions. *Brit Jour Nutrit* 2002;(suppl 2)88:S159-S163.
11. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998;80(suppl 1):S147-S171.
12. Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* 2001;(suppl 2)73:S415-S420.
13. Bruce G, Schiffrin EJ, Reniero R, Mollet B, Pfeifer A, Neeser J. The development of functional foods: lessons from the gut. *Trends Biotechnol* 1999;17(12):492-499.
14. Berg RD. Probiotics, prebiotics or conbiotics. *Trends Microbiol* 1998;89(6):89-92.
15. Ewing WN, Cole DJA. The living gut. Ireland.1994. Contex Publications p.9
16. Dibner JJ, Kitchell ML, Atwell CA, Ivey FJ. The effect of dietary ingredients and age on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. *J Applied Poultry Res* 1996;5:70-77.
17. Croom WJ, Brake J, Coles BA, Havenstein GB, McBride BW, Peebles DE, Taylor IL. Is intestinal absorption capacity rate-limiting for performance in poultry? *J Appl Poultry Res* 1999;8:242-252.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

18. Golian A, Maurice DV. Dietary poultry fat and gastrointestinal transit time of feed and fat utilization in broiler chickens. *Poult Sci* 1992;71:1357-1363.
19. Bi Yu, Hau-Yang T, Wen-Shyg C. Caecal culture enhances performance and prevents *Salmonella* infection in broilers. *J Appl Poultry Res* 1999;8:195-204.
20. Nava MG, Juárez EM, Téllez IG. Efecto de una dieta adicionada con un oligosacárido sintético comercial sobre los cambios morfológicos, de pH en el ciego e invasión a órganos por *E. coli* y *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda de un día de edad. Memorias de XXIV convención anual ANECA, 1999 mayo 5-8; León (Guanajuato.) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1999:200-203.
21. Tellez IG. Endogenous factors and mechanisms that confer resistance to *Salmonella enteritidis* infectivity in the intestinal tract of Leghorn chickens (tesis de doctorado). Texas, U.S.A. College of Veterinary Medicine, Texas A & M University, 1992.
22. Kogut M, Fukata T, Tellez GI, Hargis M. Effect of *Eimeria tenella* infection on resistance to *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with anaerobic cecal flora and feed dietary lactose. *Avian Dis* 1994;38:59-64.
23. Lupton JR, Jacobs LR. Fiber supplementation results in expanded proliferative zones in rat gastric mucosa. *Am J Clin Nutr* 1987;46:980-984.
24. Sigalet DL, Lees GM, Aherne F, Van Aerde JE, Fedorak RN, Keelan M, Thomson AB. The physiology adaptation to small bowel resection in the pig: an integrated study of morphological and functional changes. *J Pediatr Surg* 1990;25(6):650-657
25. Roberfroid MB. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. *Nutr Rev* 1996;54:s38-s42.
26. Vicente SJL. Aspectos básicos sobre la pigmentación en la industria avícola. Diplomado en producción avícola; Módulo III: Alimentación y nutrición de las aves II; 2000 marzo 94-98; México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, FMVZ a través de su División de Educación Continua y el Departamento de Producción Animal: Aves. 2000.
27. Dávila RV. Efecto de la vacuna Nobilis Cox ATM[®] contra la coccidiosis aviar sobre el grado de pigmentación y principales parámetros productivos en pollos de engorda (tesina de licenciatura). México. México(DF). Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
28. Multon JL. Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. España: Acribia, 1988.
29. Arce MJ, Vázquez PC, López CC, Ávila GE. Xantófilas en dietas para pollos de engorda. *Sint Avic* 1990;6:16-18.53.
30. Manual Ross 308. Paret Stock Management Manual. Ross, Aviagen 2001.

31. Dussan GL. La pigmentación, trabajo de equipo. Memorias de la III Jornada Médico Avícola; 1992; México (DF): División de Educación Continua, FMVZ, UNAM.
32. Hamilton PB, Tyczkowski JR. Lutein as model-dihydroxycarotenoid for the study of pigmentation in chickens. *Poult Sci* 1986;65:1141-1145.
33. Fletcher DL, Cason JA. Comparison of two methods for determining broiler processing yield. *Poultry Sci* 1991;1010-1014.
34. Chen TC, Omar S, Schultz D, Dilworth BC, Day EJ. Processing, Parts and Deboning Yields of four ages of broilers. *Poultry Sci* 1987;66:1334-1349.
35. Topping DI, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 2001;81:1031-1064.
36. Sanderson IR, Walker WA. Uptake and transport of macromolecules by intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology* 1993; 104:622-634.
37. Moran ET Jr. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. *J Nutr* 1985 May;115(5):665-74. Review.
38. Sklan D. Development of the digestive tract of poultry. *Poltry Sci J* 2001;57:415-428
39. Garriga C, Moretó M, Planas JM. Hexose transport across the basolateral membrane of the chicken jejunum. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol 41)* 1997; 272:R1330 – R1335.
40. Uni Z. Impact of early nutrition on poultry: Review of presentations. *J Appl Poultry Res* 1998;7:452-455.
41. Berteloot A, Semenza G. Advantages and limitations of vesicles for the characterization and the kinetic analysis of transport systems. *Methods Enzymol* 1990;192:409-37.
42. Prabhu R, Balasubramanian KA. A novel method of preparation of small intestinal brush border membrane vesicles by polyethylene glycol precipitation. *Anal biochem* 2001;289:157-161.
43. Shirazi-Beechey SP, Davies AG, Tebbutt K, Dyer J, Ellis A, Taylor CJ, Fairclough P, Beechey RB. Preparation and properties of brush-border membrane vesicles from human small intestine. *Gastroenterology* 1990;98(3):676-685.
44. Tiruppathi C, Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach HF. Fatty acid – induced alterations in transport systems of the small intestinal brush – border membrane. *Biochem Pharmacol* 1988;37(suppl 7):1399–1405.
45. Cano M, Vázquez M, Ilundáin A. Chloride transport in brush-border membrane vesicles from chick jejunum. *Pflügers Archv* 1993;425:395–400.

46. Torras-Llort M, Soriano-García JF, Ferrer R and Moretó M. Effect of a lysine-enriched diet on L-lysine transport by the brush-border membrane of the chicken jejunum. *Am. J Physiol* 1998;274:R69-R75.
47. Iji AI, Saki A, Tivey RD. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 3. Development and characteristics of tryptophan transport. *Br Poultry Sci* 2001;42:523-529.
48. Sklan D, Meir D, Noy Y. Chick small intestine brush border contains lipase and phospholipase activity. *Brit Poult Sci* 1999;40:392-396.
49. Eichholzand A, Crane R K. *J Cell Biol.* 26, 687 (1965).
50. Schmitza J, Preiser H, Maestracci D, Ghosh BK, Cerda JJ, Crane RK. Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim et Biophys Acta* 1973;323:98–112.
51. Kessler M, Acuto O, Srorelli C, Murer H, Müller M, Semenza G; A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. *Biochim et Biophys Acta* 1978;506:136-154.
52. Keljo JD, MacLeod RJ, Perdue MH, Butler DG, Hamilton JR. D-Glucose transport in piglet jejunal brush-border membranes: insights from a disease model. *Am J Physiol* 1985;249(Gastrointest Liver Physiol 12):G751-G760.
53. Alcalde IA, Sorribas V, Rodríguez-Yoldi MJ, Lahuerta A. Study of serotonin with brush border membrane of rabbit jejunum enterocytes. *Eur J of Pharmacol* 2000;403:9-15.
54. Maenz DD, Classen LH. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poultry Sci* 1998;77:557-563.
55. Max EE, Goodman BPD, Rasmussen H. Purification and characterization of chick intestine brush border membrane. *Biochim et Biophys Acta* 1978;511:224–239.
56. De la Horra MC, Calonge ML, Ilundáin AA. Effect of dehydration on apical Na⁺-H⁺ exchange activity and Na⁺- dependent sugar transport in brush-border membrane vesicles isolated from chick intestine. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 1998;436:112-116.
57. Roberfroid MB. Prebiotics and Synbiotics: concepts and nutritional properties. *Brit Jour Nutrit* 1998;80(suppl 2):S197-S202.
58. Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. *J Nutr Biochem.* 1998;9(12):668-675.
59. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducingthe concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:104-112.
60. Nuotio L, Mead GC. An in vitro model for studies on bacterial interactions in the avian caecum. *Lett Appl Microbiol.* 1993;17:65-67.
61. Noy Y, Sklan D. Metabolic reponses to early nutrition. *J Appl Poultry Res.* 1998;7:437-451.

62. Furuse M, Yang SI, Niwa N, Okumura J. Effect of short chain fatty acids on the performance and the intestinal weight in germ free and conventional chicks. *Br Poultry Sci.* 1991;32:159-165.
63. Tamime AY. Fermented milks: historical food with modern applications. *Memories: Symposium Danone, Fermented food, fermentation and intestinal flora, México (D.F.); May 17-18, 2001.*
64. Horra MC, Calonge ML, Ilundain AA. Effect of dehydration on apical Na⁺-H⁺ exchange activity and Na⁺- dependent sugar transport in brush-border membrane vesicles isolated from chick intestine. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 1998;436:112-116.
65. Vázquez MC, Rovira N, Ruiz-Gutiérrez V, Planas MJ. Developmental Changes in glucosa transport, lipid composition and fluidity of jejunal BBM. *Am J Physiol* (273) 1997;42:R1086-R1093
66. Dávila V, Nava GM, Diaz A, Lopez-Munguia A, Avila E, Tellez G, Vicente JL, Jarquin RL, Sartor CD, Castañeda MP. Novel approach to evaluate the intestinal mucose function and integrity in avian species. *Poult. Sci.* 83 (10):1811, 2004.
67. Schmitz J, Preiser H, Maestracci D, Ghosh BK, Cerda JJ, Crane RK. Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim Biophys Acta* 1973;323:98-112
68. Ropert A, Cherbut C, Roze C, Le Quellec A, Holst Jj, Fu-Cheng X, Bruley S. Des Varannes, Galmiche JP. Colonic fermentation and gastric tone in humans. *Gastroenterology.* 1996;111:289–296.
69. Dahlqvist A. Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* 1964;7:18-25.
70. Bradford MM; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal Biochem* 72: 248-258, 1976..
71. Nathan N., Aronson Jr and Oscar T; A method of the colorimetric determination of phosphorous; *Science* 100: 413-414, 1944.
72. Massry SG, Hajjar SM, Koureta P, Fadda GZ, Smogorzewski M; Phosphate depletion increases cytosolic calcium of brain synaptosomes; *Am J Physiol* 260 (1 Pt 2): F12-F18, 1991.
73. García ME. Modificaciones del sistema de clasificación climática de Copen para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. México: Talleres off set Iarios, 1998.
74. Marusich WL, Bavnerfeinol ChJ. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors: Technological and nutritional applications. New York: Academic Press Inc. 1981.
75. SAS Institute. SAS/STAT® Guide for the Personal Computers. Version 8.0. SAS Institute Inc., Cary, NC. 1987.

76. National Research Council. Nutrients Requeriments of Poultry. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC,1994.

Cuadro 1.-peso relativo intestinal en pollos de engorda alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiótico.

Grupos	7 días de edad (%)	14 días de edad (%)
Dieta Testigo	36.02 ± 0.55	34.95 ± 1.03
AF- Inulina Bacteriana	37.75 ± 0.81	35.34 ± 0.52
AF-Inulina Vegetal	37.41 ± 0.83	34.88 ± 0.59
	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 12

Para evaluar el peso relativo intestinal como un indicador del desarrollo de la mucosa intestinal en pollos alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiótico, antes del sacrificio se pesó al pollo e inmediatamente después del sacrificio, el tracto intestinal fue separado cuidadosamente a partir de la porción del cardias en la inserción del ventrículo gástrico muscular y hasta su finalización en la cloaca junto con el páncreas sin la Bolsa de Fabricio, se pesó en una balanza digital y se anotó junto al peso corporal correspondiente. Se tomaron los pesos de 18 aves por tratamiento a los 7 días de edad y a los 14 días se pesaron 12 aves por tratamiento.

Las unidades son presentadas en %. Se calculó como peso corporal entre peso intestinal por cien.

Cada valor representa el promedio (%) ± error estándar ($P < 0.05$)

Cuadro 2. Actividad de la nucleotidasa como indicador de la pureza de las VMBC en duodeno e ileon a los 7 y 14 días de edad en pollos alimentados con un alimento funcional.

Grupos	Purificación	Purificación	Purificación	Purificación
	Duodeno	Íleon	Duodeno	Íleon
	7 días de edad		14 días de edad	
	V/P	V/P	V/P	V/P
Dieta Testigo	10.98	10.7	7	11
AF- I Bacteriana	11.0	37.6	10	20
AF- I Vegetal	6.5	74	6	35

La actividad de la nucleotidasa se localiza en la membrana basolateral del enterocito por lo tanto, medir su actividad es un indicador de pureza del aislamiento de la membrana apical. Valores altos sugieren pureza y valores bajos contaminación.

La purificación se mide como la actividad específica de la nucleotidasa (nmolP / mg prot / min) en el homogenado inicial del aislamiento de las VMBC entre la actividad específica de nucleotidasa en el preparado final de las VMBC.

Unidad es igual al número de veces que fue purificada la enzima (veces/purificación)

$n = 6$ aislamientos individuales.

Cuadro 3. Actividad de atpasa na^+k^+ como indicador de la pureza de las VMBC en duodeno e íleon a los 7 y 14 días de edad en pollos alimentados con un alimento funcional.

Grupos	Purificación	Purificación	Purificación	Purificación
	Duodeno	Íleon	Duodeno	Íleon
	7 días de edad		14 días de edad	
	V/P	V/P	V/P	V/P
Dieta Testigo	30	2	28	3
AF- I Bacteriana	120	4	100	5
AF- I Vegetal	38	2	38	3

La actividad de la ATPasa Na^+K^+ se localiza en la membrana basolateral del enterocito por lo tanto, medir su actividad es un indicador de pureza del aislamiento de la membrana apical. Valores altos sugieren pureza y valores bajos contaminación.

La purificación se mide como la actividad específica de la ATPasa Na^+K^+ (nmolP / mg prot / min) en el homogenado inicial del aislamiento de las VMBC entre la actividad específica de ATPasa Na^+K^+ en el preparado final de las VMBC.

Unidad es igual al número de veces que fue purificada la enzima (veces/purificación)
 $n = 6$ aislamientos individuales.

Cuadro 4. Actividad de las disacaridasas (maltasa y sacarasa) como indicador de la pureza de las VMBC en pollos alimentados con un alimento funcional

Grupos	7 días de edad		14 días de edad	
	Maltasa	Sacarasa	Maltasa	Sacarasa
Duodeno (v/p)				
Testigo	11.89	0.00	0.04	5.50
AF-AB	27.03	0.00	0.60	860.00
AF-IV	7.70	38.24	2.00	131.75
Ileon (v/p)				
Grupos	Maltasa	Sacarasa	Maltasa	Sacarasa
Testigo	1.48	0.00	0.24	16.32
AF-AB	2.83	0.00	0.12	6.63
AF-IV	2.06	0.00	1.30	25.86

La actividad de las disacaridasas se localiza en la membrana apical del enterocito por lo tanto, medir su actividad es un indicador de pureza del aislamiento de la membrana apical. Valores altos sugieren pureza y valores bajos contaminación.

La purificación se mide como la actividad específica de las disacaridasas ($\mu\text{g de prot} \cdot \text{min}^{-1}$) en el homogenado inicial del aislamiento de las VMBC entre la actividad específica de las disacaridasas en el preparado final de las VMBC.

Unidad es igual al número de veces que fue purificada la enzima (veces/purificación)
 $n = 6$ aislamientos individuales.

AF-IB: Alimento Funcional adicionado con Inulina Bacteriana

AF-IV: Alimento Funcional adicionado con Inulina Vegetal.

Cuadro 5. Uniformidad en parvadas de pollos de engorda a los 21 y 35 días de edad alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiótico

Tratamiento	21 Días de edad		35 Días de edad	
	Uniformidad (%)	C.V. (%)	Uniformidad (%)	C.V. (%)
Testigo	52.94	11.01	70.14	11.76
AF-Inulina Bacteriana	44.59	12.22	61.64	14.18
AF-Inulina Vegetal	66.66	10.65	70.42	13.51

La uniformidad por los tratamientos se expresó como el porcentaje de aves con pesos corporales dentro de un $\pm 10\%$ de desviación con respecto al promedio. Además, se analizó la variabilidad del peso corporal, a través del porcentaje del coeficiente de variación como medida de uniformidad (Manual Ross 308).

Cuadro 6. Tiempo de tránsito gastrointestinal en pollos de engorda alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiótico

Grupo	10 días de edad	15 días de edad	24 días de edad	30 días de edad
Dieta Testigo	160.3 ± 5.4 ^b	142.8 ± 6.0 ^b	192.6 ± 8.8 ^a	201.3 ± 3.7 ^a
AF-Inulina Bacteriana	151.2 ± 4.38 ^b	174.6 ± 8.1 ^a	180.4 ± 13.5 ^a	169.8 ± 7.7 ^b
AF-Inulina Vegetal	178.1 ± 8.5 ^a	168.9 ± 9.6 ^a	188.6 ± 8.8 ^a	188.8 ± 6.5 ^{ab}
	n=54	n=36	n=36	n=27

El tiempo del tránsito gastrointestinal se determinó mediante la diferencia de la presentación del marcador administrado por vía y la primera observación del marcador en las excretas. Se utilizó óxido férrico (200 mg/ Kg PV) en una cápsula de gelatina que se administró por vía oral registrando el tiempo de administración de cada pollo. Las aves se marcaron y se colocaron en un corral con cama limpia, después de 2 hrs post administración del marcador, los pollos fueron observados continuamente

Valores en minutos. Cada valor representa el promedio ± error estándar. Promedios en la misma columna con diferente literal, difieren significativamente (P<0.05).

Cuadro 7. Rendimiento de la canal, pechuga, pierna y muslo de pollos alimentados con un alimento funcional adicionado con prebiótico.

Dieta	Canal %	Pechuga %	Pierna y Muslo %
Testigo	70.88 ± 0.34	14.30 ± 0.27	21.35 ± 0.43
AF-I Bacteriana	70.35 ± 0.36	13.78 ± 0.21	21.72 ± 0.18
AF-I Vegetal	71.44 ± 0.55	13.88 ± 0.22	21.48 ± 0.37

El rendimiento de la canal se evaluó por medio del pesaje de los pollos antes de salir de la granja (peso vivo) en relación al peso de canales evisceradas después del procesamiento. El rendimiento de pechuga, pierna y muslo se evaluó pesando la pechuga al deshuese, así como la pierna y muslo en relación al peso vivo. Los cuales se expresan como porcentaje.

Los valores son medias ± error estándar $p > 0.05$ con una $n=15$ Los valores son en porcentaje.

Cuadro 8. Valores de pigmentación en canales de pollo 24 hr postmortem provenientes de aves alimentadas con un alimento funcional adicionado con prebiotico.

Dieta	Amarillamiento b*	Enrojecimiento a*
Testigo	45.36 ± 2.74	4.18 ± 3.01
AF-Inulina Bacteriana	47.29 ± 4.31	2.97 ± 2.85
AF- Inulina Vegetal	45.21 ± 4.18	3.92 ± 3.20

Los valores de pigmentación se midieron en el área de la vena de la grasa (apterilo lateral) a los 50 días de edad, se utilizó un colorímetro de reflectancia Minolta (CR-300) con el sistema CIELab que mide las variables de luminosidad (L), enrojecimiento (a*) y amarillamiento (b*). La determinación de la pigmentación se realizó en las canales mantenidas en hielo 24 horas postmortem, en la misma zona (50 días del ciclo de producción).

Los valores son medias ± error estándar $p > 0.05$ con un $n = 15$. Valores con diferente literal son estadísticamente diferentes.

CUADRO 9. DIETA DE INICIACIÓN

Dieta de Iniciación	
Sorgo 9%	573.531
Soya 48%	353.767
Aceite	28.901
Ortofosfato 1820	18.598
Carb. De Ca	15.387
Sal (NaCl)	4.395
Vits y Minerales (Pollo E)	2.500
Metionina	2.091
NR Nicarbacina	0.500
L-Lisina HCL	0.180
Antioxidante	0.150
Total	1000.000
Análisis Calculado	
Prot. Cruda %	22.000
Lisina %	1.200
Met-Cistina %	0.900
Fosforo (Disp.)	0.500
Ac. Linoléico %	1.135
E.M. Aves (MC/Kg)	3.000
Metionina %	0.556
Calcio Total	1.000

CUADRO 10. DIETA DE FINALIZACIÓN

Dieta de Finalización	
Sorgo 9%	610.860
Soya 48%	304.670
Aceite	39.940
Ortofosfato 1820	16.450
Carb. De Ca	13.960
Sal (NaCl)	3.830
Vits y Minerales (Pollo E)	2.500
Metionina	1.818
Pigmento	5.330
Antioxidante	0.150
Cocidiostato	0.5
Total	1000.008
Análisis Calculado	
Prot. Cruda %	20.000
Lisina %	1.048
Met-Cistina %	0.820
Fosforo (Disp.)	0.450
Calcio Total	0.900
E.M. Aves (MC/Kg)	3.100
Metionina %	0.503

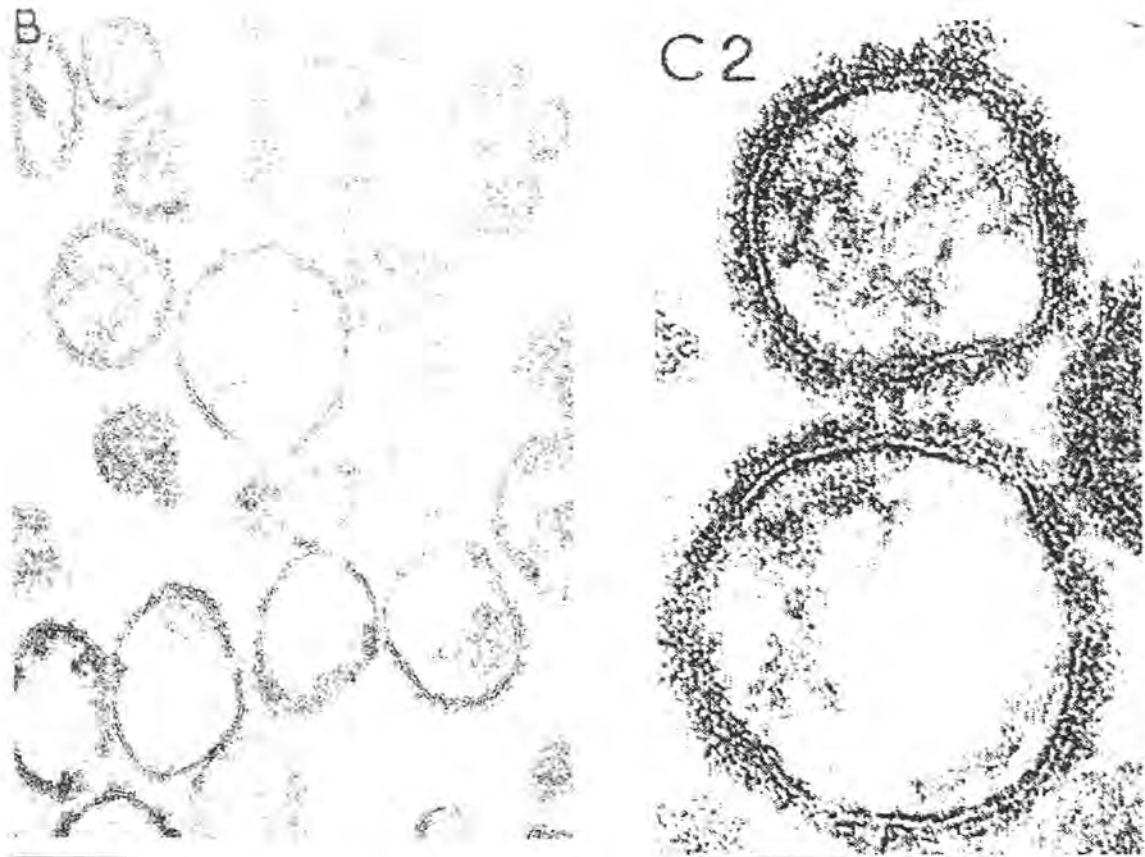


FIGURA 10. VESÍCULAS DE MEMBRANA DEL BORDE DEL CEPILLO

Fotografías tomadas con microscopía electrónica.

B) Colección de vesículas intactas, algunas poseen superficie de membrana lisa, sugiriendo que se removió el material de la membrana que da una apariencia rugosa a la membrana externa. La marca x 115,000 es de 0.1 μm .

C2) Son vesículas con superficie de membrana rugosa teniendo una apariencia de una rueda dentada.

Fotos extraídas del artículo de Schmitza J, Preiser H, Maestracci D, Ghosh BK, Cerda JJ, Crane RK. Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim et Biophys Acta* 1973;323:106

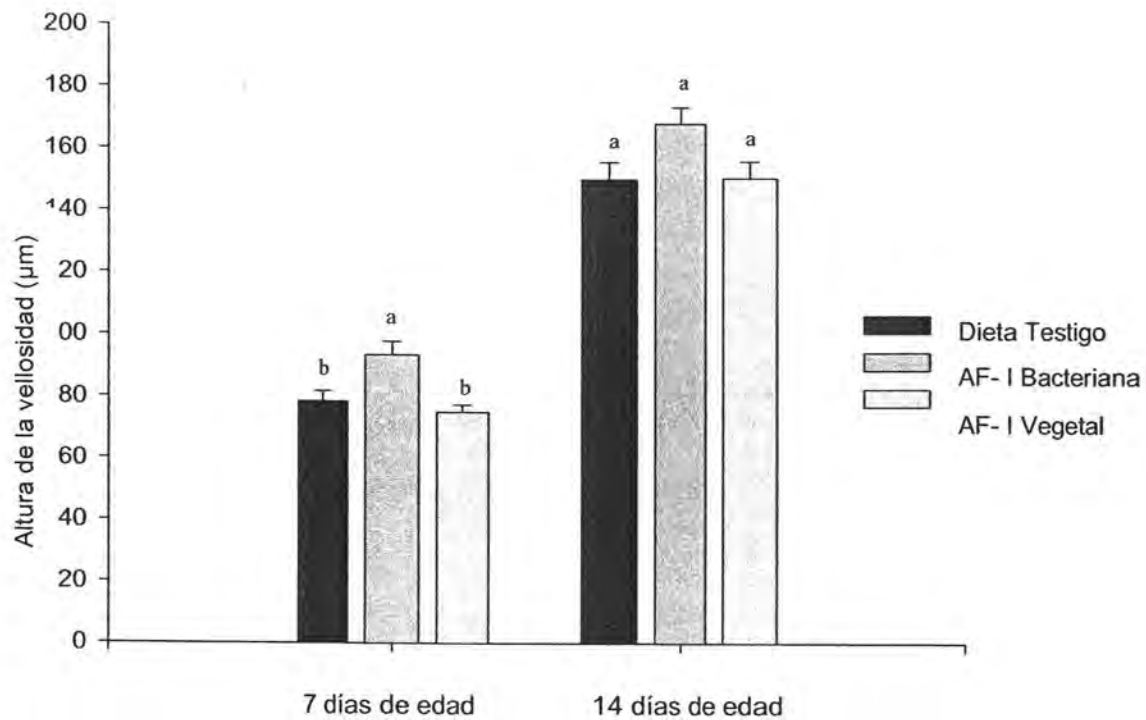


Figura 1.- Efecto de la administración de un AF adicionado con prebiótico (inulina bacteriana e inulina vegetal) sobre el epitelio duodenal de pollos de engorda a los 7 y 14 días de edad.

Cada barra representa el promedio \pm error estándar. Barras con diferente literal, difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

AF: Alimento funcional; I: Inulina

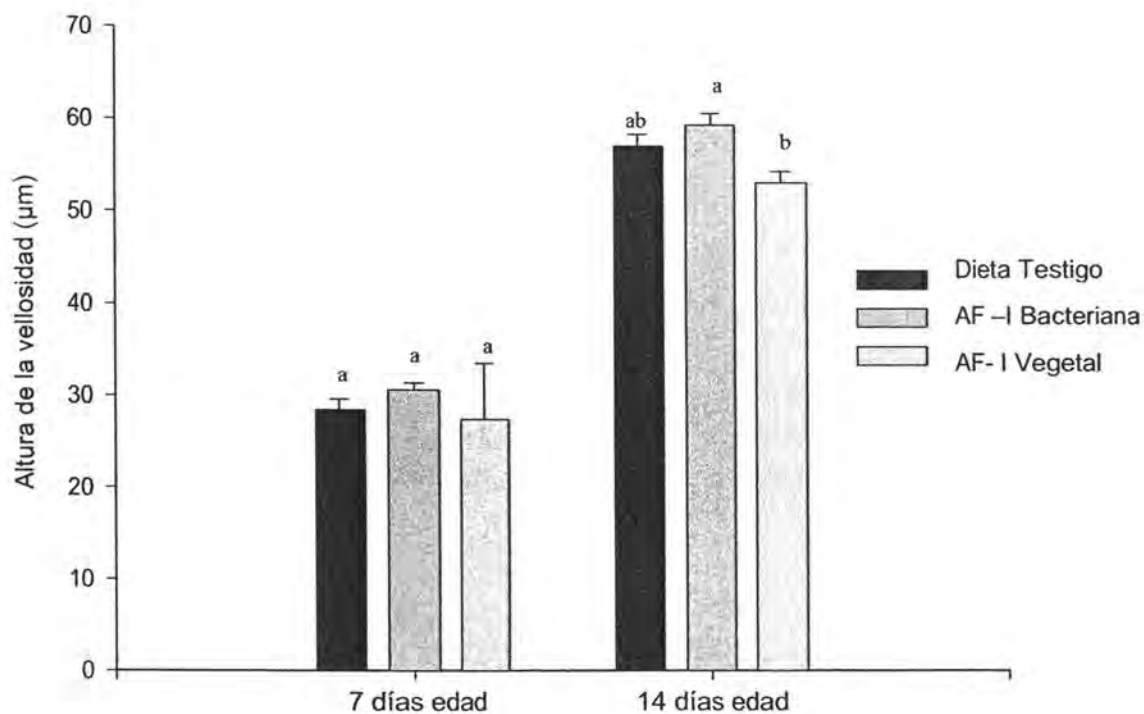


Figura 2.- Efecto de la administración de un AF adicionado con prebiótico (inulina bacteriana e inulina vegetal) en el epitelio del íleon de pollos de engorda a los 7 y 14 días de edad.

Cada barra representa el promedio \pm error estándar. Barras con diferente literal, difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

AF: Alimento funcional; I: Inulina

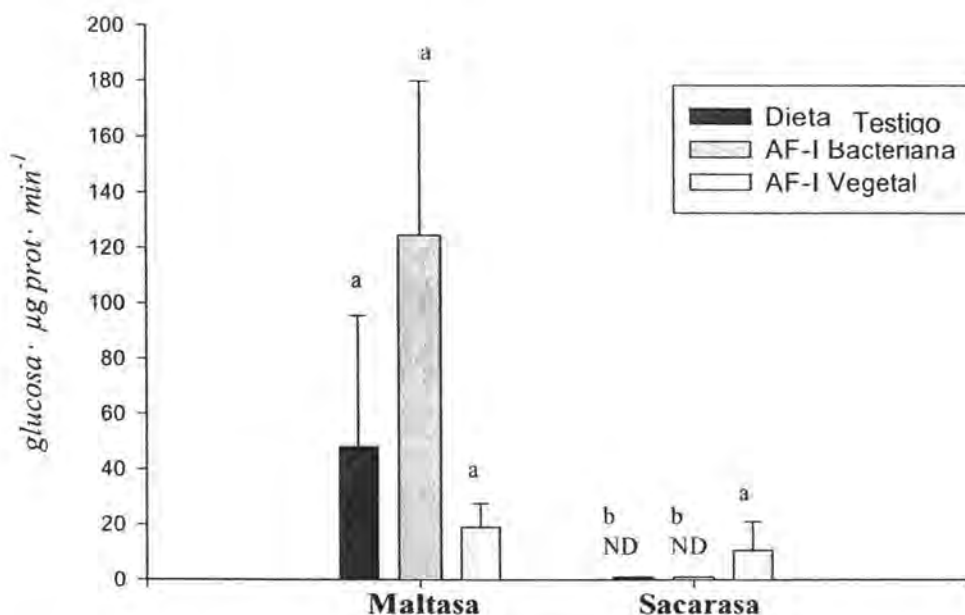


Figura 3.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LA MEMBRANA DEL BORDE DEL CEPILLO DE SACARASA Y MALTASA EN DUODENO DE POLLOS DE 7 DÍAS DE EDAD ALIMENTADOS CON UN ALIMENTO FUNCIONAL ADICIONADO CON PREBIÓTICO.

Se realizaron incubaciones independientes de cada sustrato (maltosa y sacarosa) en las VMBC previamente elaboradas.

n = 12 preparaciones de mucosa individuales, obtenidas de la mezcla del epitelio intestinal de 3 pollos.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar. Barras con diferente literal difieren significativamente ($P < 0.05$).

AF: alimento funcional, I: inulina (prebiótico), ND= Actividad No Detectada.

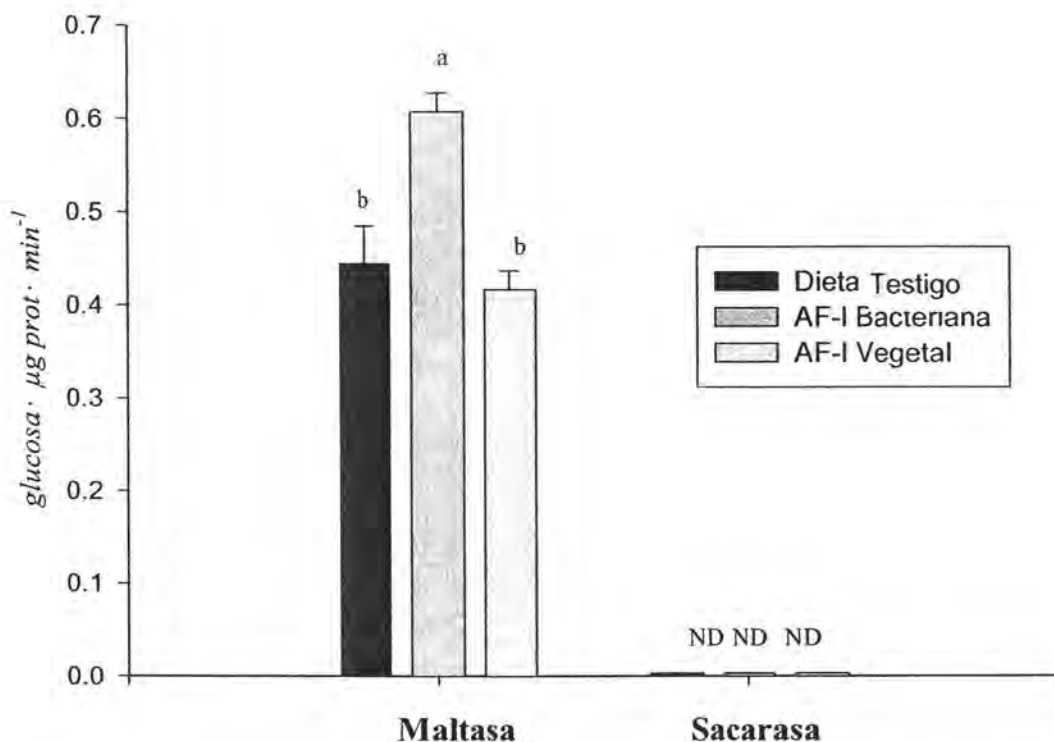


Figura 4.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LA MEMBRANA DEL BORDE DEL CEPILLO DE SACARASA Y MALTASA EN ÍLEON DE POLLOS DE 7 DÍAS DE EDAD ALIMENTADOS CON UN ALIMENTO FUNCIONAL ADICIONADO CON PREBIÓTICO.

Se realizaron incubaciones independientes de cada sustrato (maltosa y sacarosa) en las VMBC previamente elaboradas.

n = 12 preparaciones de mucosa individuales, obtenidas de la mezcla del epitelio intestinal de 3 pollos.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar. Barras con diferente literal difieren significativamente ($P < 0.05$).

AF: alimento funcional, I: inulina (prebiótico), ND= Actividad No Detectada.

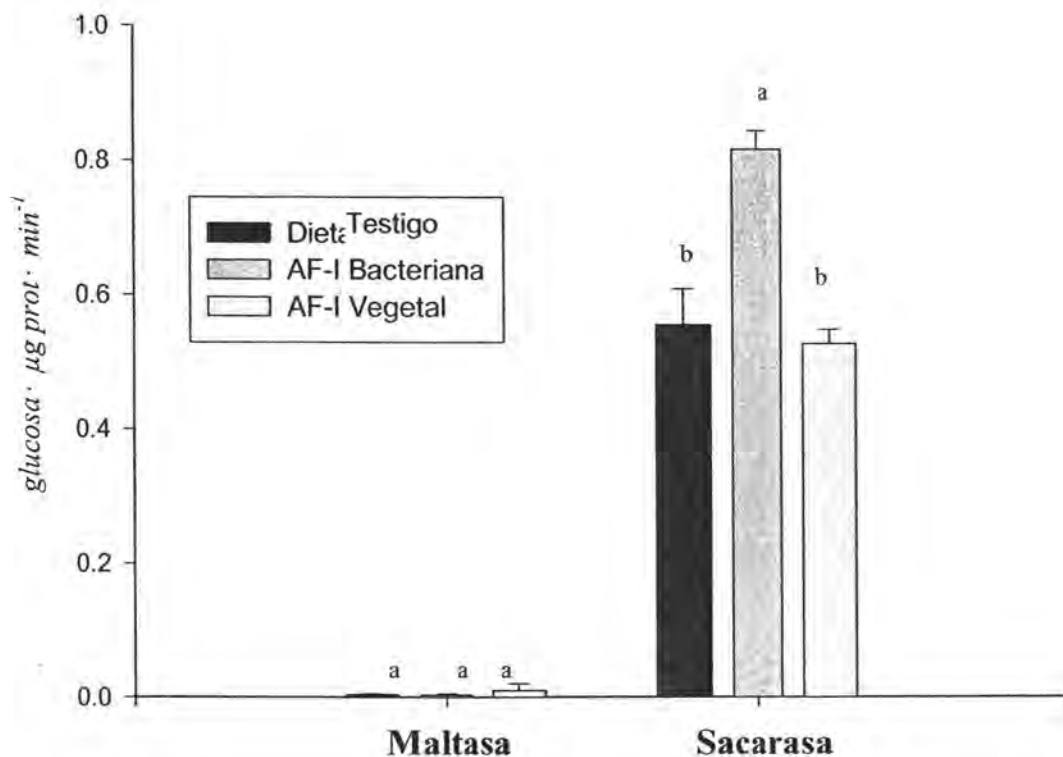


Figura 5.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LA MEMBRANA DEL BORDE DEL CEPILLO DE SACARASA Y MALTASA EN DUODENO DE POLLOS DE 14 DÍAS DE EDAD ALIMENTADOS CON UN ALIMENTO FUNCIONAL ADICIONADO CON PREBIÓTICO.

Se realizaron incubaciones independientes de cada sustrato (maltosa y sacarosa) en las VMBC previamente elaboradas.

n = 12 preparaciones de mucosa individuales, obtenidas de la mezcla del epitelio intestinal de 2 pollos.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar. Barras con diferente literal difieren significativamente ($P < 0.05$).

AF: alimento funcional, I: inulina (prebiótico), ND= Actividad No Detectada.

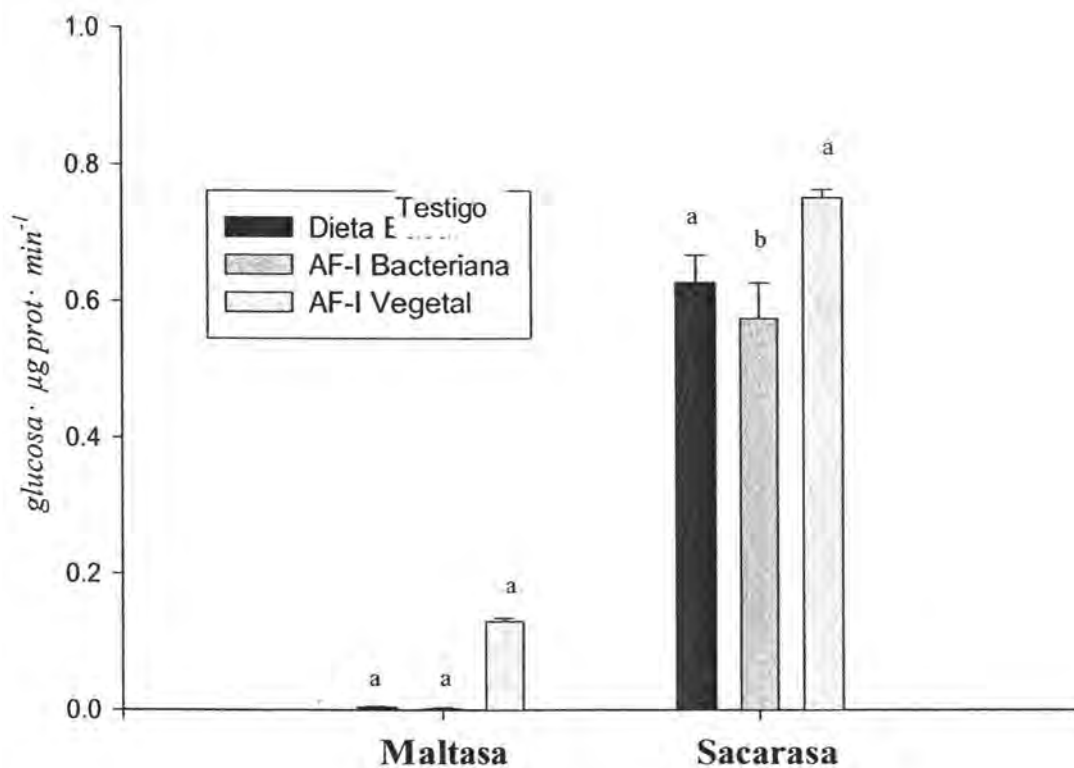


Figura 6.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LA MEMBRANA DEL BORDE DEL CEPILLO DE SACARASA Y MALTASA EN ÍLEON DE POLLOS DE 14 DÍAS DE EDAD ALIMENTADOS CON UN ALIMENTO FUNCIONAL ADICIONADO CON PREBIÓTICO.

Se realizaron incubaciones independientes de cada sustrato (maltosa y sacarosa) en las VMBC previamente elaboradas.

n = 12 preparaciones de mucosa individuales, obtenidas de la mezcla del epitelio intestinal de 2 pollos.

Cada valor representa el promedio \pm error estándar. Barras con diferente literal

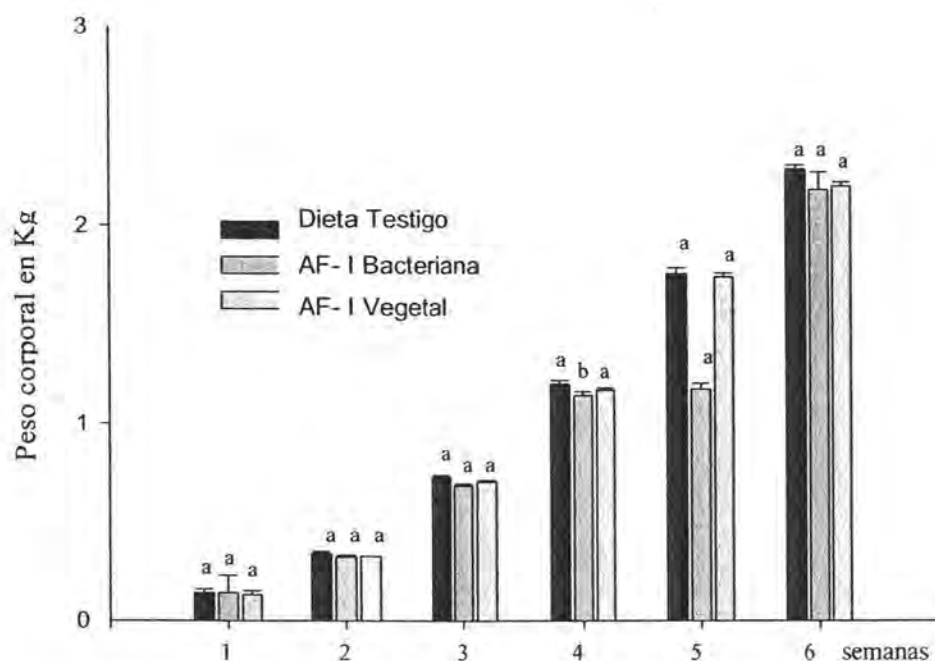


Figura 7.- Efecto de la administración de un alimento funcional adicionado con prebiótico sobre el peso corporal de pollos de engorda alimentados durante 6 semanas de edad.

La dieta fue a base de sorgo-soya formulada de acuerdo a las recomendaciones del NRC 1994. El alimento y el agua fue proporcionado *ad libitum* a todos los grupos.

Cada barra representa el promedio \pm error estándar de 98, 80, 68, 68, 67, y 36 aves a las 1a, 2a, 3ra, 4a, 5a, y 6a semanas de edad respectivamente. Barras con diferente literal difieren significativamente ($P < 0.05$).

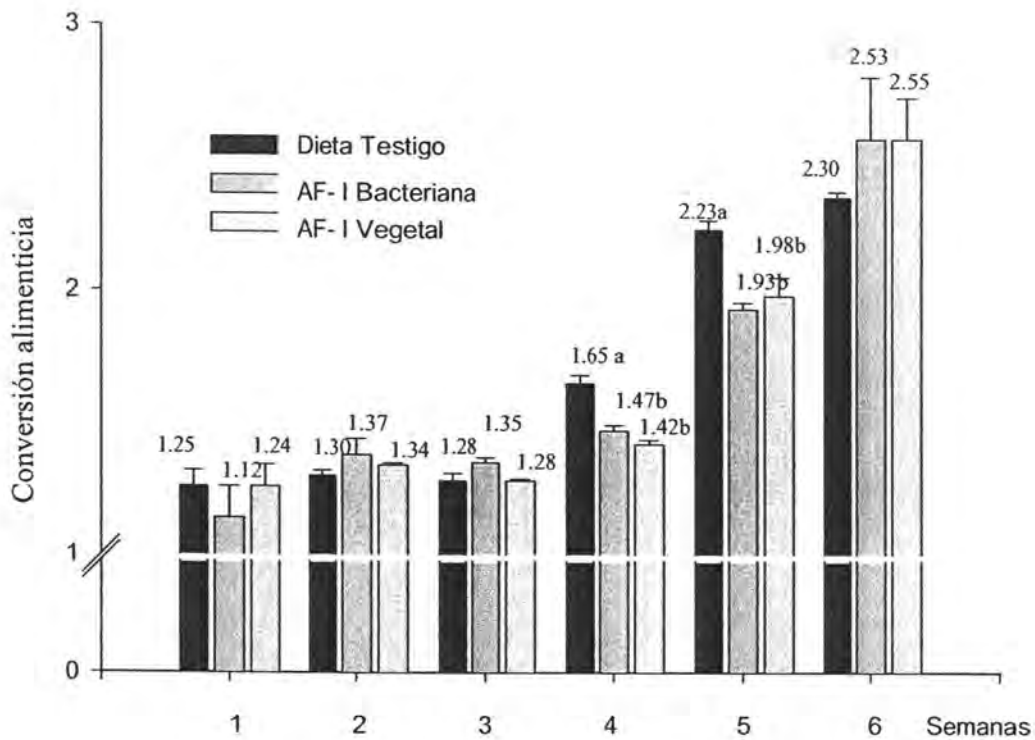


Figura 8.- Efecto de la administración de un alimento funcional adicionado con prebiótico en el índice de conversión alimenticia en pollos de engorda por un periodo de 6 semanas de edad.

Cada barra representa el promedio \pm error estándar de 98, 80, 68, 68, 67, y 36 aves a las 1a, 2a, 3ra, 4a, 5a, y 6a semanas de edad respectivamente. Barras con diferente literal difieren significativamente ($P < 0.05$).

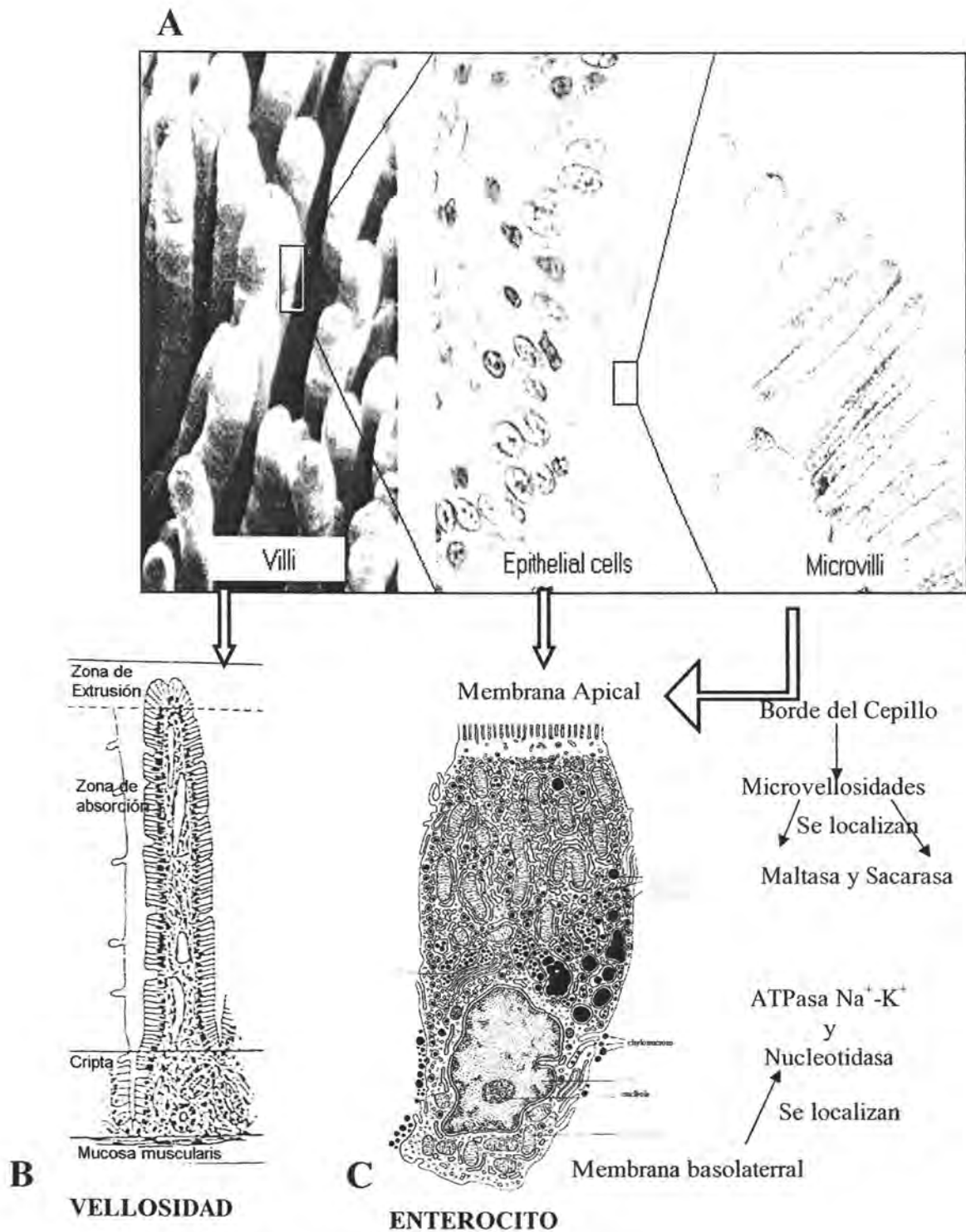


FIGURA 9. ANATOMÍA DEL EPITELIO INTESTINAL

La mucosa del epitelio intestinal presenta vellosidades (A) que aumentan la superficie de absorción. La vellosidad esta cubierta principalmente por células epiteliales “enterocitos” (B). El enterocito presenta microvellosidades que se proyectan hacia la luz intestinal (C). En el enterocito se llevan a cabo varias funciones, entre las que se encuentran las mediadas por las enzimas disacaridasas (maltasa y sacarasa) localizadas en el borde del cepillo, además de la nucleotidasa y la ATPasa Na⁺K⁺ localizadas en la membrana basolateral, entre otras.

ANEXO

CARACTERIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA DEL BORDE DEL CEPILLO EN POLLOS DE ENGORDA

OBTENCIÓN: Las aves fueron sacrificadas por dislocación cervical, para tomar con delicadeza el intestino, la muestra de duodeno correspondió únicamente al asa que contiene el páncreas y cómo íleon se tomó del divertículo de Meckel a la unión ileocecal. Estas secciones fueron inmersas inmediatamente en una solución de NaCl 0.15M en frío, ya que todo el proceso debe realizarse en cadena fría de 4°C. Después los intestinos fueron abiertos longitudinalmente con tijeras y enjuagados 3 veces por inmersiones con NaCl 0.15M, para eliminar el contenido intestinal. Posteriormente cada intestino fue colocado en una caja de petri dentro de una tina con hielo para raspar las mucosas de los intestinos con dos portaobjetos, con un portaobjetos se sostuvo el intestino mientras que con el otro se realizó el raspado. La mucosa obtenida fue colocada en papel aluminio y congelada (a la edad de 7 días se colocaron 3 raspados de diferentes intestinos para formar una muestra "una mezcla" y a los 14 días de edad sólo se utilizaron dos intestinos de 2 pollos para la mezcla). Porque en ambas edades no se obtiene suficiente muestra con un solo individuo.

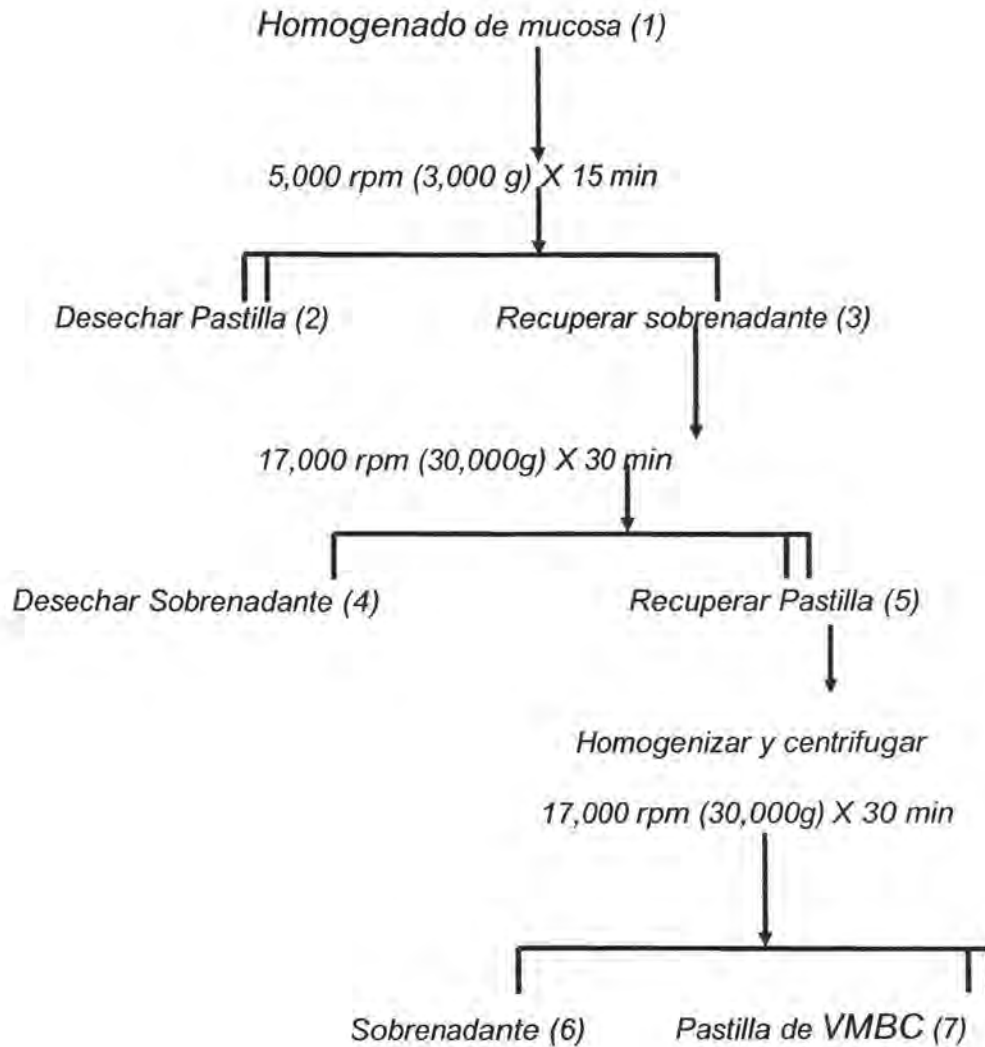
Elaboración:

Se prepararon las siguientes soluciones 1) Manitol 300mM con Tris 12mM a pH 7.1, 2) Tris 10mM a pH 7.1 y 3) Manitol 300mM con 50mM HEPES a pH 7.5.

En el laboratorio se procesaron 6 muestras al mismo tiempo, colocando 6 vasos de precipitado en una caja de unicel con hielo (para mantener la cadena fría), cada una contenía 70 ml de la solución 1 a la cual se le agregó una muestra de la mucosa obtenida, se homogenizaron en una licuadora de laboratorio a velocidad máxima por 1 minuto. De esta preparación llamada "homogenado" se tomaron 3 ml para realizar las pruebas de pureza (ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, nucleotidasa y disacaridasas).

Al resto de la preparación se le agregó CaCl_2 10nM a cada vaso y se homogenizó de nuevo por 1 min por medio de balas magnéticas. Se dejó reposar 15 min para posteriormente centrifugar como se muestra en el diagrama 1.

Diagrama 1.



La pastilla 5 fue homogenizada en la solución 2. La homogenización de las pastillas se realizó 10 veces con la ayuda de una jeringa de 10 ml adaptada con una sonda esofágica pediátrica. Las VMBC fueron suspendidas en la solución 3 para ser almacenadas en congelación (-75°C).

PURIFICACIÓN DE LAS VMBC.

NUCLEOTIDASA

Técnica de Nathan *et al.* Donde se realizaron algunas modificaciones, la preparación de los tubos se presenta en el siguiente cuadro.

PRUEBA DE 5 NUCLEOTIDASA

Tubos	Item	Agua destilada μl	Membranas μl	Mezcla Nucleotidasa
1 - 2	Blanco	650	-----	-----
3 - 4	Membranas	-----	200	450
5 - 6	Mezcla	200	-----	450

Las muestras de las VMBC se incubaron por 30 min con agitación continua a 37°C. Se agregó 250 μl de ácido tricloroacético al 10% a temperatura ambiente y se colocó en hielo. Posteriormente se centrifugó a 3,000rpm X 5 min a 5°C. Finalmente se tomaron 2 ml del sobrenadante y se determinó el Pi (ortofosfato) como menciona Summs, 1944. Únicamente se mezclan los reactivos en Vortex y se leen a 680nm. Véase siguiente cuadro.

CURVA PARA MEDIR Pi

Tubos	Agua destilada	H_3PO_4 (0.01 mM)	Molibdato + H_2SO_4	Muestra	$FeSO_4$ μl
1 - 2	3.6 ml	-----	500 + 500 μl	----- --	400
3 - 4	3.5 ml	50 μl	500 + 500 μl	----- --	400
5 - 6	3.5 ml	100 μl	500 + 500 μl	----- --	400
7 - 8	3.3 ml	200 μl	500 + 500 μl	----- --	400
9 - 10	3.2 ml	400 μl	500 + 500 μl	----- --	400
11 - 12	2.8 ml	800 μl	500 + 500 μl	----- --	400

EXPERIMENTALES

Tubos	Agua destilada	H_3PO_4 (0.01 mM)	Molibdato + H_2SO_4	Muestra	$FeSO_4$ μl
1 - 2	3.4 ml	----- --	500 + 500 μl	200 μl	400
3 - 4	3.4 ml	----- --	500 + 500 μl	200 μl	400

5 - 6	3.4 ml	----- --	500 + 500 µl	200 µl	400
7 - 8	3.4 ml	----- --	500 + 500 µl	200 µl	400

ATPasa Na⁺/K⁺

Técnica de Massry et al (1991), a la cual se le agregó el reactivo de Ouabaina, como muestra el siguiente cuadro.

Prueba de ATPasa

Grupo	Tubos	Muestras	Solución A	Ouabaina (1 mM)	Solución B
1	1 - 2	400 µl	700 µl	100 µl	-----
1	3 - 4	400 µl	-----	-----	800 µl
2	5 - 6	400 µl	700 µl	100 µl	-----
2	7 - 8	400 µl	-----	-----	800 µl
3	9 - 10	400 µl	700 µl	100 µl	-----
3	11 - 12	400 µl	----- --	-----	800 µl
4	13 - 14	400 µl	700 µl	100 µl	-----
4	15 - 16	400 µl	-----	-----	800 µl
5	17 - 18	400 µl	700 µl	100 µl	-----
5	19 - 20	400 µl	-----	-----	800 µl
6	21 - 22	400 µl	700 µl	100 µl	-----
6	23 - 24	400 µl	----- --	-----	800 µl

Las VMBC se preincubaron por 5 min a 37 °C y se adicionó a cada tubo 4 µl de ATP, se incubó 10 min a 37°C. La reacción se detuvo con ATC al 10% después se centrifugó a 5,000 rpm X 5 min. Se tomó 400 µl del sobrenadante para determinar el Pi. El cual se determinó de la misma manera que la técnica de nucleotidasa.

La lectura de proteína se realizó según la técnica de Bradford (1976) por fotocolorimetría, modificando las cantidades del tubo problema a 12 µl en vez de 25 µl de muestra y a 38 µl en vez de 25 µl de agua destilada más los 2.5 ml de solución Bradford.

DISACARIDASAS.

Se basó en la técnica de Dahlqvist para lo cual se tomaron 100 µl de la preparación de las VMBC, al igual que del homogenado inicial y se colocaron en tubos ependorf de

1.5 ml. Esto facilitó el realizar varias lecturas de una misma muestra. A estas muestras se les agregó 100 µl del sustrato de interés, es decir maltosa o sacarosa. Se dejó incubar 60 min a 37 °C, posteriormente se les agregó 800 µl de agua destilada a cada tubo; para sumergirse en agua hirviendo 2 min y después en agua fría un minuto. Para detener la acción enzimática. Cada tubo fue mezclado con vortex para después tomar 125 µl que fueron colocados en otro tubo al cual se le agregó 750 µl de TGO (Dahlqvist,1964). De nuevo se mezcló con vortex y se dejó incubar a 37°C por 30 min. Al término de la incubación se mezclaron en vortex 180 µl de la mezcla incubada que fueron colocados en pozos de placas de Elisa para su lectura.

Al tiempo que se realizó esta prueba se debe de colocar un tubo control (tiempo cero). Además se realizó una curva de diferentes concentraciones de glucosa, la cual fue referencia para realizar la lectura de las muestras analizadas.

El tiempo cero fue compuesto por 900µl de agua destilada con 100 µl del sustrato correspondiente y se incorporó en el paso del agua hirviendo de la técnica antes mencionada.

La curva de glucosa constó de 6 tubos y se encuentra descrita en el siguiente cuadro.

La lectura se realizó en un lector para placas de Elisa a **480 nm**.

CURVA DE GLUCOSA

<i>Glucosa Estandar</i> <i>µl</i>	<i>Tris-Glucosa-Oxidasa</i> <i>µl</i>	<i>Agua Destilada</i> <i>µl</i>
0	750	125
25	750	100
50	750	75
75	750	50
100	750	25
125	750	0