



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION

Y DE LA SALUD ANIMAL

**MODULACION NUTRICIONAL DE LA INMUNIDAD EN POLLO DE
ENGORDA MEDIANTE EL EMPLEO DE UN INMUNOESTIMULANTE**

(PAREDES DE LEVADURAS de *Saccharomyces cerevisiae*)

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

GABRIELA GUADALUPE GÓMEZ VERDUZCO

TUTOR:

ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ

COMITÉ TUTORAL:

CARLOS LÓPEZ COELLO

CARMEN MALDONADO BERNAL



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.

DECLARACIÓN

La tesis es el resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indique lo contrario, dándose reconocimiento a las fuentes de información consultadas. El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

GABRIELA GUADALUPE GÓMEZ VERDUZCO

DEDICATORIAS

A DIOS, desde el día en que nací, no ha cesado de manifestarse en mi vida, sólo con bendiciones, gracias señor por mis padres, hermanos, esposo, hijos, sobrinos amigos y poner en mi camino siempre personas lindas. GRACIAS DIOS POR TODO

A los seres más maravillosos que he conocido, “MIS PADRES”, con gran orgullo, respeto, admiración y amor, quiero agradecerles por darme la vida, por hacer que mi vida al lado de ustedes fuera increíble, pero sobretodo por formarme, amarme y apoyarme en todas mis aventuras. Mi amado Toñito, aunque físicamente ya no estés aquí, nunca te olvidaré, tu recuerdo ha sido una gran motivación para seguir adelante, me siento muy orgullosa de tener un gran padre.

Lupis mi amada madre, y mi gran ejemplo de amor, tolerancia, valentía, honestidad, amabilidad y bondad. Nunca podré agradecerte lo suficiente por todo lo que has dado y por amarme a pesar de mis defectos. Gracias por tu paciencia, amor, dedicación y gran apoyo, soy muy afortunada por tener una madre como tú; te amo y me siento muy orgullosa de ser tu hija.

A mi fan numero 1, mi amado esposo, “Oso” gracias por existir, gracias por ser mi cómplice y acompañarme siempre en cada aventura que se me ocurre, gracias por tu gran apoyo. Gracias por alentarme en los momentos donde desfallecía. Sin ti esto no hubiera sido posible, eres el motor que me impulsa en la vida. Y este logro también es tuyo. Te amo

A mis dos enormes bendiciones, Isabella y Mauricio, gracias por existir, ustedes son mi gran inspiración y mi alegría en la vida, es un honor tener a dos ratitas tan lindas como hijos. Los amo.

A mis hermanos, Queen, Toño, Lilo y Clau por hacer de mi infancia y juventud dos etapas super divertidas e increíbles. Gracias por estar siempre a mi lado, por compartir mis sueños con ustedes, y sobretodo por su apoyo, los quiero mucho y agradezco profundamente a Dios el tenerlos como hermanos.

A mis sobrinos, Ivan, Marquis, Trianis, Milo, Josepo, Pia, Patolín, Palis y Cloclo los quiero con todo mi corazón.

A Meker, Karol y Mirinda por estar siempre con nosotros y brindarme su cariño.

A mis amigos del Depto de Aves: Odette, Tere, Ceci, Norma, Magda, Eli, Rubén, Gary, Néstor, Xóchitl, Juan Carlos, Dr Quintana porque durante la

realización de este trabajo, me pude percatar de su solidaridad, de su apoyo, pero sobre todo muchas gracias por brindarme su amistad.

A mis amigos del CEIEPA: Arturo, Benjamín, Elizabeth, Ezequiel, Tomás, Miguel Ángel, Isaias, Jaime, Pily, Sra Oliva, Sra Irma, Sr. Jorge, muchas gracias ya que, durante el tiempo que realicé pruebas experimentales siempre demostraron gran solidaridad y apoyo.

A todos mis amigos, familiares y personas que siempre me han apoyado, gracias por su apoyo y cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Por ser mi alma mater y además por otorgarme la oportunidad seguir creciendo no solo académicamente sino como ser humano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Por otorgarme una beca que fue un gran apoyo durante la realización de estos estudios.

Al Departamento de Producción Animal: Aves

Por permitirme formar parte de su equipo de docencia y por apoyarme incondicionalmente durante la realización de este trabajo; agradezco profundamente su gran apoyo en mi crecimiento profesional. De manera especial al Dr Néstor Ledesma Martínez jefe del Departamento por todo su gran apoyo.

Al CEIEPAv

Especialmente al Dr Ernesto Ávila González, mi tutor. Mil gracias Dr Ávila por creer en mí y apoyarme incondicionalmente en la realización de este trabajo. Ha sido un privilegio trabajar con usted. ¡Es un gran ser humano!

Al Comité Tutoral

Dr Carlos López Coello y Dra Carmen Maldonado Bernal les agradezco profundamente el caminar a mi lado durante este tiempo, gracias por compartir sus grandes conocimientos y experiencia, para lograr la conclusión de este trabajo. Espero que sigamos trabajando juntos. Sobre todo agradezco su confianza y su gran calidad humana.

A los miembros del Jurado

Dra Camila Arriaga Díaz, Dr Ernesto Ávila González Dr. Antonio Díaz Cruz, Dr Néstor Ledesma Martínez, Dra Irma Tejada Castañeda. Por enriquecer con sus conocimientos y comentarios este trabajo de tesis, pero sobre todo agradezco su enorme confianza y su gran calidad humana.

CONTENIDO

| | página |
|---|---------------|
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL | |
| 1.1 Situación actual de la avicultura | 1 |
| 1.2 Inocuidad Alimentaria | 1 |
| 1.3 Sistema digestivo en las aves | 2 |
| 1.4 Sistema inmune digestivo en las aves | 3 |
| 1.5 Levaduras | 9 |
| 1.6 Paredes de levaduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 9 |
| 2. HIPOTESIS | 10 |
| 3. OBJETIVOS | 10 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 11 |
| 4.1 Diseño experimental | 11 |
| 4.2 Parámetros productivos | 13 |
| 4.3 Amarillamiento y rendimiento en canal. | 13 |
| 4.4 Respuesta Inmune humoral | 13 |
| 4.5 Respuesta Inmune Celular | 15 |
| 4.6 Hematología | 15 |
| 4.7 Histología | 15 |
| 4.8 Conteo de Ooquistes | 15 |
| 4.9 Análisis estadístico | 16 |
| 4. DISCUSIÓN | 17 |
| 5. CONCLUSIONES | 22 |
| 6. REFERENCIAS | 23 |
| 7. ANEXOS | 28 |
| I: Dietary supplementation of mannan-oligosaccharide enhances neonatal immune | |

responses in chickens during natural exposure to *Eimeria* spp.

(Artículo aceptado en *Acta Veterinaria Scandinavica* . 19 marzo 2009. 51:11)

II. Comportamiento productivo y respuesta inmune de pollos alimentados con dietas sorgo-soya con y sin aflatoxina y paredes celulares de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

(Artículo aceptado en *Técnica Pecuaria* será publicado en No. 3 (Jul-sep) del 2009.

1. INTRODUCCION

1.1 Situación actual de la avicultura

La avicultura nacional es importante ya que dentro de las áreas de producción pecuaria, ha sobresalido por ser la más dinámica y tecnificada, siendo la principal industria transformadora de proteína animal de alto valor nutritivo. Al respecto, la avicultura mexicana ha reportado el Producto Interno Bruto pecuario (PIB) más alto a nivel pecuario, representando en el 2007 el 63.24%, y ha mostrado una tasa de crecimiento promedio anual de 5% en los últimos 5 años, según datos reportados la Unión Nacional de Avicultores (UNA).

Desde 1997 la carne de pollo es la que más consume el mexicano; el consumo per-cápita observado en el 2007 para carne de pollo fue de 25.47 Kg. Así mismo, México es el principal consumidor de huevo en todo el mundo, el consumo per cápita de huevo reportado por la UNA es de 21.6 Kg. En ese mismo año se reporta una producción de 2 682 775 millones de toneladas de carne de pollo y 2 278 477 millones de toneladas de huevo.

En el ámbito mundial México ocupa la quinta posición como país productor de carne de pollo, y huevo. (UNA 2008).

La carne de pollo es un alimento importante en la dieta de los mexicanos por ser una excelente fuente de proteína animal, de bajo costo, fresca, gran disponibilidad y ofrecer una variedad de alternativas para su consumo (nuggets, rostizada, frito, cocido, en embutidos, etc.).

Convirtiéndose en un reto para los productores de pollo de engorda la producción de carne, de forma más natural, empleando a nivel nutricional otras alternativas naturales diferentes a los antibióticos como agentes promotores del crecimiento.

1.2 Inocuidad Alimentaria

Este concepto se ha convertido en un tema de gran relevancia e interés a nivel mundial, ya que tiene como objetivo fundamental la seguridad alimentaria para el consumidor. La suplementación de antibióticos a niveles subterapéuticos en el alimento de animales en producción, ha sido un manejo utilizado comúnmente en los sistemas de producción animal, fundamentado por lograr un

incremento en el peso, principalmente en el caso de aves y cerdos. Es por esto que desde 1946 se incluyeron antibióticos promotores de crecimiento (APC) por primera vez en dietas de pollo logrando, una mejora en peso. El mecanismo exacto por el cual estos APC realizan su efecto promotor, es todavía desconocido; sin embargo (*Yokohama, et al., 1982*) se proponen los siguientes mecanismos, 1) la supresión de bacterias patógenas causantes de infecciones subclínicas, lo que favorece la absorción y la utilización de nutrientes por la reducción de enterobacterias patógenas (*Jones and Rickie, 2003*), 2) reducción en la producción de toxinas bacterianas, 3) se favorece la presión selectiva, que permite la elección de cepas bacterianas resistentes a la droga utilizada; en la mayoría de los casos esta selección de resistencia se encuentra codificada de manera genética en plásmidos que pueden ser transferidos a otras bacterias, esto puede ocurrir aun en ausencia del químico con que se está realizando el proceso de presión selectiva (*Barton, 2000*). Las implicaciones de esta presión selectiva originada por los APC han mostrado temor, en el gremio científico y en los consumidores ante la generación de microorganismos resistentes a este tipo de antibióticos en bacterias propias de humanos que consumen proteína de origen animal suplementada con APC. Siendo esta la causa principal por lo que en la Comunidad Europea en el año 2006 se legisla la prohibición total de APC. Esto ha provocado la búsqueda de alternativas diferentes con el fin de encontrar beneficios similares a los que se obtienen la utilización de los APC.

1.3. Sistema Digestivo en las Aves.

El concepto anteriormente utilizado del sistema digestivo como un sistema meramente metabólico ha evolucionado, ya que desarrolla otras funciones diferentes a la digestión, absorción y metabolismo de los nutrientes. El tubo digestivo representa, un punto de reunión para expertos en disciplinas como, la clínica, zootecnia, nutrición, inmunología y bioquímica, etc. Por lo tanto es importante lograr un conocimiento más profundo de su estructura, composición, funcionamiento e interacciones (*Kleasing, 1998*).

El tubo digestivo es también la puerta de entrada que utilizan gran cantidad de agentes etiológicos de impacto económico en la avicultura como son, bacterias, virus y parásitos; por ejemplo salmonela, reovirus y coccidia solo por mencionar algunos. Además por su tamaño, representa una superficie de interacción constante entre el medio ambiente externo y el ave.

Desde el punto de vista inmunológico, el sistema inmune digestivo, se considera como uno de los más grandes e importantes, (*Muir, 2000*) ya que de todo el cuerpo es el sitio que contiene mayor cantidad de células inmunológicas; por lo tanto, es un lugar donde se realizan de manera diferentes y múltiples funciones efectoras, como la fagocitos, liberación de interleucinas, citotoxicidad, etc. todas estas con el objetivo de mantener un estado saludable.

La estimulación de cualquier función inmune efectora necesita de nutrimentos que aporten el costo energético necesario desarrollar adecuadamente esta repuesta; la falta de conocimiento en este ámbito ocasiona que los nutriólogos solo formulen en base un metabolismo basal. Por esto *Klasing, (2007)* menciona que se deben de formular dietas que puedan aportar el requerimiento energético suficiente para desarrollar una respuesta inmune eficiente.

1.4. Sistema inmune Digestivo en las Aves.

Las estructuras anatómicas en las que se han identificado grandes cantidades de células del sistema inmune digestivo en las aves comerciales son, bolsa de Fabricio (BF), divertículo de Meckel (DM), placas de Peyer (PP), tonsilas cecales (TC), tejido linfoide asociado a intestino (GALT), (*Kajiwara, et al. 2003; Muir, et al. 2000; Schat and Mayers 1991.*) y tonsila esofágica (*Olah, et al. 2003; Nagy, et al 2005*).

Respuesta inmune en el tubo digestivo

Otra de las funciones del tubo digestivo, además de la hidrólisis de las macromoléculas (carbohidratos, proteínas y grasas), es la absorción de nutrientes que atraviesan el lumen intestinal y que posteriormente alcanzarán la circulación sistémica. El tubo digestivo podría considerarse como un ecosistema muy complejo donde, de manera simultánea se realizan funciones endocrinas y defensivas. Estas acciones de defensa tienen como objetivo principal, evitar la penetración y

establecimiento de agentes patógenos. Para ser eficiente en esta función protectora, se describen mecanismos de defensa, los cuales se identifican como mecanismos de resistencia o innatos y mecanismos específicos. (Sanz ML, 2001)

Mecanismos de resistencia o innatos.

Son la primera línea de defensa natural contra microorganismos invasores, su objetivo principal, es restringir la entrada y penetración de microorganismos. Estos mecanismos de resistencia están integrados por el epitelio y la mucosa intestinal, cuya integridad evita la entrada o el establecimiento de agentes patógenos, (Tlaskalová, et al., 2004) además, los cilios los movimientos peristálticos y la producción de moco poseen la capacidad de captar y desplazar partículas extrañas hacia el exterior funcionando como una barrera física. El grado de acidez o alcalinidad (pH) es otro ejemplo de estos mecanismos, así como los péptidos antimicrobianos y las proteínas, como la lisozima que se sintetiza en la base de las criptas intestinales, puede inactivar algunas bacterias gram positivas al degradar sus paredes celulares, (Cummings, et al., 2004). El proceso de inflamación es otro de los mecanismos de resistencia, se caracteriza por un aumento en el flujo sanguíneo en el área afectada y con ello la llegada de numerosas estirpes celulares (heterófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos y células dendríticas) que de manera particular, realizan el proceso de fagocitosis. También existe un aumento en la permeabilidad capilar, lo que permite el paso del complemento, de anticuerpos y otras moléculas presentes en el plasma (Cummings, et al., 2004) como ejemplo, mencionamos a las citocinas proinflamatorias como la IL-1; que la producen los monocitos, los macrófagos y el tejido intestinal y es una de los principales mediadores de la inflamación. Se ha detectado que en los enterocitos de pollo, el chIL-1 RNAm (ácido ribonucleico de tipo mensajero para IL-1 en pollos), se expresa desde el primer día de nacimiento (Bar-shira and Friedman, 2006).

Para que las células del sistema innato puedan realizar las acciones efectoras antes mencionadas, tienen que reconocer un patrón de superficie común y constante, presente en los microorganismos llamado patrón molecular asociado a patógenos (siglas en inglés PAMP's). Entre los más

estudiados se encuentran, el lipopolisacárido, el ácido teicóico, la manosa, el RNA bicatenario característico de virus, etc. Este PAMP, es reconocido por receptores localizados en la superficie de las células del sistema inmune innato, llamados receptores de patrones (siglas en inglés PRR), la interacción entre el receptor y su ligando, desencadena diferentes tipos de respuestas efectoras, dependiendo del tipo celular activado. Dentro de los PRR existe un grupo llamado receptores tipo Toll (siglas en inglés TLR's). En pollos, se ha descrito la presencia de 10 TLR's diferentes (*Akira, 2006; Temperley, et al., 2008*).

Se pueden activar diferentes TLR's con una misma molécula, por ejemplo el zymosan puede activar TLR2 y TLR6 al mismo tiempo. La activación de los TLR's desencadena cascadas de señales intracelulares que culminan con la liberación de citocinas, quimiocinas y con la expresión o sobre expresión de marcadores de superficie (*Iqbal et al., 2005; Stuart M, 2004*).

Mecanismos de defensa específicos.

Se desarrolla cuando el cuerpo del ave está expuesto a un antígeno y construye una defensa que es específica para dicho antígeno además de generar memoria. Estos mecanismos son a través de la respuesta inmune humoral y la respuesta inmune celular.

Respuesta inmune humoral

La inmunidad humoral se sustenta en la producción de inmunoglobulinas o anticuerpos, que producen las células plasmáticas derivadas de la estimulación de los linfocitos B. En general, la respuesta de anticuerpos está dirigida contra antígenos con localización extracelular (*Scott, 2004*)

En pollos de líneas comerciales se han descrito 3 isotipos de inmunoglobulinas; IgY, IgM e IgA, pero en el tracto digestivo de las mismas, sólo se ha detectado la presencia de la IgA (*Dallaol, et al., 2005*).

Como característica de la respuesta inmune humoral en superficies mucosas, se encuentra la producción de IgA. La cual es un isotipo de anticuerpo o inmunoglobulina que a nivel sistémico se detecta en concentraciones muy bajas pero en la bilis y en secreciones intestinales se encuentra de manera abundante, reportándose concentraciones de 3.5-12.0 mg/ml (*Robinson, et al., 2001*). En el

suero su estructura es monomérica y en las secreciones es en forma polimérica (trímeros o tetrámero). Las formas poliméricas pueden transportarse de manera selectiva a través de los epitelios hasta la luz intestinal. Similar a lo señalado en mamíferos, en las aves la IgA también se asocia en forma polimérica, por medio de un elemento de unión y un elemento secretor, este último facilita su transporte a través de la célula epitelial. Sin embargo, una diferencia con los mamíferos, es que la IgA en aves está principalmente como trímero o tetrámero; a diferencia de los mamíferos en los que solo se han descrito formas diméricas. El componente de unión (J) asociado a la IgA de pollo, se identificó utilizando un antisuero que reconocía la cadena J en humanos por lo que se concluye que este componente es muy similar en peso molecular; así como por su contenido de cisteína.

El elemento secretor 34 se identificó, inyectando pollos con IgA monomérica y recuperando IgA dimérica asociada a una proteína, posteriormente se determinó el peso molecular de 80 kDa, el cuál fue similar al peso molecular del componente secretor en humanos (*Weiland, et al., 2004*).

Respuesta inmune celular

En la respuesta inmune celular, los linfocitos T son las células que reconocen y responden de manera específica a los antígenos extraños; para que se realice este proceso de reconocimiento y activación se requiere de la intervención de las células presentadoras de antígeno (CPA) (*Sanz, 2001*).

Los linfocitos T se subdividen en 2 clases, de acuerdo a los marcadores de superficie en su membrana: CD4 (colaboradores o inductores) y CD8 (citotóxicos); para que estos linfocitos puedan realizar sus mecanismos efectores es necesario que las CPA procesen (degraden) y presenten a los antígenos en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad. El complejo principal de histocompatibilidad (CPH), está codificado en una región polimórfica de genes, cuyos productos se expresan en la superficie de diferentes poblaciones celulares en forma de receptor, se sabe que todas las células nucleadas expresan en su superficie moléculas clase I del CPH. Las poblaciones de células denominadas CPA (por ejemplo, células dendríticas, linfocitos B,

macrófagos, células endoteliales) expresan moléculas clase II del CPH (*Dallaol, et al. 2005; Quereshi, et al., 1998*).

De manera interesante y contraria a los mamíferos, se ha encontrado la presencia de una molécula clase IV del CPH en líneas de aves comerciales, la cual le confiere una función co-estimuladora en la respuesta de anticuerpos (*Zekarias, et al., 2002*).

Desarrollo de la respuesta inmune específica en el intestino.

Los antígenos penetran por vía oral alcanzando el lumen intestinal, la superficie intestinal está recubierta por un epitelio simple y continuo; formando parte de este epitelio, se encuentran unas células especializadas en el transporte de macromoléculas, partículas y microorganismos, llamadas células M. Para lograr esta función inmune, las células M poseen gran cantidad de vesículas endocíticas capaces de transportar los antígenos de la superficie apical al polo basal; donde son liberadas, e interactúan directamente con las placas de Peyer, tonsilas cecales, GALT o linfocitos intraepiteliales. Al alcanzar estos sitios, los antígenos sufren un proceso de degradación y presentación a través de moléculas clase I y clase II del CPH. Los linfocitos CD8 reconocen péptidos presentados bajo el contexto del CPH clase I, siendo su función efectora la citotoxicidad (*Guy-Grand, et al., 1991; Telemo et al., 2003*). Los linfocitos CD4 reconocen péptidos presentados en el contexto de moléculas clase II del CPH y su función efectora es la producción de citocinas

La variabilidad en la intensidad así como en el tipo de respuesta desarrollada en el intestino puede deberse a: la naturaleza química del antígeno, la ausencia o presencia de señales co-estimuladoras (por ejemplo CD28-CD80; familia B7) que inducen tolerancia o anergia de células inmunes al patrón de liberación de citocinas que producen las células T inductoras, la genética de las estirpes de aves, así como su relación con otros sistemas como el neuroendocrino.

Ontogenia de células competentes en el GALT en aves

El desarrollo de la función inmunológica es un tema de gran importancia, ya que indica en que momento las células del sistema inmune que integran el GALT llegan a poblar sus sitios en el intestino (*Iji et al., 2001*), pero lo más importante en este tema es, establecer en qué momento estas

células ya son funcionales; y son capaces de responder de acuerdo a su fenotipo y a su función efectora. *Bar-shira and Friedman* (2006) mencionan que el proceso de maduración del GALT ocurre en dos fases, la primera se refiere a la colonización de células CD3⁺ en intestino, al día 4 de edad las glicoproteínas localizadas a nivel transmembranal, utilizadas como marcador de superficie de linfocitos, llegan a su pico máximo de expresión. La evaluación en la capacidad de respuesta de estas células CD3⁺, se realizó midiendo la expresión ARNm (ácido ribonucleico de tipo mensajero) de la Interleucina 2 (IL-2) y del Interferon gamma (INF- γ) demostrando que la IL-2 se expresa desde el primer día de edad en los sitios más distales del intestino (tonsilas cecales). La máxima expresión del ARNm para INF- γ se mostró el cuarto día de edad.

La segunda fase de colonización de células CD3⁺, es durante la segunda semana de edad. Mostrando el duodeno y yeyuno un máximo incremento en su expresión al octavo día; por lo que la colonización y maduración de linfocitos T en intestino se realiza en forma bifásica; la primera fase, involucra tonsilas cecales y colon principalmente y la segunda se realiza en duodeno y yeyuno.

La colonización de linfocitos B se evaluó por la expresión ácido ribonucleico de tipo mensajero de Bu-1, alcanzando el máximo pico de expresión en tonsilas cecales desde el primer día. A partir del sexto día de edad existe un flujo constante de linfocitos B en diferentes sitios del tubo digestivo.

La colonización y maduración temprana del GALT, demostrada en aves, enfatiza su importancia al nacimiento y durante las 2 primeras semanas de vida.

Al revisar la ontogenia en los mecanismos de respuesta innata, *Bar-Shira y Friedman* (2006) evaluaron la expresión de genes para Interleucina 1(IL-1). La expresión de la IL-1, se inicia desde el nacimiento en colon, duodeno y ciego; al segundo día aumenta al doble su expresión, esto puede deberse a que los pollos inician su alimentación y con ello, principia la colonización de bacterias comensales que inducen el aumento de esta citocina inflamatoria (*Kunkel, et al., 2003*)

4. Levaduras

Son hongos unicelulares clasificados genéricamente como levaduras, el *Saccharomyces cerevisiae*, mejor conocida como la levadura de cerveza ha sido utilizada históricamente por el hombre, en la producción de bebidas alcohólicas y para panadería. Es un sistema eucariota, con una complejidad sólo ligeramente superior a la de la bacteria, con un rápido crecimiento y facilidad para aislar mutantes; destaca por la facilidad para trabajar con el ADN. Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite su manipulación con las mínimas precauciones. El *Saccharomyces cerevisiae* SC7 es la especie de levadura aprobada como un microorganismo seguro para su empleo en la alimentación de animales en producción en la Unión Europea (EEC 70/524) .

Paredes de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*

El mayor componente de las paredes de estas levaduras son carbohidratos no digeribles por animales monogástricos; estos azúcares pertenecen al grupo de los oligosacáridos que estructuralmente están formados por unidades repetidas ya sea de un monosacárido o disacárido; (Jamroz, 2002; Swennen, et al., 2006). Las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* son en su mayoría (85 al 90%) oligosacáridos y el 15 al 10% restante son proteínas. Los oligosacáridos pertenecen en su mayoría a los grupos de los β -glucanos y manano-oligosacáridos (MOS). Las paredes celulares de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* (PCL) se postularon como candidato alternativo al uso de los APC (Webstrate, et al., 2002; Patterson and Burholder, 2003). Datos en la literatura muestran que la administración de β -glucanos en modelos murinos demuestran un efecto positivo y adyuvante en la respuesta inmune. (Tsukada, et al., 2003; Susuki, et al., 2001; Harada, et al., 2006; Hida, et al., 2006; Zhonggeum, et al., 2005). Además su utilización en perros reportó un aumento en la actividad de los neutrófilos en respuesta a una vacunación (Swanson, et al., 2002a, 2002b). Por otra parte la suplementación de levaduras completas, fracciones de levaduras y mezclas con probióticos, en dietas para pollos y pavos, (Arce, et al., 2005; Chae, et al., 2006; Solis, et al., 2007; Zhang, et al., 2005; Lee, et al., 2007,) han demostrado mejorar algunos parámetros productivos. Sin embargo sus mecanismos específicos de acción no han sido determinados; se

muestra un efecto positivo en la integridad intestinal, exclusión de microorganismos patógenos y función inmunoestimulante; bondades entre las que destacan, la resistencia a infecciones por *Salmonella* (Guo, 2003).

El objetivo de este estudio fue la inclusión de las PCL de *Saccharomyces cerevisiae*, en dietas sorgo-soya para pollo de engorda y evaluar su efecto productivo e inmunológico.

2. HIPÓTESIS

El uso de paredes de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* en dietas de pollo de engorda con base en sorgo-soya, producen un efecto positivo en los parámetros productivos; así como, en la respuesta inmune.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la adición de las paredes celulares de levaduras de *S. cerevisiae* en dietas base sorgo-soya para pollos de engorda a través de la respuesta inmune humoral y celular, con la finalidad de mejorar los parámetros productivos

Para cumplir este objetivo, se realizaron 3 experimentos en pollo de engorda con tres esquemas diferentes y con objetivos particulares para cada uno de ellos:

Experimento 1.

Objetivos particulares

Evaluar la inclusión paredes celulares de levaduras (PCL) de *S. cerevisiae* y comparar con un antibiótico promotor del crecimiento (Bacitracina cinc) en dietas base sorgo-soya para pollos de engorda a través de la respuesta inmune humoral y respuesta inmune celular con la finalidad de mejorar los parámetros productivos.

Experimento 2.

Objetivos particulares

Evaluar la suplementación de paredes celulares de *S. cerevisiae* en una dieta base sorgo-soya para pollos de engorda contaminada con aflatoxina B1, a través la respuesta inmune humoral y respuesta inmune celular con la finalidad de mejorar los parámetros productivos.

Experimento 3

Objetivos particulares

Evaluar la capacidad de inmuno-estimulante de las paredes celulares de *S. cerevisiae* incluidas en dietas base sorgo-soya para pollos de engorda comparando este efecto con coccidiostato y con vacuna, durante la exposición natural a *Eimeria spp* midiendo la respuesta inmune humoral y respuesta inmune celular con la finalidad de mejorar los parámetros productivos.

4. MATERIAL Y METODOS

Experimento 1.

Comportamiento Productivo e inmune de una parvada de pollo de engorda alimentada con dietas suplementadas con paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*.

Todos los procedimientos que involucraron el uso de animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales (CICUAE FMVZ-UNAM). Se realizó un estudio con pollitos de engorda comerciales, los cuales se alojaron en casetas de ambiente natural, la temperatura de crianza fue disminuida gradualmente iniciando con 32°C, hasta llegar a 21°C el día 28 de edad. El ciclo productivo se realizó en piso con una duración de 49 días. Las dietas empleadas en los tratamientos fueron con base en sorgo-soya se muestra su composición en Cuadro 1. El agua y el alimento se proporcionaron a libre acceso. Se realizó con 432 pollitos mixtos (50% de cada sexo) Ross 308, de 1 día de edad, los cuales se alojaron de manera aleatoria. Se empleó un diseño completamente al azar de 4 tratamientos, con 3 réplicas de 36 pollos cada una. Tratamiento 1: Dieta testigo (iniciación y finalización) sin promotores de crecimiento, Tratamiento 2: Como 1 + PCL 0.05% (Safmanan Safmex, Toluca-México) Tratamiento 3: Como 1 + APC (Bacitracina cinc 30ppm) y Tratamiento 4: Como 1 + 0.05% PCL y 30ppm de APC.

Experimento 2.

Efecto de la suplementación de PCL de *S. cerevisiae* a una dieta sorgo-soya contaminada con aflatoxina B1 sobre los parámetros productivos, respuesta inmune humoral y respuesta inmune celular.

Se realizó un experimento con 144 pollitos mixtos (50% de cada sexo) estirpe Ross 308, de un día de edad, los cuales se alojaron de manera aleatoria en baterías de ambiente controlado Petersime. Se empleó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 2 x 2, cada tratamiento con 6 réplicas

de 6 pollos cada una. Un factor fue con y sin la adición de 0.05% PCL a la dieta testigo de iniciación sorgo-soya y el otro factor con y sin la contaminación con 400ppb de AFBI (400mg/ton). Las aflatoxinas se obtuvieron por contaminación natural de maíz, con *Aspergillus flavus link*; el cual produce aflatoxinas B1 y B2. El material fue cuantificado como aflatoxina total, fue donado por la Unidad de Investigación en Granos y Semillas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Experimento 3.

Capacidad de inmuno-estimulación de las PCL de *S. cerevisiae* adicionadas a dietas sorgo-soya para pollos de engorda con coccidiostato o en pollos vacunados contra coccidiosis, valorando parámetros productivos, respuesta inmune humoral y respuesta inmune celular.

Se utilizaron 840 pollos mixtos de un día de edad estirpe Ross 308, los cuales se distribuyeron en 28 pisos con viruta de madera (30 pollos, mitad hembras y mitad machos) en una caseta experimental de ambiente natural. La temperatura de crianza fue disminuida gradualmente iniciando con 32°C, hasta llegar a 21°C en el día 28 de edad. Las dietas empleadas en cada fase basados en sorgo-soya, iniciación (1 a 21 días de edad) y finalización (22 a 49 días). En los tratamientos se empleó un arreglo factorial 2x2; un factor fueron con y sin adición de PCL y el otro factor la adición de coccidiostato en las dietas o la vacunación contra coccidia. Cada tratamiento contó con 7 repeticiones. Se utilizó en las dietas con coccidiostato (Nicarbazina Helm, Naucalpan, México en la fase de iniciación y Salinomicina Helm, Naucalpan, México en fase de finalización). Los pollos que fueron vacunados individualmente por vía oral con una vacuna comercial contra coccidia el primer día de edad, esta se administró directamente en el buche de acuerdo a las especificaciones del fabricante. (Advent, Viridus Animal Health LLC-Novus International Inc., St Louis, MO)

4.2 Parámetros productivos

Las aves y el alimento se pesaron semanalmente, para obtener datos de la ganancia de peso, el consumo de alimento e índice de conversión. Los datos informados son de 0 a 21 días y de 0 a 49 días de edad en los Experimentos 1 y 3. En el Experimento 2 se reportan de 0-21 días.

4.3 Amarillamiento y rendimiento en canal.

En el Experimento 3, al finalizar el ciclo productivo (49 días), se tomaron 20 aves de cada tratamiento y se sacrificaron por dislocación cervical, para evaluar el rendimiento de la canal tipo rosticero (sin plumas, sangre, patas, cabeza y vísceras). La pigmentación amarilla de la piel de la pechuga, se midió después del procesamiento en frío con un colorímetro de reflectancia (Minolta®) CR 400 en la vena de la grasa.

4.4 Respuesta inmune humoral. Para detectar el efecto inmunostimulante de PCL a nivel sistémico, se realizó una vacunación simultánea, por vía ocular virus vivo y vía subcutánea, virus inactivado con el virus de la enfermedad Newcastle. A los diez días de edad en el Experimento 1, se tomaron muestras de sangre a los días 7 y 14 días post-vacunación (5 muestras/réplica). Para el Experimento 2, las muestras se tomaron los días 4 y 11 días post-vacunación (9 muestras/tratamiento). En el Experimento 3 se tomaron muestras de sangre los días 7 y 14 días post-vacunación (5 muestras/réplica), en los tres experimentos, se obtuvieron los sueros y se congelaron a -20°C, para posteriormente determinar títulos de anticuerpos séricos específicos para el virus de Newcastle a través de la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación.

4.4.1 IgA traqueal

Con hisopos estériles, se tomaron muestras en el Experimento 2 de exudados traqueales, el día 21 de edad (5 muestras / tratamiento), que se colocaron en tubos con PBS estéril y se centrifugaron a 1200 x g, se tomó el sobrenadante y se congeló a -20° C para su posterior evaluación a través de la prueba de ELISA.

4.4.2 IgA intestinal

Se sacrificaron por dislocación cervical 10 pollos por tratamiento, se tomaron 10 cm de duodeno, posteriormente se realizaron lavados con 10 ml de PBS frío y estéril, pasando tres veces el PBS en la fracción del lumen intestinal, se recolectó y se centrifugó a 1200 x g; se tomó el sobrenadante y se congeló a -20°C para su posterior evaluación con la prueba de ELISA.

ELISA

Las placas de 96 pozos (Nunc, Fisher Scientific Rochester Site, US) de fondo plano, se cubrieron con IgA (Chicken IgA ELISA Quantitation Kit Bethyl Laboratories Inc PO Box 850 Montgomery TX 77356) de pollo previamente reconstituida en buffer de carbonatos (0.05M pH 9.6) toda la noche a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS adicionado de Tween-20 al 0.05%, Se añadió solución de bloqueo PBS-leche descremada al 0.5%, Sacarosa 0.2%, se lavaron y se depositaron las muestras de los lavados intestinales y traqueales y se incubaron 1hr a 37°C. Posteriormente se retiraron las muestras, y las placas se lavaron 5 veces con PBS Tween-20 al 0.05%. Se añadió el conjugado HRP (goat anti-chicken IgA -HRP, Bethyl Laboratories Inc PO Box 850 Montgomery TX 77356) incubándose, y nuevamente se realizaron 5 lavados. Para añadir el sustrato ABTS, y posteriormente se incubó durante 20 minutos, la reacción se detuvo con la adición de solución de paro (H₂SO₄ 2M) se realizó la lectura de la absorbancia a 405nm.

4.5 Respuesta inmune celular

4.5.1 Hipersensibilidad cutánea basofílica. La evaluación se realizó en los Experimentos 1 y 2, el día 14 de edad; en el Experimento 3, el día 21 de edad mediante una prueba de hipersensibilidad tardía (*Edelman, et al., 1985; Corrier and DeLoach., 1990*) como respuesta a la inoculación intradérmica en la membrana interdigital de las falanges 3 y 4 de la extremidad inferior derecha, empleándose (2 pollos/ réplica, 12/tratamiento), con Phitoheam aglutinina (PHA-A, Sigma Sigma-Aldrich, Inc.) a una concentración de 0.1mg/0.1ml. En la membrana interdigital de la pata izquierda, se realizó el mismo procedimiento utilizando solución salina estéril (0.1ml) como testigo.

A las 24 horas pos-inoculación, se determinó el grosor de la membrana interdigital con un vernier digital.

4.6 Hematología

Se tomaron muestras de sangre con s-monovette EDTA (Sarstedt) de las venas radiales de 3 pollos por réplica (12 pollos/tratamiento) los días 21, 35 y 49 (Experimento 1). Se realizó el conteo leucocitario diferencial en frotis sanguíneos teñidos con Wright, Las cuentas totales se determinaron indirectamente por el cálculo de los porcentajes de la célula y de cuentas totales (*Campbell, 1995*).

4.7 Histología

En el Experimento 1, se sacrificaron 10 de pollos de cada tratamiento a los 21 días de edad, se tomaron muestras de tejido intestinal de 2 cm de longitud, posteriores al divertículo Meckel, se fijaron en formalina buferada al 10%, para posteriormente ser procesados, montados en portaobjetos y teñidos con Hematoxilina-Eosina (*Berezovskiĭ, 1978*) para su posterior observación y evaluación mediante microscopía de luz. Se midió en micras (μ) la longitud y el grosor de las vellosidades intestinales.

4.8 Conteo de Ooquistes.

El conteo de ooquistes señalado en el Experimento 3, se determinó según lo descrito por *Dalloul et al. (2002)*, se tomaron 10 muestras de heces por tratamiento al día 21 de edad. Se determinó el conteo de ooquistes utilizando una cámara de McMaster.

4.9 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las variables en estudio, se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza conforme al diseño experimental empleado. Las variables productivas así como el índice hematológico del Experimento 1, se analizaron mediante un diseño completamente al azar con mediciones repetidas según el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS 6 ed. Institute, Cary, NC). Cabe mencionar también, que los títulos de anticuerpos en los 3 experimentos, se sometieron a una transformación logarítmica base 2.

Los **resultados** de estas pruebas se encuentran en los artículos incluidos en los anexos.

5. DISCUSIÓN.

En la búsqueda de aditivos naturales con efectos similares a los APC, capaces de mejorar su productividad en la avicultura, las paredes celulares de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* se postulan como un posible candidato.

Experimento 1

Los parámetros productivos en dietas sorgo-soya adicionadas con 0.05% de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* mostraron un incremento en la ganancia de peso ($P < 0.05$) a los 49 días de edad; de manera similar a un antibiótico promotor del crecimiento (Bacitracina zinc) este efecto promotor del crecimiento concuerda con lo encontrado por algunos autores (Arce, et al., 2005), este efecto promotor del crecimiento fue potenciado cuando se administraron de manera simultánea PCL y antibiótico. En las variables consumo de alimento y conversión alimenticia, no se detectaron diferencias entre los tratamientos ($P > 0.05$).

La suplementación de PCL, produjo un incremento en la longitud de las vellosidades del yeyuno, observándose un mayor efecto con la adición simultánea de PCL y APC ($P < 0.01$); estos resultados concuerdan con Baurhoo et al., 2007 quienes adicionaron manano-oligosacáridos (MOS) a dietas de pollo, y observaron un incremento en la longitud de las vellosidades del yeyuno. Solis de los Santos et al., 2005 también encontraron un aumento en la longitud de las vellosidades del duodeno al adicionar a la dieta un prebiótico, los autores explican este efecto, argumentando que la presencia de microbiota intestinal es la responsable de estimular la vascularización y el desarrollo de la vellosidad, y esto incrementa la superficie de contacto y por tanto, se aumenta la eficiencia de digestión y absorción. Otras investigaciones Hume et al., 2006, Solis de los Santos et al 2007; Oviedo et al 2006 confirman estos resultados y señalan que varios promotores nutricionales influyen en la función del intestino; favoreciendo la longitud de las vellosidades intestinales.

El resultado de los hemogramas en el Experimento 1 indicaron un aumento en los linfocitos, se infiere que las PCL favorecieron el incremento de esta población celular, al estimular receptores

tipo lectinas, descritos en poblaciones celulares de linaje linfocítico, que reconocen azúcares como ligando y esta unión favorece el proceso de mitosis.

Al respecto, se ha descrito la presencia de los receptores tipo Toll, como un gran sistema de reconocimiento (Roeder et al 2004; Stuart 2004; Akira et al 2006) expresados en diferentes células; reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, (PAMP's) iniciando con la respuesta inmune innata. Se ha determinado, que los azúcares de tipo mananos y el zymosan; presentes en *Saccharomyces cerevisiae* estimulan TLR4, TLR2 y TLR6 respectivamente.; lo que posteriormente desarrolla respuestas inmunes específicas. Por estas implicaciones las PCL de *Saccharomyces cerevisiae* se pueden considerar como estimulantes del sistema inmune, y promotoras del crecimiento al ser adicionadas en dietas soya + soya para pollos de engorda, por lo que resultan una alternativa a los APC.

Experimento 2

Santin, et al., 2003 demuestran que el consumo de alimento y la ganancia de peso se afectan por contaminación de aflatoxinas; sin embargo en los resultados de los parámetros productivos arrojados en este estudio, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en el comportamiento productivo, ($P < 0.05$) para ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia. Aunque numéricamente el peso fue mayor (1.5 %) con la adición de PCL y menor (1.8 %) en las dietas con aflatoxinas. En este estudio la ganancia de peso no se afectó con la inclusión de AFB1 (400ppb), Tejada et al 2008 observan que experimentalmente niveles 500ppb de AFB1 durante tres semanas no causan reducción en el peso de los pollos; sin embargo si se consume este mismo nivel de AFB1 (400ppb) durante un periodo de 4 semanas, se aprecia una reducción en el peso de las aves (Kubena et al., 1993). Díaz et al 2008 proponen que la aflatoxicosis en aves puede generar un efecto de hormesis; fenómeno toxicológico que se caracteriza por estimular a dosis bajas e inhibir a dosis altas. De manera específica con las aflatoxinas, este autor plantea que dosis bajas de aflatoxina estimulan el crecimiento, dosis elevadas lo deprimen.

En estudios realizados por *Morales, et al., 2009* con PCL adicionadas en dietas trigo-cebada, no encontraron diferencias estadísticas significativas en los parámetros productivos, estos autores atribuyen este efecto, al contacto limitado con la microbiota ambiental; ya que ambos experimentos fueron realizados en baterías y no hubo una interacción real con el medio ambiente.

La evaluación de anticuerpos sistémicos específicos para el virus de la enfermedad de Newcastle; indica, que la adición de PCL incrementó el título de anticuerpos sistémicos. Esto concuerda con lo publicado con *Sashidhara and Devegowda 2003* quienes utilizaron una fracción purificada de PCL (mananoligosacáridos) y mostraron un aumento significativo en el título de anticuerpos en las reproductoras; así como en la progenie.

En los resultados hematológicos; se observaron cambios en las poblaciones de leucocitos, heterófilos y linfocitos. Los tratamientos adicionados con aflatoxina mostraron un decremento en las poblaciones de leucocitos, neutrófilos y linfocitos posiblemente por el desarrollo de un estado de inmunodepresión (*Mitchell and Johns 2008*). *Sur and Celik 2003*, demuestran que las aflatoxinas inducen inmunodepresión y en este estado fisiológico, no sólo se deprimen las funciones celulares si no también se disminuye el número de linfocitos T en sangre periférica y en tejidos linfoides. Al respecto *Celik et al., 2000* observan que la dosis inmutóxica de las aflatoxinas es relativamente menor, que la dosis necesaria para ejercer un efecto detrimental en el peso.

Al realizar la evaluación de la respuesta inmune celular cuantificada a través de la prueba de hipersensibilidad tardía basofílica, se observó un aumento en el grosor interdigital ($P < 0.05$) en los pollos incluidos en los tratamientos suplementados con las PCL; de manera contraria en los tratamientos adicionados con el factor aflatoxina hubo una disminución ($P < 0.01$) que pudiera estar determinada por generar inmunodepresión en los pollos.

Experimento 3

Los parámetros productivos en la etapa de iniciación (0-21 días) mostraron diferencias ($P < 0.05$); la ganancia de peso fue mejor en aves no vacunadas, que en el caso de las aves que fueron vacunadas

contra coccidia, es to pudiera deb erse a que en las aves vacunadas, los ciclos de replicación intracelular de la coccidia (*Morris et. al,2003*) dañaron las células epiteliales del intestino y por consiguiente se alteró la absorción de nutrientes, lo que limitó el crecimiento. Otra posible explicación pudiera deberse a que el sistema inmune al ser estimulado por un antígeno; en este caso la vacuna, necesita para poder desarrollar sus funciones efectoras, nutrientes; por lo que la generación de una respuesta inmune, pudo contribuir a un efecto detrimental en el peso (*Klasing y Calvert, 2002; Morris et. al, 2003*). Durante todo el ciclo productivo, se mostró un efecto promotor de crecimiento en las aves suplementadas con las PCL, incluso en las aves vacunadas, posiblemente pudiera deberse a la restauración del epitelio intestinal, así como de sus funciones de digestión y absorción de nutrientes. Los resultados en la mejora de los índices productivos concuerdan con lo descrito por *Arce et al., 2005 y 2008 y Zhang et al., 2005* quienes utilizaron 500ppm y 3000ppm de PCL en dietas sorgo-soya y maíz-soya respectivamente. Varios autores señalan (*Hume et. al., 2006; Solis de los Santos et al., 2007 y Oviedo et al., 2006*) que varios promotores nutricionales influyen en la estructura, maduración y función del intestino y evitan cambios drásticos en la microflora intestinal en aves.

Se ha reportado que anticuerpos séricos específicos, juegan un papel importante en el desarrollo de la respuesta contra coccidia (*Girard et al., 1997*). Los resultados de este experimento cuantificando anticuerpos sistémicos específicos para el virus de la enfermedad de Newcastle, indican que la suplementación con PCL incrementa el título de anticuerpos sistémicos ($P<0.05$), de manera similar a lo reportado con *Sashidhara y Devegowda (2003)* quienes evaluaron la respuesta inmune humoral en reproductoras con la utilización de manano-oligosacáridos provenientes de *S. cerevisiae*, observaron un aumento significativo en los títulos de anticuerpos en las reproductoras, así como en la progenie. Además *Guo et al.(2004)* demostraron que aves infectadas con *E tenella* y suplementadas con polisacáridos obtenidos de *Lentinus edodes*, incrementaron de manera significativa los títulos de anticuerpos a los 14 y 21 días post-infección.

En este experimento los pollos suplementados con PCL, mostraron un aumento significativo ($P < 0.05$) de la IgA intestinal, esto concuerda con lo reportado con *Yun et al. (2000)* que encontraron que la IgA es capaz de unirse a los esporozoitos y así evitar la invasión intracelular del parásito; se infiere, que en los pollos vacunados se desarrolló una respuesta inmune local mayor con una mayor concentración de IgA, pero estos anticuerpos fueron utilizados como mecanismo efector de la respuesta inmune. Esta hipótesis se pudiera confirmar al evaluar el conteo de ooquistes, ya que en los tratamientos con PCL disminuyó significativamente ($P < 0.01$) el número de ooquistes en comparación con los vacunados.

La respuesta inmune desarrollada contra la coccidia, se caracteriza por dirigirse hacia una respuesta de tipo celular; siendo las células T las responsables de esta respuesta (*Lillehoj et al., 2000*). En este estudio se encontró, que la adición en la dieta de PCL aumentó significativamente la respuesta celular evaluada por la prueba de hipersensibilidad cutánea basofílica en los tratamientos con PCL, en comparación con los tratamientos no suplementados. Con respecto al efecto de las PCL en la liberación de ooquistes, con su adición se liberaron menor cantidad de ooquistes en las heces que los no suplementados. Estos resultados concuerdan, con lo reportado con *Lee et al. (2007)* quienes observaron una reducción en la liberación de ooquistes de aves suplementadas con un probiótico base *Pediococcus-Saccharomyces*, e infectadas con *Eimeria sp.*

La diversidad de resultados mostrados, indican que factores como el peso molecular, el grado de polimerización, fuentes de carbono en medios de cultivo, ingredientes en las dietas, interacción directa con la microbiota son un grupo de factores que influyen en la obtención de resultados óptimos.

6. Conclusiones

La influencia mundial dirigida al desuso de antibióticos como promotores del crecimiento (APC), obliga a la búsqueda de diferentes alternativas con un resultado similar a los APC. El uso de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* (PCL) en dietas para pollo pudiera funcionar como alternativa a los APC, partiendo que las PCL incluidas al 0.05% en dietas base sorgo-soya mejoran la ganancia de peso y muestran un efecto inmunoestimulante en la respuesta inmune humoral sistémica y local, así como optimizando el proceso de vacunación reflejando mejores títulos de anticuerpos sistémicos y locales en pollos sanos y en pollos deprimidos con aflatoxina B1. Este efecto benéfico en la respuesta inmune celular se reflejó en pollos suplementados con PCL.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser de utilidad en la avicultura para mejorar la productividad y la salud de aves comerciales.

Perspectivas.

Los datos obtenidos en esta investigación muestran un efecto estimulante de las PCL al ser administradas en el alimento de pollos en la respuesta inmune; sin embargo sería interesante poder dilucidar los mecanismos moleculares, por los cuales se desarrolla esta respuesta.

7. Referencias

1. Akira S. TLR Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311:1-16.
2. Arce MJ, Avila GE, López CC, García EA, García GF. Efecto de paredes celulares (*Saccharomyces cerevisiae*) en el alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos. *Tec Pec Mex* 2005; 43:155-162.
3. Arce MJ, Ávila GE, López CC. Comportamiento productivo y cambios morfológicos en vellosidades intestinales del pollo de engorda a 21 días de edad con el uso de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*. *Vet Méx* 2008; 39:223-228.
4. Baurhoo B., Phillip L and Ruiz-Feria C A. Effects of Purified Lignin and Mannan Oligosaccharides on Intestinal Integrity and Microbial Populations in the Ceca and Litter of Broiler Chickens. *Poult Sci* 2007; 86:1070-1078.
5. Bar-shira E, Friedman A. Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. *Dev Comp Immunol* 2006; 30:930-941.
6. Barton, MD. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr Res Rev* 2000; 13:279-299.
7. Berezovskiĭ ME. Method of staining of semi-thin sections with hematoxylin-eosin. *Arkh Patol* 1978; 40:69-70.
8. Campbell TA. *Avian Hematology and cytology*. 2nd edition. Iowa State University Press/Ames, 1995.
9. Celik I, Oguz H, Demet O, Donmez HH, Boydak M, Sur E. Efficacy of polypyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. *Br Poult Sci* 2000; 41: 430-439.
10. Chae BJ, Lohakare JD, Moon WK, Lee SL, Park YH, Hahn TW. Effects of supplementation of beta-glucan on the growth performance and immunity in broilers. *Res Vet Sci* 2006; 80: 291-298.
11. Corrier DE, DeLoach JR. Evaluation of Cell – Mediated, cutaneous basophilic hypersensitivity in young chickens by an interdigital skin test. *Poult Sci* 1990; 69:403-408.
12. Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Calder PC, Gibson GR, Guarner F, Isolauri E, Pannemans D, Shortt C, Tuijelaars S, Watzl B. PASSCLAIM-gut health and immunity. *Eur J Nutr* 2004 Suppl 2: 43: 118-173.
13. Dalloul RA, Lillejoh HS, Shellem TA, Doerr JA. Effect of vitamin A on host intestinal immune response to *Eimeria acervulina* in broiler chickens. *Poult Sci* 2002; 10:1509-1515.
14. Dalloul RA, Lillejoh HS, Tamin NM, Shellem TA, Doerr JA. Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by a lactobacillus-based probiotic. *Comp Immunol Microbial Infect Dis* 2005; 28: 351-361.
15. Diaz GJ, Calabrese E, Blain R. Aflatoxicosis in chickens (*Gallus gallus*): an example of hormesis? *Poult Sci* 2008; 87: 727-732.
16. Edelman AS, Sánchez LP, Robinson EM, Hochwald MG, Thorbecke JG. Primary and secondary wattle swelling response to phytohaemagglutinin as a measure of immunocompetence in chickens. *Avian Dis* 1985; 30:105-111.
17. EEC 70/524. 2004. Update (situation as 30 April 2004) of the list of the authorized additives in feedingstuffs published in application of article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC

concerning additives in feedingstuffs. [http://www.awt-feedadditives.de/fileadmin/awt/pdf/EU-FEED ADDITIVE REGISTER Part 2 22-07-2004.pdf](http://www.awt-feedadditives.de/fileadmin/awt/pdf/EU-FEED_ADDITIVE_REGISTER_Part_2_22-07-2004.pdf)

18. Girard F, Fort G, Yvoré P, Quéré P. Kinetics of specific IgA, IgM and IgG production in the duodenal and cecal mucosa of chickens infected with *E. acervulina* and *E. tenella*. *Int J Parasitol* 1997; 27:803-809.
19. Guo FC, Kwakkel RP, Williams BA, Parmentier HK, Li WK, Yang SKQ, Vertegen MWA. Effects of Mushroom and herb polysaccharides on cellular and humoral immune responses of *Eimeria tenella* infected chickens. *Poult Sci* 2004; 83:1124-1132.
20. Guo Y, Ali RA, Qureshi MA. The influence of β -glucan on immune responses in broiler chicks. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2003;25:461-472.
21. Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, Malassis-Seris M, Briottet C, Vassalli P. Two gut intraepithelial CD8⁺ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med* 1991; 173:471-481.
22. Harada T, Kawaminami H, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadome T, Ohno N. Mechanism of enhanced hematopoietic response by soluble β -glucan SCG in cyclophosphamide-treated mice. *Microbiol Immunol* 2006; 50: 687-700.
23. Hida S, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Ohno N. β -glucan derived from zymosan acts as an adjuvant for collagen-induced arthritis. *Microbiol Immunol* 2006; 50: 453-461.
24. Hilton LS, Andrew GDB, John WL. The emerging role of avian cytokines as immunotherapeutics and vaccine adjuvants. *Vet. Immunol and Immunopathol* 2002; 85:119-128.
25. Hume ME, Clemente HS, Oviedo REO. Effects of feed Additives and mixed *Eimeria* Species infection on intestinal microbial ecology of broilers. *Poult Sci* 2006; 85:2106-2111.
26. Iji PA, Saki A, Tivey DR. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 1. Intestinal weight and mucosal development. *Br Poult Sci* 2001; 42:505-513.
27. Iqbal M, PhilbinVJ, Smith AL. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet. Immunol and Immunopathol* 2005; 104:117-127.
28. Jamroz D, Jacobsen K., Bach K., Wiliezkewicz J., Orda J. Digestibility and energy value of non-starch polysaccharides in young chickens, ducks and geese fed diets containing high amounts of barley. *Comp Biochem Physiol A Integr Physiol* 2002; 131:657-668.
29. Jones FT and Ricke SC. Observations on the history of the Development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poult Sci* 2003; 82: 613-617.
30. Kajiwara E, Shigeta A, Horiuchi H, Matsuda H, Furusawa S. Development of Peyer's Patch and cecal tonsil in gut associated lymphoid tissues in chicken embryo. *J Vet Med Sci* 2003; 5:607-614.
31. Kleasing, CK. Nutritional modulation of resistance to infection disease. *Poult Sci* 1998; 77:1119-1125.
32. Kleasing, CK. Nutrition and the immune system. . *Br Poult Sci* 2007; 48:525-537.
33. Klasing KC, and Calvert CC. The care of feeding of an immune system: Analysis of nutrient needs. 2002. Pages 253-264 in Proc. VIII Int. Symp. Protein Metab.Nutr G.E. Lobley A. White and J.C. Mac Rae. Ed. Wageningen Press. Wageningen. The Netherlands.
34. Kubena LF, Harvey RB, Huff WE, Elissalde MH, Yersin AG, Phipps TD, Rottinghaus. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirperol. *Poult Sci* 1993; 72:51-59.

35. Kunkel EJ, Campbell DJ, Butcher EC. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation* 2003; 10:313-323.
36. Lee S, Lillehoj HS, Park DW, Hong YH, Lin JJ. Effects of *Pediococcus* and *Saccharomyces* based probiotic (MitoMax®) on coccidiosis in broiler chickens. *Comparat Immunol Microbiol Infect Dis* 2007; 30:261-268.
37. Lillehoj HS, and Lillehoj EP. Avian Coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Dis* 2000; 44:408-425.
38. Mitchell EB and Johns J. Avian hematology and related disorders. *Vet Clin Exot Anim* 2008; 11: 501-522.
39. Morales, LR, Auclair E, Garcia F, Esteve GE, Brufau J. Use of yeast; β -1,3/1,6- glucans; mannoproteins in broiler chicken diets. *Poult Sci* 2009; 86:1491-1500.
40. Morris BC, Danforth HD, Caldwell DJ, Pierson FW, McElroy AP. Intestinal mucosal mast cell immune response and pathogenesis of two *Eimeria acervulina* isolates in broiler chickens. *Poult Sci* 2003; 83:1667-1674.
41. Muir WL, Bryden WL, Husband AJ. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. *Develop Comp Immunol* 2000; 24: 325-342.
42. Nagy N, Igyártó B, Magyar A, Gazdag E, Palya V, Oláh I. Oesophageal tonsil of the chicken. *Acta Vet Hung* 2005;53:173-88.
43. Oláh I, Nagy N, Magyar A, Palya V. Oesophageal tonsil: a novel gut-associated lymphoid organ. *Poult Sci* 2003; 82:767-770.
44. Oviedo-Rondón EO, Hume EM, Hernández C, Clemente-Hernández S. Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* species, and supplemented with essential oil blends. *Poult Sci* 2006; 85:854-860.
45. Patterson JA, Burholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci* 2003;82:627-631.
46. Quereshi MA, Hussain I, Heggen CL. Understanding immunology in disease development and control. *Poult Sci* 1998; 77:1126-1129.
47. Robinson J K, Blanchard TG, Levine A D, Emancipator S N, Lamm M E. A Mucosal IgA mediated excretory immune system in vivo. *J Immunol* 2001; 166:3688-3692.
48. Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Rev Med Mycol* 2004; 42: 485-498.
49. Santin E, Paulillo, Maiorka A, Okada LSN, Macari M, Fischer SAV, Alessi AC. Evaluation of efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Internat J Poult Sci* 2003;2:341-344.
50. Scott TR. Our current understanding of humoral immunity of poultry. *Poult Sci* 2004; 83:574-579.
51. Sanz ML. Inmunidad del tracto intestinal. Procesamiento de antígenos. *Alergol Inmunol Clin* 2001; 58-75.
52. Schat KA, Mayers TJ. Avian Intestinal Immunity. *Crit Rev Poult Biol* 1991; 3:19-34.
53. Shashidhara RG, Devegowda G. Effect of dietary mananoligosaccharide on breeder production traits and immunity. *Poult Sci* 2003; 82:1319-1325.
54. SAS. SAS User's Guide: Statics, (version 6 ed.) Cary NC, USA: SAS Inst Inc, 1995.
55. Solis de los Santos F, Farnell MB, Téllez G, Balog JM, Anthony NB, Torres-Rodriguez A, Higgins S, Hargis BM, Donoghue AM. Effect of prebiotic on gut development and ascites incidence of broilers reared in a hypoxic environment. *Poult Sci* 2005; 84:1092-1100.

56. Solis de los Santos F, Donoghue AM, Farnell MB, Huff GR, Huff WE, Donoghue D. Gastrointestinal maturation is accelerated in turkey poult supplemented with manna-oligosaccharide yeast extract (Alphamune). *Poult Sci* 2007; 86:921-930.
57. Spring P, Wenk C, Dawson KA, Newman KE. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella challenged broiler chicks. *Poult Sci* 2000; 79: 201-211.
58. Stuart ML. Interactions of toll like receptors with fungi. *Microb and Infect* 2004; 6:1351-1355.
59. Sur E, Celik I. Effects of aflatoxin B1 on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. *Br Poult Sci.* 2003; 44:558-566.
60. Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Healy HP, Dawson KA, Merchen NR, Fahey GC. Effects of supplemental fructooligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J Nutr* 2002a; 132:980-989.
61. Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Healy HP, Dawson KA, Merchen NR, Fahey GC. Effect of supplemental fructooligosaccharides plus manna oligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adults dogs. *Arch Tierenahr* 2002b; 56:309-318.
62. Swennen K, Courtin MC, Delcour JA. Non-digestible oligosaccharides with probiotic properties. *Crit Rev Food Sci Nutrit* 2006; 46:459-469.
63. Suzuki Y, Adachi Y, Ohno N. Th1/Th2 Balancing Immunomodulating activity of gel forming (1-3) B-glucans from fungi. *Biol Pharma Bull* 2001; 24: 811-819.
64. Tejada CIZ, Avila GE, Causaubon H MT, Cervantes Olivares RA, Vásquez PC, Hernández B EM, Moreno ME. Biodetoxification of aflatoxin contaminated chick feed. *Poult Sci* 2008; 87: 1569-1576.
65. Telemo E, Korotkova M, Hanson LA. Antigen presentation and processing in the intestinal mucosa a lymphocyte homing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 90:28-32.
66. Temperley ND, Berlin S, Paton IR, Griffin DK, Burt DW Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: A story of gene gain and gene loss. *BMC Genomics* 2008; 9:62-74.
67. Tlaskalová H, Stepánková R, Hudeovick T, Tueková L, Cukroska B, Zadnikova LR, Kozakova H, Rossman P, Bártová J, Sokol D, Funda P D, Boroska D, Rehaková Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Koresová A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Let* 2004; 93:97-108.
68. Tsukada C, Yokoyama H, Miyaji C, Ishimoto Yuiko, Kawamura H, Abo T. Immunomodulation of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administration of β -glucan. *Cell Immunol* 2003; 221:1-5.
69. Unión Nacional de Avicultores (UNA). Compendio de Indicadores Económicos 2008. Dirección de estudios económicos.
70. Weiland WH, Orzaez D, Lammers A, Parmentier HK, Verstegen. A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochim J* 2004; 380:569-576.
71. Weststrate JA, Van Poppel G, Verschuren PM. Functional Foods, trends and future. *Br J Nutr* 2002; 88:233-235.

72. Yiannikouris A, Andre G, Poughon L, Francois J, Dussap CG, Jeminet G, Bertin G, Jouany JP. Chemical and conformational study of the interactions involved in micotoxin complexation with β -D-Glucans. *Biomacromolecules* 2006; 7:1147-1155.
73. Yokoyama MT, Tabori C, Miller ER, Hogberg MG. The effect of antibiotics in the weanling pig diet on growth and the excretion of volatile phenolic and aromatic bacterial metabolites. *Am J Clin Nutr* 1982; 35:1417-1424.
74. Yun, CH, Lillehoj, HS, Lillehoj, EP. Intestinal immune response to coccidiosis. *Dev Comp Immunol* 2000; 24:303-324.
75. Zekarias B, Agnes AH, Huurne T, Landman JM, Rebel MJ, Pol JM, Gruys E. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Vet Res* 2002; 33:109-125.
76. Zhang AW, Lee BD, Lee SK, Lee KW, Song KB, Lee CH. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chick. *Poult Sci* 2005; 84:1015-1021.
77. Zhonggeum P, Otaka K, Maoka T, Hidaka K. Structure of β -glucan oligomer from *Laminarium* and its effect on Human Monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2005; 69: 553-558.

8. ANEXOS

Comportamiento productivo y respuesta inmune de pollos alimentados con dietas sorgo-soya con y sin aflatoxina y paredes celulares de levadura

(*Saccharomyces cerevisiae*)

**Gómez Verduzco Gabriela¹, Cortes Cuevas Arturo², López Coello Carlos¹,
Arce Menocal José³, Vásquez Pelaez Carlos⁴, Avila González Ernesto¹.**

¹ Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

² Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia Michoacán, México.

⁴ Departamento de Bioestadística y Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Gabriela Gómez Verduzco: Orión 143 col. Prado de Churubusco, CP. 03040, del Coyoacán.

Correo electrónico: gagove@servidor.unam.mx

Arturo Cortes Cuevas: Plan de Ayala # 43, Col. La Conchita, Del. Tláhuac, CP 13360, México D.F.

Correo Electrónico: cuevasarturo03@yahoo.com

7. ANEXOS

1 **Abstract**

2 Two experiments were conducted on broilers Ross 308 fed sorghum-soybean meal
3 diets. In Experiment 1, broilers from 0 to 49 days of age were used in a completely
4 randomized design with 4 treatments and 3 repetitions of 36 chicks each one, the
5 treatments were: 1.-Control diet, 2.- As 1+wall cell yeast (YWC), 3.-As
6 1+Bacitracine zinc 30 ppm (GPA) and 4.- As 1+YWC+GPA. The YWC and GPA
7 improved at 49 days the weight gain ($P<0.05$), being greater the effect when the
8 YWC + GPA. The cell immune response evaluated by the basophilic
9 hypersensibility test and the humoral immune response measured by antibodies
10 titers against Newcastle disease (ND) was increased ($P<0.05$), the YWC
11 ameliorated the response. The addition of YWC and GPA increased ($P<0.05$) the
12 duodenal villi length measured at the 21 days age. In Experiment 2, Ross broilers
13 from 1 to 21 days of age were fed diets contaminated or not with aflatoxin B1
14 (AFB1). A completely randomized design 2 x 2 factorial arrangement with 6
15 repetitions of 6 chicks each one were used. The factors were presence or absence
16 of 0.05% YWC and presence or absence of AFB1 (400mg/ton). The 21 days of age
17 data for weight gain, feed intake, feed conversion were similar ($P>0.05$) for both
18 factors; nevertheless the humoral immune response against NCD and the cellular
19 immune response increased ($P<0.05$) with YWC and decreased with AFB1. These
20 data indicated that the YWC added in sorghum-soybean meal diets improve the
21 growth and increase the cellular and humoral immune response of broilers.

22 **Key words:** wall cell yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, immune response,
23 aflatoxin, bacitracin.

24

7. ANEXOS

1 **Resumen**

2 Se realizaron dos experimentos con pollos Ross 308 alimentados con dietas
3 sorgo+ pasta de soya. En el Experimento 1, se empleó un diseño completamente
4 al azar con 4 tratamientos y 3 repeticiones de 36 pollos cada una de 49 días de
5 edad. Los tratamientos fueron: 1.- Dieta sorgo+pasta de soya, 2.- Como
6 1+paredes celulares de levadura (PCL), 3.- Como 1+antibiótico promotor del
7 crecimiento bacitracina cinc 30ppm (APC) y 4.-Como 1+ PCL+APC. Los
8 resultados en 49 días indicaron que las PCL y el APC mejoraron la ganancia de
9 peso ($P<0.05$), siendo mayor el efecto cuando se adicionaron juntas las PCL y el
10 APC en la dieta. La respuesta inmune celular evaluada por la prueba de
11 hipersensibilidad tardía basofílica y la respuesta humoral sistémica medida por
12 anticuerpos contra Enfermedad de Newcastle (ENC) ($P<0.05$) aumentaron por
13 efecto de las PCL. La adición de PCL y APC incrementaron ($P<0.05$) la longitud de
14 las vellosidades intestinales medidas en duodeno a los 21 días edad. En el
15 Experimento 2, se empleó un arreglo factorial 2 x 2 con 6 réplicas de 6 pollos
16 cada una de 1 a 21 días de edad. Los factores a considerar fueron: con y sin la
17 adición de 0.05% PCL; así como, con y sin la contaminación de 400mg/ton de
18 aflatoxina B1 (AFB1) a una dieta sorgo+pasta de soya. Los datos a los 21 días de
19 edad para ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia fueron
20 similares ($P >0.05$) para ambos factores; sin embargo la respuesta inmune
21 humoral contra ENC y la respuesta celular cutánea ($P<0.05$) incrementaron con
22 PCL y disminuyeron con AFB1. Los resultados de este estudio indican que las
23 PCL, mejoran el crecimiento de los pollos e incrementan la respuesta celular y
24 humoral.

7. ANEXOS

.

1 **Palabras clave:** Paredes celulares, *Saccharomyces cerevisiae*, respuesta inmune,

2 aflatoxina, bacitracina.

3

7. ANEXOS

1 **Introducción**

2 El empleo de los antibióticos promotores del crecimiento (APC), como aditivo en la
3 alimentación animal desde hace más de 50 años, ha mostrado la posibilidad de
4 generar microorganismos resistentes a este tipo de antibióticos¹. Por lo que en
5 2006, se legisló su prohibición total en la comunidad europea. Por lo anterior, se
6 estudian diferentes alternativas con el fin de encontrar resultados similares a los
7 obtenidos con los APC².

8 En la alimentación de las aves se utilizan granos, los cuales se pueden contaminar
9 con hongos del género *Aspergillus*, algunas especies producen compuestos
10 heterocíclicos denominadas aflatoxinas. Los efectos biológicos de las aflatoxinas
11 se subdividen de manera en, carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos. Estos
12 efectos son influidos por variaciones de especie, sexo, edad, estado nutricional,
13 mezcla con otras micotoxinas, dosis y el período de exposición^{3,4}. El efecto tóxico
14 más importante es en el hígado, pudiendo provocar también problemas renales³.
15 Su efecto citotóxico se debe a la peroxidación de lípidos; las aflatoxinas también
16 inhiben la síntesis de DNA y RNA, producen transversiones de Guanina por
17 Timina, e inducen la separación de DNA, que se traduce en mutaciones y
18 formación de tumores (efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos)⁵. Se
19 ha encontrado un efecto en la reducción la síntesis de vitamina K y un efecto
20 inmunodepresor⁶.

21 Se pueden aplicar diversas estrategias Para evitar el efecto nocivo de las
22 aflatoxinas, se debe evitar la producción de aflatoxina por parte del hongo, la
23 destoxificación de alimento y bodegas contaminados y por último, la inhibición de
24 la absorción de aflatoxinas en el tracto digestivo³.

7. ANEXOS

1 Las paredes celulares de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* (PCL) pueden
2 ser una alternativa a los APC⁷. El mayor componente de las paredes de estas
3 levaduras, son carbohidratos no digestibles por monogástricos, estos azúcares
4 pertenecen al grupo de los oligosacáridos, estructuralmente formados por
5 unidades repetidas ya sea de un monosacárido o disacárido, a través, de enlaces
6 químicos⁸. Los oligosacáridos de las PCL de *Saccharomyces cerevisiae*
7 pertenecen en su mayoría a los grupos de los β -glucanos y mananooligosacáridos
8 (MOS). Se ha estimado que el porcentaje de oligosacáridos presentes en las PCL
9 es del 85 al 90% y el 15 o 10% restante son proteínas. Estudios con la
10 suplementación de PCL^{9,10,11}, fracciones purificadas de estas en dietas para pollos
11 y pavos han mostrado mejorar los parámetros productivos^{11,12}. Sin embargo, sus
12 mecanismos específicos de acción no han sido determinados, hay un efecto
13 positivo en la integridad intestinal,¹³ exclusión de microorganismos patógenos y
14 función inmunoestimulante, destaca la resistencia a infecciones por *Salmonella*
15 por el uso de β -glucanos y manano-oligosacáridos^{14,15}. En un estudio, se demostró
16 la capacidad de los MOS para secuestrar aflatoxina B1 (AFB1) reduciendo su
17 absorción gastrointestinal¹⁶. Por otra parte, la administración de β -glucanos en
18 modelos murinos demuestran un efecto positivo y adyuvante en la respuesta
19 inmune^{17,18,19,20,21}. Su uso en dietas de perros, aumentó la actividad de los
20 neutrófilos en respuesta a la vacunación²². Con estos antecedentes se planteó el
21 presente estudio, para evaluar la adición de PCL en dietas a base de sorgo-soya,
22 con y sin un contaminante para pollos de engorda en su comportamiento
23 productivo y respuesta inmunológica.

24 4. Material y Métodos

7. ANEXOS

1 **4.1 Aves y alojamiento**

2 Se realizaron 2 experimentos; todos los procedimientos de manejo que
3 involucraron a las aves cumplieron con los requisitos señalados por el Comité
4 Institucional para el cuidado y uso de los animales experimentales (CICUAE
5 FMVZ-UNAM)*. La temperatura de crianza fue disminuida gradualmente iniciando
6 con 32°C, hasta llegar a 21°C en el día 28 de edad. Las dietas empleadas en los
7 tratamientos fueron con base en sorgo-soya. El agua y el alimento se
8 proporcionaron a libre acceso.

9 **4.2 Diseño experimental**

10 **Experimento 1**

11 Se realizó con 432 pollitos mixtos (50% de cada sexo) Ross 308, de 1 día de
12 edad, los cuales se alojaron de manera aleatoria en 12 pisos con cama de viruta
13 de madera. Se empleó un diseño completamente al azar de 4 tratamientos, con 3
14 réplicas de 36 pollos cada una. Tratamiento 1: Dieta testigo (iniciación y
15 finalización) sin promotores de crecimiento (Cuadro 1), Tratamiento 2: Como 1 +
16 PCL* 0.05%, Tratamiento 3: Como 1 + APC (Bacitracina cinc 30ppm) y
17 Tratamiento 4: Como 1 + 0.05% PCL y 30ppm de APC.

18 **Experimento 2.**

19 Se emplearon 144 pollitos mixtos (50% de cada sexo) Ross 308, de 1 día de edad,
20 los cuales se alojaron de manera aleatoria en baterías de ambiente controlado
21 Petersime. Se empleó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 2 x
22 2, con 6 réplicas de 6 pollos cada una. Un factor fue con y sin la adición de 0.05%

*® Saf-mannan.Lesaffre Feed Additives

7. ANEXOS

1 PCL a la dieta testigo de iniciación (Cuadro 1) y el otro factor con y sin la
2 contaminación de Aflatoxina (400mg/ton).

3 Las aflatoxinas se obtuvieron por contaminación natural de maíz, con *Aspergillus*
4 *flavus link*; el cual produce aflatoxinas B1 y B2. El material cuantificado en
5 aflatoxina B1 fue donado por la unidad de investigación en granos y semillas de la
6 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma
7 de México.

8

9 **4.4 Parámetros productivos**

10 Las aves y el alimento se pesaron, para obtener datos de la ganancia de peso, el
11 consumo de alimento e índice de conversión. Los datos obtenidos fueron de 0 a
12 21días y de 0 a 49días de edad.

13 **4.5 Respuesta inmune humoral.** Para conocer si existía efecto
14 inmunoestimulante de PCL a nivel sistémico, se realizó una vacunación
15 simultánea, por vía ocular virus vivo y vía subcutánea, virus inactivado con el virus
16 de la enfermedad Newcastle. A los diez días de edad en el Experimento 1, se
17 tomaron muestras de sangre a los días 7 y 14 días post-vacunación (5
18 muestras/réplica). Para el Experimento 2, las muestras se tomaron los días 4 y 11
19 días post-vacunación (9 muestras/tratamiento), se obtuvieron los sueros y se
20 congelaron a -20°C, para posteriormente determinar títulos de anticuerpos séricos
21 específicos para el virus de Newcastle a través de la prueba de Inhibición de la
22 hemoaglutinación.

23 **4.5.1 IgA traqueal**

7. ANEXOS

1 Con hisopos estériles, se tomaron muestras en el Experimento 2 de exudados
2 traqueales, el día 21 de edad (5 muestras/ tratamiento), que se colocaron en tubos
3 con PBS estéril y se centrifugaron a 1200 x g, se tomó el sobrenadante y se
4 congeló a -20°C para su posterior evaluación a través de la prueba de ELISA.

5 **4.5.1 IgA intestinal**

6 En el Experimento 1, se sacrificaron por dislocación cervical 10 pollos por
7 tratamiento, se tomaron 10 cm de duodeno, posteriormente se realizaron lavados
8 con 10 ml de PBS frío y estéril, pasando tres veces el PBS en la fracción del
9 lumen intestinal, se recolectó y se centrifugó a 1200 x g; se tomó el sobrenadante
10 y se congeló a -20°C para su posterior evaluación a través de la prueba de ELISA.

11 **4.5.1.2 ELISA**

12 Las placas de 96 pozos² de fondo plano se cubrieron con IgA (Chicken IgA ELISA
13 Quantitation Kit Bethyl Laboratories Inc PO Box 850 Montgomery TX 77356) de
14 pollo previamente reconstituida en buffer de carbonatos (0.05M pH 9.6) toda la
15 noche a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS adicionado de Tween-20 al 0.05%,
16 Se añadió solución de bloqueo PBS leche descremada al 0.5%, Sacarosa 0.2%,
17 se lavaron y se depositaron las muestras de los lavados intestinales y traqueales y
18 se incubaron 1hr a 37°C. Posteriormente se retiraron y se lavaron 5 veces con
19 PBS Tween-20 al 0.05%. Se añadió el conjugado HRP (goat anti-chicken IgA-
20 HRP¹) incubándose, y nuevamente se realizaron 5 lavados, para añadir el
21 sustrato ABTS, con el que se incubó durante 20 minutos, la reacción se detuvo

* Sigma-Aldrich, Inc.

** Sarstedt AG & Co

7. ANEXOS

1 con la adición de solución de paro (H_2SO_4 2M) se realizó la lectura de la
2 absorbancia 405nm.

3 **4.6 Respuesta inmune celular**

4 **4.6.1 Hipersensibilidad cutánea basofílica.** La evaluación se llevó a cabo en
5 ambos experimentos, el día 14 de edad mediante una prueba de hipersensibilidad
6 tardía²³, como respuesta a la inoculación intradérmica en la membrana interdigital
7 de las falanges 3 y 4 de la extremidad inferior derecha, empleándose (2 pollos/
8 réplica, 12/tratamiento), con Phitoheamaglutinina (PHA-A*) a una concentración de
9 0.1mg/0.1ml. En la membrana interdigital de la pata izquierda, se realizó el mismo
10 procedimiento utilizando solución salina estéril (0.1ml) como testigo. A las 24
11 horas pos-inoculación, se determinó el grosor de la membrana interdigital con un
12 vernier digital.

13 **4.7 Hematología**

14 Se tomaron muestras de sangre con s-monovette EDTA (Sarstedt^{**}) de las venas
15 radiales de 3 pollos por réplica (12 pollos/tratamiento) los días 21, 35 y 49
16 (Experimento 1). Se realizó el conteo leucocitario diferencial en frotis sanguíneos
17 teñidos con Wright, Las cuentas totales se determinaron indirectamente por el
18 cálculo de los porcentajes de la célula y de cuentas totales²⁴.

19 **4.9 Histología**

20 En el Experimento 1, se sacrificaron 10 de pollos de cada tratamiento a los 21 días
21 de edad, se tomaron muestras de tejido intestinal de 2 cm de longitud, posteriores
22 al divertículo Meckel, se fijaron en formalina buferada al 10%, para posteriormente
23 ser procesados, montados en portaobjetos y teñidos con Hematoxilina-Eosina,

7. ANEXOS

1 para su posterior observación y evaluación mediante microscopía de luz. Se midió
2 en micras (μ) la longitud y el grosor de las vellosidades intestinales.

3 **5.0 Análisis estadístico**

4 Los resultados obtenidos de las variables en estudio, se analizaron
5 estadísticamente mediante análisis de varianza conforme al diseño experimental
6 empleado. Las variables productivas así como el índice hematológico del
7 Experimento 1, se analizaron mediante un diseño completamente al azar con
8 mediciones repetidas según el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS²

9 Los títulos de anticuerpos en ambos experimentos, se sometieron a una
10 transformación logarítmica base 2.

11 **6 RESULTADOS**

12 **Experimento 1**

13 Los resultados de las variables productivas, se muestran en el Cuadro 2. Se
14 puede apreciar que la ganancia de peso, consumo de alimento y conversión
15 alimenticia fueron mayores a los 49 que a los 21 días de edad ($P<0.05$). También
16 se observa, que la ganancia ($P<0.05$), mejoró con la adición de PCL, APC y la
17 suplementación conjunta de PCL y APC. Para consumo de alimento y conversión
18 alimenticia, no existieron diferencias entre los tratamientos ($P>0.05$).

19 La inclusión de PCL y APC en la dieta de los pollos incrementó la longitud de las
20 vellosidades intestinales, siendo mayor este efecto con la adición conjunta
21 ($P<0.01$); sin embargo, el grosor de las vellosidades ($P<0.05$) disminuyó con la
22 suplementación de ambos promotores (Cuadro 3).

7. ANEXOS

1 El perfil hematológico mostró diferencias significativas entre tratamientos ($P<0.01$)
2 en linfocitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos (Cuadro 4). Se observa
3 en general que los linfocitos aumentaron al adicionar los promotores de
4 crecimiento en la dieta; sin embargo, el porcentaje de heterófilos, eosinófilos,
5 basófilos y monocitos disminuyó ($P<0.01$) con la suplementación de PCL Y APC.
6 La respuesta inmune humoral sistémica que aparece en el Cuadro 5, mostró que
7 los títulos de anticuerpos séricos contra el virus de la enfermedad de Newcastle,
8 en los tratamientos adicionados con PCL, APC y ambos fueron mayores ($P<0.05$).
9 La respuesta inmune humoral local, cuantificando la concentración de IgA
10 intestinal; aumentó ($P<0.05$) en los tratamientos con promotores y fue mayor con
11 PCL y APC.
12 Para la respuesta celular evaluada a través de la prueba de hipersensibilidad
13 tardía basofílica, se encontró un aumento en el grosor interdigital ($P<0.05$) en los
14 pollos suplementados con PCL.

15

16 **Experimento 2**

17 En el Cuadro 6, se aprecia que no se encontró diferencia ($P<0.05$) entre factores,
18 para ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia. Sin
19 embargo numéricamente el peso fue mayor (1.5 %) con la adición de PCL y menor
20 (1.8 %) en las dietas con aflatoxinas

21 En el Cuadro 7, a los 11 días postvacunación (21días de edad), se nota que los
22 títulos de anticuerpos fueron mayores ($P<0.05$) para la adición de PCL. En la
23 evaluación de IgA traqueal no se encontró diferencia ($P\geq 0.05$) entre los factores, ni
24 efecto de interacción.

7. ANEXOS

1 Para la respuesta celular evaluada a través de la prueba de hipersensibilidad
2 tardía basofílica, aumentó el grosor interdigital ($P<0.05$) en los pollos por la adición
3 de PCL, y hubo disminución con el factor aflatoxina ($P<0.01$)
4 En el perfil hematológico, se mostró un efecto de interacción ($P<0.05$) PCL x AFB1
5 en los leucocitos, linfocitos y heterófilos (Cuadro 8). Se aprecia que los leucocitos
6 aumentaron con la suplementación de PCL, siendo mayor el porcentaje con la
7 dieta sin contaminar y los heterófilos disminuyeron con todas las dietas excepto el
8 testigo. La población de linfocitos se incrementó con la adición de PCL. Sin
9 embargo en los pollos con las dietas contaminadas con AFB1 no se notó un efecto
10 significativo.

11

7. ANEXOS

1 **7.0 Discusión**

2 La tendencia mundial hacia la eliminación de antibióticos promotores del
3 crecimiento (APC) en los alimentos balanceados, ha originado una búsqueda de
4 alternativas con beneficios similares a los APC. Las PCL de *Saccharomyces*
5 *cerevisiae* adicionadas en dietas sorgo-soya al 0.05% mejoraron la ganancia de
6 peso de los pollos ($P<0.05$) a los 49 días de edad, de manera similar a la
7 Bacitracina cinc, este efecto promotor del crecimiento concuerda con lo
8 encontrado por algunos autores⁹. Este efecto promotor del crecimiento fue
9 potenciado cuando se administraron de manera simultánea PCL y antibiótico.
10 Además, los resultados de este estudio confirman lo reportado por algunos
11 autores^{10,13}, quienes señalan que varios promotores nutricionales influyen en la
12 función del intestino, ya que las PCL de *Saccharomyces cerevisiae* favorecieron la
13 longitud de las vellosidades intestinales, ejerciendo un efecto positivo en el tamaño
14 ($P<0.01$), esto a su vez pudiera favorecer la superficie de absorción de nutrientes.
15 Los resultados del comportamiento productivo en el Experimento 2, no se
16 afectaron con la inclusión de AFB1 (400ug/kg). Experimentalmente niveles
17 500ug/kg durante tres semanas no causaron reducción en el peso de los pollos²⁶;
18 sin embargo se ha observado reducción en el peso de las aves, con este nivel
19 cuando se consume durante 4 semanas²⁷. *Díaz et al 2008*²⁸, proponen que la
20 aflatoxicosis en aves puede generar un efecto de hormesis, fenómeno toxicológico
21 que se caracteriza por estimular a dosis bajas e inhibir a dosis altas.

22 La respuesta a la vacunación es una herramienta para evaluar una de las
23 funciones inmunes efectoras, la evaluación de anticuerpos sistémicos específicos
24 para el virus de la enfermedad de Newcastle, indica, que la adición de PCL de

7. ANEXOS

1 incrementó el título de anticuerpos sistémicos. Esto concuerda con lo publicado
2 con algunos investigadores²⁹, quienes utilizaron una fracción purificada de PCL
3 (mananoligosacáridos) y mostraron un aumento significativo en el título de
4 anticuerpos en las reproductoras; así como, en la progenie.

5 Los hemogramas del Experimento 1 indicaron un aumento de los linfocitos, lo que
6 pudiera indicar que las PCL favorecieron el aumento de esta población celular,
7 implicada de forma importante en la respuesta inmune. En los hemogramas del
8 Experimento 2, hubo cambios solo en las poblaciones de leucocitos, heterófilos y
9 linfocitos. Los pollos con aflatoxina disminuyeron el porcentaje de leucocitos,
10 neutrófilos y linfocitos por un estado de inmunodepresión³⁰, esto pudiera deberse
11 a lo reportado por Sur and Celik 2003³¹, que demuestran que la inmunosupresión
12 que inducen las aflatoxinas no sólo se deprimen las funciones celulares, si no
13 también se disminuye el número de linfocitos T en sangre periférica y en tejidos
14 linfoides. La dosis inmunotóxica de las aflatoxinas fue relativamente más baja, que
15 las dosis necesarias para producir un decremento en el peso³¹. Esto pudiera
16 explicar que en el Experimento 2 no se encontró efecto en los parámetros
17 productivos, pero en el caso de las variables inmunológicas si se encontró un
18 efecto inmunodepresor por parte de la aflatoxina B1.

19 La respuesta inmune celular mostró que la adición en la dieta PCL, aumentó la
20 respuesta celular evaluada por la prueba de hipersensibilidad cutánea basofílica,
21 una posible explicación podría ser que la estructura química de las PCL,
22 determinadas en su mayoría por azúcares, que funcionan como ligando de
23 receptores de tipo lectinas, descritos en poblaciones celulares de linaje linfoide.
24 Por otro lado se ha descrito la presencia de los receptores tipo Toll^{32,33} presentes

7. ANEXOS

1 en diferentes células; que reconocen patrones moleculares asociados a
2 patógenos, (PAMP's) iniciando con la respuesta inmune innata. Se ha
3 determinado, que los azúcares de tipo mananos y el zymosan; presentes en
4 *Saccharomyces cerevisiae* estimulan TLR-4 y TLR-2 y TLR-6 respectivamente, lo
5 que posteriormente desarrolla respuestas inmune específicas. Por estas
6 implicaciones las PCL de *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden considerar como
7 estimulantes del sistema inmune, y promotoras del crecimiento al ser adicionadas
8 en dietas sorgo + soya de pollos de engorda, por lo que resultan una alternativa a
9 los APC.

10 **Agradecimientos**

11 Los autores agradecen al Dr. Juan Carlos del Rio (FESC de la UNAM) por la
12 donación la aflatoxina para la realización de este trabajo. Al MVZ Miguel Angel
13 Valadez (CEIEPA-FMVZ/UNAM) por su apoyo técnico en la realización de este
14 trabajo.

15

7. ANEXOS

1 Bibliografia

- 2
- 3 1. Jones FT and Ricke SC. Observations on the history of the Development of
- 4 antimicrobials and their use in poultry feeds. Poult Sci 2003;82: 613-617.
- 5
- 6 2. Patterson JA and Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in
- 7 poultry production. Pout Sci 2003;82: 627-631.
- 8
- 9 3. Mishra HN and Das C. A review on biological control and Metabolism of
- 10 aflatoxin. Crit Rev Food Sci Nutr. 2006;43: 145-264.
- 11
- 12 4. Ellis WO, Smith JP, Simpson BK, Oldham JH. Aflatoxins in food:
- 13 occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of
- 14 control. Crit Rev Food Sci Nutr. 1991;30:403-39. Review.
- 15
- 16 5. Hussein S,H and Brasel JM. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins
- 17 on humans and animals. Toxicology. 2001;167:101-134.
- 18
- 19 6. Bababunmi EA, Thabrew I, Bassir o, Aflatoxin induced coagulopathy in
- 20 different nutritionally classified animal species. World Rev Nutr Diet
- 21 1997;34:161-181.
- 22
- 23 7. Weststrate JA, Van Poppel G, Verschuren PM. Functional Foods, trends
- 24 and future. Br J Nutr 2002;88: 233-235.
- 25
- 26 8. Swennen K, Courtin MC, Delcour JA. Non-digestible oligosaccharides with
- 27 probiotic properties. Crit Rev Food Sci Nutr 2006;46:459-469.
- 28
- 29 9. Arce MJ, Avila GE, López CC, García EA, García GF. Efecto de paredes
- 30 celulares (*Sacharomyces cerevisiae*) en el alimento de pollo de engorda
- 31 sobre los parámetros productivos. Tec Pec Mex 2005;43:155-162.
- 32
- 33 10. Solis SF, Donoghue AM, Farnell MB, Huff GR, Huff WE, Donoghue DJ.
- 34 Gastrointestinal maturation is accelerated in turkey poults supplemented
- 35 with a mannan-oligosaccharide yeast extrac (Alphamune). Poult Sci
- 36 2007;86: 921-930.
- 37
- 38 11. Zhang AW. Lee BD, Lee SK, Lee KW, An GH, Song KB, Lee CH. Effects of
- 39 yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance,
- 40 meat quality, and ileal mucosa development of broiler chick. Poul Sci
- 41 2005;84: 1015-1021.
- 42
- 43 12. Chae BJ, Lohakare JD, Moon WK, Lee SL, Park YH, Hahn TW. Effects of
- 44 supplementation of beta-glucan on the growth performance and immunity in
- 45 broilers. Res Vet Sci 2006; 80: 291-298.
- 46

7. ANEXOS

- 1 13. Arce MJ, Ávila GE, López CC. Comportamiento productivo y cambios
2 morfológicos en vellosidades intestinales del pollo de engorda a 21 días de
3 edad con el uso de paredes celulares de *Sacharomyces cerevisiae*. Vet
4 Méx 2008;39: 223-228.
5
- 6 14. Guo Y, Ali RA, Qureshi MA. The influence of β -glucan on immune
7 responses in broiler chicks. Immunophar Immunotox 2003;25:461-472.
8
- 9 15. Spring P, Wenk C, Dawson KA, Newman KE. The effects of dietary
10 mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of
11 enteric bacteria in the ceca of salmonella challenged broiler chicks. Pout Sci
12 2000;79: 201-211.
13
- 14 16. Yiannikouris A, Andre G, Poughon L, Francois J, Dussap CG, Jeminet G,
15 Bertin G, Jouany JP. Chemical and conformational study of the interactions
16 involved in micotoxin complexation with β -D-Glucans. Biomacromolecules
17 2006;7:1147-1155.
18
- 19 17. Suzuki Y, Adachi Y, Ohno N. Th1/Th2 Balancing Immunomodulating activity
20 of gel forming (1-3) B-glucans from fungi. Biol Pharma Bull 2001;24: 811-
21 819.
22
- 23 18. Tsukada C, Yokoyama H, Miyaji C, Ishimoto Y, Kawamura H, Abo T.
24 Immunomodulation of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral
25 administration of β -glucan. Cell Immunol 2003;221: 1-5.
26
- 27 19. Zhonggeum P, Otaka K, Maoka T, Hidaka K. Structure of β -glucan oligomer
28 from *Laminarium* and It's effect on Human Monocytes to inhibit the
29 proliferation of U937 cells. Biosci. Biotech Biochem 2005;69: 553-558.
30
- 31 20. Harada T, Kawaminami H, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadome T,
32 Ohno N. Mechanism of enhanced hematopoietic response by soluble β -
33 glucano SCG in cyclophosphamide-treated mice. Microbiol Immunol
34 2006;50: 687-700.
35
- 36 21. Hida S, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Ohno N. β -glucano derived from
37 zymosan acts as an adjuvant for collagen-induced arthritis. Microbiol
38 Immunol 2006;50: 453-461.
39
- 40 22. Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Healy HP, Dawson KA, Merchen
41 NR, Fahey GC. Effect of supplemental fructooligosaccharides plus manna
42 oligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial
43 populations in adults dogs. Arch Tierenahr 2002b;56:309-318.
44
45

7. ANEXOS

- 1 23. Corrier DE and DeLoach JR. Evaluation of Cell – Mediated, cutaneous
2 basophilic hypersensitivity in young chickens by an interdigital skin test.
3 Poult Sci 1990;69:403-408.
4
- 5 24. Campbell TA. Avian Hematology and cytology. 2nd edition. Iowa State
6 University Press/Ames, 1995.
7
- 8 25. SAS. SAS User's Guide: Statics, (version 6 ed.) Cary NC, USA: SAS Inst Inc,
9 1995.
10
- 11 26. Tejada CIZ., Avila G.E., Causaubon H MT., Cervantes Olivares RA,
12 Vásquez PC., Hernández B. EM., Moreno ME. Biodegradation of aflatoxin
13 contaminated chick feed. 2008. Poult Sci 87: 1569-1576.
14
- 15 27. Kubena L. F., Harvey RB, Huff WE, Elissalde MH., Yersin AG, Phipps
16 T.D., Rottinghaus. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to
17 reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol. 1993. Poult Sci:
18 72:51-59
19
- 20 28. Diaz GJ, Calabrese E, Blain R. Aflatoxicosis in chickens (*Gallus gallus*): an
21 example of hormesis?. Poult Sci 2008;87: 727-732.
22
- 23 29. Shashidhara RG and Devegowda G. Effect of dietary mananoligosaccharide
24 on breeder production traits and immunity. Poult Sci 2003;82: 1319-1325.
25
- 26 30. Mitchell EB and Johns J. Avian hematology and related disorders. Vet Clin
27 Exot Anim 2008;11: 501-522.
28
- 29 31. Celik I, Oguz H, Demet O, Donmez HH, Boydak M, Sur E. Efficacy of
30 polypyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing
31 broilers. Br Poult Sci 2000;41: 430-439.
32
- 33 32. Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC.
34 Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. Rev Med
35 Mycol 2004;42: 485-498.
36
- 37 33. Akira S. TLR signaling. Curr Top Microbiol Immunol 2006;311: 1-16.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

7. ANEXOS

1 **Cuadro 1. Composición de las dietas testigo empleadas en los experimentos (kg/ton).**
 2

| Ingredientes Ini | ciador (0-3sem) | Finalizador (4-7sem) |
|---|----------------------------|---------------------------------|
| Sorgo 522 | .926 | 563.932 |
| Pasta de Soya | 382.754 | 332.153 |
| Aceite vegetal | 50.566 | 60.369 |
| Ortofosfato 18 | .737 | 16.558 |
| Carbonato de calcio | 13.678 | 12.573 |
| NaCl 4 | .194 | 3.716 |
| DL-Metionina 2 | .512 | 1.949 |
| Premezcla vitamínica* | 1.000 | 1.000 |
| Premezcla Mineral** | 1.000 | 1.000 |
| Cloruro de Colina 60% | 1.000 | 0.800 |
| L-lisina HCl | 0.983 | 0.000 |
| Coccidiostato*** 0 | .500 | 0.500 |
| Antioxidante 0 | .150 | 0.150 |
| Pigmento amarillo (<i>Tagetes erecta</i>) 0 | .000 | 5.300 |
| Total | 1000 1 | 000 |
| Nutrientes | Análisis calculado | |
| EM (Kcal/Kg) | 3100 | 3200 |
| Proteína cruda (%) | 22.00 | 20.09 |
| Lisina (%) | 1.20 | 1.00 |
| Metionina+ cistina (%) | 0.900 | 0.800 |
| Calcio (%) | 1.00 | 0.90 |
| Fósforo Disp. (%) | 0.50 | 0.45 |

3 Proporciona por kg. Vitamina A, 12 000 000 UI; Vitamina D3, 2, 5 00 000 UI; Vitamina E, 15 , 000 UI;
 4 Vitamina K3, 2.0 g; Vitamina B1 2.25g, vitamina B2, 7.5 g; B12 20 mg; Piridoxina, 3.5 g; Pantotenato de
 5 calcio, 12.5 g; Niacina, 45g; Biotina, 125 mg; cloruro de colina, 250 g; ácido fólico, 1.5g.

6 ** Proporciona por kg. Selenio, 200 mg; cobalto, 0.20 g; Yodo, 0.30 g; Cobre, 12 g; Zinc, 50 g; Hierro, 50g;
 7 Manganeso, 110 g; Excipiente cbp, 1000 g.

8 ***Iniciador (Nicarbazina) Finalizador (Salinomycin)

7. ANEXOS

1 **Cuadro 2. Efecto de la adición de Paredes Celulares de Levadura y Bacitracina cinc**
 2 **en dietas de pollos de engorda de 0 a 21 y 0a 49 días de edad. (Exp. 1)**
 3

| Variable | Edad (días) | Tratamientos | | | | Prob. F |
|----------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------|
| | | Testigo PC | L* | APC** | PCL* + APC** | |
| Ganancia de Peso g | 21 | 713 ^b ±6.3 732 | ^{ab} ±3.5 720 | ^{ab} ±18.5 7 | 50 ^a ±3.8 | .000 |
| | 49 | 3040 ^A ±24.0 | 3137 ^{ab} ±47.9 | 3091 ^{ab} ±7.3 | 3160 ^a ±57.0 0 | |
| | Media | 1876 ^B ±520 19 | 35 ^{AB} ±538 19 | 05 ^{AB} ±530 19 | 55 ^A ±539 0 | |
| Consumo de alimento g | 21 | 959 ^a ±17.23 10 | 25 ^a ±18.98 | 995 ^a ±13.28 96 | 9 ^b a±16.38 0 | .000 |
| | 49 | 5914 ^b ±22.50 6 | 045 ^b ±88.81 57 | 77 ^b ±47.55 59 | 55 ^b ±62.46 | |
| | Media | 3436 ^A ±1108 | 3535 ^A ±1123 | 3386 ^A ±1067 | 3461 ^A ±1115 | |
| Conversión alimenticia g/g | 21 | 1.33 ^a ±0.02 1 | .4 ^a ±0.02 1. | 38 ^a ±0.02 1.35 | ^a ±0.05 | 0.298 |
| | 49 | 1.94 ^b ±0.02 1. | 92 ^b ±0.04 1.8 | 6 ^b ±0.01 1.88 | ^b ±0.03 | |
| | Media | 1.63 ^A ±0.14 | 1.67 ^A ±0.12 | 1.62 ^A ±0.11 | 1.62 ^A ±0.12 | |

4 Valores con distinta letra en el mismo renglón son diferentes ($p < 0.05$)

5 *Paredes Celulares de Levadura

6 ** Bacitracina cinc.

7

8

9

10 **Cuadro 3. Gr osor y lon gitud de las vellosidades intestinales e n duodeno d e poll os**
 11 **suplementados con Paredes Celulares de Levadura y Bacitracina cinc. (Exp. 1)**
 12

| Vellosidades | Tratamientos | | | | Prob. F |
|--------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------|
| | Testigo PCL* | APC** | PCL* + APC** | | |
| Grosor (μ) | 106.39 ^{ab} ±6.74 109 | .93 ^a ±8.08 91 | .28 ^{ab} ±5.02 87 | .06 ^b ±3.53 0.05 | |
| Longitud (μ) | 1274.75 ^b ±54.10 145 | 7 ^{ab} ±44.09 1 | 493.33 ^a ±24.45 1570 | ^a ±44.21 | 0.01 |

13 Valores con diferente letra en el mismo renglón son diferentes.

14 *Paredes Celulares de Levadura

15 ** Bacitracina cinc.

7. ANEXOS

1 **Cuadro 4. Índices hematológicos en pollos de engorde con Paredes Celulares de**
 2 **Levadura y Bacitracina cinc. (Exp. 1)**
 3

| Célula Día | | Testigo | PCL* | APC** | PCL* + APC** | EEM | Prob. F |
|------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------|------------|
| Linfocitos % | 8 | 61.9 | 64.9 | 61.8 | 65.1 | 3.15 | 0.0001 |
| | 17 | 54.9 | 65.0 | 65.0 | 69.9 | | |
| | 24 | 55.0 | 69.2 | 66.2 | 67.3 | | |
| | <i>promedio</i> | <i>58.8^c</i> | <i>64.4^a</i> | <i>66.2^b</i> | <i>67.4^a</i> | | |
| Heterófilos % | 8 | 22.2 | 20.7 | 21.6 | 20.7 | 2.29 | 0.0001 |
| | 17 | 24.6 | 22.0 | 22.4 | 19.1 | | |
| | 24 | 28.8 | 19.4 | 20.8 | 20.1 | | |
| | <i>promedio</i> | <i>25.2^a</i> | <i>20.7^{bc}</i> | <i>20.8^b</i> | <i>20.0^c</i> | | |
| Eosinófilos % | 8 | 1.8 | 1.2 | 2.1 | 1.6 | 0.70 | 0.0001 |
| | 17 | 1.6 | 1.1 | 0.7 | 0.3 | | |
| | 24 | 1.6 | 0.8 | 0.7 | 0.7 | | |
| | <i>promedio</i> | <i>1.6^a</i> | <i>1.0^b</i> | <i>0.7^b</i> | <i>0.9^b</i> | | |
| Basófilos % | 8 | 3.3 | 2.3 | 3.4 | 2.3 | 0.87 | .0001 |
| | 17 | 2.4 | 1.8 | 2.2 | 1.3 | | |
| | 24 | 3.2 | 1.1 | 1.3 | 1.7 | | |
| | <i>promedio</i> | <i>3.0^a</i> | <i>1.7^b</i> | <i>1.3^c</i> | <i>1.8^b</i> | | |
| Monocitos | 8 | 10.8 | 10.9 | 11.1 | 10.3 | 1.39 | 0.002 |
| | 17 | 12.0 | 10.1 | 9.7 | 9.3 | | |
| | 24 | 11.4 | 9.7 | 11.0 | 10.2 | | |
| | <i>promedio</i> | <i>11.4^a</i> | <i>10.2^b</i> | <i>11.0^b</i> | <i>10.0^b</i> | | |

4 Cifras con letra diferente en cada renglón son diferentes.

5 *Paredes Celulares de Levadura

6 ** Bacitracina cinc.

7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

7. ANEXOS

1 **Cuadro 5. Respuesta inmune humoral y celular en dietas de pollos de engorda con**
 2 **Paredes Celulares de Levadura y Bacitracina cinc. (Exp. 1)**
 3

| Variable | Tratamientos | | | | EEM | Prob F |
|------------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|------|-----------|
| | Testigo | PCL* | APC** | PCL* + APC** | | |
| HI VEN ^{log2+} | 5.75 ^c | 7.75 ^a | 6.37 ^{bc} | 7.5 ^{ab} | 0.22 | 0.01 |
| IgA intestinal DO ⁺⁺ | 0.891 ^c | 0.998 ^{bc} | 1.027 ^{ab} | 1.0337 ^a | 0.05 | 0.05 |
| HTB mm ⁺⁺⁺ | 0.5722 ^b | 0.7656 ^{ab} | 0.5456 ^b | 0.8744 ^a | 0.08 | 0.05 |

4 Valores con diferente letra en el mismo renglón son diferentes

5 *Paredes Celulares de Levadura

6 ** Bacitracina cinc.

7 + Títulos en logaritmo base 2 de la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación
 8 contra el virus de la enfermedad de Newcastle.

9 ++ Densidad óptica

10 +++ Hipersensibilidad Tardía Basofílica

11

12

7. ANEXOS

1 **Cuadro 6. Efectos mayores de la adición de Paredes Celulares de Levadura en dietas**
 2 **sorgo-soya de pollos de 0 a 21 días de edad con y sin aflatoxina. (Exp. 2)**

| | Ganancia de Peso g | Consumo de Alimento g | Conversión Alimenticia |
|----------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| PCL | | | |
| Sin | 785 | 1125 | 1.34 |
| Con | 797 | 1031 | 1.32 |
| AFB1 | | | |
| Sin 798 | | 1101 | 1.34 |
| Con 784 | | 1055 | 1.31 |
| EEM | 3.86 24 | .47 0 | .01 |
| Factor | Fuente de Variación | | |
| PCL* | 0.125 0 | .577 0 | .183 |
| AFB1** | 0.144 0 | .099 0 | .505 |
| PCL* x AFB1** | 0.531 0 | .561 0 | .631 |

3
4
5
6
7
8

*Paredes Celulares de Levadura
 ** Aflatoxina B1.

7. ANEXOS

1 **Cuadro 7. Efectos mayores de la inclusión PCL en la respuesta inmune humoral y**
 2 **celular. (Exp.2)**

| HI | VEN ^{log2+} | IgA traqueal ng/ml | HTB ⁺⁺⁺ mm |
|-------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------|
| PCL | | | |
| Sin | 5.0 ^{ab} | 0.165 | 0.2867 ^b |
| Con | 5.7 ^a | 0.193 | 0.4808 ^a |
| AFB1 | | | 0.3075 ^a |
| Sin | 5.05 ^{ab} | 0.151 | 0.2383 ^b |
| Con | 4.90 ^b | 0.193 | |
| EEM | 0.19 | 0.01 | 0.04 |
| Factor | Fuente de Variación | | |
| PCL | 0.05 0. | 584 | 0.001 |
| AFB1 | 0.093 0 | .188 | 0.002 |
| PCL x AFB1 | 0.010 0 | .591 | 0.068 |

4

5 ***Paredes Celulares de Levadura**

6

6 **** Aflatoxina B1.**

7

7 **+ Títulos en logaritmo base 2 de la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación**
 8 **contra el virus de la enfermedad de Newcastle.**

9

9 **+++ Hipersensibilidad Tardía Basofílica**

10

7. ANEXOS

1 **Cuadro 8. Perfiles hematológicos mayores en pollos alimentados con y sin aflatoxina**
 2 **B1. (Exp. 2)**

| | Leucocitos X10 ⁹ /L Heteró | filos X10 ⁹ /L Li | nfocitos X10 ⁹ /L |
|-------------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| PCL | | | |
| Sin | 4.4 ^a 1. | 51 | 2.2 ^b |
| Con | 5.5 ^b 1. | 97 | 2.7 ^a |
| AFB1 | | | |
| Sin 5. | 2 | 2.09 ^a 2. | 4 |
| Con 4 | .8 | 1.39 ^b 2. | 5 |
| Testigo | 4.23 ^b 2. | 74 ^a | 1.97 ^b |
| PCL | 6.20 ^a 1. | 44 ^b | 2.93 ^a |
| AFB1 | 4.68 ^{ab} 1. | 20 ^b | 2.56 ^{ab} |
| PCL + AFB1 | 4.89 ^{ab} 1. | 59 ^b | 2.57 ^{ab} |
| EEM | 0.36 | 0.18 | 0.14 |
| Factor | Fuente de Variación | | |
| PCL | 0.018 0 | .002 | 0.011 |
| AFB1 | 0.312 0 | .02 | 0.502 |
| PCL x AFB1 | 0.048 0 | .000 | 0.013 |

4
5
6 ***Paredes Celulares de Levadura**

7 **** Aflatoxina B1.**

8
9
10