

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

**LAS PAREDES CELULARES DE LEVADURA DE *SACCHAROMYCES*  
*CEREVISIAE*: UN ADITIVO NATURAL CAPAZ DE MEJORAR LA  
PRODUCTIVIDAD Y SALUD DEL POLLO DE ENGORDE**

Memoria presentada por *RENE MORALES LÓPEZ* para acceder al grado de  
Doctor dentro del programa de doctorado de Producción Animal del  
departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos

*Barcelona, junio 2007*

Joaquim Brufau i de Barberà i Maria Francesch i Ollé, doctors veterinaris i investigadors de Nutrició Animal, de l'IRTA (Recerca i Tecnologia Agroalimentàries),

INFORMEM:

Que la memòria titulada "Las paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*: Un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde" presentada per René Morales López per optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona, ha estat realitzada sota la nostra direcció a Nutrició Animal de l'IRTA.

Que la considerem conclusa i autoritzem la seva presentació per a ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per què així consti, signem la present a Mas de Bover, Constantí, el dia 30 de març de 2007,

Dr. Joaquim Brufau i de Barberà

Dra. Maria Francesch i Ollé

Departament de Ciència Animal i dels Aliments  
Sr/a René Morales López

D'acord amb la normativa vigent, la Subcomissió de Postgrau d'aquesta Universitat, ha nomenat el Tribunal que ha de jutjar la Tesi Doctoral presentada pel/per la senyor/a **René Morales López** al Departament de Ciència Animal i dels Aliments i el títol de la qual és:

Las paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*: Un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde

Sota la direcció del/dels següent/s doctor/a/s/es **Joaquim Brufau i Maria Francesch** i del/de la tutor/a doctor/a **Josep Gasà Gaso**.  
I presentada en aquesta Escola de Postgrau.

La composició del tribunal és la següent:

PRESIDENT: Dr. Domingo Alvarez, Mariano

SECRETARI: Dra. Martínez Ramirez, Paz

VOCAL: Dr. Esteve García, Enric

VOCAL: Dra. Ferrer Roig, Ruth

VOCAL: Dra. Barroeta Lajusticia, Ana Cristina

SUPLANT: Dr. Perez Hernandez, Jose Francisco

SUPLANT: Dra. Pérez Vendrell, Anna

Per delegació de la Subcomissió de Postgrau,

Carles Jaime Cardiel  
Delegat del Rector per a Doctorat

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 22 de maig de 2007

***ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR EL GRUPO LESAFFRE FEED  
ADDITIVES MEDIANTE EL PROYECTO O CONTRATO LFA-IRTA (0602-  
22253) 2002-2006***

## AGRADECIMIENTOS

El autor del presente trabajo agradece a la **S. I. Lesaffre** por el apoyo económico brindado por parte de sus divisiones **Lesaffre Feed Additives** (Francia) y **Saf-Agri** (México) para poder realizar este proyecto.

Al **Institut de Reserca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)** Departamento de **Nutrición Animal**, por permitir realizar este proyecto dentro de sus instalaciones.

A mis tutores, los Drs. Joaquim Brufau y Maria Francesch investigadores del IRTA-Nutrición Animal por su ayuda y consejos para la realización de esta tesis.

A los Drs. Eric Auclair y Michael Larbier (LFA, Francia) por su gran apoyo, consejos y disponibilidad para la culminación de esta tesis.

A la familia Brufau (Joaquim, Marta, Claudia y Maria Teresa) y en especial a la Sra. Marta y Sr. Joaquim por hacer mas placentera mi estancia en Cataluña y por brindarme su valiosa amistad durante el tiempo de la realización del proyecto doctoral.

Al Dr. Francisco Garcia (Saf-Agri, México), por promover la realización de este tipo de proyectos de colaboración multi-institucionales, y por brindarme todas las facilidades para poder regresar a Cataluña a culminar la tesis y presentar su defensa.

Al Dr. Antonio Garcia (Saf-Agri, México), por el apoyo brindado para la culminación de la tesis.

A las familias Mejias (Dioni y Rosa; Alfonso y Ángela) por ayudarme tener una estancia más cómoda en Mas de Bover y por darme su confianza y amistad. Gracias Alfonso por apoyarme también en las jornadas de trabajo dentro de la granja.

A todo el personal de Mas de Bover (técnicos, investigadores y trabajadores de granja y laboratorio), y en especial a Anna Pinto y Quica Dols, por su valiosa ayuda para redactar y coordinar todos los certificados y comprobantes necesarios para poder mantener mi estancia en Cataluña.

A todos lo amigos de Mas de Bover y en especial a Pere Duran por su amistad; a Josep Andreu mi compañero de excursiones y oficina; a Roger Badia por su ayuda para llevar los tramites finales de esta tesis doctoral.

A todas aquellos animales empleados para realizar todos los estudios de la presente tesis.

---

**RESUMEN**

Se realizaron un total de **6 experimentos** empleando pollos de engorde Ross 308 machos, el objetivo de estos estudios fue el de evaluar las respuestas en la productividad y la salud de las aves, al proporcionarles dietas elaboradas con maíz o trigo-cebada-centeno suplementadas con diferentes levaduras activas de *S. cerevisiae* y sus componentes: paredes celulares de levadura, extractos, beta-glucanos y manano-proteínas, sin emplear otro tipo de aditivos (APC, coccidiostatos o enzimas). En los **experimentos 1** (dietas trigo-cebada-centeno o TCC) y **2** (dieta maíz), las aves fueron alojadas en jaulas en diseños experimentales en bloques completos (6) aleatorizados con 8 tratamientos (ambos experimentos): T-1) Control negativo (CN), sin aditivos; T-2) CN + avilamicina, 0.01 g/kg; T-3) CN+levadura-1 (uso pecuario), 2 g/kg; T-4) CN+levadura-2 (uso panadero), 1 g/kg; T-5) CN+levadura-3 ("Killer yeast"), 0.8 g/kg; T-6) CN+extracto de levadura, 0.15 g/kg; T-7) CN+PCL-1, 0.5 g/kg; y T-8) CN + PCL-2, 0.5 g/kg. Los resultados de estos estudios mostraron que con las dietas de TCC (0 a 42 días), el empleo de la levadura-3 y de la PCL-2, incrementó de forma significativa ( $P<0.05$ ) el peso final y el consumo de alimento respecto a la dieta control, mostrando un efecto similar al de la avilamicina. En las dietas con maíz, en los primeros 14 días, el empleo de avilamicina, levadura-1, PCL-1 y 2, mejoraron ( $P<0.05$ ) el índice de conversión respecto al empleo de la dieta control, e incrementaron numéricamente el peso vivo promedio al día 42. En las dietas con TCC, la suplementación de avilamicina y PCL-2, resultó en un incremento en el coeficiente de digestibilidad ileal de la grasa cruda ( $P<0.05$ ) respecto a los tratamientos que incluyeron levaduras 2 y 3. El **experimento 3**, fue realizado con el objetivo de profundizar más acerca de los mecanismos de acción de la PCL-2, o PCL seleccionada del resto de los demás aditivos evaluados en los primeros 2 estudios. Las aves fueron alojadas en jaulas empleando un modelo factorial 3x2 con distribución aleatorizada: un factor fue el programa de alimentación dieta única (0-43 días) maíz (1DM), programa-2) 2 dietas maíz (2DM), iniciación (0-21 días) y crecimiento (22-43 días); y programa-3) similar al programa-2 con dietas con trigo-cebada-centeno (2DTCC); el otro factor fue la inclusión de PCL-2 (0 y 500 mg/kg de alimento). Durante 43 días de prueba, la utilización de las PCL en los diferentes programas de alimentación mejoró el peso vivo final (+3.4%) ( $P<0.01$ ), la ganancia diaria de peso (+3.4%) ( $P<0.01$ ), y el consumo diario de alimento (+2.3%) ( $P<0.05$ ). A escala de la mucosa del yeyuno (interacción PCL x Programa de alimentación,  $P<0.06$ ), la utilización de PCL, incrementó la altura de las vellosidades en mayor magnitud en las dietas elaboradas con maíz, alrededor del +34.2% en 1DM y +33.0% en 2DM; y en menor magnitud en los programas 2DTCC +18.0% en los grupos con PCL, ya que la sola utilización de las dietas control del programa 2DTCC provocó un estímulo de mayor altura (+21%) de las vellosidades del yeyuno con relación al uso de dietas control con maíz (1DM y 2DM. La interacción estadísticamente significativa ( $P<0.05$ ) de los factores PCL x Programa de alimentación para el grosor de la mucina digestiva, mostró que las PCL incrementaron el grosor de la capa de mucina en las dietas con maíz en +69.3% en 1DM y +73.6% en 2DM; observándose un mayor estímulo de +88.6% en los grupos con PCL del programa 2TCC, que incluso fue significativamente mayor respecto a los efectos de las PCL en los programas 1DM y 2DM. El día 22 de experimentación, las PCL incrementaron el de forma significativa ( $P<0.01$ ) el número de células caliciformes sin importar el tipo de programa de alimentación. Por otra parte, la utilización del programa 2DTCC provocó un incremento ( $P<0.05$ ) en el número de células caliciformes de la mucosa digestiva del ave de similar magnitud al empleo del programa 2DM y mayor respecto al programa 1DM. De forma independiente a las PCL, el empleo de las dietas del programa 2DTCC, representó incrementos en la viscosidad del contenido

---

ileal ( $P<0.0001$ ), y del número de células caliciformes ( $P<0.05$ ). Por otro lado, la utilización de PCL no afectó la respuesta de la producción de anticuerpos contra la vacuna de NDV a los 26 días posteriores a la primera vacunación, sin embargo el empleo del programa 1DM, representó un incremento ( $P<0.05$ ) en la producción de anticuerpos vacunales de NDV, con respecto a los programas con dos dietas. De hecho, la utilización de los programas 2DM y 2DTCC resultaron en incrementos de los pesos relativos del bazo ( $P<0.05$ ) y menores valores numéricos de los pesos relativos de la bolsa de Fabricio respecto al empleo del programa 1DM. Los **experimentos 4 y 5**, fueron realizados para evaluar los efectos en la productividad, morfología de la mucosa del yeyuno y respuesta inmune de las aves por la incorporación en la dieta (TCC) de la PCL-2, y de sus principales polisacáridos purificados beta-glucanos (BG), y manano-proteínas (MP). El **experimento 4**, fue realizado en jaulas e incluyó seis tratamientos experimentales: T-1) CN, T-2) CN + Avilamicina (10mg/kg de alimento); T-3) CN + PCL-2, 500 mg/kg de alimento; T-4) CN + MP, 95 mg/kg de alimento similar al contenido de MP de la PCL-2 (500 mg); T-5) CN + BG, 145mg/kg similar al contenido de BG de la PCL (500 mg); y T-6) CN con MP (T-4) + BG (T-5). En el **experimento 4**, todos los pollos fueron vacunados el día 9 de edad, vía el agua de bebida con una vacuna virus vivo atenuado de NDV. El **experimento 5**, fue realizado en corrales en el suelo e incluyó cuatro grupos experimentales: T-1) CN; T-2) CN + PCL-2, 500 mg/kg de alimento; T-3) CN + MP, 190 mg/kg similar al contenido de MP de la PCL-2 (500 mg); y T-4) CN + BG, 227 mg/kg similar al contenido de BG de la PCL (500 mg). Los resultados en 42 días para el **experimento 4**, mostraron que los pollos que consumieron Avilamicina, PCL, MP+BG y BG incrementaron numéricamente ( $P>0.05$ ), el peso vivo promedio respecto a los pollos que consumieron la dieta control. Los días 23 y 36 del ensayo, la utilización de las diferentes dietas experimentales no representó modificaciones en la producción de anticuerpos de la vacuna del NDV en los pollos. No obstante, el empleo de la dieta experimental de MP+BG purificados resulto en mayores % relativos del peso del timo ( $P<0.05$ ) respecto al empleo de las dietas control, y similares respecto a la utilización en la dieta de PCL y de BG purificado (37 días de edad). Los resultados productivos del **experimento 5** (42 días de prueba), no mostraron efectos consistentes de la utilización de la PCL-2 en el peso vivo de las aves, solo el índice de conversión del alimento fue numéricamente mejor en los pollos alimentados con PCL, MP y BG respecto a los pollos alimentados con la dieta control. El día 21 de ensayo, la utilización en la dieta de PCL, MP y BG incrementó de forma significativa ( $P<0.01$ ) la altura de las vellosidades de la mucosa del yeyuno respecto a la utilización de la dieta control. Por otra parte, el % del peso relativo del hígado fue menor ( $P<0.01$ ) en los pollos alimentados con PCL y BG respecto a los pollos que consumieron la dieta control (21 días). En el **experimento 6**, se estudió la capacidad de inmuno-modulación de la PCL-2 en pollos inoculados con LPS de *E. coli*. Las aves se alojaron en jaulas durante 28 días de prueba, y los tratamientos experimentales fueron asignados de acuerdo a un arreglo factorial 2x2: desafío con LPS (0 y 1 mg LPS/kg de peso vivo) y PCL en la dieta (0 y 500 mg/kg). Se utilizaron dietas experimentales (maíz-trigo-cebada) en harina sin coccidiostáticos, antibióticos promotores crecimiento, ni enzimas para el alimento. De 0 a 21 ( $P<0.04$ ) y 0 a 28 ( $P<0.01$ ) días de prueba, la suplementación en la dieta con PCL mejoró significativamente el índice de conversión alimenticia de los pollos de engorde. Durante los 21 días de prueba, los pollos desafiados con LPS de *E. coli* mostraron menores ( $P<0.001$ ) ganancias de peso, menores consumos de alimento ( $P<0.009$ ) y peores índices de conversión alimenticia ( $P<0.02$ ). En el día 14 de prueba, la respuesta inmune mediada por células (prueba de la reacción de hipersensibilidad cutánea tardía o RHCT) fue incrementada ( $P<0.004$ ) en los grupos de pollos que consumieron PCL en la dieta. A los 21 días de prueba, se observó una reducción significativa (Interacción

---

---

PCLxLPS,  $P < 0.03$ ) del peso relativo de la bolsa de Fabricio en los grupos inoculados con LPS respecto al grupo control, con PCL y con PCL+LPS. Los resultados de este estudio mostraron que las PCL suministradas en el alimento de pollos de engorde fueron capaces de contrarrestar los efectos adversos del estrés inmunitario por la inyección de LPS (*E. coli*) sobre la eficiencia alimenticia y reducción del % de peso relativo de la bolsa de Fabricio del ave. Los resultados de estos experimentos mostraron que las PCL adicionadas a dietas de pollos de engorde pudieron mejorar su eficiencia productiva, parte del mecanismo de acción para llevar a cabo este efecto pueden estar asociados con efectos positivos de favorecer un mejor estado de salud intestinal que le permite llevar a cabo un mejor desarrollo. El cual, podría estar relacionado con una mejora de los mecanismos de resistencia innata a escala digestiva que permitieron mantener un mejor estado de inmunocompetencia del ave, situación que puede tener beneficios cuando las aves son mantenidas bajo condiciones de estrés o en ambientes con presencia de mayores desafíos microbianos.





**SUMMARY**

A total of 6 experiments were carried out using male broiler chickens of the Ross 308 strain. The objective of these studies was to evaluate the effects of dietary supplementation to maize or wheat-barley-rye diets (without antibiotics, coccidiostats or enzymes) with live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), its components (yeast cell wall, yeast extract, purified beta-glucans and mannano-proteins) and avilamycin (antibiotic growth promoter as positive control) on animal performance and health. In experiment 1 (wheat-barley-rye diets or WBR) and experiment 2 (maize diet), chickens were placed in cages and were distributed in a randomized complete block design with eight experimental treatments: T-1) negative control (NC), without additives; T-2) NC + avilamycin, 0,01 g/kg; T-3) NC + live yeast-1 (cattle use), 2 g/kg; T-4) NC + live yeast-2 (baker use), 1 g/kg; T-5) NC + live yeast-3 ("killer yeast"), 0,8 g/kg; T-6) NC + yeast extract, 0,15 g/kg; T-7) NC + yeast cell wall (YCW)-1, 0,5 g/kg; and T-8) NC + YCW-2, 0,5 g/kg. The results of these studies showed that chickens fed WBR diets (0 to 42 days) plus live yeast-3 and YCW-2, increased significantly ( $P<0.05$ ) the final body weight and daily feed intake with respect to the NC, indeed the effect in animal productivity of dietary live yeast-3 and YCW-2 was similar to that obtained with avilamycin as antibiotic growth promoter. In experiment 2 (maize diets), during the first 14 days of experimentation, chickens fed avilamycin, live yeast-1, YCW-1 and YCW-2 improved ( $P<0.05$ ) the feed conversion ratio with respect the NC. In WBR diets, dietary supplementation with avilamycin and YCW-2 resulted in an increment of ileal coefficient of digestibility for crude fat ( $P<0.05$ ) with respect to the treatments that included live yeast 2 and 3. The first and second experiment showed that dietary supplementation with YCW-2 had more benefits in animal productivity than the use of other yeast products. Thus, in experiment 3, YCW-2 was selected to study the effect on animal productivity and intestinal mucosa morphology of broiler chickens fed WBR and maize based diets. In this experiment, chickens were placed in cages and distributed in a completely randomized design with a 3x2 factorial model: one factor was the feeding program, program-1) single maize diet (0-43 days) (1MD), program-2) 2 maize diets (2MD) starter (0-21 days) and grower (22-43 days); and program-3) similar to the program-2 with wheat-barley-rye based diets (2WBRD); the other factor was the dietary inclusion of PCL-2 (0 and 500 mg/kg of feed). During 43 days, the use of YCW improved the final body weight (+3.4%) ( $P<0.01$ ), daily gain of weight (+3.4%) ( $P<0.01$ ), and daily feed consumption (+2.3%) ( $P<0.05$ ). Looking at intestinal mucosa in the jejunum (interaction YCW x feeding Program,  $P<0.06$ ) (22 days), the use of YCW increased villous height with respect to the use of control diets, and this effect was greater in chickens feed maize diets, +34.2% in 1MD and +33,0% in 2MD; and smaller in the programs 2WBRD +18.0%. On the other hand, the single use of program 2WBR diets resulted in greater villous height (+21%) in relation to the use of maize control diets (1DM and 2DM). A statistical significant interaction ( $P<0.05$ ) YCW x feeding program for the intestinal mucus thickness, showed that dietary YCW increased the mucus thickness, +69.3% in 1MD, +73,6% in 2MD and a greater stimulus (+88,6%) in 2WBR diets with respect to the negative control diets. The number of goblets cell at the intestinal mucosa was increased significantly by dietary supplementation with YCW ( $P<0.01$ ). Regarding the feeding program, the use of 2WBRD program increased ( $P<0.05$ ) the number of goblet cells in similar magnitude as the 2MD program and greater than 1MD program. In addition, the use of 2WBRD program increased clearly the intestinal viscosity ( $P<0.0001$ ) with respect to the maize diets. Experiments 4 and 5 were conducted to evaluate the effects of dietary YCW-2 and purified polysaccharides from the YCW (beta-glucans or BG and manno-proteins or MP) on animal productivity, intestinal mucosa morphology and immune response of broiler chickens. In experiment 4, chickens

were placed in cages, and distributed in six experimental treatments: T-1) NC, T-2) NC + Avilamycin (10mg/kg of feed); T-3) NC + YCW-2, 500 mg/kg of feed; T-4) NC + MP, 95 mg/kg of feed similar to the MP content in YCW-2; T-5) NC + BG, 145mg/kg of feed similar to the BG content of YCW-2; and T-6) NC with MP (T-4) + BG (T-5). At 9 days, all chicks were vaccinated via drinking water with an attenuated live virus vaccine of Newcastle disease. In experiment 5, chickens were placed on litter floor pens, and four experimental treatments were applied: T-1) NC; T-2) CN + YCW-2, 500 mg/kg of feed; T-3) NC + MP, 190 mg/kg similar to the MP content of YCW-2; and T-4) NC + BG, 227 mg/kg similar to the BG content of YCW-2. In experiment 4, results at 42 days, showed that chickens fed Avilamycin, YCW, MP+BG and BG increased numerically ( $P>0.05$ ) the body weight with respect to those fed control diets. At 23 and 36 days, the antibody response to Newcastle virus vaccine was not modified by the different experimental treatments. However, at 37 days, chickens fed purified MP+BG diets showed similar relative thymus weight ( $P<0.05$ ) to those chickens feed YCW and BG diets and greater than those feed negative control diets. The productive results of experiment 5 (42 days of test), did not show consistent effects for the use of the YCW-2, and only the feed conversion ratio was numerically better in the chickens fed with YCW, MP and BG with respect to those chickens fed with the control diet. At day 21, the use of experimental diet supplemented with YCW, MP and BG increased significantly ( $P<0.01$ ) the intestinal villous height with respect to the negative control. On the other hand, the relative liver weight was smaller ( $P<0.01$ ) in the chickens fed with YCW and BG than in those fed negative control diets (21 days). In experiment 6, the capacity of immuno-modulation of dietary inclusion of PCL-2 was studied in chickens inoculated with LPS of *E. coli*. Chickens were placed in Petersime batteries cages during 28 days of experimentation in a completely randomized design in a 2x2 factorial model: one factor was the inoculation with LPS of *E. coli* (1mg/kg) and the other the dietary inclusion of YCW-2 (0 and 500 mg/kg of feed). From 0 to 21 ( $P<0.04$ ) and 0 to 28 ( $P<0.01$ ) days of test, the dietary supplementation with YCW improved significantly the feed conversion ratio of chickens; in contrast chickens challenged with LPS de *E. coli* showed lower feed efficiency from 0 to 21 and from 0 to 28 days. In addition, at 21 days, chickens challenged with LPS showed lower body weight ( $P<0.001$ ), lower daily gain weight ( $P<0.001$ ) and daily feed consumption ( $P<0.009$ ) than non- inoculated chickens. Regarding to immune parameters at 14 days of trial, chickens fed YCW increased ( $P<0.004$ ) cellular immune response or delayed cutaneous hypersensitivity response than those fed control diets. At 21 days of trial, a significant reduction on relative weight of bursa of Fabricius (YCW x LPS Interaction,  $P<0.03$ ) was observed in the chickens inoculated with LPS than in those non-inoculated and fed the control diet, non inoculated chickens fed YCW and inoculated chickens fed YCW. The results of these experiments showed that the dietary supplementation with YCW to broiler chickens diets can improve the animal productive performance; part of the mode of acting of dietary YCW could involve favouring intestinal health and maintaining a better state of immune-competence in the chickens. These positive effects can bring some benefits to chickens when raised under stress conditions or in environments causing great microbial challenges.

**Abreviaciones utilizadas:**

AF: Aflatoxina	mg: Miligramo
Ag: Antígeno	MOS: Manano-oligosacáridos
AGCC: Ácidos grasos volátiles de cadena corta	MP: Manano-proteína
APC: Antibiótico Promotor del crecimiento	MS: Materia seca
ASB: Albúmina sérica bovina	NDV: Newcastle disease virus o virus de la enfermedad Newcastle
BCR: B-cell receptor	NK: Células natural killer
BF: Bolsa de Fabricio	OA: Ocratoxinas
BG: $\beta$ -glucano	PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns
CD: Cluster of difererentation	PC: Proteína cruda
CDI: Coeficientes de digestibilidad ileal	PCL: Pared celular de la levadura
CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad	PE: Pollo de engorde
CPA: Célula presentadora de antígeno	pH: Potencia de hidrógeno
cps: Centipoises	PNA: Polisacáridos no-amiláceos
CRP: C-reactive protein	PRR: Pattern recognition receptors
CTLP: Tejido linfático peri-arteriolar	SCAN: Scientist Committeemen of Animal Nutrition
EM: Energía metabolizable	SI: Sistema inmune
EMA: Energía metabolizable aparente	SIA: Sistema inmune adaptativo
EN: Enteritis necrótica	SII: Sistema inmune innato
EUA: Estados Unidos de América	SV: Scavenger receptors
FDA: US-Food and Drug Administration	T-2: Toxina T-2
FOS: Fructo-oligosacáridos	TCC: Trigo-cebada-cebada-centeno
GRAS: Generally Recognised As Safe.	TCR: T-cell receptor
GRB: Glóbulos rojos de borrego	TFAE: Tejido folicular asociado al epitelio
HCL: Ácido clorhídrico	TGF: Factor transformador del crecimiento
IDR: Inmuno-difusión radial	TLATD: Tejido linfoide asociado al tracto digestivo
IEF: Inmuno-electroforesis	TLRs: Toll-like receptors
IFN: Interferón	TNF Factor de necrosis tumoral o tumoral necrosis factor
Ig: Inmuno-globulina	UE: Unión Europea
IL: Interleucina,	UFC: Unidades formadoras de colonias
Kcal: Kilocaloría	
Kg: Kilogramo	
LIE: Linfocitos intra-epiteliales	
MBL: Manosa-binding lectin	



<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>Página</b>
<b>Capítulo 1. Introducción general</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2. Revisión bibliográfica</b>	<b>5</b>
2.1. Antibióticos promotores del crecimiento	7
2.1.1. APC y su relación con la microbiota bacteriana del tracto gastrointestinal	8
2.1.2. Beneficios obtenidos por la utilización de APC en dietas para animales	9
2.1.3. Historia del empleo de APC en producción animal	12
2.1.4. La prohibición de los APC en la Unión Europea	12
2.1.5. Impacto de la prohibición de los APC en alimentación animal (aves y cerdos) en los indicadores de resistencia bacteriana y en la producción animal en los países escandinavos y Suiza	15
2.1.6. Ventajas y desventajas de la prohibición de los APC	19
2.1.7. Recomendaciones para afrontar las pérdidas en productividad animal ante la ausencia de APC	21
2.2. Enfoque global del estudio de la salud intestinal y salud del ave	23
2.2.1 El sistema digestivo del ave	24
2.2.1.1. Anatomía microscópica del tracto digestivo	26
2.2.1.2. Enterocitos con membrana en borde de cepillo	28
2.2.1.3. Desarrollo del tracto digestivo del pollo	30
2.2.1.4. Actividad enzimática de la mucosa digestiva del pollo	33
2.2.1.5. Morfología y orientación de las vellosidades intestinales	33
2.2.1.6. La mucina del epitelio de la mucosa digestiva	35
2.2.1.6.1. Estructura de la mucina	35
2.2.1.6.2. Mucina y células caliciformes en el pollo de engorde	36
2.2.1.6.3. Modificación del patrón de secreción de la mucina	36
2.2.2. Microflora digestiva	38
2.2.2.1. Colonización bacteriana del tracto digestivo del ave	39
2.2.2.2 Bacterias del ileón y ciego del pollo de engorde	41
2.2.2.3. Polisacáridos no-amiláceos solubles y sus interacciones con la microflora digestiva	43
2.2.3. El sistema inmune	46
2.2.3.1. Inmunidad innata (inespecífica, natural o nativa)	47
2.2.3.1.1. Células del SII	47

2.2.3.1.2. Reconocimiento del antígeno (SII)	48
2.2.3.2. Inmunidad adaptativa	49
2.2.3.2.1. Reconocimiento del antígeno (SIA)	50
2.2.3.3. Diferencias entre inmunidad Innata e Inmunidad Adaptativa	53
2.2.3.4. Inmunoglobulinas de las aves	53
2.2.3.5. Órganos linfoides en el ave	54
2.2.3.5.1. El Timo	55
2.2.3.5.2. El bazo	56
2.2.3.5.3. La glándula de Halder, la glándula Pineal y los nódulos linfoides	56
2.2.3.6. Desarrollo del sistema inmune del ave	57
2.2.3.7. Mecanismos de defensa del tracto digestivo de las aves	58
2.2.3.7.1. Distribución horizontal del tejido linfoide asociado al tracto digestivo de aves	58
2.2.3.7.1.1. Bolsa de Fabricio	59
2.2.3.7.1.2. Tonsilas cecales	60
2.2.3.7.1.3. Placas de Peyer	60
2.2.3.7.1.4. Divertículo de Meckel	61
2.2.3.7.2. Distribución vertical del tejido linfoide asociado al tracto digestivo de aves (linfocitos de la pared intestinal)	61
2.2.3.7.3. IgA secretora (IgAs)	62
2.2.3.8. El pollo de engorde, animal susceptible a padecer estrés e inmunodepresión y sus consecuencias	63
2.2.4. Oportunidades para mejorar la salud intestinal y la salud del ave	66
2.2.4.1. Desarrollo y Mantenimiento	66
2.2.4.2. Inmunidad y Microflora	68
2.2.5. Sustancias empleadas en alimentación de aves para favorecer la salud intestinal y la inmunidad	70
2.2.5.1. Acidificantes o Ácidos orgánicos	70
2.2.5.2. Enzimas exógenas	71
2.2.5.3. Prebióticos, probióticos y simbióticos	72
2.2.5.4. Extractos de naturales o aceites esenciales	74
2.2.5.5. Inmunomoduladores	76
2.2.5.6. Otros aditivos	77
2.3. Las levaduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y sus aplicaciones en alimentación animal	78

2.3.1 Fracciones de levaduras	79
2.3.2 Fabricación industrial de levaduras	79
2.3.3 Fabricación industrial de paredes celulares y extractos de Levadura	80
2.3.3.1 Características de los extractos de levadura	81
2.3.4. Características de la pared celular de levadura	81
2.3.4.1. Composición de la PCL	82
2.3.4.2. Estructura de la PCL	83
2.3.5. Utilización de levaduras en alimentación animal	84
2.3.5.1. Utilización de paredes celulares de levadura, MOS y beta-glucanos en alimentación animal	89
2.3.5.2. Principales ventajas y desventajas del empleo de fracciones de PCL	91
2.3.6. Mecanismos de acción en el animal de las levaduras y paredes celulares de <i>S. cerevisiae</i> adicionadas en el alimento	92
2.3.6.1 Exclusión de patógenos y micotoxinas	94
2.3.6.1.1. Propiedades farmacodinámicas de la levadura	94
2.3.6.1.2. Exclusión de bacterias fimbria-1 específicas	95
2.3.6.1.3. Exclusión de micotoxinas	96
2.3.6.2. Efecto trófico sobre la mucosa digestiva	98
2.3.6.3. Estimulación del sistema inmune	100
<b>Capítulo 3. Planteamiento y objetivos del estudio</b>	<b>103</b>
3.1. Objetivo general	107
3.2. Objetivos particulares	108
<b>Capítulo 4. Evaluación preliminar de la incorporación de distintas levaduras y sus componentes en dietas elaboradas con trigo-cebada-centeno y maíz de pollos de engorde: efectos sobre parámetros productivos y digestivos del ave</b>	<b>111</b>
4.1. Resumen	113
4.2. Introducción	113
4.3. Material y métodos	115
4.3.1. Animales y alojamientos	115
4.3.2. Diseño y tratamientos experimentales	116
4.3.3. Parámetros evaluados	117
4.3.3.1. Digestivos	117



4.3.3.1.1. Viscosidad del contenido intestinal	117
4.3.3.1.2. Absorción de nutrientes	117
4.3.3.1.3. Recuentos de poblaciones bacterianas en el contenido digestivo	118
4.3.4. Análisis estadístico	119
4.4. Resultados	119
4.4.1. Parámetros productivos	119
4.4.2. Parámetros digestivos	121
4.5. Discusión	122
4.6. Conclusión	126
4.8. Tablas y figuras	127
<b>Capítulo 5. Efectos del programa de alimentación y de la utilización de paredes celulares de levadura sobre los parámetros productivos, desarrollo de la mucosa digestiva, respuesta inmune humoral y pesos de los órganos linfoides de pollos de engorde</b>	<b>135</b>
5.1. Resumen	137
5.2. Introducción	138
5.3. Material y métodos	140
5.3.1. Animales y alojamientos	140
5.3.2. Diseño y tratamientos experimentales	140
5.3.3. Parámetros evaluados	141
5.3.3.1. Digestivos	141
5.3.3.1.1. Viscosidad del contenido intestinal	142
5.3.3.1.2. Morfología de la mucosa del yeyuno	142
5.3.3.2. Respuesta inmune humoral	142
5.3.3.3. Porcentajes de los pesos relativos de los principales órganos linfoides del ave	142
5.3.4. Análisis estadístico	143
5.4. Resultados	143
5.4.1. Parámetros productivos	143
5.4.2. Variables digestivas	144
5.4.3. Morfología de la mucosa intestinal	145
5.4.4. Variables inmunitarias	145
5.5. Discusión	146
5.6. Conclusión	150
5.7. Tablas y figuras	151

---

---

**Capítulo 6. Influencia de la suplementación en la dieta con paredes celulares de levadura y fracciones purificadas de beta-glucanos y manano-proteínas, sobre los parámetros productivos, desarrollo de la mucosa digestiva, respuesta inmune humoral y % de los pesos relativos de órganos linfoides y digestivos del pollo** **157**

6.1. Resumen	159
6.2. Introducción	160
6.3. Materiales y método	161
6.3.1. Animales y alojamientos	161
6.3.2. Dietas experimentales	162
6.3.2.1. Experimento 1	163
6.3.2.2. Experimento 2	164
6.3.3. Análisis estadístico	165
6.4. Resultados	165
6.4.1. Experimento 1	165
6.4.2. Experimento 2	166
6.5. Discusión	167
6.6. Conclusión	172
6.8. Tablas y Figuras	174

**Capítulo 7. Efecto inmunomodulador de las paredes celulares de levadura adicionadas en dietas de pollos de engorde inoculados con lipopolisacárido de *E. coli*** **181**

7.1 Resumen	183
7.2. Introducción	183
7.3. Materiales y método	185
7.3.1. Animales y alojamientos	185
7.3.2. Dietas experimentales	185
7.3.3. Tratamientos y diseño experimental	186
7.3.4. Desafío o inoculación con LPS	186
7.3.5. Parámetros evaluados	186
7.3.5.1. Productividad de las aves	186
7.3.5.2. Porcentajes de los pesos relativos de los órganos linfoides del ave	187
7.3.5.3. Reacción cutánea para la evaluación de la prueba de hipersensibilidad tardía (Corrier y DeLoach, 1990)	187
7.3.6. Análisis estadístico	187

---

---

	<i><b>Índice</b></i>
7.4. Resultados	188
7.5. Discusión	189
7.6. Conclusión	191
7.7. Tablas y Figuras	192
<b>Capítulo 8. Discusión general</b>	<b>195</b>
8.1. Productos de levadura y sus efectos en la productividad del ave	197
8.2. Manano-proteínas y $\beta$ -glucanos, efectos en la productividad del ave	199
8.3. Mecanismos de acción de los productos de levadura y de las PCL y sus fracciones	199
<b>Capítulo 9. Conclusiones</b>	<b>203</b>
<b>Capítulo 10. Referencias bibliográficas</b>	<b>207</b>
<b>Capítulo 11. Apéndice</b>	<b>255</b>

---

ÍNDICE DE TABLAS	Página
<b>Tabla 2.1.</b> Antibióticos utilizados para promover el crecimiento en alimentación animal, clasificados de acuerdo al tipo de sustancias y mecanismo de acción (modificado de <b>Witte, 1996</b> ).	7
<b>Tabla 2.2.</b> Resumen de los beneficios obtenidos en producción animal por el empleo de distintos antibióticos promotores del crecimiento (modificado de <b>Page, 2005</b> ).	11
<b>Tabla 2.3.</b> Efectos de la retirada de antibióticos promotores del crecimiento sobre la productividad de pollos de engorde Ross-308 ( <b>Anonymous, 1999</b> ).	21
<b>Tabla 2.4.</b> Actividad de las enzimas y secreciones digestiva en el ave (adaptado de <b>Leeson y Summers, 2001</b> ).	31
<b>Tabla 2.5.</b> Crecimiento (g/100 g de peso corporal) de los órganos digestivos del pollo de engorde calculados a diferentes edades (adaptado de <b>Iji et al., 2001a</b> ).	32
<b>Tabla 2.6.</b> Características del contenido digestivo y bacterias presentes en las diferentes secciones del tracto digestivo.	40
<b>Tabla 2.7.</b> Componentes del sistema inmune innato (adaptado de <b>Abbas y Lichtman, 2004</b> ).	48
<b>Tabla 2.8.</b> Características de la inmunidad adaptativa (adaptado de <b>Abbas y Lichtman, 2004</b> ).	50
<b>Tabla 2.9.</b> Fases de la respuesta inmune adaptativa (adaptado de <b>Abbas y Lichtman, 2004</b> ).	52
<b>Tabla 2.10.</b> Pesos relativos de los órganos linfoides de pollos de engorde representativos de una estirpe moderna 2001 (Ross 308) y una estirpe de 1957 (Athens-Canadian) (adaptado de <b>Cheema et al., 2003</b> ).	64
<b>Tabla 2.11.</b> Contenido y composición de la pared celular de varias especies de levaduras (adaptado de <b>Nguyen et al., 1998</b> ).	83
<b>Tabla 2.12.</b> Macromoléculas de la pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (adaptado de <b>Aguilar-Uscanda y François, 2003; Klis et al., 2006</b> ).	84
<b>Tabla 2.13.</b> Efectos benéficos en diferentes especies por la administración de levaduras de <i>Saccharomyces</i> en la dieta.	87

---

<b>Tabla 2.14.</b> Efecto en el crecimiento de pollos de engorde por la utilización de levaduras de <i>Saccharomyces</i> en la dieta.	88
<b>Tabla 2.15.</b> Efectos de la incorporación de MOS derivados de PCL en la dieta de pollos de engorde comerciales.	90
<b>Tabla 2.16.</b> Efectos de la incorporación de MOS derivados de PCL en la dieta de pavos y de gallinas de postura.	92
<b>Tabla 2.17.</b> Efectos de la incorporación de glucomananos esterificados de PCL a piensos para aves contaminados de forma experimental con diversas micotoxinas.	98
<b>Tabla 3.1.</b> Principales constituyentes de 3 paredes celulares industriales de levadura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> empleados como aditivos polisacáridos en alimentación animal.	106
<b>Tabla 4.1</b> Composición de las dietas experimentales.	127
<b>Tabla 4.2.</b> Principales constituyentes de las 2 paredes celulares de levadura (PCL) de <i>S. cerevisiae</i> producidas de forma industrial y empleadas en las dietas experimentales.	128
<b>Tabla 4.3.</b> Efecto de la suplementación dietaria (dietas de trigo-cebada-centeno) de antibiótico promotor del crecimiento (APC o avilamicina), levaduras de <i>S. cerevisiae</i> y sus constituyentes (extractos y paredes celulares), sobre los parámetros productivos de pollos de engorde: peso vivo, ganancia de peso por día (GDP), consumo de alimento por día (CAD) e índice de conversión alimenticia (ICA). Experimento 1.	129
<b>Tabla 4.4.</b> Efecto de la suplementación dietaria (dietas de maíz) de antibiótico promotor del crecimiento (APC o avilamicina), levaduras de <i>S. cerevisiae</i> y sus constituyentes (extractos y paredes celulares), sobre los parámetros productivos de pollos de engorde: peso vivo, ganancia de peso por día (GDP), consumo de alimento por día (CAD) e índice de conversión alimenticia (ICA). Experimento 2.	130
<b>Tabla 4.5.</b> Valores promedio por día del consumo de agua en relación al consumo de alimento y de la viscosidad intestinal (contenido ileal), de pollos de engorde alimentados con una dieta control libre de aditivos y dietas con APC (avilamicina), levaduras de <i>S. cerevisiae</i> y sus componentes (extractos y paredes celulares).	131

<b>Tabla 4.6.</b> Valores promedio de recuentos de colonias bacterianas del contenido ileal de pollos de engorde, alimentados con una dieta control libre de aditivos y dietas con APC (avilamicina), levaduras de <i>S. cerevisiae</i> y sus componentes (extractos y paredes celulares).	132
<b>Tabla 4.7.</b> Valores promedio de los coeficientes de digestibilidad ileal de nutrientes de pollos de engorde, alimentados con una dieta control libre de aditivos y dietas con APC (avilamicina), levaduras de <i>S. cerevisiae</i> y sus componentes (extractos y paredes celulares).	133
<b>Tabla 5.1.</b> Composición de las dietas experimentales.	151
<b>Tabla 5.2.</b> Efectos de la utilización de paredes celulares de levadura y de distintos programas de alimentación, sobre los parámetros de productividad* de pollos de engorde en sus diferentes fases productivas.	152
<b>Tabla 5.3.</b> Efectos de la utilización de paredes celulares de levadura (PCL) y de distintos programas de alimentación, sobre el contenido de materia seca en excretas y contenido digestivo y sobre la viscosidad del contenido ileal.	153
<b>Tabla 5.4.</b> Efectos de la utilización de paredes celulares de levadura (PCL) y de distintos programas de alimentación, sobre la morfometría de la mucosa del yeyuno de pollos de engorde (22 días).	154
<b>Tabla 5.5.</b> Efectos de la utilización de paredes celulares de levadura (PCL) y de distintos programas de alimentación, sobre la respuesta inmunitaria de tipo humoral contra la vacuna del virus de la enfermedad Newcastle (NDV).	155
<b>Tabla 5.6.</b> Efectos de la utilización de paredes celulares de levadura (PCL) y de distintos programas de alimentación, sobre los porcentajes de los pesos relativos de los principales órganos linfoides del pollo de engorde.	156
<b>Tabla 6.1.</b> Composición de las dietas experimentales.	174
<b>Tabla 6.2.</b> Principales constituyentes de la pared celular de levadura ( <i>S. cerevisiae</i> ) y de sus fracciones de polisacáridos purificadas empleadas en las dietas experimentales.	175
<b>Tabla 6.3.</b> Efectos de la utilización en la dieta de avilamicina (APC), paredes celulares de levadura (PCL), manano-proteínas (MP) y beta-glucanos (BG) sobre los parámetros de productividad* de pollos de engorde (42 días de experimentación) (Experimento 1).	176

<b>Tabla 6.4.</b> Efectos de la utilización en la dieta de avilamicina (APC), paredes celulares de levadura (PCL), manano-proteínas (MP) y beta-glucanos (BG) sobre los pesos relativos de los principales órganos linfoides (37 días de edad) y la producción de anticuerpos de la vacuna del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) de pollos de engorde ( <b>Experimento 1</b> ).	177
<b>Tabla 6.5.</b> Efectos de la utilización en la dieta de paredes celulares de levadura (PCL) manano-proteínas (MP) y beta-glucanos (BG) sobre los parámetros de productividad* de pollos de engorde (42 días de experimentación) ( <b>Experimento 2</b> ).	178
<b>Tabla 6.6.</b> Efectos de la utilización en la dieta de paredes celulares de levadura (PCL), manano-proteínas (MP) y beta-glucanos (BG) sobre la altura de las vellosidades del yeyuno (21 días de edad) y pesos relativos de algunos órganos digestivos (21 días de edad) (Experimento 2).	179
<b>Tabla 7.1.</b> Composición de las dietas experimentales.	192
<b>Tabla 7.2.</b> Efectos de la incorporación en la dieta de paredes celulares de levadura (PCL), sobre los parámetros productivos* (0-21 días) de pollos inoculados con lipopolisacárido (LPS) de <i>E. coli</i> .	193
<b>Tabla 7.3.</b> Efectos de las PCL sobre los pesos relativos de los principales órganos linfoides expresados como % del peso del ave (21 días) y la reacción de hipersensibilidad cutánea tardía de pollos inoculados con LPS de <i>E. coli</i> .	194
<b>Tabla 11.1.</b> Peso promedio de pollos de engorde alimentados con dietas trigo-cebada-centeno (TCC) y maíz suplementadas con levaduras, paredes celulares de levaduras (PCL), extractos, manano-proteínas (MP), beta-glucanos (BG) y antibiótico promotor del crecimiento (APC), y efecto en el parámetro expresadas como % de mejora por el uso de los distintos aditivos respecto del empleo de la dieta control = 100% (por experimento y globales).	257
<b>Tabla 11.2.</b> Índice de conversión alimenticia de pollos de engorde alimentados con dietas trigo-cebada-centeno (TCC) y maíz suplementadas con levaduras, paredes celulares de levaduras (PCL), extractos, manano-proteínas (MP), beta-glucanos (BG) y antibiótico promotor del crecimiento (APC), y efecto en el parámetro expresadas como % de mejora por el uso de los distintos aditivos respecto del empleo de la dieta control = 100% (por experimento y globales).	258

<b>Tabla 11.3.</b> Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 1 (dietas únicas trigo-cebada-centeno 0-42 días).	259
<b>Tabla 11.4.</b> Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 2 (dietas únicas maíz 0-39 días).	259
<b>Tabla 11.5.</b> Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 3 (dietas únicas 0-43 días).	260
<b>Tabla 11.6.</b> Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 3 (programas con dietas de 0-21 y 21-43 días).	260
<b>Tabla 11.7.</b> Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 4 (dietas únicas trigo-cebada-centeno 0-42 días).	261
<b>Tabla 11.8.</b> Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 5 (dietas 0-21 y 21-42 días).	261
<b>Tabla 11.9.</b> Composición analizada de la dieta basal empleada en el experimento 6 (dietas únicas maíz-trigo-cebada-centeno 0-28 días).	262



---

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
<b>Figura 2.1.</b> Resistencia a la avoparcina de cepas de <i>Enterococcus faecium</i> aisladas en pollos y cerdos y consumo del antimicrobiano (adaptado de <b>DANMAP, 2004</b> ).	16
<b>Figura 2.2.</b> Resistencia a la virginamicina en cepas de <i>Enterococcus faecium</i> aisladas en pollos y cerdos y el consumo de este antimicrobiano (adaptado de <b>DANMAP, 2004</b> ).	17
<b>Figura 2.3.</b> Resistencia a la avilamicina en cepas de <i>Enterococcus faecium</i> aisladas en pollos y cerdos y el consumo del antimicrobiano (adaptado de <b>DANMAP, 2004</b> ).	17
<b>Figura 2.4.</b> Consumo de antimicrobianos en Dinamarca como promotores del crecimiento y de prescripción veterinaria y humana (adaptado de <b>DANMAP, 2004</b> ).	18
<b>Figura 2.5.</b> Tracto digestivo del ave (adaptado de <b>Sturkie, 1976</b> ).	25
<b>Figura 2.6.</b> Representación esquemática transversal de la pared intestinal y sus diferentes superficies (adaptada de <b>Moran, 1982</b> ).	27
<b>Figura 2.7.</b> Representación esquemática de la mucosa intestinal (adaptado de <b>Fortun-la Mothe y Boullier, 2003; Moran, 1982</b> ).	29
<b>Figura 2.8.</b> Forma y orientación de las vellosidades intestinales en pollos de engorde: a) vellosidad en forma de dedo, 1 día de edad; b) vellosidades en forma de hoja plegadas y sin orientación en zigzag, 21 días; c) vellosidades en forma de lengua, canto y hoja sin orientación en zigzag, 21 días; y d) vellosidades en diferentes formas con orientación en zigzag, 21 días (tomado y adaptado de <b>Van Leeuwen et al., 2004</b> ).	34
<b>Figura 2.9.</b> Composición de la flora bacteriana del ileon y ciego de pollos de engorde por el estudio de la fracción 16s ADNR (adaptado de <b>Lu et al., 2003</b> ).	42
<b>Figura 2.10.</b> Principales mecanismo de la respuesta inmune innata y adaptativa (adaptado de <b>Abbas y Lichtman, 2004</b> ).	46
<b>Figura 2.11.</b> Representación de la estructura general de una inmunoglobulina o anticuerpo (adaptado de <b>Sánchez Vizcaíno, 2000</b> ).	53

- Figura 2.12.** Diferentes órganos linfoides del pollo primarios (timo y bolsa de Fabricio) y secundarios (glándulas de Halder, bazo, tonsilas cecales, nódulos linfoides, glándula pineal y divertículo de Meckel). 55
- Figura 2.13.** Esquema de la producción industrial de levaduras y paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de **DAN-LFA, 2005**). 80
- Figura 2.14.** Levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y estructura de su pared celular (adaptado de **Anonymous, 2003; Oriol, 2004**). 82



**Capítulo 1. Introducción general.**

## **1.0. Introducción general**

Desde hace 50 años en la industria de la alimentación animal se han empleado antibióticos a dosis sub-terapéuticas con la finalidad de mejorar el crecimiento, la eficiencia alimenticia y la salud del animal (antibióticos promotores del crecimiento=APC). No obstante, esta práctica está siendo cuestionada debido al creciente temor de la posible generación de genes de resistencia en bacterias digestivas para antibióticos empleados en terapéutica humana, situación que podría representar un riesgo potencial para la salud pública. En la actualidad, debido a esta situación y a otras crisis alimentarias (Encefalomielitis espongiforme bovina o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, dioxinas, etc.) sufridas previamente en la Unión Europea (UE), la percepción del consumidor hacia los productos de origen animal se ha sensibilizado aun más incrementándose las preferencias hacia los productos producidos de forma más natural y de mejor calidad. El pasado uno de enero de 2006, en los países pertenecientes a la Unión Europea (UE) se llevó a cabo la prohibición total del empleo de APC en los piensos de animales; inclusive se ha contemplado una futura prohibición para el uso de aditivos de tipo coccidiosícticos e hitomostáticos (31 de diciembre del 2012). Dentro de la UE, algunos países escandinavos como Suecia y Dinamarca realizaron prohibiciones previas a la del primero de enero del 2006 para el uso de APC. Hasta la fecha, los resultados obtenidos en Suecia y Dinamarca por la adopción de esta medida, han mostrado que la crianza de pollos de engorde no se vio afectada de forma catastrófica, parte de este comportamiento fue atribuido a que se continuaron utilizando en los piensos coccidiostatos de tipo ionóforos con efectos antimicrobianos. Por lo cual, podría considerarse que las consecuencias de las prohibiciones parciales y totales ocurridas en la UE para el uso de APC durante los últimos 20 años se conocen solo en forma parcial. Las consecuencias futuras, podrían incluir una reducción de la productividad animal y un incremento en la presentación de enfermedades de forma subclínicas y clínicas, sobretodo en el caso de los sistemas de producción con medidas sanitarias inadecuadas. Algunas de las preguntas que surgen ahora son: 1) que tan lejos de las experiencias europeas pudieran extrapolarse estas medidas a otras partes del mundo, probablemente los diferentes patrones de enfermedades, condiciones climáticas (tropicales o frías) y métodos de producción de los distintos países podrían requerir diferentes soluciones a una futura prohibición global; 2) las mejoras en eficiencia productiva del animal con el uso de APC pudieran ser remplazadas con otro tipo de mecanismo de control antimicrobiano; 3) las mejoras en la eficiencia productiva del animal, pueden ser logradas sobre la base de un mejor entendimiento y manipulación de los factores que regulan la disponibilidad y utilización de nutrientes en el tracto digestivo del animal (salud intestinal). En la nutrición actual y moderna, las mejoras en las prácticas de manejo, alimentación y bioseguridad además del

empleo en la dieta de nuevos aditivos (enzimas, microorganismos, extractos de plantas, ácidos orgánicos, manano-oligosacáridos, e inmuno-estimulantes) que ejerzan efectos nutricionales y en la salud del animal, son y serán puntos estratégicos para afrontar la prohibición de los APC y para mejorar la salud y productividad del ave. Bajo estas nuevas premisas, nuevas oportunidades quedan abiertas en la industria alimenticia para el desarrollo e investigación de sustancias naturales que puedan ser empleadas en alimentación animal. En el caso de las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* (SC), gracias a sus propiedades nutricionales y farmacodinámicas, su utilización en alimentación de animal y humana ha sido frecuente desde hace ya varios años. Las levaduras pueden constituir un buen complemento alimenticio ya que pueden proveer nutrientes como proteínas, minerales, y vitaminas (B12). En humanos las levaduras de SC, han sido empleadas para controlar diarreas a causa de *Clostridium spp* en pacientes medicados con antibióticos por vía oral durante periodos prolongados. Aparentemente, la utilización de levaduras SC muestra ser una buena alternativa en alimentación animal no obstante, su empleo ha sido mayormente orientada a alimentación de rumiantes. Recientemente, en alimentación de monogástricos, se ha incrementado el interés y la frecuencia del empleo de fracciones celulares o paredes celulares de levaduras SC. Parte de los beneficios que se le atribuyen a las paredes celulares de la levadura, son de servir como fuentes de polisacáridos de tipo manano-oligosacáridos y beta-glucanos. Los manano-oligosacáridos, pueden favorecer la exclusión intestinal de bacterias patógenas, y específicamente de las que presentan fimbria tipo-1 como *Salmonella*. En el caso de los beta-glucanos, estudios en mamíferos y peces, muestran que este tipo de moléculas puede incrementar la resistencia al estrés y enfermedades infecciosas al funcionar como sustancias estimulantes de la respuesta inmune de tipo innata. Por otra parte, aunque el empleo de levaduras y fracciones de levaduras (paredes celulares) puede representar una alternativa viable para mejorar la productividad de animales monogástricos ante la ausencia de APC en las dietas. En la actualidad, la generación de una mayor información sobre las características propias de estos nuevos aditivos (levaduras y paredes celulares) y de su comportamiento bajo distintas condiciones dietarias, adquiere una gran importancia para poder lograr un mejor entendimiento y optimización del empleo de estos nuevos productos (levaduras de SC y sus fracciones) en dietas para pollos de engorde. De esta manera la presente tesis muestra una serie de experimentos realizados en pollos de engorde donde se evalúan las respuestas del empleo de levaduras y las paredes celulares de levadura en la dieta como una alternativa para mejorar la productividad y salud del ave.

**Capítulo 2. Revisión bibliográfica.**

**2.0. Revisión bibliográfica**

**2.1. Antibióticos promotores del crecimiento**

Muchos antibióticos son utilizados en la industria de la producción animal o de forma más concreta dentro de los sistemas de producción intensiva, con dos principales finalidades: en una mayor proporción con fines terapéuticos para mejorar la salud y el bienestar animal; y en menor proporción con un fin profiláctico para mejorar el crecimiento y la eficiencia alimenticia del animal o como APC (Jones y Ricke, 2003; Dibner y Richards, 2005). En el **Tabla 2. 1.**, se mencionan algunos ejemplos de antibióticos utilizados como APC en la industria de la alimentación animal, clasificándolos de acuerdo al tipo de sustancia activa y a su mecanismo de acción.

**Tabla 2.1.** Antibióticos utilizados para promover el crecimiento en alimentación animal, clasificados de acuerdo al tipo de sustancias y mecanismo de acción (modificado de Witte, 1996).

<b>Grupo</b>	<b>Sustancias</b>		<b>Mecanismo de acción</b>
<b>Glicopéptidos</b>	<i>Avoparcina</i> <i>Ardacina</i> <i>Bambermicina</i>	<i>Vancomicina</i> <i>Teicoplanina</i> <i>Daptomicina</i>	Inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, al evitar el proceso de transglucosilación bacteriano
<b>Inóforos</b>	<i>Monensina</i> <i>Salinomicina</i>	<i>Lasolacid</i> <i>Narasina</i> <i>Maduramicina</i>	Disgregación de la membrana citoplásmica bacteriana
<b>Macrólidos</b>	<i>Tilosina</i> <i>Espiramicina</i> <i>Kitasamicina</i> <i>Oleandomicina</i>	<i>Eritromicina</i> <i>Azitromicina</i> <i>Claritromicina</i>	Inhibición de síntesis proteica, por estallido del ribosoma bacteriano
<b>Ortosomicinas</b>	<i>Avilamicina</i>	<i>Everninomicina</i>	Inhibición de síntesis proteica, evita la elongación bacteriana
<b>Fosfo-glicolípidos</b>	<i>Flavomicina</i>	-	Inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, al evitar el proceso de transglucosilación bacteriano
<b>Polipéptidos</b>	<i>Bacitracina</i>	-	Inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, al evitar el proceso de transglucosilación bacteriano
<b>Quinolonas</b>	<i>Olaquinox</i> <i>Carbadox</i>	<i>Ciadox</i>	Inhibe la síntesis de ADN bacteriano
<b>Estreptograminas</b>	<i>Virginiamicina</i>	<i>Pristamicina</i> <i>Quinupristina-dalfopristina</i>	Inhibición de síntesis proteica, por estallido del ribosoma bacteriano



Actualmente, los antibióticos empleados como promotores del crecimiento en alimentos para animales han sido prohibidos dentro de los países pertenecientes a la Unión Europea (UE) no obstante, el resto de países no pertenecientes a la UE continúa utilizando diversos APC en piensos para animales para llevar a cabo esta finalidad.

### 2.1.1. APC y su relación con la microbiota bacteriana del tracto gastrointestinal

La microbiota presente en el tracto digestivo de animales es un conjunto de una gran variedad de microbios de los cuales las bacterias son las predominantes (**Savage, 1977; Mackie et al., 1999**). Se considera que el número de células bacterianas supera en 10 veces al número total de células presentes en el animal huésped. Por lo cual, estas poblaciones de bacterias pueden influenciar significativamente los procesos inmunológicos, nutricionales, fisiológicos y de protección en el huésped (**Berg y Savage, 1972; Berg, 1996**). Los antibióticos utilizados en piensos para animales aparentemente ejercen su acción en la modificación y reducción de la microbiota intestinal. Y de manera significativa, sobre el control de las bacterias gram-positivas que frecuentemente están asociadas con los problemas de salud y baja productividad animal. Debido a este efecto, la respuesta o eficacia de los APC para mejorar la productividad animal puede depender de diversos factores como el tipo de dieta empleada y las condiciones de higiene en las cuales son mantenidos los animales (**Rosen, 1995; Bedford, 2000**).

La estrecha relación entre la utilización de APC y la microflora del huésped pudo ser observada en los estudios de **Bywater (1998)**, en donde se encontró que la utilización de APC en dietas de pollos de engorde libres de gérmenes o sin una microflora digestiva, no representó ningún beneficio en su productividad. De manera similar, otros estudios (**Coates y Harrison, 1969**) realizados con pollos mantenidos en condiciones de muy buena higiene durante su periodo de crianza, mostraron una nula o pobre respuesta a la inclusión de APC en la dieta. Estas observaciones podrían indicar que si los antibióticos contrarrestan los efectos adversos de la microflora digestiva sobre la eficiencia productiva del animal, pueden "permitir el crecimiento" en vez de "promoverlo" (**Anderson et al., 1999**). Esta aseveración pudo ser corroborada en los estudios de **Muramatsu et al. (1994)**, quienes empleando pollos libres de gérmenes observaron que el costo en energía metabolizable aparente (EMA) que representa la microbiota presente en el tracto digestivo de los animales convencionales era de al menos un 10% del total de la EMA de la dieta. De hecho, los datos de este estudio también mostraron que los animales criados en condiciones libres de gérmenes mostraban un mayor crecimiento en relación a aquellos animales criados en condiciones convencionales, gracias al nulo efecto en la utilización de la EMA por parte de la microbiota digestiva. La carencia de una microbiota digestiva que

no represente ningún desafío en el huésped limita claramente la respuesta a la incorporación de APC en la dieta. En otro sentido, el ambiente en cual son mantenidos los animales adquiere también una gran importancia, ya que el tracto digestivo del animal permanece estéril hasta antes del nacimiento o la eclosión en el caso de aves (**Bedford, 2000**).

### **2.1.2. Beneficios obtenidos por la utilización de APC en dietas para animales**

El efecto antimicrobiano de los APC suministrados en los piensos de animales puede representar grandes beneficios en su salud y productividad (**Page, 2005**). En la **Tabla 2.2.**, están resumidos algunos de los beneficios de la utilización de diferentes antibióticos promotores del crecimiento en diferentes especies de animales de producción. Como puede observarse los efectos ejercidos por la utilización de APC no solo involucran efectos directos sobre la productividad del animal además, ciertos procesos metabólicos del animal pueden verse favorecidos previniéndole algunos desordenes. Por otro lado, la utilización de APC puede brindar beneficios en términos de una reducción en la liberación de algunos contaminantes al medio ambiente y sobre el control de la presentación de algunas enfermedades. Se conoce que las bacterias intestinales colonizan la pared intestinal del tracto digestivo, utilizan los componentes de la dieta, reducen la digestión y absorción de nutrientes particularmente lípidos al degradar algunas enzimas digestivas y en el caso de los lípidos por desconjugación de los ácidos biliares (**Lepkowsky et al 1964; Philips y Fuller 1983; Langhout et al., 2000**). Como consecuencia el huésped incrementa la producción de enzimas digestivas, el peso del páncreas y del intestino para digerir y competir por los nutrientes de la ración (**Brenes et al., 1993; Angkanaporn et al., 1994**).

En una situación de excesiva proliferación bacteriana en el tracto digestivo del animal, pueden ocurrir diversas situaciones que interfieran con su fisiología digestiva, por ejemplo: incremento de la respuesta inmunológica a escala de la mucosa digestiva que puede desencadenar inflamación (**Taylor, 2001**), incremento de la secreción de mucus e incremento de la tasa de renovación del epitelio digestivo por la acción de poliamidas producidas durante el metabolismo bacteriano (**Deloyer et al., 1993; Noack et al., 1996**), incremento de la velocidad de migración de los enterocitos inmaduros al ápice de la vellosidad intestinal que puede mermar los procesos de digestión y absorción de nutrientes (**Silva y Smithard, 1996**), e incremento en la producción de calor debido a una mayor fermentación bacteriana de sustratos (**Teeter et al., 2003**). De acuerdo a **Teeter et al. (2003)**, los gastos en energía del huésped para transformar o eliminar las sustancias tóxicas del metabolismo bacteriano, podrían ser de 242 Kcal EM/kg. Por lo tanto, el control o reducción de la microbiota del tracto digestivo del huésped por la

acción de los APC, podría evitar los efectos nocivos de las bacterias, y proporcionar beneficios directos o indirectos al huésped a distintos niveles (**Bedford, 2000; Richards et al., 2005**):

- a) Mejor estado de inmunocompetencia. La reducción de microorganismos patógenos puede reducir la ocurrencia de enfermedades clínicas, subclínicas o procesos inflamatorios que generarían un gasto inmunológico para el animal.
- b) Reducción de los metabolitos microbianos que deprimen el crecimiento. Se sabe que algunos productos del metabolismo microbiano (como el NH<sub>3</sub> y el ácido láctico) aumentan la tasa de división celular de los enterocitos, lo cual consume energía, altera la barrera intestinal, favorece la translocación bacteriana e inhibe la máxima absorción de nutrientes.
- c) Menor competición por el uso de los nutrientes con los microorganismos.
- d) Favorecer la absorción y utilización de los nutrientes a través de una pared intestinal más delgada.

En estudios realizados para evaluar los efectos globales del empleo de APC en alimentación de pollos y cerdos mantenidos bajo diversas condiciones o ambientes, se sugiere que el promedio de beneficios de estas sustancias fue de una mejora en el índice de conversión de aproximadamente +3%, con un rango de 0 a 5% (**Rosen, 1995; Thomke y Elwinger, 1998**). Incluso, ha sido sugerido que el efecto de la utilización de APC en la reducción del índice de conversión del alimento, y en la mejora de la digestibilidad del pienso puede ser reflejado de forma directa en la reducción de excreciones al medio ambiente (**Thomke y Elwinger, 1998**).

**Tabla 2.2.** Resumen de los beneficios obtenidos en producción animal por el empleo de distintos antibióticos promotores del crecimiento (modificado de Page, 2005).

<i>Beneficio</i>	<b>Antibióticos empleados en alimentación animal</b>								
	<i>Principio activo</i>								
<b>Medioambiental (Reducción)</b>									
Emisión de Metano (Rumiantes)			Bambermicina	Lasolacid	Monensina	Narasina	Salinomicina	Tilosina	Virginiamicina
Excreción de nitrógeno	Avilamicina	Bacitracina	Bambermicina	Lasolacid	Monensina	Narasina	Salinomicina	Tilosina	Virginiamicina
Eliminación de fósforo				Lasolacid	Monensina	Narasina	Salinomicina		Virginiamicina
<b>Productividad (incremento)</b>									
Ganancia de peso	Avilamicina	Bacitracina	Bambermicina	Lasolacid	Monensina	Narasina	Salinomicina	Tilosina	Virginiamicina
Eficiencia alimenticia	Avilamicina	Bacitracina	Bambermicina	Lasolacid	Monensina	Narasina	Salinomicina	Tilosina	Virginiamicina
Rendimiento de la canal	Avilamicina		Bambermicina						
Supervivencia y crecimiento de lechones							Salinomicina		Virginiamicina
Producción Láctea (vacas)				Lasolacid	Monensina				Virginiamicina
<b>Enfermedades (control)</b>									
Enteritis necrótica (Aves)	Avilamicina	Bacitracina		Lasolacid	Monensina	Narasina	Salinomicina		Virginiamicina
Enteritis por clostridias (cerdos)							Salinomicina		Virginiamicina
Enteropatía proliferativa (cerdos)	Avilamicina	Bacitracina			Monensina		Salinomicina	Tilosina	Virginiamicina
Disentería porcina							Salinomicina		Virginiamicina
Neumonía aguda (bovinos)				Lasolacid	Monensina	Narasina	Salinomicina		
Coccidiosis (becerras y cabras)				Lasolacid	Monensina	Narasina	Salinomicina		
Toxoplasmosis (ovejas)					Monensina				
<b>Trastornos metabólicos y fermentativos (prevención)</b>									
Acidosis láctica				Lasolacid	Monensina	Narasina	Salinomicina		Virginiamicina
Laminitis				Lasolacid	Monensina	Narasina	Salinomicina		Virginiamicina
Cetosis					Monensina				
Timpanismo ruminal				Lasolacid	Monensina				
<b>Otros (mejora)</b>									
Tolerancia al calor	Avilamicina			Lasolacid	Monensina	Narasina	Salinomicina		Virginiamicina
Calidad de las camas (pollos de engorde)	Avilamicina								Virginiamicina

### **2.1.3. Historia del empleo de APC en producción animal**

El empleo de antibióticos con la finalidad de promover el crecimiento de los animales comenzó en 1946, cuando fue observada una sustancial respuesta en el crecimiento de pollos como respuesta a la inclusión de estreptomicina en el alimento (**Moore, 1946**). En los años 50, fueron realizados estudios en aves y cerdos con dietas suplementadas con antibióticos, en las cuales era confirmada la respuesta significativa en el crecimiento del animal debidos al empleo de antibióticos en el alimento (**Groschke y Evans, 1950; Stokstad y Jukes, 1950; Whitehill et al., 1950**). Por otro lado, fue durante ese periodo de tiempo, cuando la producción animal cambiaba rápidamente de sistemas de producción de baja productividad, alta morbilidad y en semilibertad a sistemas intensivos de producción animal más controlados y estabulados. De forma paralela, las demandas de alimento se incrementaban en la población durante el periodo de la post-guerra. Por lo cual, el descubrimiento de un inesperado acelerador de crecimiento recibió un especial interés y entusiasmo por la comunidad científica y por él público en general (**Jukes, 1972**). Como respuesta a este suceso, desde mediados de los años 50 han sido realizadas una gran cantidad de investigaciones en relación a los antibióticos y su nueva aplicación (**Dibner y Richards, 2005**).

### **2.1.4. La prohibición de los APC en la Unión Europea**

Los cambios ocurridos recientemente en los sistemas de producción animal de los países pertenecientes a la Unión Europea (UE) no sólo son debidos al temor de la posible relación entre la utilización de APC en la industria pecuaria, y la aparición de ciertos microorganismos resistentes a antibióticos empleados en terapéutica humana. Además, diversas crisis de seguridad alimentaria sufridas en la industria de la producción animal de estos países, por ejemplo: Encéfalomielitis espongiforme bovina (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), contaminación por dioxinas y otros accidentes han tomado parte importante en establecimiento de estas nuevas medidas (**Brufau, 2000**). Actualmente, la sensibilidad del consumidor hacia los productos de origen animal se ha incrementado, y la preferencia por productos de mejor calidad y producidos de forma más natural es cada vez más frecuente (**Halfhide, 2003; Brufau, 2000**). De hecho, la posibilidad de que bacterias resistentes del tracto digestivo de animales puedan servir como reservorio y causar la diseminación de microorganismos resistentes a antibióticos empleados en terapéutica humana continua siendo dudosa (**Witte, 2000; Butaye et al., 2003; Phillips et al., 2004**). Probablemente, la decisión de la prohibición de los APC dentro de la UE ha sido basada sobre un principio de precaución o del manejo del riesgo, donde no solo el factor científico ha sido el más determinante sino además, otros factores como

análisis riesgo-beneficio, sociales, financieros y éticos han sido tomados en cuenta para adoptar estas medidas (**Wegener, 2005; Chesson, 2005; Kruse, 2005**).

Ya en 1969 surgían las primeras alarmas sobre la preocupación de la presencia de resistencias bacterianas y su relación con el uso de APC en piensos para animales. En ese año se publicó el informe británico de Swann (**Swann Committee Report, 1969**) en el cual se alertaba sobre el posible riesgo potencial de la selección de bacterias resistentes en animales, y que estas pudieran posteriormente pasar al ser humano. Dichas recomendaciones consideraban que no se utilizarían como promotores de crecimiento, antibióticos que pudieran ser empleados en terapéutica humana o antibióticos que mostraran mecanismos de resistencias cruzadas. En 1970 se publica la directiva 70/524 sobre el uso de aditivos en la alimentación animal dentro de la Comunidad Económica Europea. La directiva estableció que solamente podrían ser empleados como antibióticos promotores aquellas sustancias que tuvieran un efecto demostrado en el crecimiento animal, que fueran activas frente a bacterias gram-positivas, y que no se absorbieran a escala digestiva para prevenir la presencia de residuos en la carne. Además se especificó que los antibióticos que fueran utilizados en terapéutica humana o animal, entre ellos las tetraciclinas o  $\beta$ -lactámicos, serían retirados de su empleo como APC en el pienso para animales (**Anonymous, 1997**).

Para mediados de los noventa, en diversos países europeos se aislaron cepas bacterianas de *Enterococcus spp* resistentes a la vancomicina a partir de muestras de alimentos, aguas residuales, heces de humanos y de animales sanos no obstante, este tipo de cepas no eran identificadas en muestras clínicas, (**Bates et al., 1994; Torres et al., 1994; Aarestrup et al., 1995; Robredo et al., 2000**). Los aislamientos de *Enterococcus* resistentes representaban un riesgo para la salud humana ya que la vancomicina constituye una alternativa terapéutica viable para el tratamiento de infecciones graves a causa de *Enterococcus* multi-resistentes, microorganismo presente en la flora microbiana normal del tracto digestivo de humanos y animales, y que frecuentemente se encuentra implicado en infecciones graves en humanos. En contraste, en los Estados Unidos de América (EUA), se aislaban cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina en muestras clínicas humanas, y no en muestras medioambientales, alimentarias o en contenidos intestinales (**Murray, 2000**). Se planteó la posibilidad de que el uso de avoparcina como APC, autorizado en Europa hasta 1997 pero nunca autorizado en los EUA, pudiese haber contribuido a la selección de cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina en animales, ya que ambas moléculas presentan similar estructura química, similar mecanismo de acción y resistencia cruzada. Los estudios epidemiológicos realizados sobre el uso de avoparcina en animales en Europa y del elevado empleo de vancomicina en

humanos en EUA, podrían explicar las distintas características epidemiológicas de resistencia a la vancomicina en cepas de *Enterococcus* en ambos continentes. Aunque esta aseveración no ha sido bien esclarecida aun, se podría pensar que las cepas bacterianas resistentes de animales podrían pasar a través de la cadena alimenticia al humano y transferir sus genes de resistencia a los *Enterococcus* del intestino, los cuales posteriormente podrían provocar infecciones (**Bates et al., 1994; Torres et al., 1994; Aarestrup et al., 1995; Robredo et al., 2000; Murray, 2000**).

Otro ejemplo relevante, fue el emergente aislamiento de bacterias patógenas (*Salmonella* y *Campylobacter*) resistentes a las fluoroquinonas o, en concreto, a la ciprofloxacina observado en los EUA. No obstante, en otros países donde el uso de fluoroquinonas no había sido aprobado para su uso en alimentos para animales o era desalentada esta aplicación, se presentaban problemas de resistencia con el uso de ciprofloxacina en humanos (**Glynn et al., 1998; Smith et al., 1999**). A partir de 1986, inician una serie de prohibiciones entre los países Europeos para la utilización de APC en piensos para animales. Por ejemplo, el gobierno Sueco estableció que los antibióticos y químico-terapéuticos solamente podrían ser incorporados en dietas para animales para aliviar o curar enfermedades y no para promover la eficiencia productiva (**Anonymous, 1997**). En 1995, Suecia se une a la UE y mediante el Tratado de Adhesión se le permite prohibir el uso de APC hasta finales de 1998. Durante este periodo otros estados miembros de la UE (Dinamarca, Alemania, y Finlandia), impusieron cláusulas de protección contra ciertos antibióticos como avoparcina, tilosina, espiramicina y virginamicina, que eran autorizados en alimentación animal como APC (**Anonymous, 1998**).

Finalmente a partir de las opiniones de instituciones científicas europeas, en 1997, el Comité Científico de Nutrición Animal emitió una opinión y posteriormente la Comisión Europea efectuó la suspensión o prohibición del empleo de la avoparcina en alimentación animal. Al finalizar 1998, el Consejo de Ministros de la UE, suspendió la autorización como aditivos del fosfato de tilosina, espiramicina, bacitracina de zinc y virginamicina (**SCAN**)<sup>i</sup>. En 1999, el Comité Científico de Dirección (Scientific Steering Committee o SSC por sus siglas en inglés) de la Comisión Europea, publicó su opinión sobre la resistencia hacia los antimicrobianos,<sup>ii</sup> considerando 4 componentes ecológicos para la transferencia de resistencia a antimicrobianos: 1) humanos, 2) animales, 3) plantas, y 4) mantos freáticos. Siendo los factores comunes entre estos los antimicrobianos, bacterias, y los genes que codifican la resistencia. En el 2003, el diario oficial de la UE publicó la regulación No.

---

<sup>i</sup> [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/outcome\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/outcome_en.html).

<sup>ii</sup> [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out50\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out50_en.html)

183/2003<sup>iii</sup> sobre los aditivos empleados en nutrición animal. Estableciendo que los antibióticos usados para promover el crecimiento en alimentación animal ya no serían permitidos a partir del 1 de enero del 2006. En el caso de los coccidiostatos e histomostáticos su inclusión como aditivos en los piensos para animales sería permitido hasta el 31 de diciembre de 2012 como una medida para limitar infecciones digestivas durante la crianza intensiva de aves. Además, fue establecido que la comisión respectiva tendría que presentar un reporte al Parlamento y Consejo Europeo, sobre el correcto empleo de los coccidiostatos e histomostáticos como aditivos alimenticio y la disponibilidad de las posibles alternativas a ellos antes del uno de enero del 2008.

### **2.1.5. Impacto de la prohibición de los APC en alimentación animal (aves y cerdos) en los indicadores de resistencia bacteriana y en la producción animal en los países escandinavos y Suiza**

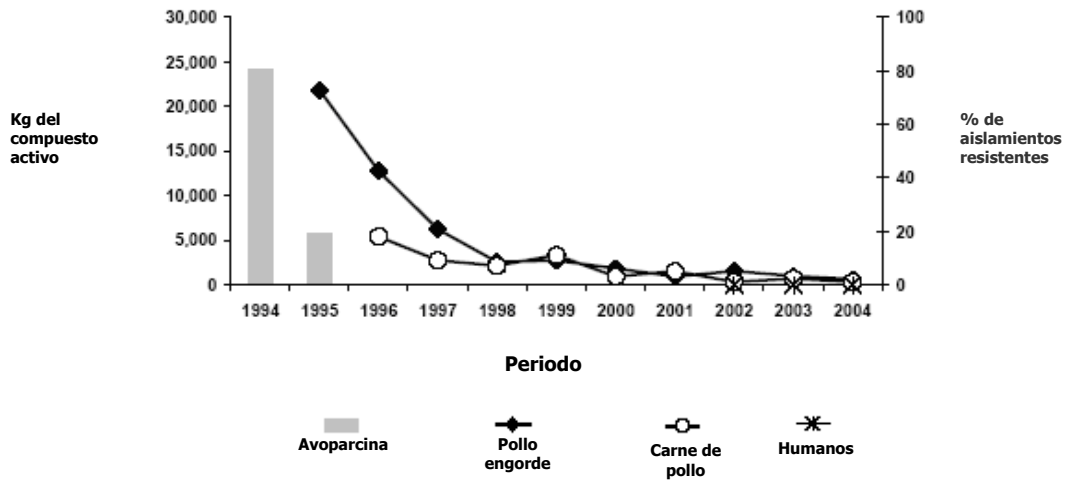
Dinamarca es el modelo más ampliamente estudiado, los resultados de los estudios de vigilancia anual sobre el consumo y la ocurrencia de resistencia de agentes antimicrobianos en bacterias de animales domésticos, alimentos y humanos desde 1997,<sup>ii</sup> mostraron que la ocurrencia de resistencia a avoparcina, virginamicina y macrólidos en cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de pollos y cerdos, disminuyeron durante los últimos 7 años después de la prohibición (**Figuras 2.1., 2.2., 2.3 y 2.4**). Por otro lado, los efectos observados por la eliminación de APC en la industria danesa del pollo de engorde no significaron grandes problemas en la productividad de los animales. Se consideró las pocas pérdidas observadas en la eficiencia alimenticia de las aves podrían ser compensadas por la eliminación del costo de incluir APC en las dietas. La ausencia de problemas de enteritis necrótica (EN) en las parvadas fue atribuida en parte al continuo uso de otras sustancias con efecto antimicrobiano como es el caso de los ionóforos o coccidiostatos (**Emborg et al., 2001**). En la producción de cerdos, posterior a la prohibición de APC, se observó un incremento en la presentación de problemas de diarreas pos-destete. Para afrontar esta situación, se investigaron varias sustancias alternativas con efectos no-antimicrobianos. De estas investigaciones se concluyó, que las alternativas únicas no eran del todo eficaces para prevenir las diarreas en la etapa de destete de los cerdos, observándose un incremento en la utilización de antibióticos con prescripción terapéutica. (**Callesen y Kjeldsen, 2005; Chesson, 2005**). De hecho, en Dinamarca desde 1997 hasta el 2004, se ha observado un incremento continuo en el consumo de antimicrobianos con prescripción veterinaria (**Figura 2.4.**).

---

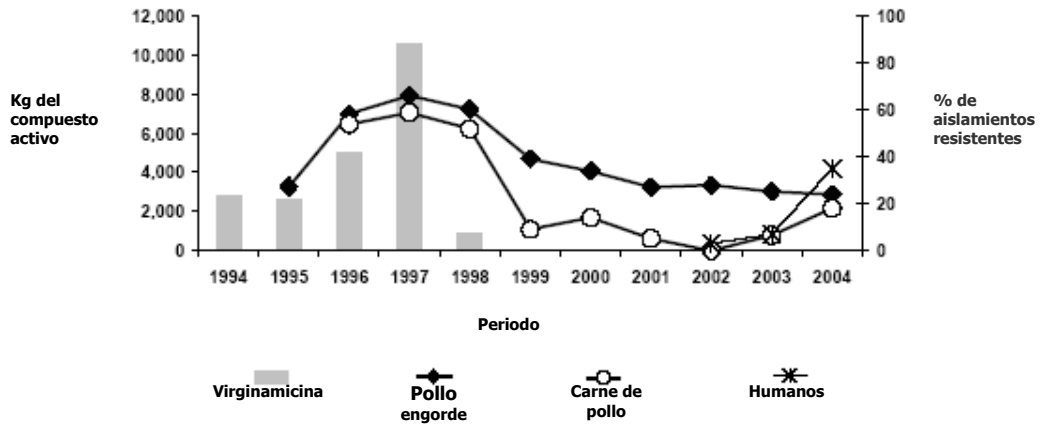
<sup>iii</sup> [http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2003/l\\_268/l\\_26820031018en00290043.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2003/l_268/l_26820031018en00290043.pdf)

<sup>ii</sup> [www.svs.dk](http://www.svs.dk), DANMAP, 2004

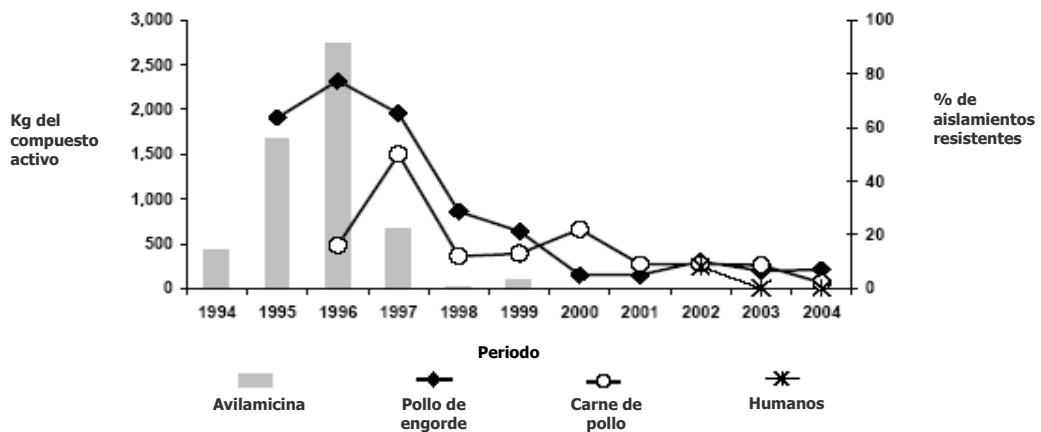




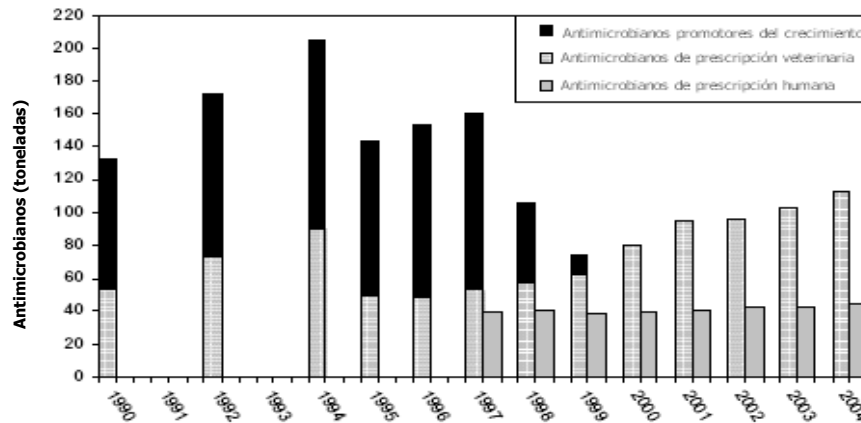
**Figura 2.1.** Resistencia a la Avoparcina de cepas de *Enterococcus faecium* aisladas en pollos y cerdos y consumo del antimicrobiano (adaptado de **DANMAP, 2004**).



**Figura 2.2.** Resistencia a la Virginamicina en cepas de *Enterococcus faecium* aisladas en pollos y cerdos y el consumo de este antimicrobiano (adaptado de **DANMAP, 2004**).



**Figura 2.3.** Resistencia a la Avilamicina en cepas de *Enterococcus faecium* aisladas en pollos y cerdos y el consumo del antimicrobiano (adaptado de **DANMAP, 2004**).



**Figura 2.4.** Consumo de antimicrobianos en Dinamarca como promotores del crecimiento y de prescripción veterinaria y humana (adaptado de **DANMAP, 2004**).

En Suecia, después de la prohibición de 1986 y durante un periodo de transición de 2 años se desarrollaron líneas de investigación encaminadas a estudiar las vías más eficaces para convivir con problemas de EN o infección por *Clostridium* en aves comerciales. Los resultados de estas investigaciones mostraron que aunado al uso de coccidiostatos, otros factores relacionados con el establecimiento de adecuados programas de higiene y practicas de manejo, la correcta manipulación de la composición de las dietas y la construcción de instalaciones avícolas en climas estables eran necesarios para disminuir la ocurrencia de enteritis necrótica en las granjas de pollos (**Wierup, 2005**). En la actualidad, la EN no se considera un problema en la producción de pollos de engorde en Suecia, en buena parte esto ha sido debido al establecimiento y mejoras de las medidas previamente descritas y al empleo de coccidiostatos o ionóforos permitidos aun en alimentación animal. Por otro lado, se ha observado un incremento en la productividad de los pollos de engorde, en buena parte debido también a las mejoras genéticas de estos animales en los últimos años (**Wegener, 2005**). En la producción porcina los problemas de diarreas post-destete emergieron después de la retirada del olaquinox. Para corregir estos problemas se establecieron cambios en las áreas de manejo, alimentación, higiene y selección genética, y la inclusión de zinc en el alimento de lechones y uso de alimento medicado en algunas manadas (**Wierup, 2005**).

Aunque en el caso de Finlandia la prohibición de APC aparentemente no resultó en un incremento de los casos de diarrea post-destete, si se observó un incremento en el consumo de alimento medicado en un 14% de las manadas. La ausencia de problemas en la etapa de post-destete en la producción porcina, fue atribuida a la información sobre el correcto manejo de los cerdos previo al retiro de los APC desde mediados de los años 90, que permitió a los productores ajustar y adecuar gradualmente sus prácticas de producción (**Laine et al., 2004**). En Suiza, la prohibición de APC en producción de cerdos no sobre-incrementó en general la prescripción veterinaria de antimicrobianos. Sin embargo, los patrones de uso indican un aumento en el número de tratamientos asociados a manejos de enfermedades diarreicas. Aun así la producción de cerdo no se vio substancialmente afectada y el volumen de producción se ha incrementado durante este periodo de observación (**Arnold et al., 2005**).

### 2.1.6. Ventajas y desventajas de la prohibición de los APC

Hasta la fecha, las consecuencias de la prohibición de los APC en la alimentación de animales dentro de los países de la UE se conocen solo en parte. La experiencia Danesa, permitió observar una disminución gradual de los niveles de resistencia en la flora bacteriana de animales de granja para algunos antibióticos (macrólidos, avoparcina/vancomicina) posterior a la prohibición de APC no obstante, esta respuesta no ha sido observada aun en la población humana (**Casewell et al., 2003**). Otra ventaja importante de la prohibición de los APC en producción animal, deberá incidir en una mejora de la percepción del consumidor hacia los productos de origen animal (carne, leche, y huevos). Paradójicamente, los beneficios o cuestionamientos sociales sobre el incremento en la aplicación de antimicrobianos con una finalidad terapéutica en animales después de la prohibición de APC, han sido asumidos sin discusión y no han sido sujetos a un análisis económico (**Chesson, 2005**). Las preguntas que surgen ahora son, ¿la experiencia danesa de una prohibición total de APC en alimentación animal puede extrapolarse a otras partes del mundo?, ¿Dinamarca puede ser un espejo del modelo de producción para varias partes del norte de Europa y Norte América? No obstante, se cree que el modelo de producción animal danesa sin APC no sería representativo para los países del Sur de Europa y también quedaría un tanto lejano de los esquemas de producción pecuarios realizados en los países tropicales. Países con distintos patrones de enfermedades, condiciones climáticas y métodos de producción podrían requerir otro tipo de medidas a las establecidas en los países Escandinavos ante una posible prohibición de APC. Por otro lado, las necesidades de las poblaciones locales representarían diferentes situaciones en los análisis de riesgo-beneficio (**Chesson, 2005**).

En el Reino Unido, los registros de ventas de antimicrobianos de uso veterinario publicados por parte de la Dirección de Medicina Veterinaria (**Veterinary Medicines Directorate, 2002**), indicaron que posteriormente a la prohibición de los APC en la UE en 1999, se incrementaron las ventas de antimicrobianos con uso terapéutico de 383 toneladas en 1999 a 437 toneladas en 2000. Este incremento fue atribuido al incremento del uso de tetraciclinas (36 toneladas), sulfonamidas y trimetropin (12 toneladas), y macrólidos (12 toneladas) (**Caswell et al., 2003**). Los mismos autores describen un incremento en el uso de terapéuticos autorizados para porcino de 7 toneladas, en avicultura de 13 toneladas y de 37 toneladas para otras especies. De acuerdo con **Caswell et al., 2003**, las desventajas de la prohibición de los APC en alimentación animal representan y representarán un notable incremento en los costos del control de enfermedades subclínicas y clínicas, mortalidad, pérdida en la eficiencia alimenticia e incremento en la prescripción de antimicrobianos de manera específica. Este problema será de mayor importancia cuando los animales sean mantenidos bajo condiciones de manejo o higiene normales o inadecuadas (**Mateos et al., 2000**).

En producción avícola y, en concreto, en pollos de engorde han sido realizados estudios para evaluar los efectos en la productividad del ave por la no utilización de APC en la dieta. **Engster et al. (2002)**, realizaron experimentos en distintas regiones de EUA con pollos de engorde mantenidos en condiciones comerciales durante 52 días, 7 millones de aves en un periodo de 3 años empleando 158 casetas en pares que incluyeron un control positivo (con coccidiostato, Roxarsone y APC) y control negativo sin APC. Los pollos del control negativo o sin APC mostraron una reducción de la viabilidad de las aves del 0.14% (Carolina del Norte o CN) al 0.20% (Península de Delmarva o PD); pérdida del peso promedio de 13.5 g en PD y de 18.0 g en CN; un incremento en el índice de conversión de 0.016 en PD y 0.012 en CN; además de una mayor variación en la homogeneidad en las parvadas. Los efectos negativos sobre la productividad del animal a causa de la retirada del APC en las dietas de los pollos, fueron corregidos solo temporalmente cuando se utilizaban camas nuevas en las casetas.

De forma similar a los estudios previos, los resultados de 3 pruebas realizadas en las instalaciones de una de las principales compañías comercializadoras de aves destinadas a la producción de carne (**Ross Breeders' facilities**), indicaron que la retirada de APC de las dietas de pollos de engorde puede representar pérdidas en el crecimiento y en la eficiencia alimenticia del ave, parte de estas estimaciones están resumidas en la **Tabla 2.3**.

**Tabla 2.3.** Efectos de la retirada de antibióticos promotores del crecimiento sobre la productividad de pollos de engorde Ross-308 (**Anonymous, 1999**).

Parámetro (6 semanas)	Efecto de la retirada de APC	Rango
Peso vivo	-50 g	0 a -150 g*
Índice de conversión del alimento	+0.04	0 a +0.08
Mortalidad	+0.1%	-1.3 a +1.0%
Homogeneidad de la parvada o coeficiente de variación	+1.8%	+0.2 a +3.3%

\* La mayor observación fue obtenida con el empleo de trigo (altamente viscoso) en la dieta.

En una predicción más general realizada para Holanda (**Jongbloed, 1998**), fue sugerido que la prohibición de APC reduciría la eficacia de la utilización del alimento por el animal de un 3 y 8%. De acuerdo a la experiencias Suecas, posteriores al retiro de APC, también se ha observado un incremento de +2.3% en la producción de heces. Esta observación podría tener importantes implicaciones económicas en los países donde las camas producidas durante la crianza de las aves tienen que ser retirada para la recepción de otra parvada comercial (**Anonymous, 1999**). Así también y según **Mateos et al. (2000)** la prohibición del uso de APC como aditivos tendrá un impacto significativo en los productores de alimentos de origen animal debido al incremento en la incidencia de: 1) diarrea en lechones después de un destete temprano debido a *E. coli* y disentería porcina; 2) heces líquidas en pollo de engorda y otras aves engordadas en piso debido a Enteritis necrótica producida por *Clostridium spp.*; 3) acidosis y paraqueratosis en ganado de carne en corral; y 4) coccidiosis en pollo de engorde y otras aves si el uso de ionóforos coccidiostáticos no es permitido en el alimento.

**2.1.7. Recomendaciones para afrontar las pérdidas en productividad animal ante la ausencia de APC**

Dentro de las principales prácticas descritas para afrontar las posibles pérdidas en la eficiencia productiva de los animales cuando los APC no sean utilizados en sus dietas, estarían aquellas encaminadas a mejorar las condiciones de bienestar y de salud del animal: 1) un mejor manejo de los animales, instalaciones y densidades de población; 2) mejora de las medidas de bioseguridad e higiene 3) cambios en los programas de alimentación, ingredientes y formulación de dietas y 4) aplicación de nuevas vacunas (entre éstas vs. *Coccidias* y *Clostridium*). Aunadas a estas medidas, el empleo en las dietas de nuevos aditivos no-antimicrobianos que puedan ejercer efectos en el animal de

tipo nutricional o de mejorar las condiciones de salud del tracto digestivo (nutracéuticos): enzimas, microorganismos, extractos de plantas, ácidos orgánicos, manano-oligosacáridos e inmuno-estimulantes (polisacáridos), son actualmente y serán empleados en la nutrición moderna como alternativas para mejorar la productividad del animal ante la ausencia de APC (**Bedford, 2000; Brufau, 2000; Kaldhusdal, 2003; Adams, 2004**).

## **2.2. Enfoque global del estudio de la salud intestinal y salud del ave**

El gran desarrollo logrado en la industria avícola durante los últimos 50 años, ha sido debido a las mejoras realizadas en las áreas de genética, alimentación y nutrición, control de enfermedades, mataderos, incubación y nacedoras. En la actualidad, la carne de pollo es una de las proteínas de origen animal de mayor consumo y la de menor costo de producción a escala mundial (**Mack *et al.*, 2005**). Es importante enfatizar que el empleo de APC en las prácticas de alimentación ha sido una herramienta determinante para incrementar la eficiencia alimenticia y productiva del ave durante estos últimos años (**Dibner y Richards, 2005**). Respecto a la prohibición del uso de APC en alimentos para animales, aunque esta medida no ha sido adoptada en otros países distintos a los pertenecientes a la UE, la importante apertura de los mercados de exportación para los productos de origen animal podría desencadenar una prohibición gradual de los APC en otros países (**Dibner y Richards, 2004; Palermo-Neto, 2005**). De hecho, algunos países Latino-Americanos que exportan productos avícolas y acuícolas a la UE, han tenido que adaptar sus sistemas de producción a las medidas impuestas en la UE (**Palermo-Neto, 2005**). Ante este nuevo horizonte en el área de producción animal sin APC, se generan dos importantes preguntas (**Dibner y Richards, 2004**):

- 1) Las mejoras obtenidas en la eficiencia productiva del animal con el uso de APC pueden ser remplazadas con la implementación de algún otro mecanismo de control antimicrobiano a escala digestiva.
  
- 2) El mejor entendimiento y la manipulación de los factores que regulan la disponibilidad y utilización de los nutrientes a escala del tracto digestivo del animal, pueden servir como base importante para incrementar la eficiencia productiva del animal.

Estos nuevos conceptos o cuestionamientos han propiciado que en la industria de la alimentación animal, los nutricionistas y los productores de alimentos sean más concientes de la necesidad de optimizar las funciones del aparato digestivo de monogástricos incluyendo los procesos de digestión y absorción de nutrientes, barrera intestinal (primera línea de defensa) y su microbiota a un nivel mínimo de empleo de nutrientes para el mantenimiento digestivo y respuesta inmune (respuesta anti-inflamatoria) para obtener los máximos beneficios en la productividad del animal (**Van der Klis y Jansman, 2002**). A pesar de este gran interés, el estudio y entendimiento del sistema digestivo no muestra ser un modelo sencillo ya que durante las diferentes fases de crecimiento del individuo, la función y desarrollo intestinal pueden verse modificados de forma benéfica o adversa por factores de tipo dietarios, de manejo o medioambientales, e



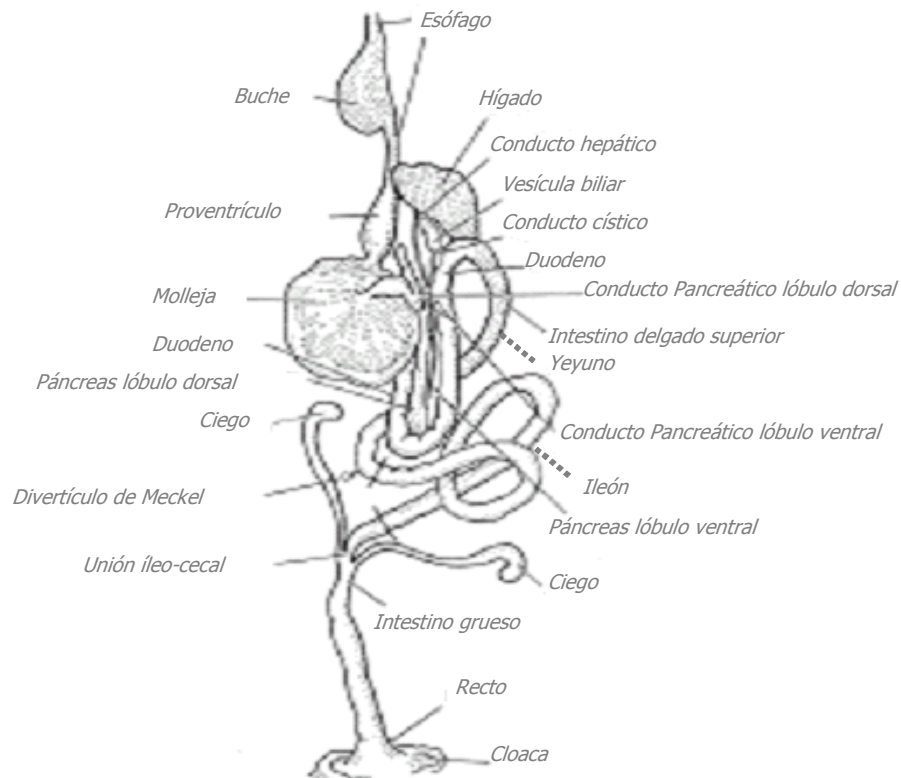
infecciosos (bacterias, virus y parásitos) (**Van der Klis y Jansman, 2002; Dibner y Richards, 2004; Richards et al., 2005**). Como consecuencia, el amplio campo de estudio de los temas relacionados con alimentación animal y salud intestinal, y el empleo de nuevos aditivos naturales (nutracéuticos o alimentos funcionales) muestran ser un gran reto en la nutrición moderna (**Adams, 2004; Dibner y Richards, 2004; Sifiri, 2005**). Para estudiar el sistema digestivo del ave podríamos considerar los siguientes componentes: el tracto digestivo y los órganos que le proveen secreciones para realizar la digestión (páncreas e hígado), su microflora, y el tejido inmune asociado al tejido digestivo (**Dibner y Richards, 2004**).

### **2.2.1 El sistema digestivo del ave**

En la **Figura 2. 5.** se presenta un esquema del sistema digestivo del ave. En relación con otros vertebrados, el sistema digestivo del ave presenta aspectos únicos o adaptaciones, a escala de la boca no presenta estructuras dentarias, y los pesados músculos de la mandíbula han sido remplazados por un ligero pico (**McLelland, 1975; 1979**). Para realizar el proceso de digestión, el ave ingiere su alimento de manera completa, lo almacena temporalmente en el buche y lo mastica en la molleja. El moco, la pepsina y el ácido clorhídrico son adicionados en el proventrículo, órgano que funciona como estomago glandular y que no realiza la función de almacenamiento. Por lo cual, la función general de estomago único (monogástrico) le es conferida por varios órganos a la vez (**Moran, 1982; Dibner y Richards, 2004**). En relación con los mamíferos, el tracto digestivo del ave puede considerarse relativamente corto y simple no obstante, se reconoce que es altamente eficiente para llevar a cabo los procesos de digestión y absorción de los nutrientes derivados de los alimentos (**Moran, 1982; Turk, 1982**). De hecho, algunos estudios (**Long, 1967**) han sugerido que el estomago del pollo es capaz de secretar mas ácido (HCl y pepsinogeno por unidad de peso vivo en comparación a los mamíferos).

El intestino delgado del ave al igual que el de mamíferos esta dividido en tres secciones, duodeno, yeyuno (intestino delgado proximal) e ileón (intestino delgado distal). No obstante, las diferencias entre las tres secciones no son claramente perceptibles macroscópicamente e incluso histológicamente. En el caso del duodeno se considera que esta sección se inicia en la conjunción con la molleja y abarca la superficie del páncreas formando un asa ascendente y otra descendente. Para diferenciar el yeyuno del ileón se utiliza como referencia la presencia del divertículo de Meckel (pequeño tallo o divertículo vitelino) (**Moran, 1982; Turk, 1982; Moran, 1996**). En el area intestinal donde finaliza el ileón y se inicia el intestino grueso, se encuentra localizada la unión ileocecal o lugar

donde se unen las dos sacos ciegos al intestino, y las tonsilas cecales que representan la mayor concentración de tejido linfoide intestinal (**Didner y Richards, 2004**).



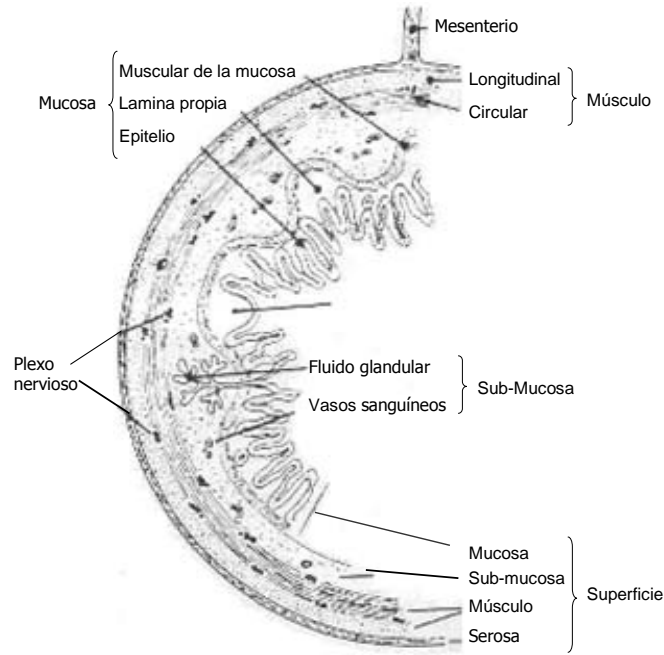
**Figura 2.5.** Tracto digestivo del ave (adaptado de **Sturkie, 1976**).

En las aves, el ciego se encuentra constituido por dos bolsas ciegas de pared delgada que alojan en su interior la mayor cantidad de microflora anaeróbica del tracto digestivo por lo cual, funciona como la principal cámara u órgano de fermentación del ave (**McNab, 1973; Józefiak et al., 2004**). El intestino grueso denominado recto o colón en algunas ocasiones, es considerado un órgano corto que permite la conexión entre el intestino delgado y la cloaca. La cloaca, a su vez, funciona como receptáculo común de los productos finales del sistema urinario, fecal y reproductivo del ave a través de las siguientes estructuras o aperturas: urodeo, coprodeo y proctodeo respectivamente (**Turk, 1982**).

El páncreas de las aves al igual que el de mamíferos es un órgano glandular, presenta un color amarillo pálido, se localiza dentro del asa duodenal, y está dividido en tres lóbulos (dorsal, ventral y esplénico). Las funciones específicas de cada una de las 3 secciones son desconocidas (**Paik et al., 1974**) no obstante, al igual que los mamíferos el páncreas del ave realiza funciones de tipo endócrino y exócrino. La función exocrina la realizan las glándulas tubulo-acinares del parénquima pancreático, que drenan su secreción a través de los conductos pancreáticos directamente a la porción ascendente del asa duodenal, incluyendo diversas enzimas como las amilasas, lipasas, enzimas proteolíticas, y el bicarbonato de sodio (**Moran, 1982; Denbow, 2000**). El hígado en las aves se encuentra constituido por un lóbulo derecho y uno izquierdo unidos por la línea media, y orientados cranealmente respecto al proventrículo y la molleja. En el pollo y pavo, el lóbulo derecho presenta un mayor tamaño mientras que el lóbulo izquierdo está subdividido en dos porciones (dorsal y una ventral). La bilis hepática se transporta del hígado directamente al duodeno a través de dos conductos hepáticos (derechos e izquierdo) o conductos hepato-entéricos. El conducto hepático derecho, presenta una ramificación que constituye el conducto hepato-cístico, conducto que se conecta con la vesícula biliar para drenar el contenido de la vesícula al duodeno. Al igual que los conductos pancreáticos, los conductos biliares drenan sus secreciones en la porción ascendente del asa duodenal (**Moran, 1982; Denbow, 2000**).

#### **2.2.1.1. Anatomía microscópica del tracto digestivo**

La anatomía microscópica del tracto digestivo muestra ser consistente a lo largo de sus diferentes secciones, a escala de la pared del tubo digestivo pueden observarse varias superficies o capas de tejido, del exterior o al interior del lumen intestinal se describen las siguientes: serosa, músculo longitudinal, músculo circular, sub-mucosa y mucosa (**Figura 2.6**). La mucosa o primera capa presente de la pared intestinal al interactuar con los contenidos lumen intestinal presenta una superficie recubierta por epitelio altamente diferenciado, soportado sobre trazas de tejido conectivo y músculo. La sub-mucosa está constituida por dos secciones de músculo liso distribuido en dos direcciones externa (longitudinal) e interna (circula), entre estas capas musculares se localizan vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios autónomos. Este patrón de distribución de tejidos puede observarse de forma general desde el esófago hasta el colón. Incluso, las tonsilas cecales y la bolsa de Fabricio presentan las mismas capas de tejido, solo que de manera concreta el tejido conectivo de la mucosa está completamente poblado por linfocitos.



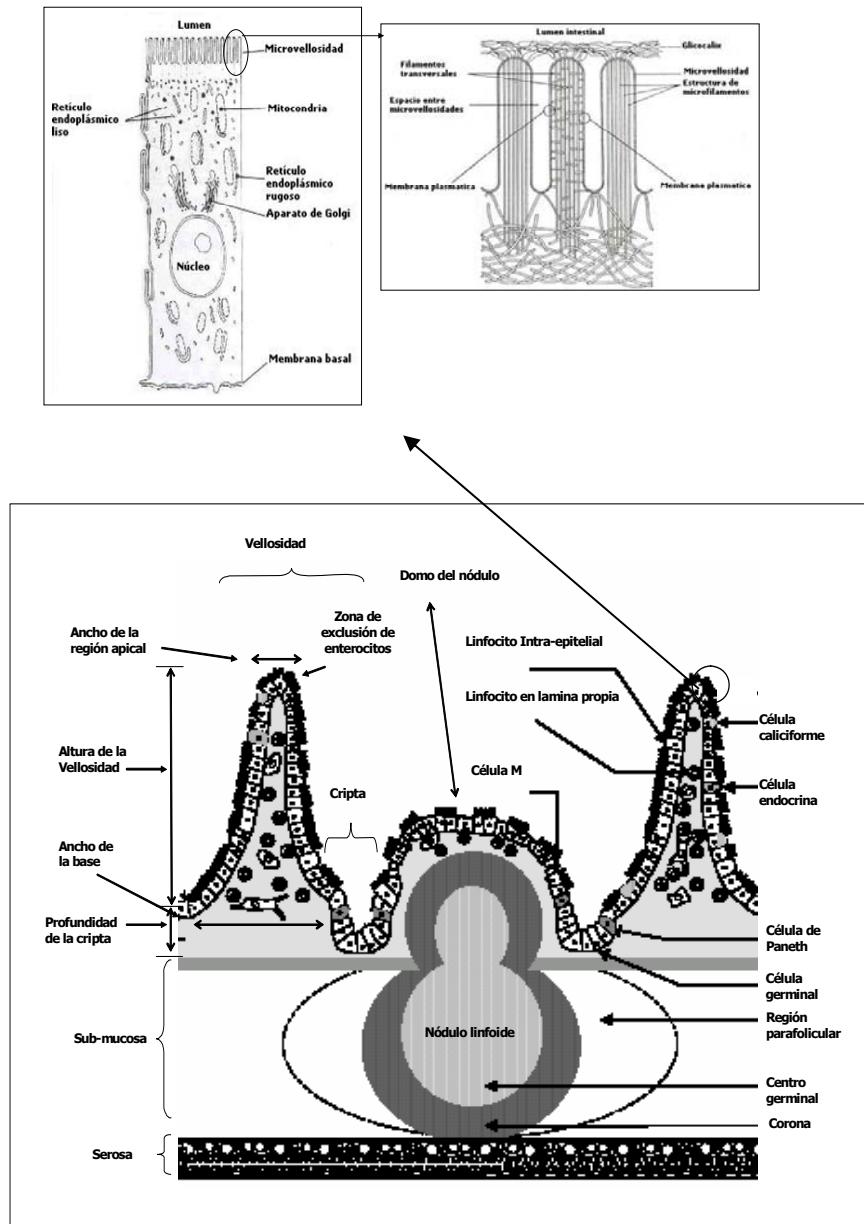
**Figura 2.6.** Representación esquemática transversal de la pared intestinal y sus diferentes superficies (adaptada de **Moran, 1982**).

Otro aspecto importante de la mucosa digestiva, lo encontramos en la gran diferenciación celular del epitelio que proporciona una interesante información sobre el desarrollo y la función del sistema digestivo. Por ejemplo la mucosa del esófago y buche, presentan un epitelio escamoso o epitelio simple plano, mientras que el epitelio del proventrículo es altamente diferenciado hacia células productoras de ácido. A diferencia de los mamíferos, el recto de las aves presenta numerosas vellosidades planas con pocas células caliciformes y criptas (generalmente cortas), considerándose que puede cumplir un papel en la reabsorción de agua. Por otro lado, la mucosa del intestino delgado presenta un epitelio en forma de pliegues o vellosidades que le sirven para multiplicar y crear una importante área de contacto enfocada a optimizar los procesos de secreción enzimática y de adsorción de nutrientes (**Moran, 1982; Turk, 1982; Moran, 1996; Dibner y Richard, 2004**). En condiciones de salud, el epitelio de la mucosa digestiva es impermeable al paso de macromoléculas o micro-organismos, gracias a la interacción de diversos sistemas que incluyen: 1) el cierre de las uniones intercelulares de los enterocitos

de la mucosa, 2) la calidad y cantidad de la capa de mucus o mucina, y 3) la presencia de linfocitos intra-epiteliales y células secretoras de anticuerpos (plasmáticas) en la lámina propia. A nivel de la base de las vellosidades pueden observarse zonas de proliferación de enterocitos, o zonas de criptas encargadas de la renovación de las células del epitelio de la vellosidad las cuales son constituidas por células madres o germinales y células productoras de péptidos con capacidad antimicrobiana (**Figura 2.7.**) (**Schat y Myers, 1991; Dibner y Richards, 2004**).

#### **2.2.1.2. Enterocitos con membrana en borde de cepillo**

El epitelio de la mucosa digestiva se encuentra recubierto por diferentes tipos de células o enterocitos de forma rectangular alineados en columnas: células secretoras de moco ("caliciformes" o "goblets"), células con capacidad absorptivas y células secretoras de hormonas (células endocrinas). Los enterocitos que llevan a cabo funciones de absorción son conocidos también como enterocitos con membrana en "borde de cepillo" o "brush-border", debido a que presentan en su membrana apical protuberancias similares a dedos o en forma de micro-vellosidades principalmente constituidas por fibras de actina (**Figura 2.7.**) (**Moran, 1982; 1996**). Estas micro-vellosidades son contráctiles y realizan movimientos oscilatorios para inmovilizar las enzimas digestivas que finalizarán la digestión de los nutrientes, además de llegar a incrementar hasta 30 veces más la superficie de absorción de la membrana celular del enterocito (**Van Dijk *et al.*, 2002**). En asociación al sistema de micro-vellosidades se pueden observar una gran cantidad de glico-proteínas con enlaces tipo N y O que actúan como lectinas (glicocalix). Estas lectinas adquieren una importancia significativa en el animal ya que pueden interactuar con algunos microorganismos patógenos. En varias especies de animales ha sido descrito que antes de que los enterocitos puedan llevar a cabo funciones de absorción de nutrientes o durante el proceso de migración y diferenciación celular, pueden ser capaces de expresar enzimas digestivas en su membrana celular de tipo: disacaridasas, fosfatasas alcalinas, hidrolasas, maltasas, y aminopeptidasas-N (**Moog, 1950; Weiser, 1973; King *et al.*, 1983**). En la **Tabla 2.4.**, se presenta de forma general y resumida la actividad enzimática que se lleva a cabo a lo largo del tracto digestivo del ave.



**Figura 2.7.** Representación esquemática de la mucosa intestinal (adaptado de **Fortun-La Mothe y Boullier, 2003; Moran, 1982**).

**2.2.1.3. Desarrollo del tracto digestivo del pollo**

Durante la etapa de desarrollo embrionario, el ave solo depende de las fuentes de energía provenientes de la yema o saco vitelino (principalmente lípidos). Después de la eclosión, el ave debe adaptarse a una rápida transición hacia la utilización de nuevas fuentes ricas de carbohidratos exógenos provenientes principalmente de alimentos vegetales (**Romanoff, 1960; Uni et al., 1996**). Por ejemplo, del día 17 de incubación al día de la eclosión, el peso relativo del intestino embrionario sufre un incremento de entre 1 a un 3.5% en relación al pesos del embrión. A los 15 días de incubación, es posible observar la actividad y expresión de moléculas de ARN de algunas enzimas (disacaridasas y peptidasas) y para los principales transportadores de membrana (sodio-glucosa y ATPasa) a escala de sistema de micro-vellosidades del enterocito. Estos sistemas van incrementándose gradualmente a partir del día 19 de incubación y sufren un mayor incremento el día de la eclosión o día 21 de incubación (**Uni et al., 2003a**). En el día 16 de incubación, el páncreas embrionario ya es capaz de secretar enzimas proteolíticas antes de mostrar actividades específicas para enzimas de tipo carboxipeptidasa-A y quimitripsina (**Marchaim y Kulka, 1967**).

A los 18 días de incubación, es posible detectar la presencia de  $\alpha$ -amilasa de origen pancreático, observándose una máxima actividad de esta enzima el día 4 post-eclosión. En el caso de la tripsina, esta enzima se encuentra de forma activa el día 18 de incubación, y poco antes de la eclosión también puede observarse la presencia de lipasas (**Moran, 1985**). Inmediatamente después de la eclosión y durante los primeros días de vida, el intestino del ave incrementa su peso relativo más rápido que su masa corporal (**Tabla 2.5.**), este proceso de rápido crecimiento es mayor entre los días 6-8 en el pavipollo, mientras que en el pollo ocurre durante de los 7 a los 10 días de edad (**Lilja, 1983; Uni et al., 1999; Iji, et al., 2001a**). El efecto de rápido crecimiento es diferente para las distintas secciones del intestino, siendo más rápido, a edad más temprana y en mayor proporción para el duodeno respecto al observado para el yeyuno y el ileón (**Sklan, 2001**). Y en el caso de la molleja y el páncreas, este efecto no se presenta (**Uni et al., 1999; Iji et al. 2001a**).

**Tabla 2.4.** Actividad de las enzimas y secreciones digestivas en el ave (adaptado de Leeson y Summers, 2001).

Órgano	pH	Enzima o secreción	Sustrato	Producto
<i>Pico o boca</i>	7.0-7.5	Saliva	Lubricación y ablandamiento del alimento	
		Amilasa (tialina)	Almidón	Dextrinas
			Dextrinas	Almidón
<i>Buche</i>	4.5	Mucus	Lubricación y ablandamiento del alimento	
<i>Proventrículo y molleja</i>	2.5	HCl	Acidificación de la digesta e inicio de desnaturalización de proteínas	
		Pepsina	Proteína	Polipéptidos
		Lipasa	Triglicéridos	Ácidos grasos y monoglicéridos
<i>Duodeno</i>	6.0-6.8	Amilasa (amilopsina)	Almidón y dextrinas	Maltosa y glucosa
		Tripsina, Quimiotripsina y Elastasas	Proteínas y péptidos	Péptidos y aminoácidos
		Carboxipeptidasas Colagenasas	Péptidos Colágeno	Péptidos y aminoácidos
		Bilis	Emulsificación de grasas	
		Lipasa	Grasa	Ácidos grasos Monoglicéridos Diglicéridos
		Colesterol esterasa	Esteres de colesterol	Ácidos grasos y colesterol
<i>Yeyuno</i>	5.8-6.8	Maltasa e Isomaltasa	Maltosa e Isomaltosa	Glucosa Glucosa
		Sucrasas	Sucrosa	Glucosa Fructuosa
		Lactasas	Lactasa	Glucosa y galactosa
		Peptidasas	Péptido	Dipéptido Aminoácidos
		Polinucleotidasas	Ácidos nucleicos	Mono nucleótidos
				Celulosa, polisacáridos, almidón y azúcar



Estudios realizados sobre la morfometría de las vellosidades intestinales del pollo, sugieren que sus principales cambios ocurren entre los primeros 21 días de edad (**Iji et al., 2001a**). Al día de edad, los enterocitos son redondos y apolares no obstante, horas posteriores a la eclosión los enterocitos sufren un alargamiento, presentan una polaridad y la definición de su membrana en borde de cepillo (sistema de micro-vellosidades) (**Geyra et al., 2001a**). Posterior a los 2 días de la eclosión, la altura de las vellosidades del duodeno se incrementan dos veces llegando a una meseta de máximo crecimiento los días 6 y 8 de edad del ave. En el yeyuno y el ileón, la meseta de máximo crecimiento de la vellosidad ocurre alrededor de los 10 días o más de edad del ave. Durante este periodo de tiempo, los enterocitos de las secciones transversales de la vellosidad sufren un incremento en su tamaño de un 20 a un 40%, observándose crecimientos aun mayores en los enterocitos situados en las porciones baso-laterales de la zona apical de la vellosidad. Como resultado del incremento en la altura, la anchura y del número de enterocitos de la vellosidad, se considera que el área de superficie de la vellosidad tiende a incrementarse paralelamente respecto a su altura (**Uni et al., 1995**).

**Tabla 2.5.** Crecimiento (g/100 g de peso corporal) de los órganos digestivos del pollo de engorde calculados a diferentes edades (adaptado de **Iji et al., 2001a**).

Edad en días	Molleja	Intestino	Páncreas	Hígado	Saco vitelino
1	11.0 <sup>a</sup>	4.1 <sup>bc</sup>	1.1 <sup>d</sup>	4.2	8.14 <sup>a</sup>
7	8.0 <sup>b</sup>	7.2 <sup>a</sup>	0.6 <sup>b</sup>	4.7	0.07 <sup>b</sup>
14	4.5 <sup>b</sup>	5.0 <sup>b</sup>	0.4 <sup>c</sup>	4.8	0.03 <sup>b</sup>
21	3.9 <sup>c</sup>	3.7 <sup>c</sup>	0.3 <sup>c</sup>	3.4	0.01 <sup>b</sup>
EE	0.55	0.31	0.04	0.61	0.614

Letras distintas dentro de una misma columna son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Durante el proceso de desarrollo de la mucosa digestiva no solo ocurre una rápida proliferación e hipertrofia celular, además es posible observar un incremento en la velocidad de migración del enterocito. Observándose que la tasa de proliferación de los enterocitos llega a su punto máximo al día 7 de edad, mientras que el tiempo de migración del enterocito desde la cripta hasta el ápice (lugar donde muere y es exfoliado al lumen) se incrementa con la edad hasta el día 14 (**Iji et al., 2001a**). En un pollo de 2 días de edad, el tiempo de migración ha sido estimado en 72 horas, en el caso de un pollo de 14 días de edad, este proceso es más lento y se estima en 96 horas duración (**Uni et al., 2000**). A diferencia de los mamíferos, en aves ha sido observado que el proceso de proliferación de enterocitos puede realizarse también a lo largo de la vellosidad y no solo en las criptas (**Geyra et al., 2001a; Uni et al., 1998a**). Las criptas de las vellosidades

intestinales de las aves se desarrollan rápidamente horas seguidas a la eclosión. Al día de edad, las criptas comienzan a formarse, y a los 2 y 3 días llegan a ser bien definidas, además durante esta etapa se incrementa su tamaño, su número, y se inicia su ramificación (Geyra *et al.*, 2001; Uni *et al.*, 2000). El desarrollo de las criptas llega a una meseta máximo desarrollo a los días 4-5 de edad del ave, dando como resultado que el número de células por cripta también se vea incrementado. Por ejemplo, entre los 4 y 5 días de edad, las criptas a nivel del yeyuno son de mayor tamaño, ramificadas y con zonas bien definidas de proliferación celular con constante división y migración de enterocitos (Iji *et al.*, 2001a).

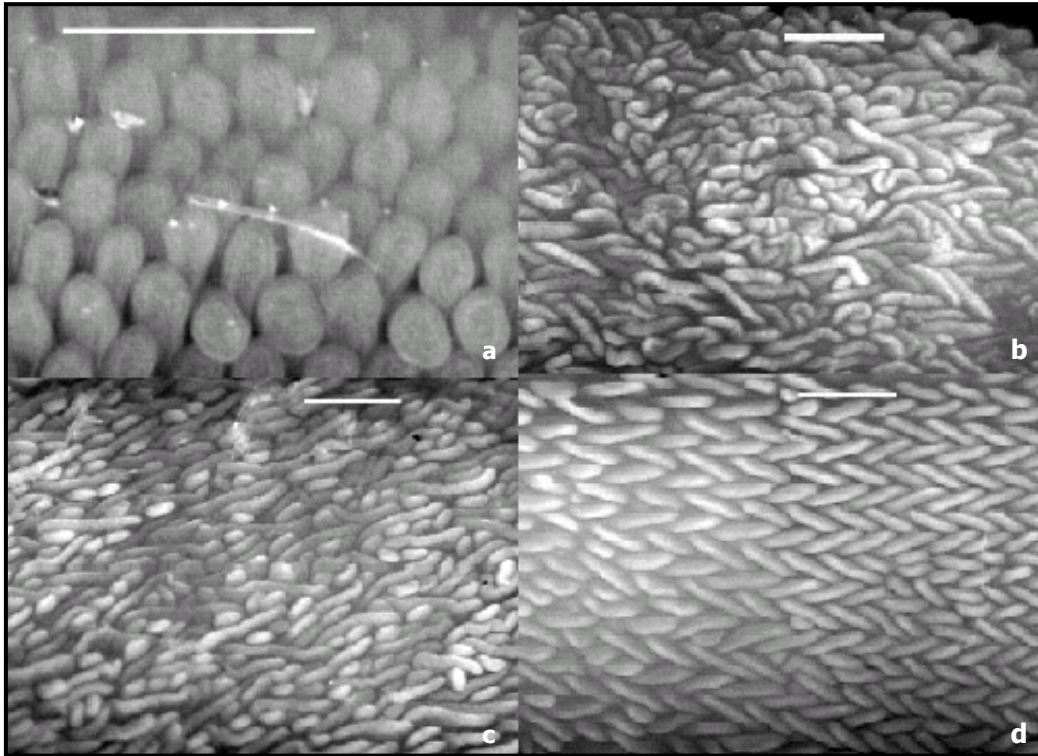
### 2.2.1.4. Actividad enzimática de la mucosa digestiva del pollo

Posterior a los 2 días edad, la actividad enzimática por masa de intestino de la mucosa digestiva del ave muestra una estrecha relación con el número de enterocitos presentes en cada vellosidad. Algunos estudios (Sklan *et al.*, 1996; Sklan y Noy, 2000; Sklan, 2001) han sugerido que la actividad enzimática expresada por enterocito no cambia en gran cantidad con respecto a la edad del ave; y otros (Iji *et al.*, 2001b) han descrito incluso una disminución de la actividad enzimática específica para 4 enzimas presentes en las micro-vellosidades del enterocito (maltasa, sucrasa, amonipeptidasa N y fosfatasa alcalina) al incrementarse la edad del ave. No obstante, la actividad enzimática específica total por vellosidad si se ve incrementada con respecto a la edad del ave, ya que la superficie de la vellosidad es mayor y puede alojar una mayor cantidad de enterocitos al incrementarse la edad del ave, sin que este efecto sea consecuencia de un incremento en la eficiencia individual de cada enterocito. Como consecuencia de este proceso, la capacidad de digestión en el pollo también se ve favorecida (Nitsan *et al.*, 1991a; Nir *et al.*, 1993) y en particular la digestión de grasas (Ketels y De Groote, 1988).

### 2.2.1.5. Morfología y orientación de las vellosidades intestinales

La gran superficie que puede representar la mucosa intestinal del individuo es consecuencia de una serie de proyecciones de la misma (vellosidades) con considerables variaciones en su forma y distribución (King y McLelland, 1979). De los 7 a los 28 días de edad, el desarrollo en la forma de las vellosidades intestinales del pollo es más pronunciado a escala del yeyuno e ileón. En pollos de un día de edad, la mayoría de las vellosidades presentes en el intestino corresponden a vellosidades simples en forma de dedo y pocas en forma de hoja o lengua (Figura 2.8.) (Van Leeuwen *et al.*, 2004). Al incrementarse la edad del ave, el área de ocupación de la mucosa del intestino delgado (duodeno, yeyuno e ileón) por vellosidades en forma de lengua disminuye de un 82% en el día 7 al 29% en el día 28. En contraste, el área de la vellosidad que es ocupada por vellosidades en forma de canto se incrementa de un 2% en el día 7 al 63% en el día 28.

El cambio en la forma de las vellosidad de lengua y hoja hacia formas de canto dará como resultado un mayor ensanchamiento de la vellosidad (**Van Leeuwen *et al.*, 2004**). Un segundo aspecto en la morfología de las vellosidades intestinales del ave es su orientación. En el pollo de engorde, es posible observar una orientación transversal de las vellosidades intestinales en forma de zig-zag principalmente en la porción del yeyuno (**Figura 2.8.**).



**Figura 2.8.** Forma y orientación de las vellosidades intestinales en pollos de engorde: a) vellosidad en forma de dedo, 1 día de edad; b) vellosidades en forma de hoja plegadas y sin orientación en zigzag, 21 días; c) vellosidades en forma de lengua, canto y hoja sin orientación en zigzag, 21 días; y d) vellosidades en diferentes formas con orientación en zigzag, 21 días (Tomado y adaptado de **Van Leeuwen *et al.*, 2004**).

La posición transversal en zig-zag de las vellosidades retrasa el paso de la digesta sobre la mucosa digestiva y puede mejorar su contacto con el epitelio. En pollos de engorde, se ha estimado que la orientación en zig-zag de las vellosidades del yeyuno es de un 53 al 70%

del área de la mucosa al día 7 de edad. Este tipo de orientación también ha sido observada en gallinas de postura de 18 semanas de vida (**Van Leeuwen *et al.*, 2004**).

#### **2.2.1.6. La mucina del epitelio de la mucosa digestiva**

El epitelio digestivo esta constantemente expuesto a numerosos agentes, entre ellos: enzimas digestivas, material fecal, bacterias intestinales (residentes y patógenas) y otros microorganismos, y sus productos. Por lo cual, la capa de mucosidad (gel viscoso y elástico) que recubre y lubrica el epitelio digestivo cumple una formidable función de barrera de resistencia innata ante las agresiones del contenido luminal (**Forstner *et al.*, 1995; Moncada *et al.*, 2003**). Esta capa de mucosidad es principalmente constituida por mucina, glico-proteína secretada por las células caliciformes ("goblet") del epitelio y que en conjunto con la red del glicocalix constituyen una capa homogénea inmisible de estructura tridimensional (**Perez-Vilar y Hill, 1999**). La mucina no solo ejerce una función de protección para la mucosa, sino además participa en otro tipo de funciones que incluyen: 1) exclusión de todas las partículas y restricción de la difusión de compuestos de gran peso molecular; 2) solubilización de los nutrientes y optimización de la superficie de absorción cuando son creados focos de concentración de producto que no han sido disipados al final del proceso de digestión; 3) aislamiento y protección de las enzimas asociadas a la superficie epitelial ante la degradación de las enzimas pancreáticas secretadas en el lumen; y 4) restricción de los productos finales de la digestión o nutrientes para que los microbios del lumen intestinal no los utilicen (**Forstner y Forstner, 1994; Moran, 1996**).

##### **2.2.1.6.1. Estructura de la mucina**

De acuerdo con su estructura y localización, la mucina puede estar presente en dos categorías, unida a la membrana y en su forma secretada. Solo la forma secretada contribuye a la formación de la capa de mucosidad, de la cual cada subunidad de mucina se encuentra constituida por un esqueleto proteico con una gran cantidad de cadenas laterales de carbohidratos que incluyen el ácido siálico, dímeros de galactosa,  $\alpha$ -D-manosa, N-acetil-D-glucosamina y residuos de  $\beta$ - $\delta$ -galactosa. La cadena proteica o de polipéptidos, contiene diversos dominios repetidos y distribuidos en parejas "tandem" ricos en treonina, prolina, y / o serina. La abundancia de treonina y serina en la cadena proteica, le provee numerosos sitios para la unión con cadenas de oligosacáridos a partir de enlaces de glucosídicos o de glicolización de tipo-O, estimándose que el contenido de carbohidratos de la mucina es de alrededor de un 90% de su materia seca (**Forstner *et al.*, 1995; Perez-Vilar y Hill, 1999**).

La glicosilación es una modificación pos-traducciona que genera una gran diversidad de glicanos a partir de un número relativamente limitado de monosacáridos (**Spiro, 2002**). Un gran ejemplo de glicosilación es observado en la mucina, su alta densidad de carga le es concedida por el ácido siálico, la resistencia a proteasas del lumen intestinal y su alta capacidad de retención de agua (hidratación) son atributos debidos a la glicolización (**Hasniscg, 2001**). La sustitución de un grupo sulfato y O-acetilo por el ácido siálico del oligosacárido terminal de la mucina, le confiere una resistencia adicional a las glucosidasas. Por lo cual, la mucina puede ser sulfatada y silisada, resultando en mucina ácida. Estudios realizados en ratones muestran que la mucina ácida es más resistente a la degradación microbiológica que la recién formada mucina neutra. Se ha observado que cadenas mas largas y ramificadas corresponden a mucinas sulfatadas, y las cadenas cortas y lineales llegan a ser mucinas neutras (**Hasniscg, 2001; Moncada y Chadee, 2002; Moncada et al., 2003**).

#### **2.2.1.6.2. Mucina y células caliciformes en el pollo de engorde**

En el pollo de engorde a los 3 días previos a la eclosión, se ha observado que las tres secciones de su intestino delgado presentan solo mucina ácida. Al momento de la eclosión y a los 7 días de edad, el intestino delgado ya presenta similares proporciones de células caliciformes que producen mucina ácida y neutra. Respecto al número de células caliciformes, su número por área de vellosidad se ve incrementado con respecto a la edad del ave, de forma diferente para las tres secciones del intestino delgado, en el caso del duodeno se incrementan levemente y rápidamente en el yeyuno e ileón (**Uni et al., 2003b**).

#### **2.2.1.6.3. Modificación del patrón de secreción de la mucina**

El patrón de glicosilación de una proteína es dependiente del tipo de célula que la produce por lo cual puede ser modificada por diversas situaciones (fisiológicas o presencia de enfermedades) (**Moncada et al., 2003**). En mamíferos, algunas de las causas de la modificación del patrón de secreción de la mucina y tasa de diferenciación de las células caliciformes pueden ser asociadas a las siguientes condiciones: disminución a causa de agentes o factores que interfieren con los procesos de glicolización y síntesis de proteínas (**O'Doherty y Kuksis, 1975; Sherman et al., 1985; Smirnov et al., 2004**); disminución debida a cambios que alteren las tasas de migración celular desde las zonas de proliferación o criptas (**Shea-Donohue et al., 1985**) o por perturbaciones en las tasas de diferenciación de células precursoras de las células caliciformes (**De Ritis et al., 1975; Wattel et al., 1979; Shub et al., 1983**); incremento en la producción y en la tasa de diferenciación celular como respuesta a factores inmunológicos de tipo microbianos o para contrarrestar el proceso de invasión a la mucosa por parásitos y virus

**(Moncada *et al.*, 2003; Cebra, 1999; Deplancke y Gaskins, 2001)**. Las condiciones dietarias, al ser capaces de modificar los procesos fisiológicos de la mucosa digestiva, indudablemente interfieren con los patrones de secreción de mucina en el tracto digestivo de animales, entre ellos el del pollo de engorde (**Fernandez *et al.*, 2000; Montagne *et al.*, 2003; Uni *et al.*, 2003b; Smirnov *et al.*, 2004; Smirnov *et al.*, 2005**). Estudios realizados en animales han sugerido que el correcto funcionamiento de la barrera intacta y funcional de la mucina digestiva, esta directamente relacionado con parámetros óptimos de tipo cuantitativos (grosor) y cualitativos (ácida o neutra) de la mucina digestiva (**Van Dijk *et al.*, 2002; Moncada *et al.*, 2003**).

### 2.2.2. Microflora digestiva

En ocasiones la aparición de brotes infecciosos o el incremento en problemas de salud pública, podrían estar asociados con la aparición de desequilibrios entre la coexistencia de las poblaciones de bacterias y sus hospedadores. Generalmente estos desequilibrios ocurren como resultado de cambios o manipulaciones del medio ambiente, por ejemplo: manejo de los animales, procesos industriales, control de los desechos o residuos, aplicación de antibióticos, estados de salud y enfermedad, medidas de higiene y hábitos alimenticios (**Apajalahti, 2001; Bergone-Eérézin, 1999**). Como consecuencia, el estudio de las interrelaciones entre las comunidades bacterianas y sus comensales es y ha sido de especial interés para los diferentes ambientes, entre ellos el tracto digestivo (**Mitsuoka, 1978; Apajalahti, 2001**). En la actualidad, existen aun grandes dificultades para crear las condiciones o medios de cultivos *in-vitro* que permitan el crecimiento y la diferenciación de la gran diversidad de bacterias digestivas de los animales (**Zoetendal et al., 2004**). No obstante, los estudios sobre la modificación de la microflora digestiva del animal, con el uso de técnicas de cultivo y recientemente mediante técnicas de secuenciación de las fracciones bacterianas del ARN ribosomal (ARNr), han sido herramientas imprescindibles y útiles para establecer algunas relaciones entre los microorganismos y el huésped, e indagar aun más sobre cuestiones filogenéticas (**Woese, 1987; Leser et al., 2002; Zhu et al., 2002**).

En el interior del tracto digestivo de los animales, una gran diversidad de especies bacterianas compiten y coexisten por sus necesidades nutricionales y de espacio durante los proceso de colonización, establecimiento y crecimiento (**Apajalahti, 2003**). De forma paralela estas bacterias interactúan con el hospedador a diferentes niveles: participando en los procesos digestivos (**Gasking, 2001; Van der Klis y Jansman, 2002**); evitando el establecimiento de microorganismos potencialmente patógenos que puedan producirle enfermedad (**Lloyd et al., 1997; Ewing y Cole, 1994**); produciendo metabolitos tóxicos (**Ewing y Cole, 1994; Gasking, 2001; Pond y Yen, 1987**); incrementando la tasa de renovación del epitelio digestivo (**Gasking, 2001; van der Klis y Jansman, 2002**) y degradando la capa de mucina (**Mack et al., 1999; Deplancke y Gaskins, 2001; Van der Klis y Jansman, 2002**). Las bacterias digestivas pueden inducir el reclutamiento de células del sistema inmunitario a escala de la lámina propia del epitelio digestivo, a un nivel de complejidad capaz de discernir de forma específica entre los procesos de infección o tolerancia inmunológica hacia antígenos infecciosos, no infecciosos y alimenticios. Este complejo mecanismo puede ser capaz de constituir una segunda barrera inmunitaria cuando son activados los apropiados de mecanismos de

inflamación e inmunidad de la mucosa digestiva por parte de los antígenos digestivos (**Deplancke y Gaskins, 2001; Cebra, 1999**).

### **2.2.2.1. Colonización bacteriana del tracto digestivo del ave**

En **1965 Dubos** y colaboradores, describieron un esquema de clasificación de la microflora anaerobia presente en el tracto digestivo de un individuo, incluyendo tres categorías:

1. Bacterias autóctonas, presentes en grandes cantidades en el tracto digestivo y se piensa que pudieron haber coevolucionado con el hospedador como resultado de la asociación y el mutualismo.
2. Bacterias normales, aquellas que colonizan el lumen intestinal y que están presentes en el medio ambiente, no son consideradas patógenas ni autóctonas.
3. Bacterias patógenas, bacterias que cuando se encuentran en grandes cantidades causan enfermedad.

En aves recién eclosionadas, su tracto digestivo es estéril (**Mead y Adams, 1975; Savage, 1986**) por lo cual, el establecimiento de la flora bacteriana digestiva ocurriría a partir del material fecal proveniente de las aves maduras, como ocurre con los mamíferos (**Mackie *et al.*, 1999; van der Wielen *et al.*, 2001**). En la actualidad, los polluelos empleados en sistemas de producción intensivos son privados del contacto con el excremento de aves adultas, y posteriormente son alojadas en instalaciones con apropiadas condiciones de higiene. Estas prácticas provocaran un retardo en establecimiento de la microflora digestiva del ave, y que el proceso de colonización bacteriana ocurra a partir de los detritus del medio ambiente como: nacedoras e incubadoras, medios de transporte, instalaciones avícolas, agua y alimento (**Smith y Jones, 1963; Mackie *et al.*, 1999**). En el pollo de engorde de 1 día de edad, se ha estimado que la densidad bacteriana puede ser de hasta  $10^8$  y  $10^{10}$  UFC/g de digesta a nivel del ileón y ciegos respectivamente. Posterior a 3 días de edad, ocurre un incremento en las concentraciones bacterianas, pudiendo observar valores que exceden los  $10^9$  y  $10^{11}$  UFC/g de contenido digestivo en el ileón y ciegos respectivamente, valores que permanecerán constantes hasta los 30 días de edad (**Mead y Adams, 1975; Apajalahti, 2003**).

En la **Tabla 2.6.**, se encuentran resumidos algunos de los principales grupos bacterianos que han sido identificados en las principales secciones del tracto digestivo de aves. Como puede observarse, factores como el peristaltismo y el pH de cada uno de los segmentos



digestivos, son determinantes para el establecimiento selectivo de poblaciones bacterianas específicas a lo largo del tubo digestivo.

**Tabla 2.6.** Características del contenido digestivo y bacterias presentes en las diferentes secciones del tracto digestivo.

Sección intestinal	Contenido digestivo		Bacterias
	pH	Tiempo medio de retención (fase sólida), minutos	
Buche	4.5	<sup>i</sup> 31 <sup>ii</sup> 41	<u>Gram +:</u> <sup>2</sup> <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Coliformes</i>
Proventrículo Molleja	4.8 4.4 2.6	<sup>i</sup> 39 <sup>ii</sup> 33	<sup>2</sup> <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Coliformes</i>
Duodeno	5.7-6.0	<sup>ii</sup> 5, <sup>i</sup> 10	<u>Aerobios, Gram +:</u> <sup>1</sup> <i>Enterococcus</i> , <i>Bifidobacterias</i> , <sup>4</sup> <i>Lactobacillus</i>
Yeyuno	5.8	<sup>i</sup> 84, <sup>ii</sup> 71	<u>Anaerobios facultativos, Gram -</u> <sup>1</sup> <i>Coliformes</i>
Ileon	6.3	<sup>i</sup> 97, <sup>ii</sup> 90	<u>Anaerobios estrictos, Gram +:</u> <sup>1</sup> <i>Clostridias</i>
Ciego	5.7	<sup>i</sup> 119	<u>Gram -:</u> <sup>1</sup> <i>Bacteroides</i> , <i>Estafilococos</i> , <sup>5</sup> <i>Streptococos</i> , <i>Eubacterium</i>
Recto	6.3	<sup>i</sup> 26	<u>Gram -:</u> <sup>1</sup> <i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterias</i> , <sup>3</sup> <i>Bifidobacterias</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <sup>3</sup> <i>Clostridias</i> , <i>Propionobacterias</i> , <i>Eubacterias</i>
Autores	<b>Farmer, 1942</b>	<sup>i</sup> <b>Van der Klis et al., 1990</b> <sup>ii</sup> <b>Shires et al., 1987</b>	<sup>1</sup> ( <b>Barnes et al., 1972; Mead, 1989</b> ), <sup>2</sup> ( <b>Ochi et al., 1964; Smith, 1965; Fuller y Turvey, 1971</b> ), <sup>3</sup> ( <b>Hutanen y Pensack, 1965; Barnes, 1977; Salanitro et al., 1974</b> ), <sup>4</sup> ( <b>Sarra et al., 1985; Fuller, 1973</b> ), <sup>5</sup> ( <b>Salanitro et al., 1978</b> )

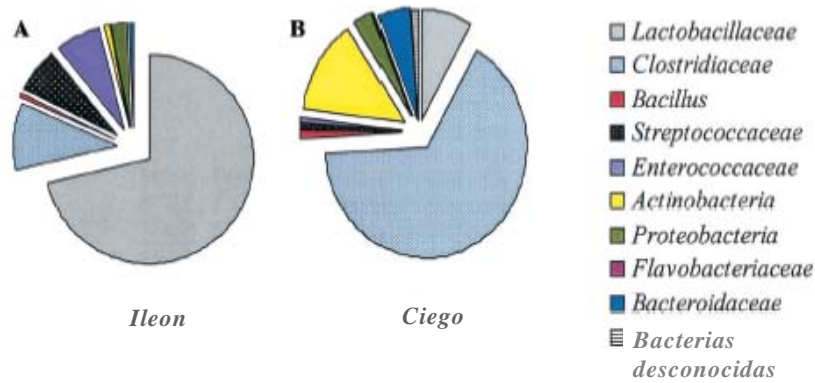
Por otro lado, considerando que las bacterias digestivas derivan la mayor parte de sus requerimientos de energía para reproducción y crecimiento, a partir de los nutrientes que escapan de la digestión y absorción del tubo digestivo (alimentos de pobre digestibilidad), las preferencias de estas bacterias hacia ciertos sustratos así como la composición

química y estructura de la digesta, son otros factores determinantes para el establecimiento bacteriano. De hecho, la sección distal al ileón, o en concreto el ciego, lugar principal de los procesos de fermentativos del tracto digestivo en el ave también constituye la mayor concentración de bacterias de resto de las secciones digestivas (**Gasking, 2001; Apajalahti, 2003; Józefiak et al., 2004**). En aves jóvenes, hasta que las poblaciones bacterianas del tracto digestivo no están bien establecidas, se pueden observar una menor cantidad de especies de bacterias digestivas respecto al tracto digestivo de animales adultos, esta importante característica podría implicar que las aves jóvenes presentan un ecosistema microbiológico digestivo inestable y más fácilmente perturbable (**Mead, 1989**). Dicha observación, ha dado hincapié a considerar que una de las características importantes de un ecosistema digestivo estable, es la presencia de una gran diversidad de especies bacterianas en el tracto digestivo.

### 2.2.2.2 Bacterias del ileón y ciego del pollo de engorde

En el ciego del pollo se han aislado alrededor de 200 tipos diferentes de bacterias anaerobias, con el empleo de técnicas de cultivo bacteriológicas se ha podido demostrar que la mayor parte de estas bacterias corresponden a géneros de anaerobios estrictos, por ejemplo: cocos gram+ (28%), *Bacteroidacea* (20%), micrococcos (6%), *Clostridiaceae* (5%), *Eubacteriaceae* (16%), *Germmiger formicillis* (5%) y *Miscellaneus* (11%) (**Barnes et al., 1972; Barnes et al., 1973; Barnes et al., 1979**). A pesar de las previas estimaciones, algunos autores (**Barnes et al., 1972; Mead, 1989; Salanitro et al., 1974**) consideran que las técnicas de cultivo solo han permitido identificar de un 10 a un 60 % de las bacterias presentes en el ciego. A escala del ileón, **Salanitro et al. (1978)** reportan para las secciones del duodeno al ileon, bacterias de tipo aerobias y anaerobias, dichas bacterias incluyen géneros predominantes de erobicos entre ellas *Streptococcus* o *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y *E. coli*; y en un 9 al 39% del total, bacterias anaerobias como cocos, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Gemmiger* y *Fusobacterium*. En estudios más recientes (**Apajalahti et al., 2001; Zhu et al., 2002; Gong et al., 2002**) que emplearon técnicas moleculares, fueron identificadas a escala del ciego secuencias correspondientes a grupos y subgrupos filogenéticos diferentes, algunos de ellos podrían corresponder a los aislados con técnicas de cultivo tradicionales no obstante, los autores de estos nuevos estudios consideran que la mayoría de las bacterias encontradas continúan siendo desconocidas. **Lu et al. (2003)**, estudiaron la fracción 16s ADNr bacteriana e identificaron 13 géneros diferentes en común para el ileón y ciego, cada una de las secciones además presentaba diferencias en la abundancia en cada uno de los grupos bacterianos. En el ciego, la diversidad bacteriana correspondía a bacterias de los géneros *Clostridiaceae* (65%), *Lactobacillus* (8%) y *Bacteroides* (5%). En el ileón, el género predominante fué *Lactobacillus* (67%), y el resto

de bacterias correspondieron a los generos *Clostridiaceae* (11%), *Streptococcus* (6.5%), y *Enterococcus* en un (6.5%) (Figura 2.9).



**Figura 2.9.** Composición de la flora bacteriana del ileon y ciego de pollos de engorde por el estudio de la fracción 16s DNAr (adaptado de **Lu et al., 2003**).

Los mismos autores (**Lu et al., 2003**), sugirieron que las poblaciones de bacterias del ileón y del ciego del pollo no eran diferentes durante los 3 primeros días de vida, en el periodo de 7 a 14 días la microflora de ciego era un subconjunto de la flora ileal, y después de esta edad, ocurría una significativa diferenciación entre ambas poblaciones, sugiriendo que cada región desarrolla su propias poblaciones bacterianas. Durante los primeros 3 días de edad del pollo, se detectaron proteo-bacterias gran negativas en ileón ( $\alpha$ -*Ochrobacterium*,  $\beta$  *Alcalignes*, *A. fecalis*,  $\epsilon$ -*Campylobacter* y  $\gamma$  *E. coli*) y en el ciego ( $\alpha$ -*Ochrobacterium*,  $\beta$  *Alcalignes*, *A. fecalis* y  $\gamma$  *E. coli*) las cuales fueron desplazadas de manera transitoria por las poblaciones de bacterias más estables a mayor edad.

### 2.2.2.3. Polisacáridos no-amiláceos solubles y sus interacciones con la microflora digestiva

En la industria de la nutrición animal, cierto tipo de polisacáridos y proteínas procedentes de los cereales que constituyen los alimentos de aves comerciales, son reconocidos como factores antinutricionales ya que no llegan a ser accesibles a la acción enzimática digestiva del animal, interfieren o bloquean la digestión y absorción de otros nutrientes, y reducen la productividad del ave (**Ward, 1995; Ferket, 1996**). En las dietas de pollos de engorde, los carbohidratos cumplen la finalidad de servir como la principal fuente de energía por otro lado, la clasificación de los carbohidratos llega ser un tanto complicada debido a la gran variedad de sus estructuras químicas y propiedades físicas. En la industria de la nutrición animal y humana, los carbohidratos son usualmente incluidos dentro de los azúcares, oligosacáridos, almidón y polisacáridos no amiláceos (PNA). La glucosa como monosacárido y la fructuosa como disacárido, constituyen los azúcares predominante en las dietas de aves comerciales. Este tipo de azúcares y el almidón, son susceptibles a la acción de las enzimas pancreáticas y pueden ser bien digeridos a nivel del intestino delgado del animal (**Carre, 1993**). De manera contraria, las fracciones de PNA no susceptibles a la acción de las enzimas pancreáticas del individuo, y solo pueden ser utilizadas de forma posterior a un proceso de fermentación llevado a cabo por las distintas poblaciones de bacterias digestivas (**Trowell et al., 1976**). Situación que adquiere importantes implicaciones en nutrición animal, ya que los PNA son los principales componentes de la fibra dietaria y pueden ejercer diversos efectos en la digestión y absorción de nutrientes (**Hetly y Choct, 2003**).

En animales monogástricos, el tipo de fibra incluida en la dieta es uno de los principales factores relacionados con modificaciones o alteraciones en el desarrollo y la función del tracto digestivo. Los efectos que la fibra dietaria puede ejercer sobre la morfología y la tasa de recambio celular de la mucosa digestiva dependen en gran medida de las características fisicoquímicas de la fibra, de su nivel de incorporación en la dieta, del periodo de ingestión, del segmento intestinal, y de la especie y la edad del animal (**Montagne et al., 2004**). De forma general la ingestión de fibra puede ser capaz de incrementar el tamaño, longitud de los órganos digestivos y patrón de secreción de la mucina digestiva (**Van der Klis y Van Voorst, 1993; Iji et al., 2001d, Mongtane et al., 2003**). En cereales como trigo, cebada y centeno, frecuentemente empleados en la elaboración de dietas para aves están presentes cantidades considerables de polisacáridos no-amiláceos (PNA) de tipo solubles (**Elwinger y Teglöf, 1991; Jorgensen et al., 1996**). En el caso concreto de aves comerciales, las investigaciones generadas acerca de los efectos antinutricionales que pueden ejercer los PNA solubles sobre los procesos de

digestión y absorción de nutrientes a escala digestiva, son asociados con la presencia de fracciones solubles de beta-glucanos (1-3/1-4) en la cebada (**White *et al.*, 1981; 1983; Campbell *et al.*, 1987**) y centeno (**Antoniou y Marquardt, 1981; Antoniou *et al.*, 1981; War y Marquardt, 1987**), y arabonoxilanos (pentosanos) en caso del trigo (**Choct y Annison, 1990, 1992**).

Los PNA con un alto peso molecular son capaces de incrementar la viscosidad del contenido intestinal, modificar la velocidad de tránsito del contenido digestivo y los procesos de fermentación del tracto digestivo (**Scoles *et al.*, 1993; Almirall y Esteve-Gracia, 1994; Smits y Annison, 1996; Regaee *et al.*, 2001**). Probablemente, la elevada cantidad de nutrientes no digeridos en las secciones finales del tracto digestivo, a causa de un incremento de la viscosidad de contenido digestivo, podrían servir como sustratos a bacterias y promover su proliferación (**Langhout, 1998**). En algunas investigaciones realizadas en pollos (**Wagner y Thomas, 1978**), se observó un incremento en las poblaciones de bacterias anaeróbicas a nivel del intestino delgado, cuando se utilizaban dietas elaboradas con cebada. En otros más recientes (**Hofshagen y Kaldhusdal, 1992**), se encontró que la inclusión de cebada, trigo y guisantes a dietas para pollos de engorde resultaba en un incremento del número de conteos de colonias de Clostridias en el intestino delgado del ave. **Choct *et al.* (1996)**, observaron que los PNA del trigo aumentaban la viscosidad y la concentración de ácidos grasos volátiles a nivel ileal, situación que sustentaba la mayor actividad bacteriana a causa del consumo de PNA.

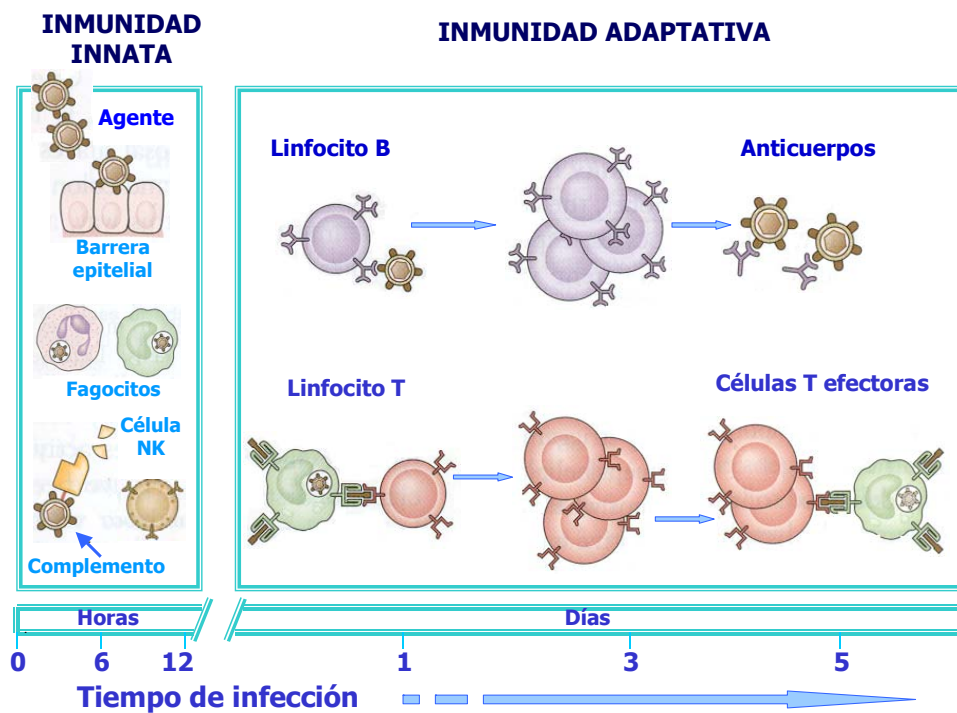
La interacción entre los PNA solubles dietarios y la microflora digestiva, pueden significar importantes cambios en la fisiología y el ecosistema digestivo (**Langhout, 1998; Langhout *et al.*, 1999**). A escala digestiva, este tipo de interacciones pueden resultar en modificación de los patrones de secreción enzimática, alteración de las dinámicas de digestión (principalmente grasas) y asimilación de nutrientes, y de mayores pérdidas endógenas. Situaciones que merman la capacidad digestiva del ave y como consecuencias directas le ocasionan menor crecimiento y eficiencia en la utilización del alimento, efectos que suelen ser más pronunciados en pollos jóvenes (**War y Marquardt, 1987; Viveros *et al.*, 1994; Velamen y Valhl, 1994; Almirall *et al.*, 1995**). Los PNA al ser capaces de modificar las poblaciones microbianas del intestino delgado (**Langhout *et al.*, 1999**), pueden favorecer las condiciones para el inicio de algunas patologías digestivas (**Pluske *et al.*, 1996; 1998; Kaldhusdal y Hofshagen, 1992**). En algunos estudios realizados en pollos de engorde, se observó un incremento en la ocurrencia de enteritis necrótica de forma subclínica, acompañada por un menor crecimiento y pobre eficiencia alimenticia, cuando las aves eran alimentados con dietas ricas en cebada (**Kaldhusdal y Hofshagen, 1992; Hofshagen y Kaldhusdal, 1992**).

---



### 2.2.3. El sistema inmune

El sistema inmune (SI) de animales vertebrados ha evolucionado a lo largo del tiempo para protegerlo contra diversos patógenos entre ellos bacterias, virus, hongos, parásitos u otros agentes que puedan provocarle enfermedad (*inmunidad*), y bajo algunas circunstancias ante sus propias estructuras (*auto-inmunidad*). La principal finalidad fisiológica del SI es la de prevenir infecciones y erradicar aquellas que ya están establecidas. Como puede observarse en la **Figura 2.10.**, el SI se vale de una colección de células, tejidos y moléculas (*respuesta inmune*) que pueden responder ante diferentes agentes empleando dos tipos de mecanismo de defensa o de inmunidad: inmunidad innata o respuesta inmune de tipo innata, e inmunidad adaptativa o respuesta inmune de tipo adaptativa, cada una de ellas con características específicas y que serán descritas en párrafos posteriores (**Abbas y Lichtman, 2004**).



**Figura 2.10.** Principales mecanismo de la respuesta inmune innata y adaptativa (adaptado de **Abbas y Lichtman, 2004**).

**2.2.3.1. Inmunidad innata (inespecífica, natural o nativa)**

Las puertas de entrada más comunes de microbios hacia el organismo huésped son la piel, tracto digestivo y el tracto respiratorio. El epitelio que recubre los tejidos digestivos y respiratorios cumple importantes funciones; su integridad evita la entrada de agentes extraños ejerciendo una función de barrera física; en segunda instancia, la humedad de los epitelios retiene partículas que serán desplazadas hacia el exterior por medio del sistema de cilios presentes en estos epitelios. La producción de moco ejerce otra función mecánica que ayuda a la eliminación de agentes externos; mientras que el grado de acidez o alcalinidad (pH) presentes en las diferentes regiones del tracto digestivo impiden el establecimiento de algunos microorganismos evitando el desarrollo de infecciones (**Fearon y Locksley, 1996; Kogut, 2005**). A nivel del epitelio también existen células especializadas en capturar antígenos y transportarlos a los tejidos linfoides periféricos (**Mayer, 2003; Abbas y Lichtman, 2004**). Aunque, no todos los organismos multicelulares (vertebrados, invertebrados y plantas) poseen mecanismos inmunológicos con el mismo grado de complejidad. Todos ellos poseen mecanismos intrínsecos que siempre están presentes y listos para reconocer y eliminar microbios, los cuales constituyen el **sistema inmune innato (SII)**. Se pensó que la SII, era inespecífico y que carecía de efectividad ante el combate de infecciones, actualmente se sabe que SII puede responder específicamente hacia ciertos microbios, llegando a ser considerado como un potente mecanismo de defensa capaz de controlar y eliminar infecciones antes de que el sistema inmune adaptativo aparezca. Por otro lado, el SII, instruye al sistema inmune adaptativo para responder hacia diferentes microbios de la manera más efectiva, e incluso el sistema inmune adaptativo se vale del SII para erradicar infecciones en un efecto bi-direccional. En la **Tabla 2.7.**, se mencionan los componentes del SII (**Fearon y Locksley, 1996; Medzhitov y Janeway, 1997; Beutler y Hoffmann, 2004**).

**2.2.3.1.1. Células del SII**

El SII esta constituido principalmente por células antígeno-inespecíficas o Fagocitos (**Tabla 2.7.**). Los monocitos con vida media de algunos meses, emigran desde la médula ósea hacia la circulación general para alojarse en los diferentes tejidos, lugar donde se diferenciaran a macrófagos para actuar como centinelas ante cambios o presencia de invasores (**Qureshi, 1998**). Los neutrófilos o heterófilos en el caso de aves, presentan una vida media de días y no llevan acabo procesos de recirculación, acceden a los tejidos de forma similar a los monocitos, y son reconocidos como la primera línea de batalla ante invasores (**Harmon, 1998**). En mamíferos un importante número de neutrófilos permanecen unidos al endotelio vascular para después segregarse a partir de señales de



alarma por parte de los centinelas o macrófagos, como fiebre y señales inmunes o endocrinas (**Goodeeris y Mast, 1999**).

**Tabla 2.7.** Componentes del sistema inmune innato (adaptado de **Abbas y Lichtman, 2004**).

**Barreras Físicas y Químicas:**

- Barreras epiteliales
- Secreciones (mucina)
- pH del estomago
- Enzimas

**Fagocitosis: <sup>i</sup>Heterófilos (Neutrófilos), Monocitos / Macrófagos y Trombocitos células endoteliales y epiteliales.**

**Células asesinas naturales (NK=natural killer por sus siglas en inglés)**

**Vía alterna de las proteínas del complemento**

**Citocinas**

**Proteínas plasmáticas:**

- Lectina fijadora de manosa (MBL = manosa-binding lectin)
- Proteína reactiva C (CRP = C-reactive protein)

---

<sup>i</sup> Presentes en aves a diferencia de los Neutrófilos observados en mamíferos.

**2.2.3.1.2. Reconocimiento del antígeno (SII)**

Los fagocitos migran a los sitios de infección como respuesta a quimioatrayentes (TNF y IL-1) producidos previamente por el encuentro de un microbio con un fagocito (**Hernández-Urzúa y Alvarado-Navarro, 2001**). En el sitio de la infección, el fagocito se adhiere al endotelio vascular a causa de la liberación de quimiocinas (proceso de migración extravascular), posteriormente el fagocito reconoce e ingiere al microbio para darle muerte intracelular (**Figura 2.10.**) (**Goodeeris y Mast, 1999; Kogout, 2005**). El SII reacciona hacia sustancias microbianas y no hacia no-microbianas, y en ocasiones ante células dañadas del huésped. El SII reconoce estructuras de los microorganismos que generalmente le son útiles para su supervivencia y capacidad de infección. Este tipo de estructuras o "*patrones moleculares asociados a patógenos*" (PAMPs = *pathogen-associated molecular patterns*, por sus siglas en inglés), no están presentes en el huésped y son compartidas por varios microbios del mismo tipo, algunos ejemplos de patrones moleculares son (**Mukhopadhyay et al., 2004; Kogout, 2005a**):

- a) Lipopolisacáridos residuos de manosa en glicoproteínas, la mayor parte de las especies bacterianas presentan glicoproteínas con residuos de manosa a diferencia de las células de mamíferos que terminan en N-acetil glucosamina o ácido siálico.
- b) Cadenas dobles de RNA presente en virus y no en mamíferos.
- c) Di-nucleótidos CpG no metilados presentes en el DNA bacteriano y no en mamíferos.

Los PAMPs presentes en los microorganismos, son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (*PRR= pattern recognition receptors, por sus siglas en Ingles*) presentes en las células del SII. Los PRR y otros antígenos de superficie celulares generalmente son compartidos en diferentes grados por las células del SII, por ejemplo: fagocitos polimorfo-nucleares, monocitos, células dendríticas, células natural killer (NK), y en cierto grado en células endoteliales y epiteliales. Dentro de la familia de los PRR, encontramos además una serie de receptores de reconocimiento de patrones microbianos denominados TLRs (*Toll-like receptors, por sus siglas en inglés*) (**Mukhopadhyay et al., 2004; Beutler, 2004**). Las células del SII, como los macrófagos también presenta receptores de aseo (*SV = scavenger receptors, por sus siglas en inglés*) de tipo manosa y  $\beta$ -glucano, los cuales sirven para reconocer de forma directa los ligandos de la superficie microbiana, y permitir su englobamiento y endocitosis. Otro tipo de receptores presentes en los macrófagos, son receptores de opsoninas fagocíticas que permiten reconocer anticuerpos y factores del complemento (**Martinez-Pomares et al., 2001; Peiser et al., 2002; Herre et al., 2004**).

#### **2.2.3.2. Inmunidad adaptativa**

En algunas circunstancias, microorganismos patógenos evaden los mecanismos de protección del SII y pueden invadir los tejidos del huésped. Bajo esta situación, el sistema inmune lleva a cabo una respuesta inmune de tipo adaptativo. La inmunidad adaptativa (específica o adquirida) es estimulada por la presencia de microorganismos que han accedido a los tejidos del huésped, este tipo de respuesta se desarrolla de forma más lenta pero presenta una mayor duración, pudiendo ser considerada más efectiva y adaptable hacia el agente infeccioso (**Skerra, 2003; Abbas y Lichtman, 2004**). En las **Tablas 2.8.** y **2.9.**, se resumen algunas de las características de la respuesta inmune adaptativa, así como sus distintos tipos de inducción y fases de desarrollo en el individuo (**Abbas y Lichtman, 2004**).

---

**Tabla 2.8.** Características de la inmunidad adaptativa (adaptado de **Abbas y Lichtman, 2004**).

---

**Inmunidad**

---

**1) Celular**

Llevada a cabo por linfocitos T y células NK.  
Defensa contra infecciones intracelulares.  
Solo reconoce antígenos proteicos.

**2) Humoral**

Llevada a cabo por inmunoglobulinas o anticuerpos (linfocitos B).  
Los anticuerpos reconocen estructuras proteicas, carbohidratos y lípidos.

---

**Tipo de inducción:**

---

**a) Forma pasiva**

Transferencia de inmunoglobulinas y linfocitos de un individuo infectado o inmunizado (vacunado) a uno no inmunizado, de una forma rápida e incluso antes de que el individuo sea capaz de establecer una inducción activa, por ejemplo, la transferencia de inmunoglobulinas a partir del calostro de madres a su progenie en las primeras horas de vida.

---

**b) Forma activa**

Inducida por alguna infección o vacunación de un individuo, lo que ocasionaría una **respuesta inmune primaria** mediada por linfocitos no sensibilizados (sin previo contacto con el antígeno) y que conlleva producción de anticuerpos específicos además, de la creación de linfocitos con memoria inmunológica. En un segundo contacto con el mismo antígeno, se desencadena una **respuesta inmune secundaria** de mayor magnitud, velocidad, duración y eficiencia en relación a la primera respuesta. Este **fundamento** ha sido empleado hasta la fecha en los **programas de vacunación** de animales y humanos.

---

**2.2.3.2.1. Reconocimiento del antígeno (SIA)**

El sistema inmune adaptativo (SIA) está constituido por células antígeno-específicas entre ellas linfocitos (T y B) y sus productos (anticuerpos). Las células B presentan en su membrana celular receptores correspondientes a inmunoglobulinas (BCR), mientras que las células T presentan como receptores de membrana moléculas denominadas T cell receptor (TCR). La diversificación de estos receptores y de sus diferentes antígenos ocurre a partir de una distribución clonal por ejemplo, cada célula T y B presenta un solo idiotipo de receptores para sus antígenos el cual es diferente al de otro clon de linfocitos, como resultado de esta gran diversificación se obtiene una alta especificidad para diferentes antígenos (epítopes). Y debido a que el sistema inmune está constituido por una gran cantidad de clones de células con distintas especificidad, el número total o repertorio de

linfocitos específicos para diferentes antígenos muestran ser extremadamente grande (**Chen *et al.*, 1994; Masteller y Thompson, 1994; Goodeeris y Mast, 1999**).

Las células B y sus receptores BCR, reconocen epítopes específicos y antígenos no procesados de conformación macromolecular por ejemplo, proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Además, las células B son capaces de reconocer también partes de estas macromoléculas o pequeños y simples grupos químicos. Las células T y sus TCR, reconocen principalmente antígenos procesados y desplegados por una célula presentadora de antígenos (CPA) o macrófago. El antígeno de naturaleza proteica es procesado intracelularmente por CPA, la cual posteriormente expresará epitopes lineales de 10 a 20 aminoácidos de este antígeno en asociación al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de su membrana celular para que sea reconocido por las células T (**Chen *et al.*, 1994; Masteller y Thompson, 1994; Goodeeris y Mast, 1999**). Las poblaciones de linfocitos T pueden subdividirse en CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen los epítopes asociados al CMH clase II correspondiente a antígenos exógenos fagocitados por una CPA, y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reconocen los epítopes asociados al CMH tipo I o antígenos endógenos correspondientes a antígenos citoplásmicos resultado de la transcripción del antígeno dentro de una célula huésped, por ejemplo una CPA infectada con algún virus.

Esta diferencia en el reconocimiento de antígenos provoca que las células T del tipo CD4<sup>+</sup> sean reconocidas como células T cooperadoras, ya que permiten la presentación del antígeno a células diana a partir de la liberación de citocinas. Mientras que las células T del tipo CD8 son consideradas células T citotóxicas, ya que provocan muerte celular a células diana infectadas, a partir de señales de transducción citotóxicas y factores citotóxicos (**Arstila *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1994**). A partir del estudio de los perfiles de secreción de citocinas de células CD4 de mamíferos fue posible diferenciar dos subtipos celulares: células Th1, que se caracteriza por la secreción de interleucina-2 (IL-2), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); y células Th2, que se secretan IL-4, IL-5, IL-10 y factor transformador del crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Reconociéndose también que el tipo de citocinas secretadas por cada subtipo de células, tiene importantes implicaciones y efectos en las células dianas (**Romagnani, 1995; Ying, 1995; Umetsu, 1997**):

IL-12 -- **células Th1** → IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ , mediadores en las diferentes reacciones relacionadas con citotoxicidad e inflamación. Por lo cual, estas células son importantes en la activación de la inmunidad mediada por células (células Th1, T, NK y macrófagos) como respuesta a infecciones virales, bacterianas y parasitarias.

IL-4-- **células Th2** → IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, estimulan la producción de inmunoglobulinas en los linfocitos B. Por lo cual, activan la respuesta inmune humoral en células Th2 y B, para conferir protección ante microorganismos no intracelulares y además inhiben la respuesta de macrófagos.

**Tabla 2.9.** Fases de la respuesta inmune adaptativa (adaptado de **Abbas y Lichtman, 2004**).

Los linfocitos T y sus receptores celulares para antígenos específicos, son considerados la clave para la llevar a cabo la respuesta inmune adaptativa:

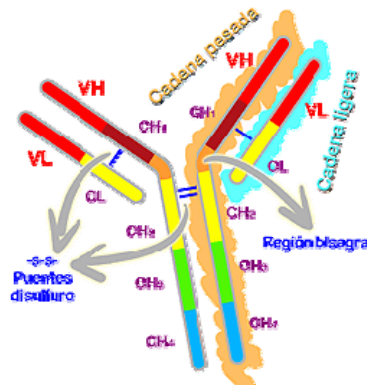
1. Reconocimiento del antígeno	Linfocito no sensibilizado, localiza y reconoce al antígeno o microbio. Requiere al menos <b>2 tipos</b> de señales:
2. Activación de linfocitos	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Unión antígeno (Ag) al receptor de antígenos del linfocito (<b>tipo 1</b>) requerida para establecer la respuesta inmune.</li><li>▪ Otras señales colectivas (<b>tipo 2</b>) provistas por microbios y por la respuesta inmune innata a estos microbios.</li></ul> <b>Expansión clonal</b> , los linfocitos sensibilizados hacia un Ag en particular se multiplican y crecen rápidamente. Algunos linfocitos se diferencian hacia: <b>linfocitos efectores</b> (producen sustancias para eliminar al antígeno).
3. Eliminación del antígeno o fase efectora	Algunos <b>Linfocitos B</b> , hacia <b>células plasmáticas</b> (secretan <b>anticuerpos</b> ). Algunos <b>Linfocitos T</b> , hacia <b>células NK</b> (destruyen células del huésped infectadas). Incluso puede ayudarse de componentes del <b>SII</b> .
4. Declinación (homeostasis)	Ya eliminada la infección o contrarrestada, los estímulos hacia linfocitos se detienen, la mayor parte de las células que fueron activadas por antígenos llevan a cabo muerte celular o apoptosis, y son rápidamente removidas por procesos de fagocitosis sin desencadenar un estado de alarma.
5. Memoria	Después de la respuesta inmunológica son conservados durante meses o años linfocitos con memoria inmunológica que pueden responder de manera rápida a un repetido encuentro con el antígeno.

### 2.2.3.3. Diferencias entre inmunidad Innata e Inmunidad Adaptativa

Algunas de las principales diferencias establecidas entre el SII y el SIA son: a) el SII responde en similar magnitud ante repetidas presentaciones con el mismo microorganismo, mientras que el SIA lo hace de manera más eficiente en posteriores contactos con el mismo microorganismo; b) el SII es capaz de reconocer no más de un millar de patrones microbianos, mientras que el SIA presenta una gran especificidad y puede reconocer cerca de un billón de diferentes antígenos no solo de origen microbiano; c) el SII no tiene memoria y no reacciona contra el huésped, mientras que el del SIA presenta memoria inmunológica y en ocasiones reacciona hacia células del huésped (Abbas y Lichtman, 2004).

### 2.2.3.4. Inmunoglobulinas de las aves

Las inmunoglobulinas o anticuerpos, son un grupo de glicoproteínas presentes en el suero y líquidos tisulares de animales. Parte de estas inmunoglobulinas pueden encontrarse unidas a la superficie de células B y otra parte en forma libre en la sangre y linfa, siendo el suero el lugar donde se encuentra su mayor concentración. Las inmunoglobulinas son producidas por células B activadas o células plasmáticas, como resultado de una previa interacción entre un linfocito y un antígeno específico. De forma estructural, las inmunoglobulinas son constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas principalmente, dos de ellas son denominadas ligeras y dos pesadas, en la inmunoglobulina una cadena ligera se encuentra unida con una cadena pesada para formar un par que conforma un sitio de unión para un antígeno (Figura 2.11.) (Leslie y Clew, 1969).

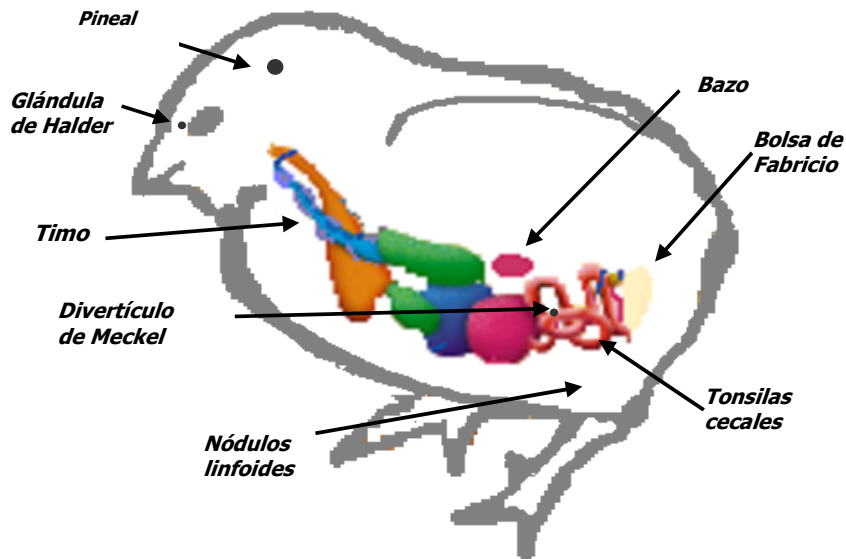


**Figura 2.11.** Representación de la estructura general de una inmunoglobulina o anticuerpo (adaptado de Sánchez Vizcaíno, 2000).

Algunas de las principales funciones de las inmunoglobulinas involucran reacciones específicas de unión con el antígeno que originó su formación o con una sustancia de origen similar, neutralizando su actividad en el caso de toxinas, neutralizando su capacidad infectiva en virus, o provocando su destrucción o eliminación en bacterias y parásitos (**Leslie y Clew, 1969**). En las aves han sido descritas tres clases de inmunoglobulinas análogas a las inmunoglobulinas de mamíferos, IgA, IgM e IgY (IgG en mamíferos). A pesar de que ha sido propuesta la presencia de inmunoglobulinas análogas a la IgE e IgD de mamíferos, su presencia en aves no ha sido demostrada aun (**Burns y Maxwell, 1981; Chen *et al.*, 1982**). Las inmunoglobulinas IgA e IgM del ave son similares en el peso molecular, morfología y movilidad electroforética respecto a sus contrapartes en mamíferos. Por otro lado, la IgY es la inmunoglobulina de menor peso molecular en el suero de animales ovíparos, encontrándose principalmente de forma sistémica aunque es posible encontrarla en contenido duodenal, lavados traquéales y plasma seminal. Es denominada IgY, debido a que su cadena pesada es mayor y antihigiénicamente diferente a la cadena pesada de la inmunoglobulina IgG de mamíferos (**Leslie y Clew, 1969; Warr *et al.*, 1995**).

#### **2.2.3.5. Órganos linfoides en el ave**

Los órganos linfoides del sistema inmune del ave (**Figura 2.12.**) se dividen en órganos linfoides primarios o centrales y órganos linfoides secundarios o periféricos. En los órganos linfoides primarios ocurre la maduración de los linfocitos y en los órganos linfoides secundarios se propicia el entorno adecuado para la presentación de antígenos entre la célula presentadora y los linfocitos (**Glick, 2000**). La bolsa de Fabricio y el timo, son considerados los órganos linfoides primarios del ave (**Dietert y Lament, 1994**). En el caso de la bolsa de Fabricio también se ha descrito que puede ejercer funciones de órgano linfoide secundario. El bazo, la glándula de Halder, la médula ósea, las tonsilas cecales y el tejido linfoide asociado a mucosas son considerados como órganos linfoides secundarios (**Glick, 2000**).



**Figura 2.12.** Diferentes órganos linfoides del pollo primarios (timo y bolsa de Fabricio) y secundarios (Glándulas de Halder, bazo, tonsilas cecales, nódulos linfoides, glándula pineal y divertículo de Meckel).

#### 2.2.3.5.1. El Timo

El timo de las aves está constituido por seis o siete lóbulos de forma irregular localizados subcutáneamente a ambos lados de las venas yugulares sobre la región torácica del cuello. El timo al igual que la bolsa de Fabricio, posee regiones corticales y medulares, en el timo se produce la hormona tímica que promueve la expresión de marcadores celulares tipo T en las células de la médula ósea (Murthy *et al.*, 1984). El reconocimiento de antígenos en los linfocitos T en relación a los linfocitos B, ocurre a partir de receptores celulares (no inmunoglobulinas) tipo T (T-cell receptor = TCR) que reconocen sólo antígenos de superficie y permanece como parte integral de la célula. A nivel de membrana celular es posible identificar grupos de determinantes específicos o patrones de diferenciación (CD = Cluster of differentiation), que indican la fase de diferenciación celular del linfocito. En humanos se han descrito cinco TCR denominados CD3, constituidos por polipéptidos complejos ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ). De manera similar a humanos en aves se describe también una molécula CD3 (Chen *et al.*, 1986), y otra serie de



---

moléculas TCR homologas a TCR de mamíferos  $\gamma/\sigma$  (TCR1) y TCR  $\alpha/\beta$  (TCR2) (**Chen et al., 1991**).

#### **2.2.3.5.2. El bazo**

El bazo es considerado un órgano linfoide secundario, en el pollo se encuentra localizado dorsalmente respecto al lóbulo hepático derecho (**Nickel et al., 1977**), algunos autores describen la presencia de lóbulos adyacentes craneales o caudales al bazo, que sufren hiperplasia en aves esplenectomizadas (**Glick, 2000**). El bazo sufre su mayor velocidad de crecimiento durante las primeras 6 semanas de edad y logra su tamaño máximo a las 10 semanas de edad del ave (**Glick, 2000**). Al igual que el bazo de humanos, el bazo de las aves esta constituido por pulpa roja y pulpa blanca. En la pulpa blanca se encuentran localizadas zonas de tejido linfático peri-arteriola (CTLP), centros germinales y regiones de pulpa blanca peri-elipsoide. Se considera que la mayoría de los CTLP de la pulpa blanca del bazo son timo dependiente y contienen linfocitos, macrófagos y células dendríticas no obstante, a escala de los bordes de CTLP también se pueden localizar algunos centros germinales burso-dependientes. A partir de la arteria esplénica se origina la arteria central que entra a la pulpa blanca y rodea todos los CTLP, la arteria central penetra las regiones de pulpa blanca peri-elipsoide formando capilares peniciliformes que en sus regiones medias están rodeados por capilares elipsoides. Estos capilares elipsoides son revestidos de células dendríticas asociadas a los elipsoides, la finalidad de este complejo sistema de capilares es la de captar y muestrear la gran diversas sustancias que entran a traves de los capilares (**Glick, 2000**).

#### **2.2.3.5.3. La glándula de Halder, la glándula Pineal y los nódulos linfoides**

La glándula de Halder, la glándula pineal y los nódulos linfoides del ave participa en el sistema de vigilancia inmunológica en los diferentes sistemas del individuo. La glándula de Halder se encuentra localizada en posición ventral y postero-medial respecto a la orbita del ojo (**Mueller et al., 1971**). La glándula de Halder, esta constituida principalmente por linfocitos B y células plasmáticas (**Thaxton, 1991**) por lo cual, participa en la activación, proliferación y diferenciación de células tipo-B y en la producción de anticuerpos (**Mueller et al., 1971; Gallego y Glick, 1988; Scott y Savage, 1996**). La glándula pineal, participa en el sistema de vigilancia inmunológica a escala del sistema nervioso. Algunos estudios (**Cogburn y Glick, 1983**), demostraron su papel en la producción de anticuerpos utilizando modelos de inoculación con albúmina sérica bovina, y observando una respuesta en la producción de anticuerpos contra este antígeno a los 5 días pos-inoculación. Por otro lado, el empleo de técnicas de inmunohistoquímica permitió demostrar la presencia de inmunoglobulinas tipo IgA en la superficie luminal y peri folicular de los folículos pineales (**Olah y Glick, 1991**). Las acumulaciones linfoides o

nódulos linfoides más desarrolladas en el ave, se localizan en la región tibio-poplítea posterior y de las venas femorales. Estos nódulos linfoides poseen conductos linfáticos aferentes y eferentes, células T y B, centros germinales y prominentes sistemas de sinusoides linfáticos (**Olah y Glick, 1983; 1985**). Su función, es la participación en el sistema de vigilancia inmunológica a nivel sistémico, esta función fue evidenciada a partir de la inoculación con antígenos en el cojinete plantar del ave que posteriormente resultaba en un agrandamiento de los nódulos tibio-popliteos y femorales (**McCorkle et al., 1979**).

#### **2.2.3.6. Desarrollo del sistema inmune del ave**

Los eventos más importantes en el desarrollo del SI del ave comienzan durante la fase embrionaria y continúan después de la eclosión (**Goble, 1996; Ratcliffe et al., 1996**). Los principales órganos linfoides son repoblados a partir de las migraciones de células madres desde la médula ósea hacia los distintos órganos con linfocitos tipo T y B. Entre los días 8 y 15 de desarrollo embrionario, células basófilas migran hacia la bolsa de Fabricio. En el caso del timo, el proceso de colonización con células madre tipo T ocurre en tres oleadas de inmigración (6-8, 12-14 y 18 y 20 días de desarrollo embrionario) (**LeDouarin et al., 1984, 1990**). Durante la primera semana de vida, ocurre un periodo de migración de poblaciones de linfocitos del timo y la bolsa de Fabricio hacia los restantes órganos linfoides como el bazo y los órganos linfoides asociados a mucosas (**Ciriaco et al., 2003**). Durante este mismo periodo ocurren además una serie de eventos educacionales o de formación y eliminación de células inunes que tendrán como resultado la producción de clones únicos de linfocitos que posteriormente mediarán la respuesta inmune del ave (**Klausing, 1998a**). A escala de órganos linfoides se ha observado que posterior a la eclosión del ave, la bolsa de Fabricio incrementa su tamaño en 2% más respecto al peso corporal del ave y en alrededor de un 3% a los 21 días (**Dibner et al., 1998**).

La lámina propia de la mucosa digestiva de pollos de un día de edad, contiene poco estroma (capilares, fibras reticulares y fibras musculares) y niveles pobres de linfocitos (**Bar-Shira et al., 2003; Bar-Shira y Friedman, 2005**) que presentan una baja actividad para la expresión de citocinas efectoras (IL-2 y IFN $\gamma$ ) (**Dunon et al., 1997**). La presencia de estos linfocitos podría coincidir con una de las primeras oleadas de emigración de linfocitos T desde el timo, y con la aparición de linfocitos B a escala periférica (**Yamamoto et al., 1977; Lawrence et al., 1981**). Posterior a los 4 días de edad, ocurre una segunda y mayor oleada de similar dinámica de emigración de linfocitos T y B hacia los tejidos digestivos (**Friedman et al., 2003**). Esta segunda oleada es paralela al desarrollo del parénquima intestinal, e incluye a linfocitos activos y maduros

que muestran una gran capacidad para expresar citocinas con funciones efectoras (IL-2 y INF $\gamma$ ) (**Bar-Shira y Friedman, 2003**). De acuerdo a **Yason *et al.* (1987)**, la mayor parte del tejido estromal, células mono-nucleares y ocasionalmente eosinófilos se van incrementan en relación a la edad del ave. En mamíferos, es reconocido que el sistema neuroendócrino participa en la regulación del sistema inmune a escala digestiva ya que la mucosa digestiva es extremadamente bien inervada, y algunos neurotransmisores como la sustancia P, somatostatina y colecistoquinina pueden participar en la activación de los linfocitos T y B del tracto digestivo (**Furnes y Costa, 1980; Bienenstock *et al.*, 1989**). En el caso de aves, el tracto digestivo también está bien inervado y la presencia de la sustancia P al momento de la eclosión es baja no obstante, la concentración de la sustancia P se va incrementando lentamente en relación a la edad del ave hasta llegar a su máximo a las 20 semanas de edad (**Brodin *et al.*, 1981**).

### **2.2.3.7. Mecanismos de defensa del tracto digestivo de las aves**

El estudio del tejido linfoide asociado al tracto digestivo (TLATD o GALT = Gut-associated lymphoid tissue por sus siglas en Inglés) adquiere gran relevancia cuando consideramos que la mucosa digestiva del ave: 1) es una de las mayores barreras de contacto con el medio externo debido a la gran superficie que puede representar (**Bar-Shira y Friedman, 2005**), 2) es un punto crítico para la entrada e invasión de diversos agentes patógenos para el individuo, sobre todo de aquellos que se replican en el epitelio digestivo y que ocasionan importantes pérdidas al sector avícola (coccidias) (**Schat y Myers, 1991**), y 3) el TLATD es uno de los mayores sistemas inmunológicos del individuo, en humanos el TLATD contiene una mayor concentración de linfocitos en comparación a otro tipo de tejidos incluyendo nódulos linfoides y el bazo (**Bienenstock y Befus, 1980**), en el caso de aves en los párrafos posteriores se irá describiendo su distribución y presencia.

#### **2.2.3.7.1. Distribución horizontal del tejido linfoide asociado al tracto digestivo de aves**

La respuesta inmune a escala local juega un papel fundamental en la protección del ave, estructuras inmunológicas bien definidas están presentes a lo largo del tejido digestivo o TLATD, entre ellos: la bolsa de Fabricio, tonsilas cecales, placas de Peyer, divertículo de Meckel y pequeñas concentraciones de agregados linfoides (**Schat y Myers, 1991; Sklan, 2005**). Los grupos celulares presentes en el sistema inmune a escala digestiva son principalmente linfocitos T y B, y en una menor proporción poblaciones celulares de monocitos/macrófagos, neutrófilos o heterófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos y células NK (**Lillehoj, 1993**).

**2.2.3.7.1.1. Bolsa de Fabricio**

La bolsa de Fabricio (BF), es un saco redondo de aproximadamente 1 cm de diámetro localizado de forma adyacente a la cloaca, en su interior se encuentran localizados folículos que contienen linfocitos B, células plasmáticas y macrófagos. La BF, en los pollos sufre un rápido crecimiento durante las primeras 3 semanas de edad, logra su máximo crecimiento entre las 5 y 6 semanas de edad, e involuciona antes de la madurez sexual del animal (**Glick, 2000**). El papel que desempeña la BF en la respuesta inmune del ave, podría considerarse como la de un órgano linfoide primario y secundario a la vez ya que puede ejercer funciones como parte del TLATD. La BF, se origina a partir de una evaginación de la región proctodea de la cloaca, este proceso también da origen a la formación de un conducto bursal que en su apertura contiene infiltrados difusos de linfocitos T (**Odend'hal y Brezaile, 1980**). El conducto bursal permite la comunicación directa entre el lumen de la BF y el lumen intestinal, y las contracciones de la cloaca permiten succionar y facilitar el muestreo de partículas o antígenos que acceden al interior de la BF a través del conducto bursal. Este mecanismo permite que la aplicación de antígenos a través de la cloaca resulte en el desarrollo de una respuesta inmune que evidencia el papel de la BF como órgano linfoide secundario (**Sorvari et al., 1977**).

Dentro del lumen de la BF, pueden observarse de 10 a 15 pliegues que pueden contener de 8000 a 12000 folículos. Cada folículo presenta una corteza, una medula, un borde cortico-medular y tejido folicular asociado al epitelio (TFAE) en la región medular (**Glick, 1983**). La presencia de células M en los TFAE puede facilitar los movimiento de antígenos desde el lumen bursal hasta la parte interna de la médula del folículo, lugar donde las células B inmaduras sufrirían un proceso de desarrollo (**Sayegh et al., 2000**). Los marcadores celulares de las células B de la BF, se encuentran constituidos por inmunoglobulinas asociadas a la membrana celular. **Gilmour et al. (1976)**, reveló la presencia de dos locis autosómicos Bu-1 y Th1 utilizando anti-sueros específicos, estos receptores identificados reconocen antígenos de linfocitos búrsales / células B periféricas y células tímicas / células T periféricas de forma respectiva. También se han reportado estructuras alélicas como Bu-1a (94 kDa) y Bu-1b (70 kDa) que son utilizadas durante las fases de colonización de folículos, y la de un antígeno Bu-2 distinto de Bu-1, que identifica células Ig<sup>+</sup> y Ig<sup>-</sup> (**Chen et al., 1991**).

### **2.2.3.7.1.2. Tonsilas cecales**

Las tonsilas cecales son acumulaciones de tejido linfoide localizadas en las regiones proximales de cada uno de los sacos ciegos. Se considera que por su localización y por el continuo contacto de las vellosidades de las tonsilas cecales con el contenido fecal, las tonsilas cecales ejercen una función de centinelas del tejido linfoide periférico con producción de anticuerpos contra antígenos solubles (**Jankovic y Mitrovic, 1967; Orlans y Rose, 1970**). De forma general la estructura de una tonsila cecal es comparable a la de una placa de Peyer y su organización consiste en unidades esféricas (alrededor de 400 unidades de este tipo) (**Glick *et al.*, 1981b**). Cada unidad esférica presentara una cripta central, tejido linfoide difuso y centros germinales. Las tonsilas cecales presentan células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (IgM, IgG y IgA). A los 5 días de edad del ave, los linfocitos T y B ya están presentes dentro de los centros germinales de las tonsilas. El tejido linfoide en las tonsilas cecales esta distribuido en 2 áreas: sub-epitelial o zona dependiente de células B; y zona profunda o zona dependiente de células T. Los centros germinales pueden ser localizados en ambas zonas y contienen macrófagos en sus áreas corticales. Aunque los macrófagos están presentes de forma global en las tonsilas cecales, su distribución es más orientada y presente a las áreas de la base del epitelio (**Jankovic y Mitrovic, 1967; Orlans y Rose, 1970**).

### **2.2.3.7.1.3. Placas de Peyer**

Las placas de Peyer en aves están localizadas en la región anterior del íleon cerca de la unión íleo-cecal. Algunos autores (**Schat y Myers, 1991**) sugieren que las placas de Peyer aparecen alrededor de los 10 días de edad, en aves de 12 semanas de edad se pueden observar de 5 a 6 placas con un diámetro de 5 mm. No obstante, en pollos más adultos solo es posible encontrar una placa de Peyer de manera consistente en la región anterior del íleon (**Schat y Myers, 1991**). Las vellosidades de las placas de Peyer son anchas, presentan epitelio plano, carecen de células caliciformes y presentan micropliegues pinocíticos o células M. El área sub-epitelial de la placa de Peyer, contiene agregados de tejido linfoide difuso y una gran cantidad de centros germinales. Los centros germinales son rodeados de células reticulares y en el tejido linfoide difuso pueden encontrarse macrófagos. De forma similar a las tonsilas cecales, dentro de las placas de Peyer es posible diferenciar en las zonas sub-epiteliales, zonas dependientes de células B y zonas dependientes de células T. En aves que fueron bursectomizadas se observó una despoblación celular de las zonas B-cell dependientes y zonas centrales (**Befus *et al.*, 1980**). La mayor parte de estas zonas presentan células positivas a marcadores de tipo  $\alpha/\beta$  T-cell receptor (TCR2) y células T cooperadoras (CD4) (**Bucy *et al.*, 1988**). Las células plasmáticas de las placas de Peyer son capaces de producir los

tres tipos de isotipos de inmunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) (**Jeurissen et al., 1989; 1999; Schat y Meyer, 1991**).

#### **2.2.3.7.1.4. Divertículo de Meckel**

El divertículo de Meckel tiene su origen en el saco vitelino o saco de la yema, su estructura presenta dos secciones bien definidas (saco de la yema y tallo de la yema). Estudios histológicos han descrito que en aves de 2 semanas de edad, el divertículo de Meckel tiene comunicación con el lumen intestinal del yeyuno (**Olah y Glick, 1984**), y esta comunicación se pierde a las 6 semanas de edad (**Jeurissen et al., 1988**). Durante el periodo de involución que va de las 2 a las 6 semanas de edad, en la sección del saco del divertículo de Meckel se llevan a cabo procesos de mielopoyesis extramedular. En la capa muscular del divertículo de Meckel se localizan células de tipo granulocitos, mientras que los monocitos se encuentran asociadas a la superficie de las células gigantes (**Olah y Glick, 1984**). Se considera que la participación del divertículo de Meckel en las funciones de mielopoyesis extra-medula y su papel en el TLATD no ha sido claramente bien definida (**Schat y Myers, 1991**).

#### **2.2.3.7.2. Distribución vertical del tejido linfoide asociado al tracto digestivo de aves (linfocitos de la pared intestinal)**

A escala de la lámina propia de la mucosa digestiva es posible encontrar una cantidad importante de linfocitos de tipo B y T (principalmente CD4<sup>+</sup>) (**Jeurissen et al., 1989; Bucy et al., 1988**). Los linfocitos B son positivos a inmunoglobulinas tipo IgM e IgA, por lo que la lámina propia también contiene células plasmáticas productoras de estas inmunoglobulinas (**Jeurissen et al., 1989**). En el epitelio digestivo (duodeno, yeyuno e íleon), la mayoría de los linfocitos intra-epiteliales (LIE) están distribuidos entre los distintos enterocitos o células epiteliales situados sobre la base o sótano de la membrana basal (**Ernst et al., 1985**). De acuerdo a **Back (1972)**, las poblaciones de LIE son heterogéneas y están constituidas en un 77% por linfocitos, 22% por leucocitos y 1% por eosinófilos. Estudios con linfocitos marcados con <sup>3</sup>H-timidina, demostraron que los LIEs pueden migrar desde la lámina propia hacia el epitelio de la mucosa (**Back, 1972**). En otros modelos que emplearon aves timectomizadas se observó una reducción en la población LIE en la mucosa digestiva, situación que sugeriría un origen tímico para estos linfocitos (**Back, 1970 ab**).

Los estudios de comparación entre los antígenos de superficie de las células T de aves adultas con sus homólogos en mamíferos, permitieron demostrar una posible distribución funcional y no solo anatómica de los linfocitos presentes en la mucosa digestiva, por ejemplo: las células T con marcadores CD3<sup>+</sup> están localizados en la lamina propia y el

epitelio; las células con marcadores CD4<sup>+</sup> y TCR2<sup>+</sup> se encuentran principalmente en la lamina propia, submucosa y centros germinales de las tonsilas cecales; y células CD8<sup>+</sup> y TCR1<sup>+</sup> están presentes principalmente en el epitelio (**Bucy et al., 1988**). Otros estudios permitieron demostrar la presencia de linfocitos con actividad NK a escala intraepitelial (**Chai y Lillehoj, 1988; Lillehoj y Chai, 1998**). En mamíferos, uno de los principales mecanismos de defensa a escala de las criptas de la vellosidad lo constituyen la presencia de células tipo Paneth, células que tienen la capacidad de producir sustancias con capacidad antimicrobiana (lisozimas y defensinas) (**Leer y Ganz, 1996; 2002**). En el caso de aves, se han identificado algunas defensinas a nivel de las criptas de la vellosidad no obstante, no se han identificado aún a las células responsables de su producción o en su caso, presencia de células de Paneth (**Bezuidenhout y Van Aswegen, 1990**), situación que podría sugerir que las células responsables de la producción de estas defensinas pudieran ser macrófagos o heterófilos (**Evans et al., 1994; Brockus et al., 1998; Sugiarto y Yu, 2004**).

#### **2.2.3.7.3. IgA secretora (IgAs)**

La presencia de una inmunoglobulina en el pollo denominada IgA diferente a IgG e IgM fue reportada por primera vez por **Lebacqz-Verheyden et al. (1972)**. Posteriormente se reportó que la IgA está presente en grandes cantidades en las secreciones biliares y secreciones intestinales (**Lebacqz-Verheyden et al., 1972; Bienenstock et al., 1973; Leslie y Martin, 1973**). En secreciones biliares de pollo, se han cuantificado concentraciones de 3.5 a 12.0 mg/ml (**Bienenstock et al., 1973; Mockett, 1986**). De forma similar a mamíferos, en aves la IgA puede estar presente en el suero en su forma monomérica y en las secreciones en su forma polimérica (trímeros o tetrámero). De forma contraria a los mamíferos, en el pollo la forma de dímero de la IgA es la más común en las secreciones (**Rose et al., 1981; Solari y Kraehenbuhl, 1985**). La inmunoglobulina IgA ha sido reconocida como un anticuerpo benigno ya que presenta una incapacidad para unirse con los factores del complemento que pueden inducir una respuesta inflamatoria. Otras de las funciones de la IgA, involucran la neutralización de virus y bacterias que puedan adherirse al epitelio digestivo e invadirla; además participa en la aglutinación de antígenos para que queden atrapados en el mucus intestinal y facilitar su eliminación por parte del huésped. La IgA es protegida de la acción de las proteasas del lumen intestinal por un componente secretor (glicoproteína) que es producido por las células epiteliales, este componente secretor envuelve la fracción Fc del dímero de la inmunoglobulina y esconde los sitios sensibles a la acción de las proteasas (**Cunningham-Rundles, 2001**).

### 2.2.3.8. El pollo de engorde, animal susceptible a padecer estrés e inmunodepresión y sus consecuencias

Uno de los principales objetivos en el área de producción avícola es el de proporcionar y mantener las condiciones óptimas de bienestar en los animales para lograr los mejores índices productivos y las mayores rentabilidades (**Sams, 2005**). A pesar de todos los esfuerzos realizados por los productores para llevar a cabo este objetivo, situaciones como: estrés calórico, altas densidades de población, hipoxia (animales criados a grandes altitudes), contacto con agentes infecciosos o no infecciosos (micotoxinas), prácticas de manejo y empleo de materias primas de menor calidad en las raciones, pueden estar presentes de forma única o combinada en los actuales sistemas de producción (**García-Rubio, 2003; Cahaner y Deeb, 2004; Prado et al., 2005**). Bajo este escenario, los pollos de engorde criados en condiciones intensivas tienden a sufrir niveles variables de estrés. En un nivel moderado de estrés crónico, el ave sería capaz de adaptarse e incluso podría manifestar crecimientos aparentemente normales. No obstante, ante situaciones simultáneas de múltiples agentes estresantes el ave no llegaría a adaptarse y reaccionaría de forma adversa (**García-Rubio, 2003**). En aves, los cambios metabólicos originados como respuesta al estrés pueden afectar distintos niveles, por ejemplo:

1. Modificación del tamaño de la glándula adrenal al incrementarse la liberación de corticosterona (**Nir et al., 1975; Thaxton, 1982**).
2. Atrofia del timo, bolsa de Fabricio, y bazo (**Puvadolpirod y Thaxton, 2000ab**), una involución temprana de la bolsa de Fabricio en pollos jóvenes puede reducir el estatus de inmunocompetencia del ave o resultar en inmunodepresión (**Thaxton et al., 1968; Dohms y Saif, 1984; Murray et al., 1987ab; Mashaly et al., 2004;**).
3. Cambios en la circulación de leucocitos, por ejemplo, decremento en linfocitos e incremento de heterófilos (**Puvadolpirod y Thaxton, 2000abc**).
4. Menor crecimiento y menor absorción de nutrientes (**Puvadolpirod y Thaxton, 2000d**).

Los problemas de inmunodepresión en las instalaciones avícolas debidos a la presencia de estrés, pueden verse agravados si consideramos que las mejoras genéticas para lograr un rápido crecimiento en las estirpes actuales de pollos de engorde han resultado en un decremento en su estatus de inmunocompetencia (**Lamont, 1998**). Algunos estudios



han encontrado que la selección para lograr un mayor crecimiento en los pollos de engorde han resultado en una mayor susceptibilidad para padecer la enfermedad de Marek (**Han y Smiyth, 1972**) y en una correlación negativa con la producción de anticuerpos contra glóbulos rojos de borrego o respuesta inmune humoral (**Siegel y Gross, 1980; Van der Zijpp, 1983**). Recientemente **Cheema et al. (2003)** compararon el estatus de inmunocompetencia de pollos de engorde representativos de 1957 contra aves de 2001, los resultados de estos estudios sugirieron que las estirpes actuales de pollos de engorde (2001) presentan una disminución en la capacidad de respuesta inmune de tipo adaptativa, menores pesos relativos de los principales órganos linfoides y mayor susceptibilidad de sufrir inflamación respecto a las aves de 1957 (**Tabla 2.10**).

**Tabla 2.10.** Pesos relativos de los órganos linfoides de pollos de engorde representativos de una estirpe moderna 2001 (Ross 308) y una estirpe de 1957 (Athens-Canadian) (adaptado de **Cheema et al., 2003**).

<i>24 días de edad</i>	<i>Estirpe 1957</i>	<i>Estirpe 2001</i>
Peso vivo (kg)	201 <sup>b</sup>	693 <sup>a</sup>
Timo (%)	0.30	0.24
Bolsa de Fabricio (%)	0.46 <sup>a</sup>	0.29 <sup>b</sup>
Bazo (%)	0.18 <sup>a</sup>	0.12 <sup>b</sup>
Tonsilas cecales (%)	0.04 <sup>a</sup>	0.03 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup> Letras distintas dentro de una mismas columna, son diferentes estadísticamente (P<0.05).

Los problemas relacionados con procesos de inmunodepresión en las parvadas comerciales de pollos pueden incluir: mayor susceptibilidad a enfermedades, deficiente respuesta a programas de vacunación u otros antígenos (pobres niveles de anticuerpos séricos), reacciones post-vacunales severas, complicación con agentes oportunistas, manifestaciones atípicas de algunas enfermedades, interacción entre varios agentes etiológicos, incremento en la conversión alimenticia, mayores mortalidades, pobre crecimiento y desuniformidad en las parvadas (**Quiroz, 2000**).

#### 2.2.4. Oportunidades para mejorar la salud intestinal y la salud del ave

La selección genética para lograr un rápido crecimiento en las estirpes actuales de pollos de engorde comerciales ha resultado también en cambios estructurales en su sistema digestivo, en el apetito y el sistema inmunitario (**Denbow, 1994; Dunnington y Siegel, 1996; Cheema *et al.*, 2003**). Ante esta situación, algunos autores han sugerido que las oportunidades para mejorar la eficiencia en la utilización de nutrientes en aves pueden ser divididas en aquellas que afecten el desarrollo intestinal, el mantenimiento intestinal y la salud e inmunidad (**van der Klis y Jansman, 2002; Dibner y Richards, 2004; Richards *et al.*, 2005**).

##### 2.2.4.1. Desarrollo y Mantenimiento

Los pollos de engorde al día de la eclosión presentan un saco vitelino, proventrículo, molleja e intestino delgado más pesado en relación a otras aves de menor velocidad de crecimiento (**Nitsan *et al.*, 1991b**). Esta y otras características, han dado hincapié a desarrollar líneas de investigación en pollos de engorde y pavos encaminadas a evaluar las ventajas de potenciar el consumo de nutrientes o del alimento al momento de la eclosión o inclusive días previos a este (alimentación in-ovo) sobre los parámetros de crecimiento, desarrollo muscular y del sistema inmunitario (**Dibner *et al.*, 1998; Noy y Sklan, 1999; Halevy *et al.*, 2003**). Investigaciones en el área de fisiología digestiva han demostrado que la presencia de nutrientes en el tracto digestivo del ave es un factor esencial para favorecer su desarrollo (**Moran, 1985; Biviano *et al.*, 1993**). De forma contrastante, los efectos de la restricción del alimento horas seguidas tras la eclosión del pollo, se reflejan de forma negativa en el crecimiento, en el desarrollo de la mucosa digestiva (atrofia) (**Uni *et al.*, 1998; Geyra *et al.*, 2001b**) y en perturbaciones del proceso de síntesis y secreción de la capa de mucosidad o mucina de la mucosa digestiva (**Uni *et al.*, 2003b; Smirnov *et al.*, 2004**).

Algunos estudios han mostrado que proporcionar alimento a los pollos durante las primeras 48 hr posterior a la eclosión puede favorecer la utilización de nutrientes del saco vitelino (proteína y grasa) y una rápida reabsorción, además de un mayor crecimiento e incremento del peso del intestino delgado en relación a los animales que son sometidos a un ayuno (**Noy y Sklan, 1998; Noy y Sklan, 1999**). Por otro lado, la implementación de programas de alimentación in-ovo, puede favorecer el desarrollo digestivo del ave, el cual es traducido en un mayor diámetro de intestino delgado, mayor altura de las vellosidades (**Uni y Ferket, 2004; Tako *et al.*, 2004; Uni *et al.*, 2005**) y mayor desarrollo de las células caliciformes de la mucosa digestiva al momento de la eclosión (**Smirnov *et al.*, 2006**). De hecho, los resultados de estos estudios mostraron que los

beneficios obtenidos en el desarrollo del tracto digestivo de las aves alimentadas in-ovo, la mayoría de las veces eran reflejados en mayores pesos corporales a la eclosión y al final de los experimentos.

La tasa de recambio celular y el mantenimiento de la integridad de la mucosa digestiva, son factores que pueden tener significativas implicaciones en la eficiente utilización de nutrientes por el animal (**Montagne et al., 2003; Dibner y Richards, 2004**). La mucosa digestiva no solo representa una de las mayores áreas de superficie de contacto con el medio externo del animal, además representa la mayor tasa de renovación celular respecto a cualquier otro tejido del organismo (**Cant et al., 1996; Gewirtz et al., 2002**). En el pollo de engorde la tasa de renovación celular está acompañada de una gran tasa metabólica que puede significar un gasto en energía de un 20-23 a un 36% del total corporal (**Summers, 1991; Cant et al., 1996**). La mucosa digestiva utiliza de forma preferente sustratos que incluyen glucosa, glutamina y glutamato para sus procesos metabólicos no obstante, la mucosa digestiva también puede participar en la degradación de aminoácidos de cadena ramificada, esenciales y en ocasiones limitantes (metionina, treonina y lisina) (**Watford et al., 1979; Wu, 1998**).

En el pollo, la síntesis proteica del tracto digestivo ha sido estimada entre 1.3 y 6.6 g/día, con tasa fraccional de síntesis del 49 al 77% (**Bryan et al., 1983; Muramatsu et al., 1987; Cant et al., 1996**), se considera que las pérdidas de proteína corporal a escala digestiva están relacionadas con secreciones digestivas enzimáticas, pérdida de células epiteliales apoptóticas y demandas de energía de los mecanismos de transporte activo de iones y nutrientes (**Smith et al., 1990**). La importancia de que la mucosa digestiva utilice aminoácidos como fuentes de energía, radica en que parte de estos aminoácidos no serán destinados para la síntesis muscular en el animal (**Kidd, 2000; Dibner y Richards, 2004**). En animales monogástricos una parte representativa de los nutrientes del tracto digestivo pueden ser empleados en la síntesis y secreción de mucina digestiva (**Montagne et al., 2004**). Considerando que la mucina digestiva puede ser catabolizada por las bacterias digestivas y/o ser eliminada de forma normal durante la constante renovación de la mucosa (**Moncada et al., 2003**), algunos autores han sugerido que una excesiva producción de mucina como respuesta a una gran proliferación bacteriana puede resultar en mayores pérdidas endógenas o ser incompatible con absorción de nutrientes de la mucosa digestiva (**Hoskins, 1984; Houdijk et al., 1999; Jeurissen et al., 2002**). De hecho, los aminoácidos treonina, serina y prolina han sido empleados como indicadores de pérdidas endógenas proteicas asociados con la producción de mucina (**Montagne et al., 2004**). Por otro lado, a pesar de que el patrón óptimo de síntesis y secreción de la mucina digestiva en el tracto digestivo sigue siendo desconocido,

su rol crítico en la protección y en la salud de mucosa digestiva es ampliamente reconocido (**Jeurissen *et al.*, 2002; Moncada y Chadee, 2002**).

En la actualidad, la edad al sacrificio del pollo de engorde sigue reduciéndose gracias al continuo progreso genético, aunado a este importante factor, el éxito de los actuales sistemas de producción puede verse favorecido con la formulación y empleo de dietas de alta calidad, capaces de estimular el desarrollo del sistema digestivo (enterocitos y sistemas de defensa) y el sistema óseo del ave durante los primeros días de vida. Estas prácticas pueden ser traducidas en términos de mayor capacidad de ingestión de alimento e integridad del esqueleto, aspectos básicos para incrementar la eficiencia productiva del ave (**Didner y Richard, 2004; Leeson, 2006**). En pollos de engorde se ha sugerido que por cada gramo extra logrado en el peso vivo del ave al día 7 de edad, pueden obtenerse 5 g gramos extras de peso vivo al día 49 de edad (**Leeson, 2006**).

### 2.2.4.2. Inmunidad y Microflora

Los factores dietarios que puedan producir cambios drásticos en la microflora digestiva del ave, adquieren un especial interés ante la presencia de estrés en las instalaciones avícolas y de animales susceptibles a sufrir inmunodepresión como los actuales pollos de engorde (**Lamont, 1998; Qureshi *et al.*, 1998; Hoerr, 1998**). Ante la ausencia de APC en las dietas de estos animales, la suma de factores adversos (ambientales, dietarios y microbianos) pueden predisponer a la presentación o el agravamiento de cuadros de enfermedades digestivas subclínicas y clínicas (**Kaldhusdal, 2003**). Una de las oportunidades para afrontar situaciones adversas asociados con los problemas de inmunodepresión en las parvadas comerciales de pollos de engorde, es la de mantener una adecuada activación del sistema inmunitario en el ave, a un nivel que le permita mantenerlo funcional o que le evite situaciones de inmunodepresión sin llegar a ocasionar una excesiva inmunoestimulación que resulte en la depresión del crecimiento o reducción de la eficiencia alimenticia (inmunomodulación) (**Adams, 2004**).

De acuerdo a **Richards *et al.* (2005)**, los estudios realizados hasta la fecha sobre las poblaciones bacterianas del tracto digestivo de los animales muestran ser controversiales, ya que el número de bacterias reportadas depende en gran magnitud de factores como la región digestiva muestreada, la técnica utilizada (cultivo tradicional o técnica molecular), tipo de dieta, localización geográfica y otros factores. Por otro lado, los datos reportados sobre las descripciones de la microflora digestiva de animales, podrían considerarse incompletos debido ha que se menciona que la mayor parte de las bacterias digestivas no han podido ser aisladas aun por técnicas de cultivo tradicionales, y que la mayoría de las encontradas por técnicas moleculares continúan siendo desconocidas (**Apajalahti,**

**2003**). Ambas situaciones supondrían que actualmente las dos grandes oportunidades para la investigación en el área de producción animal estarían encaminados a: 1) determinar el balance óptimo de especies microbianas digestivas que permitan mejorar el status de salud y mantenimiento del sistema digestivo del animal, para maximizar el crecimiento y minimizar los costos de producción de animales mantenidos bajo condiciones comercial de producción; y 2) desarrollar las dietas y estrategias que permitan establecer esta microbiota, sobretodo a temprana edad de las aves cuando la función y la microflora del tracto digestivo comienzan a desarrollarse (**Adams, 2004**).

### **2.2.5. Sustancias empleadas en alimentación de aves para favorecer la salud intestinal y la inmunidad**

Las nuevas tendencias en la nutrición moderna, promueven que el alimento destinado a aves comerciales no solo tiene que proveerle un adecuado nivel de nutrientes de alta disponibilidad, además de esta importante característica, aspectos de seguridad y ausencia de patógenos toman un papel cada vez más importante. El alimento deberá ser capaz de modular la microflora digestiva que permita el control de desórdenes digestivos, proteger al ave de los estragos de la oxidación, mitigar el desarrollo de enfermedades no infecciosas y mantener un sistema inmune eficiente para afrontar las enfermedades infecciosas. Para lograr este objetivo y ante la ausencia de APC en alimentación animal, el empleo de cierto tipo de nuevas sustancias denominadas "nutricinas" debido a sus capacidades de ejercer efectos de tipo nutritivos y en la salud del animal, resultan muy interesantes en el área de nutrición de aves (**Adams, 1999; 2004**). Los nuevos aditivos denominados "nutricinas" pueden ejercer una amplia gama de mecanismos de acción que pueden ir desde favorecer la calidad e higiene de los alimentos hasta evitar la presentación de enfermedades en el animal, algunos de los principales ejemplos de estos nuevos aditivos empleados en alimentación de aves así como sus mecanismos de acción se describen a continuación.

#### **2.2.5.1. Acidificantes o Ácidos orgánicos**

En un principio uno de los mecanismos de acción de los ácidos orgánicos, fue basado en la capacidad de estas moléculas para reducir el pH del contenido digestivo (**Gauthier, 2005**). Actualmente, las experiencias generadas de su empleo en la industria alimentaria como agentes preservadores, han proporcionado importante información sobre otros mecanismos de acción. Los ácidos orgánicos no disociados o no ionizados, pueden acceder a células bacterianas pH sensitivas (*E. coli*, *Salmonella spp*, *C. perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp*), provocando desequilibrios en los gradientes del pH celular (internos y externos) que serán incompatibles con la fisiología normal y el desarrollo del microorganismo (**Presser et al., 1997; Brul y Coote, 1999**). Otra importante aplicación de los ácidos orgánicos, ha sido su empleo como primera línea de defensa ante la contaminación y el crecimiento de hongos, capaces de producir micotoxinas en materias primas y alimentos almacenados (**Holmberg et al., 1989**). Los ácidos orgánicos también son utilizados como una alternativa viable para reducir la incidencia de desordenes gastrointestinales en lechones, ya que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de bacterias patógenas en un ambiente complejo de alta humedad como el sistema digestivo (**Partanen y Mrzoz, 1999**). De manera general se considera que, en relación a la utilización de antibióticos, los ácidos orgánicos muestran resultados

más limitados y variables (**Huyghebaert, 2003**). A pesar de estas consideraciones en avicultura, el empleo en la dieta de mezclas de ácidos orgánicos (fórmico y propiónico) fue capaz de reducir la proliferación de *Salmonella* (**Thompson y Hilton, 1997**) y *Campylobacter* (**Chaveerach et al., 2004**). De acuerdo a **Huyghebaert (2003)** y **Mroz (2003)**, los ácidos orgánicos podrían ejercer un rol en el desarrollo de la mucosa digestiva, al servir como una fuente de energía de rápida asimilación para las células digestivas. Algunos autores también han sugerido que su utilización en avicultura debe ser racionalizada ya que bacterias como *Salmonella* pueden desarrollar mecanismos de resistencia cuando se utilizan ácidos orgánicos similares durante periodos de tiempo prolongados (**Van Immerseel et al., 2002**).

#### **2.2.5.2. Enzimas exógenas**

La aplicación a escala práctica de enzimas exógenas en avicultura, se debió en gran medida a que fue reconocido que los PNA solubles presentes en cereales como el centeno, la cebada, el trigo y el triticale, cereales considerados viscosos, interferían los procesos de digestión y absorción de nutrientes. A escala práctica fueron desarrolladas enzimas de tipo carbohidrazas entre ellas  $\beta$ -glucanasas para el caso de la cebada y pentosanasas para el trigo y el centeno (**Choct, 2006**). Los mecanismos de acción de las enzimas dietarias o carbohidrazas adicionadas en alimentos para aves con grandes concentraciones de PNA, pueden incluir los siguientes mecanismos: reducción de la viscosidad e incremento de la velocidad de tránsito del contenido digestivo y del alimento, ambos efectos son reflejados en una mayor capacidad de digestión y absorción de nutrientes y en la generación de una menor cantidad de sustratos disponibles para que microorganismos fermentadores proliferen a nivel del intestino delgado. De esta forma, los procesos de digestión enzimática endógena del sistema digestivo pueden verse restaurados a un estado normal y eficiente y por otro lado, los efectos nocivos que los PNA ejercen sobre la productividad del animal podrían verse contrarrestados (**Bedford y Classen, 1992; Huyghebaert, 1995; Bedford, 2000b; Brufau et al., 2006**).

Las enzimas dietarias pueden reducir la multiplicación de bacterias a nivel del ileón, a nivel de los ciegos, los productos resultantes de la acción de las enzimas exógenas pueden ser utilizados como sustratos por bacterias fermentadoras, pudiéndose verse incrementada la producción de ácidos grasos volátiles que favorezcan la proliferación de bacterias benéficas (*Bifidobacterias*) y supriman la proliferación de bacterias patógenas (*Campylobacter, Salmonella, Clostridium*) (**Apajalahti y Bedford, 1999; Bedford, 2000b; Fernández et al., 2000**). Otro efecto importante atribuido a las enzimas exógenas, es el de poder disminuir las descargas de nutrientes no digeridos por el animal al medio ambiente. Este efecto benéfico, puede ser bien ejemplificado con la utilización de



enzimas de tipo fitasas, las fitasas pueden mejorar la digestibilidad del ácido fítico de los ingredientes de un 25 a un 70% en dietas para aves (**Choct, 2006**). Aparentemente, la magnitud de los efectos que las enzimas exógenas de tipo carbohidrasas pueden ejercer en las productividad del ave, podría estar condicionada al tipo de sustrato presente en los alimentos, observándose grandes respuestas en dietas elaboradas con cereales de pobre calidad o viscosos (centeno, cebada y trigo) y limitada en dietas elaboradas con cereales de alta calidad o no viscosos, como es el caso del sorgo y maíz cereales utilizados en la elaboración de dietas para aves en países americanos (**Elwinger y Teglöf, 1991; Choct, 2006**). No obstante, la necesidades actuales de utilizar cereales como el maíz en la producción de combustibles o bio-combustibles, puede resultar en una mayor utilización de cereales viscosos, subproductos, granos procedentes de la industria de la destilería o ingredientes menos convencionales en alimentación animal, situación que motivaría la investigación hacia la producción de nuevas enzimas para este tipo de nuevos sustratos (**Choct, 2006**)

### **2.2.5.3. Prebióticos, probióticos y simbióticos**

El uso de sustancia prebióticas y microorganismos probióticos pueden representar dos alternativas potenciales para el control de enfermedades digestivas en avicultura (**Patterson y Burkholder, 2003**). Los "probióticos" (pro-vida), han sido definidos como microorganismos vivos que al ser suplementados al alimento de animales, pueden provocar efectos benéficos en el huésped al mejorar el balance intestinal de microorganismos (**Fuller, 1989**). Las sustancias denominadas "prebióticos" son ingredientes no digeribles que al ser ingeridos por el animal pueden ser utilizados como sustratos por bacterias específicas digestivas, provocando una estimulación del crecimiento y actividad de grupos selectivos bacterianos en los órganos digestivos (**Gibson y Roberfroid, 1995**). La utilización de forma conjunta de sustancias prebióticas que sirven de sustrato para la proliferación y actividad de microorganismos probióticos con la finalidad de mejorar el balance de microorganismos y condiciones digestivas del animal, ha sido definida como productos "simbióticos".

En la UE hasta el 2006, fueron autorizadas de forma provisional o final 22 preparaciones de microorganismos probióticos como aditivos alimenticios para producción animal. Dentro de ellos 7 correspondían a probióticos autorizados para avicultura, todos ellos autorizados en pollos de engorde, uno en pavos y uno en gallinas ponedoras. Los organismos autorizados para avicultura correspondían a géneros bacterianos de *Enterococcus*, *Bacillus* y en un caso *Pediococcus* (**EC: DG health y Consumer Protection, 2006**). Otros microorganismos utilizados como aditivos probióticos son las levaduras de las especies de *Saccharomyces cerevisiae* o *Kluyveromyces* (**Anadon, 2006**). Dentro de las sustancias prebióticas, los principales aditivos corresponden a

productos a base de fructooligosacáridos (FOS, oligofruktosa e inulina). No obstante, otro tipo de productos también han sido investigados para llevar a cabo esta función en el animal: trans-galactooligosacáridos, glucooligosacáridos, glicooligosacáridos, lactulosa, lactitol, maltooligosacáridos, xilooligosacáridos y los siguientes polisacáridos: fructooligosacáridos, agarooligosacáridos, mananoligosacáridos, arabinosanos, estaquiosa, rafinosa y sucrosa (**Monsan y Paul, 1995, Orban *et al.*, 1997; Patterson *et al.*, 1997; Piva 1998; Collins y Gibson, 1999**).

De forma similar a otros nuevos aditivos, los mecanismos de acción de los microorganismos probióticos y sustancias prebióticas son conocidas solo en parte. De acuerdo a distintas investigaciones realizadas en humanos y animales, los mecanismos de acción que estos aditivos pueden ejercer en el tracto digestivo del huésped, incluyen los siguientes efectos: competición por sitios y sustratos bacterianos; producción de compuestos tóxicos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos; reducción de la colonización de bacterias patógenas; modificación de las poblaciones bacterianas; modificación del sistema inmunitario; prevención de cáncer y reducción de los triglicéridos, colesterol y otros compuestos (amonio, escatol, indol, p-cresol y fenol) (**Walker y Duffy, 1998; Gibson y Fuller, 2000, Simmering y Blaut, 2001**). De acuerdo a **Simon (2003)**, quien evaluó los resultados de 22 experimentos publicados sobre la utilización de probióticos en dietas de pollos de engorde y pavos, la magnitud de las respuestas en la productividad de las aves por la utilización de estos aditivos en ocasiones fueron nulas o adversas, mientras que en las pruebas favorables muchas veces no fueron estadísticamente significativas. El mismo autor sugirió que las causas de la gran variación de los resultados podría deberse a que los probióticos pueden ejercer un mecanismo de acción sobre las comunidades bacterianas digestivas no obstante, las condiciones medioambientales microbianas y el estatus intestinal de los distintos animales empleados en estos estudios podrían ser muy distintos entre ellos.

**2.2.5.4. Extractos de naturales o aceites esenciales**

Por muchos años la terapia natural y la industria de la medicina alternativa han utilizado hierbas, especies y aceites esenciales como sustancias naturales con propiedades farmacéuticas en humanos (**Mitscher *et al.*, 1987**) no obstante, su utilización en animales como la finalidad de promover el crecimiento o prevenir enfermedades se considera relativamente nueva (**Kamel, 2000**). Algunas de las definiciones (**Webster's Encyclopedic Cambridge, 1989**) que podríamos utilizar para algunas de estas nuevas sustancias serían las siguientes:

- Aceites esenciales: aceites volátiles obtenidos de plantas y que poseen el olor y las características propias de la planta; son utilizados principalmente para la elaboración de perfumes, saborizantes y farmacéuticos (extractos obtenidos por hidrodestilación).
- Hierbas: plantas con flor cuyos tallos no llegan a ser arbolados ni persistentes, plantas valoradas por sus propiedades médicas, sabores, esencias u otras similares.
- Botánicos: Drogas hechas a partir de una planta (hojas, raíces, cortezas, etc).

De forma normal las plantas han desarrollado la capacidad de sintetizar una gran diversidad de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que le sirven para interactuar con el medio ambiente, para defenderse del estrés fisiológico o medioambiental y ante depredadores y patógenos. De la amplia gama de estos compuestos químicos, muchos de ellos presentan propiedades tóxicas mientras que otros pueden ocasionar efectos benéficos en los productos alimenticios y en el metabolismo del animal. De estos últimos, algunos pueden ser específicamente enriquecidos y estandarizados eventualmente en sustancia botánicas o fitobióticos (**Wenk, 2006**). Algunos ejemplos de sustancias químicas derivadas de plantas asociadas con sus propiedades aromáticas incluyen compuestos como terpenos, fenoles, ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos, y cetonas. En las plantas, especies y frutos pueden citarse: sabidina (nuez moscada), cinamaldehído (canela), eugenol (clavo), carvacrol (orégano), cineol (cardamomo, romero, salvia, eucalipto y laurel), linalol (cilantro), cuminaldehído (comino), acetol (anís), ftálicos (apio), apiol (perejil), trogonellina (alholva), capsaicina (cayena, pimiento rojo), piperina (pimienta), alil-isotiocianato (rábano picante y mostaza), zingerona (jengibre), alicina (ajo), timol (tomillo) y mentol (menta), además pueden incluirse sustancias presentes en diversas plantas como saponinas, flavonoides, taninos y otras (**Santomá *et al.*, 2006**).

Los mecanismos de acción de los compuestos presentes en los productos botánicos podrían incluir distintos efectos: activación de consumo del alimento y secreción de jugos digestivos; estimulación del sistema inmunitario; propiedades antibacterianas, coccidiostáticas, antihelmínticas y antivirales; además de efectos anti-inflamatorios y antioxidantes (**Wenk, 2006**). En estudios *in vitro*, el ajo ha mostrado un efecto inhibitorio antimicrobiano para bacterias como *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* (**Amagase et al., 2001**). De acuerdo a **Adams (1999)**, el efecto antimicrobiano de los compuestos derivados del clavo (eugenol), mostaza (alil-isotiocianato), canela (cinamaldehído) y el ajo (alicina) podría considerarse fuerte; del comino (p-cimene), cilantro (lialol), orégano (carvacrol), romero (cineol), salvia (cíñelo) y tomillo (timol) medianos; mientras que el jengibre y pimienta podrían considerarse débiles. En aves se observó que la utilización en conjunto de varios extractos (pimienta, ciruela y otros) en la dieta, mostró ejercer efectos antimicrobianos y de reducir la oxidación de los lípidos en la carne del pollo o en el proceso de rancidez de esta (**Pokorny, 1999; Nam y Ahn, 2003; Mitsch et al., 2004**). Por otro lado, se considera que por sí solos o en combinación, los extractos de plantas o productos botánicos no llegan a ejercer efectos sobre el control total o tolerancia cero para ciertos patógenos (**Ricke et al., 2005**). La mayoría de las propiedades antioxidantes observadas en frutas y vegetales, han sido asociadas a su contenido de compuestos fenólicos con grupos reactivos hidroxilos (catequinas, ácido gálico, ácido colinérgico), ácido neocolinérgico y otros compuestos de tipo antocianinos, carotenoides y flavonoides (**Guo et al., 1997; Donovan et al., 1998; Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001**).

Posiblemente, la lista de productos botánicos o fitoquímicos podría ser más extensa, ya que hasta el día de hoy la información obtenida sobre sus aplicaciones y mecanismos de acción es muy pequeña en relación al gran área de conocimiento que pueden representar estas nuevas sustancias (**Roura, 2003**). Por otro lado, la aplicación de extractos naturales en animales de producción se basa mayoritariamente en extrapolar conocimientos obtenidos de la medicina homeopática (**Roura, 2003**). De los cuales, muchos de los mecanismos antimicrobianos fueron constados en pruebas *in vitro*, y solo un número limitado de ellos en animales (**Losa y Köhler, 2001**). En ocasiones la gran cantidad de diferentes componentes presentes en las mismas plantas, obliga a que bajo ciertas circunstancias se tengan que incluir dosis elevadas de 10 y 100 veces de ciertos extractos en relación a la dosis normal de APC (**Cepero-Briz, 2005**).

### 2.2.5.5. Inmunomoduladores

La modulación del sistema inmune del animal podría adquirir una gran relevancia ante la situación actual de restricciones graduales de APC, y de medicamentos utilizados para proteger a los animales mantenidos en ambientes con gran presencia de desafíos microbianos. En la industria de la alimentación animal, se han identificado una gran cantidad de moléculas (betaina, vitaminas, minerales, ácidos grasos y aminoácidos), algunas de ellas de gran peso molecular (polisacáridos, proteínas, glicopéptidos, y nucleótidos) capaces de ser usados como sustancia estimulantes del sistema inmune de animales. De hecho, la industria acuícola desde hace algunos años ha venido utilizando polisacáridos de tipo  $\beta$ -glucanos procedentes de las paredes celulares de levaduras (*S. cerevisiae*), y sustancias antioxidantes como carotenoides y tocoferol con la finalidad de incrementar la supervivencia (Adams, 2004), y optimizar la respuesta inmune de estos animales (Chew, 1993). Una de las principales dudas acerca del empleo de inmunestimulantes en alimentación animal, es la dificultad para predecir hasta que punto puede llegar a ser estimulado el sistema inmune de un animal para mantenerlo activo y capaz de defenderlo ante desafíos medioambientales, sin que este le represente una reducción en su crecimiento o eficiencia alimenticia (inmunomodulación). Por ejemplo, algunos estudios en cobayos infectados con el virus de encefalitis equina y alimentados con niveles farmacológicos de vitamina E, mostraron un deterioro en el crecimiento de estos animales por la interacción de los factores (Nokels, 1979). En el caso de pollos, la utilización de niveles altos de ácido ascórbico fue capaz de reducir las lesiones asociadas con Micoplasmas y *E. coli* no obstante, estas aves también mostraron una menor eficiencia alimenticia (Gross, 1992).

Otro ejemplo de inmunomodulación que comienza a ganar interés ante la ausencia de APC en alimentación animal, es la inmunización pasiva o aplicación de anticuerpos específicos a un individuo antes o después de la exposición con agentes capaces de provocarle enfermedad (Berghman *et al.*, 2005). El calostro bovino y la yema del huevo de gallinas procedentes de animales hiperinmunizados han sido utilizados como acarreadores naturales de anticuerpos por excelencia (Ehrlich, 1982). Los ejemplos más significativos de la utilización de anticuerpos con fin terapéutico o profiláctico incluyen el tratamiento de enterotoxemias causadas por *E. coli* en humanos (Tacket *et al.*, 1988; Freedman *et al.*, 1998) cerdos (Marquardt *et al.*, 1999; Owusu-Asiedu *et al.*, 2003) y becerros (Ikemori *et al.*, 1992); Salmonelosis letal en becerros (Yokohama *et al.*, 1998); enfermedades entéricas ocasionadas por rotavirus en humanos (Davidson *et al.*, 1989), becerros (Kuroki *et al.*, 1994) y lechones (Henning-Pauka *et al.*, 2003) e infecciones de coronavirus en becerros (Ikemori *et al.*, 1997). Recientemente, se ha observado que la utilización de anticuerpos específicos suministrados por vía

digestiva puede ser capaz de incrementar el crecimiento y la eficiencia alimenticia de pollos de engorde, al neutralizar los neuropeptidos (*colecistoquinina*) y precursores de la síntesis de eicosanoides (*ácido araquidónico*), sustancias producidas durante un proceso inflamatorio digestivo y que afectan el consumo del alimento y el crecimiento del animal (**Cook, 2004**). A pesar de que los beneficios obtenidos por la utilización de anticuerpos en el alimento de animales muestran ser incuestionables, la producción y estandarización de calostro y de la yema de huevo con fines terapéuticos, aparentemente simple, significa una labor intensiva y costosa. Situación que limitaría la utilización de anticuerpos en alimentación animal a gran escala, en relación a otro tipo de aditivos (antibióticos, vitaminas y minerales) (**Berhman et al., 2005**).

#### **2.2.5.6. Otros aditivos**

Los manano-oligosacáridos o MOS, procedentes de paredes celulares de levaduras de *S. cerevisiae* han sido utilizados desde hace más de una década como aditivos naturales en la alimentación de aves (**Hooge, 2004**). A pesar de que los MOS pueden ser agrupados dentro del los grupos de aditivos denominados como prebióticos, sus mecanismos de acción no mencionan efectos de servir como sustratos de bacterias digestivas. En el caso de aves, tres de los principales mecanismos acción descritos para los MOS o derivados de paredes celulares de levaduras de *S. cerevisiae* adicionados a las dietas, incluyen efectos de exclusión de patógenos digestivos como *Salmonella*, estimulación del sistema inmunitario y estimulación del desarrollo de la mucosa digestiva (**Spring et al., 2000; Hooge, 2004; Iji et al., 2001**). En el siguiente capítulo de esta revisión de literatura serán abordados a mayor detalle las características de estas sustancias, sus mecanismos de acción y sus aplicaciones en avicultura, ya que en la presente tesis fue evaluada la aplicación de levaduras de *S. cerevisiae*, paredes celulares de levaduras y otros componentes de levaduras en dietas de pollos de engorde.

**2.3. Las levaduras de *saccharomyces cerevisiae* y sus aplicaciones en alimentación animal**

Dentro de las especies de hongos unicelulares clasificados genéricamente como levaduras encontramos incluido al *Saccharomyces cerevisiae* (**Gonzalez y Valenzuela, 2006**). Las levaduras del género *S. cerevisiae* son capaces de llevar a cabo procesos de fermentación a partir de la transformación de azúcares a etanol y dióxido de carbono, propiedades que han sido ampliamente explotadas desde hace muchos años en la industria de la producción de pan y de bebidas alcohólicas (**Stewart y Russell, 1998**). Otras importantes aplicaciones de las levaduras de *S. cerevisiae*, incluyen su empleo en modelos biológicos enfocados a elucidar procesos básicos de fisiología celular, y su utilización de forma intensa en el área biotecnológica. En la actualidad, se considera que la levadura de *S. cerevisiae* es uno de los microorganismos eucariota más estudiados y estrechamente ligado al progreso de la humanidad (**Mewes et al., 1997**). Por otro lado, algunas levaduras del género *Saccharomyces* muestran buena capacidad para neutralizar toxinas de *Clostridium*, característica que ha sido aprovechada en terapéutica humana para controlar diarreas ocasionadas por una prolongada medicación con antibióticos por vía oral (**Castagliuolo et al., 1997**).

A escala nutricional, las levaduras son capaces de metabolizar y transformar de forma natural minerales inorgánicos hacia formas orgánicas en un proceso similar al que realizan las plantas. Cuando un individuo consume las células de levadura muertas, estas pueden aportarle diversos nutrientes a parte de los minerales como es el caso de proteínas, péptidos y vitaminas. Previo al descubrimiento de las vitaminas del complejo-B, las levaduras de cervecía se utilizaban como un complemento alimenticio para monogástricos. En la actualidad, células de levadura vivas continúan adicionándose a dietas para animales con la finalidad de mejorar su salud y productividad, sobretodo en el caso de animales rumiantes, (**Cuaron, 2000; Lesson y Summers, 2001; Newbold, 2003; van Vuuren, 2003**). Gracias a sus significativas propiedades nutricionales y farmacéuticas, las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* Sc7 han sido aprobadas como un microorganismo seguro para su empleo (**EEC 70/524**) en alimentación animal dentro la Unión Europea (UE). Situación que concuerda con otros países como Japón, lugar en el que desde hace varios años la levadura de *S. cerevisiae* forma parte de la farmacopea Japonesa (**Nitta y Kobayashi, 1999**) o Estados Unidos de América, donde la FDA (**US-Food y Drug Administration**) le ha otorgado el grado de microorganismo seguro o grado GRAS (*Generally Recognised As Safe*).

**2.3.1 Fracciones de levaduras**

Otro tipo de productos derivados de las células de levaduras (*S. cerevisiae*), son los conocidos como extractos o autolisados de levadura y las paredes celulares de levaduras, productos obtenidos a partir de la autólisis de la célula completa de levadura. Los extractos son utilizados en la industria alimenticia desde hace varios años como sustancias saborizantes (**Oriol, 2004; Stone, 2006**). En el área de alimentación animal, desde la pasada década se ha incrementado el interés por la utilización en la dieta de fracciones de paredes celulares de levadura como fuentes de polisacáridos de tipo  $\beta$ -glucanos y mannano-oligosacáridos (MOS). Este tipo de polisacáridos son reconocidos como aditivos naturales capaces de ejercer efectos benéficos en la salud y productividad del individuo (**Donzis, 1996; Hooge, 2004**). En la industria acuícola, polisacáridos de tipo  $\beta$ -glucanos procedentes de las paredes celulares de *S. cerevisiae* son utilizados como sustancias inmunoestimulantes para incrementar la supervivencia de estos animales bajo condiciones de estrés (**Adams, 2004**).

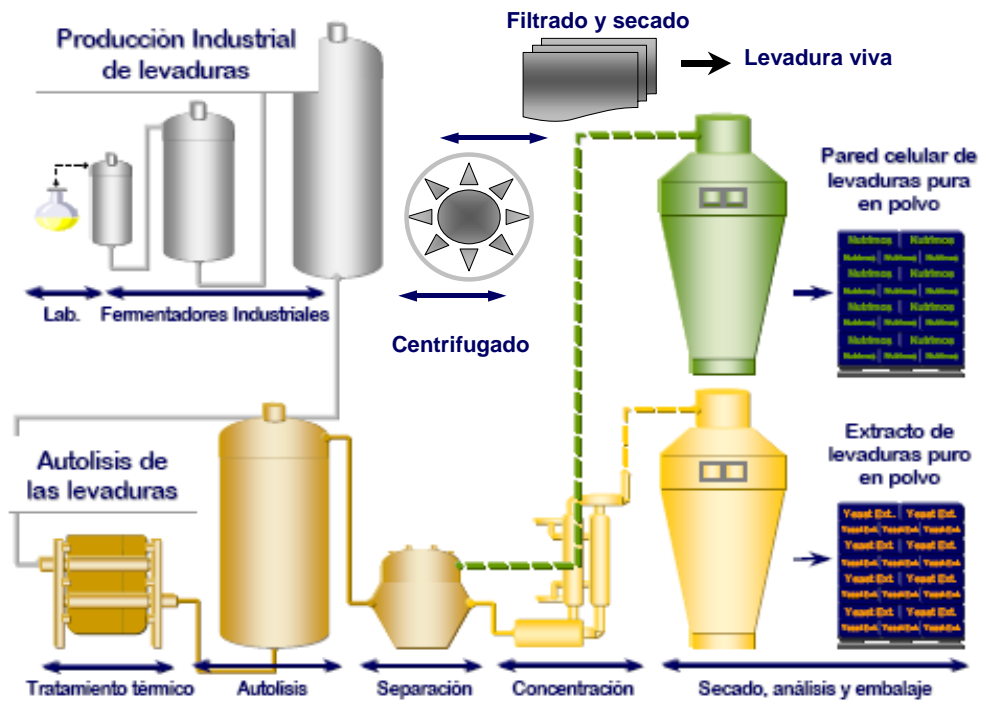
**2.3.2 Fabricación industrial de levaduras**

De forma industrial, cultivos puros de la levadura son producidos específicamente para su uso en la industria cervecera, vinícola, destilería, panadería, doméstico y pecuario (**Romero y Gomez-Basauri, 2003; Stone, 2006**). En la industria alimenticia, las formas activas de levadura más predominantes son: como primer lugar, levadura deshidratada con un 95% de materia seca (MS); como segunda, torta de levadura húmeda con un 30% MS; y en menor proporción o como tercera, levadura en forma de crema con 18 a 20% de MS, levadura generalmente utilizada en la industria de panadería (**DAN-LFA, 2005; Stone, 2006**). En la **Figura 2.13.**, se muestra de forma resumida algunos de los principales pasos del proceso de fabricación de levaduras, que puede incluir las siguientes fases: 1) Selección, aislamiento y multiplicación celular de los inóculos de levadura a nivel de laboratorio; 2) Propagación de la cepa de levadura en el laboratorio (de frascos de 10ml a frascos de 10L), realizada con la finalidad de aumentar la cantidad del producto o inóculo industrial; 3) Propagación industrial, se emplean bio-reactores o fermentadores aeróbicos de 15 a 200m<sup>3</sup> en donde el objetivo es proveer los nutrientes (oxígeno, nitrógeno y carbohidratos), y las correctas condiciones de temperatura y pH a la levadura para que se multiplique; y 4) Secado y deshidratado, cuando la concentración de levaduras es adecuada en los fermentadores el caldo de cultivo es centrifugado para formar una crema de levadura, posteriormente la crema se filtra para formar la torta de levadura que es secada a una temperatura adecuada para no destruir su capacidad fermentativa (**Oriol, 2004; DAN-LFA, 2005**).



### 2.3.3 Fabricación industrial de paredes celulares y extractos de Levadura

La producción de paredes celulares de levadura se realiza como un paso alterno y posterior a la producción industrial de las levaduras activas (**Figura 2.13**). Cuando la cantidad de levaduras es la adecuada dentro de los fermentadores, se realiza un proceso térmico que provocara la autólisis de las células de levadura. A partir de aquí, se lleva a cabo un proceso de centrifugación del producto autolizado que provocara la separación de la pared celular y del contenido intracelular (extracto de levadura) de la levadura muerta. Posteriormente los productos separados (pared celular y extracto de levadura) son concentrados y secados cuidadosamente para conservar sus características nutricionales (**Romero y Gomez-Basauri, 2003; Oriol, 2004; DAN-LFA, 2005**).



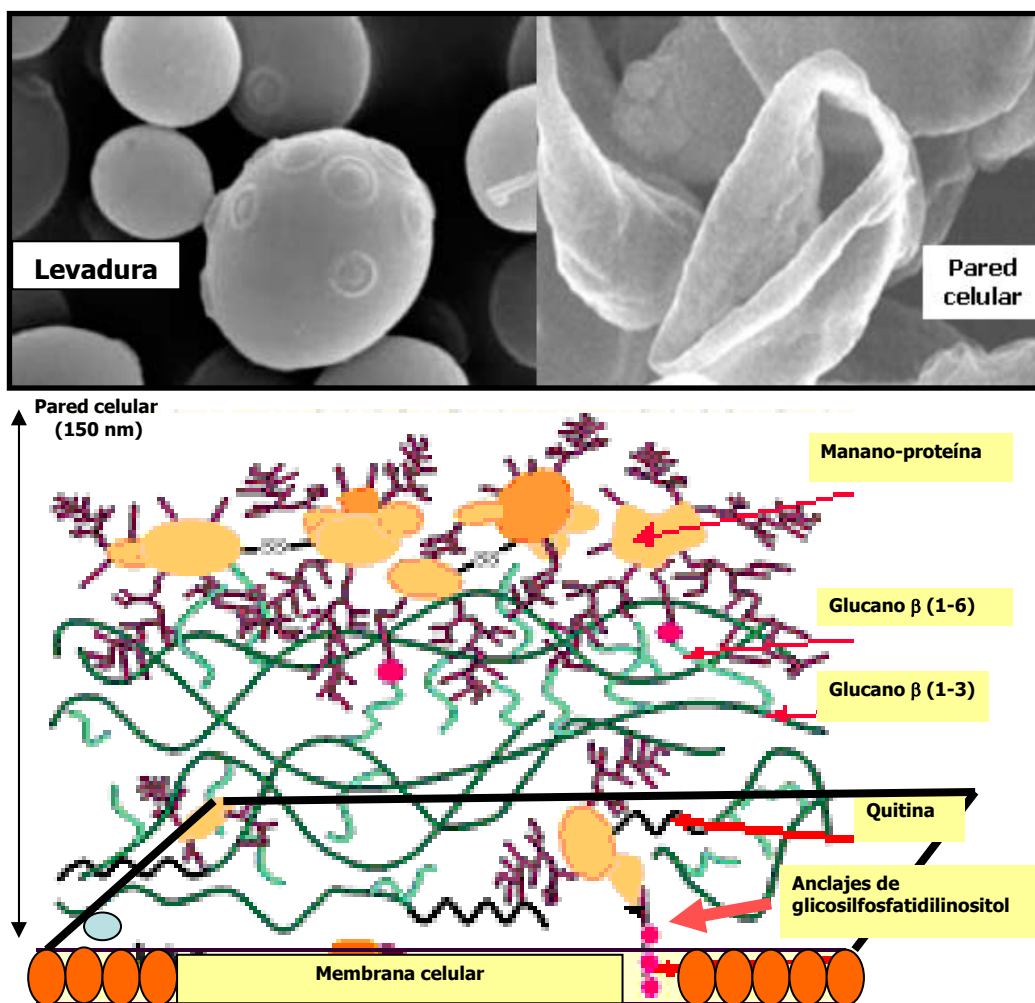
**Figura 2.13.** Esquema de la producción industrial de Levaduras y paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de **DAN-LFA, 2005**).

### **2.3.3.1 Características de los extracto de levadura**

Los extractos de levadura, son fuentes ricas en aminoácidos, 5'-nucleótidos, ácido glutámico, vitaminas y minerales. Debido a esta característica, los extractos de levadura son empleados para enriquecer medios de cultivo microbiológicos y optimizar el crecimiento de los microorganismos. Otra importante aplicación de los extractos de levadura, la encontramos en la industria alimenticia donde generalmente son utilizados para potenciar el sabor de los alimentos (**Romero y Gomez-Basauri, 2003; Oriol, 2004; Stone, 2006**).

### **2.3.4. Características de la pared celular de levadura**

Recientemente se ha incrementado el interés por el estudio de las fracciones o polisacáridos de las paredes celulares de levadura como  $\beta$ -glucanos y mananos, ambas moléculas pueden mostrar efectos benéficos en la salud de animales de producción y humanos. No obstante, las concentraciones de estos polisacáridos dentro de las paredes celulares pueden verse modificados por diversas circunstancias (cepa de origen y proceso de producción), situación que puede adquirir importantes implicaciones en los procesos de producción de este tipo de productos (polisacáridos de la pared celular) que comienzan a tener bastante interés en alimentación animal e industria farmacéutica humana (**Aguilar-Uscanda y François, 2003**). La pared celular de la levadura esta constituida por polisacáridos y glicoproteínas en forma de una red tridimensional (**Figura 2. 14.**), que funciona como una estructura altamente dinámica y adaptable al medio que la rodea. La pared celular de la levadura es capaz de adaptarse a cambios fisiológicos (multiplicación logarítmica o estacional), y morfológicos (conjugación, esporulación y crecimiento), o a las condiciones ambientales de su entorno. Por otro lado, las principales funciones de la pared celular están encaminadas a garantizar la supervivencia de la célula, entre estas se pueden incluir las siguientes: mantiene las condiciones de estabilidad osmótica dentro la célula, brinda protección ante condiciones de estrés físico, mantiene la integridad y la forma celular durante los procesos de crecimiento y división (**Klis *et al.*, 2006**); limita la permeabilidad de macromoléculas a través de la pared celular y la blinda del ataque de proteínas externas; evita el escape hacia el medio externo de moléculas solubles intermediaras durante la construcción de la pared celular, y crea los micro-ambientes internos adecuados para la membrana celular durante las fases de estancamiento de los cultivos y colonias (**Orleáns, 1997; Osumi, 1998; Klis *et al.*, 2006**).



**Figura 2.14.** Levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y estructura de su pared celular (Adaptado de **Anonymous, 2003; Oriol, 2004**).

#### 2.3.4.1. Composición de la PCL

Estudios realizados con levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* sugieren que dependiendo de las condiciones de crecimiento, la pared celular de la levadura puede representar de un 10 a un 25% del total de la MS de la célula (**Fleet, 1991; Kis, 1994**). En estudios más recientes donde fueron evaluadas diferentes especies de levaduras, se encontraron valores de porcentajes de MS de pared celular de un 26 al 32%, observándose diferencias de acuerdo a la especie de levadura (**Nguyen et al., 1998**) (**Tabla 2.11.**). Se ha estimado que el porcentaje de polisacáridos que puede contener la pared celular de la levadura puede ser de alrededor de un 85 a un 90%, y de

un 10 a un 15% de proteínas (**Tabla 2.11.**). A escala estructural, la pared celular de la levadura esta constituidas por 3 grupos de polisacáridos (**Tabla 2.12.**): 1) polímeros de manosa o manano-proteínas, hasta un 50% de la MS de la PCL; polímeros de glucosa o  $\beta$ -glucanos (1,3/1,6), hasta un 55% de la MS de PCL, y en menor proporción polímeros de N-acetil-glucosamina o quitina en un 6% de la MS de PCL (**Nguyen et al., 1998; Klis et al., 2002; Aguilar-Uscanda y François, 2003**).

**Tabla 2.11.** Contenido y composición de la pared celular de varias especies de levaduras (adaptado de **Nguyen et al., 1998**).

Especie de levadura	Pared (%) <sup>i</sup>	Composición de la pared	
		Polisacáridos	Proteínas
<i>Kloeckera apiculata</i> 64	29.8±1.8	86.8±1.9	13.2±0.6 <sup>b</sup>
<i>Kl. apiculata</i> 2168	28.7±0.9	86.1±2.2	13.9±0.6 <sup>b</sup>
<i>Debaryomyces hansenii</i> 2577	32.0±2.0	89.1±2.4	10.9±0.4 <sup>c</sup>
<i>D. hansenii</i> 1570	29.9±1.5	86.1±1.9	15.9±0.7 <sup>a</sup>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> 1299	25.8±1.6 <sup>b</sup>	85.1±1.7	14.9±0.6 <sup>a</sup>
<i>Z. bailii</i> 3704	27.1±0.7	83.8±2.0	16.2±0.6 <sup>a</sup>
<i>Kluyveromyces marxianus</i> R157	29.5±1.4	86.8±2.1	13.2±0.5 <sup>b</sup>
<i>Kluy. marxianus</i> 1586	32.5±1.7 <sup>a</sup>	88.6±2.7	11.4±0.4 <sup>c</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1117	29.0±1.6	86.5±2.5	13.5±0.5 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Promedios dentro de una misma columna y con diferente letra exponencial son diferentes (P<0.05). <sup>i</sup> Valor expresado en % MS de la célula.

De forma resumida, puede considerarse que aunque la construcción de la pared celular de la levadura es firmemente controlada por la levadura, la composición (polisacáridos), estructura y grosor, dependen en gran magnitud de las condiciones medioambientales impuestas dentro de los fermentadores, (**Aguilar-Uscanga et al., 2003**), del ciclo de vida de la célula (**Kils et al., 2006**) y de la cepa de origen (**Oriol, 2004**). De hecho, cuando las células de levaduras son sometidas a variaciones drásticas en los parámetros de fermentación dentro de los fermentadores, como respuesta a este estrés la levadura incrementa las proporciones de quitina a escala de la pared celular (**Aguilar-Uscanda y François, 2003**).

#### **2.3.4.2. Estructura de la PCL**

Los polisacáridos que constituyen la PCL, corresponden a moléculas de 1,3- $\beta$ -glucanos, 1,6- $\beta$ -glucanos, mananoproteínas y quitina, todos ellos con diferentes grados de polimerización, tamaño o peso molecular, y porcentajes dentro de la pared (**Tabla 2.12.**). La capa interna de la pared celular la componen moléculas de 1,3- $\beta$ -glucanos

moderadamente ramificados unidos por puentes de hidrógeno, que le proporcionan elasticidad a la red tridimensional que sirve de soporte a la capa externa constituida principalmente por manano-proteínas, o capa protectora que se extienden hacia el medio externo de la célula (**Klis et al., 2006**). La gran elasticidad de la pared celular puede ser ejemplificada cuando se transfiere a la levadura a una solución hipertónica, observándose que la célula se encoje rápidamente llegando a perder más de un 60% de su volumen, que le representaría una pérdida en su superficie de un 40 a un 60% no obstante, este proceso es revertido cuando la levadura se transfiere a su medio original (**Morris et al., 1986**). De forma general, la conjunción de las 4 macromoléculas dentro de la pared celular de la levadura (**Tabla 2.12.**) ocurre de la siguiente manera: la porción proteica de la manano-proteína (100kDa aprox.) se une a la macromolécula de 1, 6- $\beta$ -Glucano por medio de anclajes de tipo glicosilfosfatidilinositol que contienen 5 residuos de ligaduras  $\alpha$ -manosil; la macromolécula de 1, 6- $\beta$ -Glucano a su vez presenta ramificaciones con enlaces  $\beta(1, 3)$ , a escala de estas ramificaciones la quitina puede unirse a ella por medio de enlaces  $\beta(1, 4)$  y  $\beta(1, 2)$ ; y finalmente, la porción terminal reducida del 1, 6- $\beta$ -Glucano se conecta con la porción terminal no-reducida de la glucosa terminal del 1, 3- $\beta$ -Glucano (**Kollar et al., 1995; Kollar et al., 1997**).

**Tabla 2.12.** Macromoléculas de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de **Aguilar-Uscanda y François, 2003; Klis et al., 2006**).

Macromolécula <sup>1</sup>	% de la Pared celular	Promedio del GP/kDa
Manano-Proteína <sup>2</sup>	30-50	Altamente variable
1,6- $\beta$ -Glucano	5-10	24/150
1,3- $\beta$ -Glucano	30-45	240/1500
Quitina	1.5-6	25/120

<sup>1</sup> Los componentes son presentados en el orden en que se encuentran en la pared celular del exterior al interior de la célula. Condiciones de estrés en la pared celular provocan incrementos drásticos en los niveles de quitina.

**GP** = Grado de polimerización, kDa = kilodaltones o tamaño de la molécula.

<sup>2</sup> El contenido de proteína es de 4 al 5% de la masa restante y corresponde a la proteína ligada a las cadenas de carbohidratos de tipo manosa.

### 2.3.5. Utilización de levaduras en alimentación animal

En una situación similar a la de la mayoría los nuevos aditivos naturales, los mecanismos de acción específicos para los diferentes aditivos elaborados a partir de levadura y sus fracciones empleados en dietas de animales no han sido claramente definidos. A pesar de

esto, los beneficios obtenidos en la salud y productividad de los animales por su aplicación en la dieta son bien documentados. De acuerdo a algunos autores (**Nilson et al., 2004; Spark et al., 2005**) las mejoras observadas en la productividad y salud de los animales que consumen levaduras podrían estar asociadas a efectos de tipo directos e indirectos. Como efectos directos podríamos incluir los de tipo nutricional, y en concreto a los ejercidos por los diversos nutrientes presentes en las células de levadura como proteínas, minerales, vitaminas, aminoácidos y péptidos, que pueden ser utilizados por el individuo cuando la levadura muere. Otra hipótesis planteada, es la capacidad que presenta la levadura para producir numerosas enzimas (proteasas, peptidasas, invertasas, hidrolasas, maltasas, fosfatasas, galactosidasas, etc), algunas de ellas pueden ser liberadas en el intestino y reforzar la acción de las enzimas endógenas, facilitando la digestión de la materia seca del alimento. Aparentemente, este mecanismo podría brindar mayores beneficios en animales rumiantes (por su dependencia de la digestión fermentativa) ya que en el caso de animales monogástricos (ave y cerdo) no más del 30% de la energía neta para mantenimiento proviene de los productos de la fermentación, y además en estas especies la composición de las dietas no impone una dependencia importante de la digestión fermentativa (**Cuaron, 2000**).

En la **Tabla 2.13.**, se presenta de forma resumida una serie de trabajos en distintas especies de animales (aves, peces y mamíferos), en los cuales fueron evaluados los efectos del consumo de diferentes levaduras de *Saccharomyces*. Los resultados de estos trabajos sugieren que los beneficios tipo nutricional y no nutricional que la levadura de *Saccharomyces* puede ejercer en la salud del animal, incluyen efectos diversos que van desde la modificación de la digestibilidad de nutrientes o MS, desarrollo de la mucosa digestiva, reducción de la colonización digestiva por bacterias patógenas como *Salmonella*, contrarrestar los efectos adversos de las micotoxinas y modificación de la respuesta inmunitaria (**Tabla 2.13**). En el caso concreto de la utilización de levaduras en dietas para pollos de engorde, en la **Tabla 2.14.**, se presentan estudios realizados en este tipo de animales alimentados con levaduras. De forma global, la utilización de levaduras en la dieta represento beneficios de +3.3% en promedio en el peso vivo del pollo con respecto a las aves alimentadas con dietas sin levaduras. No obstante, de estos resultados, también puede observarse que la mitad del total de estudios reportados, los efectos en el crecimiento de las aves por parte de la levadura no fueron estadísticamente consistentes. Por otro lado, la aplicación de las levaduras en el alimento de las aves también muestra variaciones, en algunos estudios las levaduras fueron adicionadas en combinación con bacterias probióticas como *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bacillus* sin obtenerse un claro efecto sinérgico. Otro aspecto importante observado en estos estudios,

## ***2.0. Revisión bibliográfica***

---

fue una gran variación en las dosis incluidas en las dietas o alimentos de las aves, observándose dosificaciones desde 100g hasta 4kg por tonelada de alimento.

**Tabla 2.13.** Efectos benéficos en diferentes especies por la administración de levaduras de *Saccharomyces* en la dieta.

<b>Efecto</b>	<b>Especie</b>	<b>Autor</b>
<b>Antagonismo bacteriano e inmunológicos</b>		
<i>S. boulardii</i>	Reducción de la colonización de <i>Salmonella</i> en el ciego de aves sometidos a estrés por transporte.	Pollo de engorde (42 d) <b>Line et al., 1997</b>
<i>S. boulardii</i>	Reducción de la colonización de <i>Salmonella typhimurium</i> en el ciego y excreción en excretas.	Pollo de engorde (23 d) <b>Line et al., 1998</b>
<i>S. cerevisiae</i>	Incremento de la supervivencia ante la infección por <i>Vibriosis</i> .	Peces ( <i>Penaeus vannamei</i> ) <b>Scholz et al., 1999</b>
<i>S. cerevisiae</i>	Incremento en la producción de inmunoglobulinas (Enf. de la bolsa de Fabricio y Newcastle) en aves con aflatoxinas en la dieta.	Pollo de engorde (42 d) <b>Channakrishnappa et al., 1999</b>
<i>S. boulardii</i>	Estimulación de la secreción intestinal de IgAs.	Ratas <b>Buts et al., 1990</b> Ratones <b>Rodrigues et al., 2000</b>
<i>S. cerevisiae</i>	Incremento de la respuesta inmune innata.	Peces ( <i>Sparus aurata</i> L.) <b>Ortuño et al., 2002</b>
<i>S. cerevisiae</i>	Incremento en la producción de inmunoglobulinas IgG Reducción en la colonización de coliformes en el tracto digestivo.	Lechones, 29 y 39 d postdestete <b>White et al., 2002</b>
<i>S. uvarum</i>	Aumento de la capacidad oxidativa de neutrófilos sanguíneos.	Equinos criollos en entrenamiento <b>Paz et al., 2003</b>
<i>S. cerevisiae</i>	Incremento de la supervivencia de larvas de camarón desafiadas con <i>Vibrio sp.</i> 90-69B3.	Camarón ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) <b>Burgents et al., 2004</b>
<b>Digestivos:</b>		
<i>S. boulardii</i>	Decremento en el número de células calciformes y profundidad de las criptas de las vellosidades intestinales del íleon.	Pollo de engorde (35 d) <b>Bradley et al., 1994</b>
<i>S. cerevisiae</i>	Modificación del pH, concentraciones de ácido láctico y amonio, porcentajes molares de acetato y butirato en colon, con el uso de dietas con alto contenido de almidón.	Equinos <b>Medina et al., 2002</b>
<i>S. cerevisiae</i> SC47	Reducción de la digestibilidad de la materia orgánica, grasa y energía bruta.	Lechones <b>Van Heugten et al., 2003</b>
<i>S. cerevisiae</i>	Incremento en la digestibilidad de la MS, materia orgánica y digestibilidad aparente de la proteína bruta.	Corderos <b>Haddad y Goussous, 2005</b>
<i>S. boulardii</i>	Incremento en la productividad debida a una mejor recuperación de la mucosa digestiva posterior al destete.	Lechones <b>Bontempo et al., 2006</b>



**Tabla 2.14.** Efecto en el crecimiento de pollos de engorde por la utilización de levaduras de *Saccharomyces* en la dieta.

<i>Autor</i>	<i>Ave (días)</i>	<i>Producto</i>	<i>Dosis</i>	<i>control</i>	<i>levadura</i>	<i>% mejora</i>	<i>Probabilidad</i>
<b>Baidya et al., 1993</b>	P.E (42 d)	Levadura viva <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100g/t	Ganancia de peso total		+1.6	NS
				1261	1282		
<b>Mandal et al., 1994</b>	P.E (56 d)	Levadura viva <i>Saccharomyces cerevisiae</i> + <i>Bacillus coagulans</i>	100g/t	Ganancia de peso total		-3.0	NS
				1705	1653		
<b>Bradley et al., 1994</b>	P.E (21 d)	<i>Saccharomyces boulardii</i>	100g/t	Peso vivo		+11.2	*
				464	516		
<b>Sarkar et al., 1997</b>	P. E (42 d)	Levadura viva <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc 47	1 kg/t	Peso vivo		+3.4	NS
				1645 g	1701 g		
<b>Mahajan et al., 1999</b>	P. E (42 d)	Levadura viva <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1026) en combinación con: <i>L.</i> <i>acidophilus</i> y <i>S. faecium</i>	250g/t	Peso vivo		+2.5 (invierno) +6.4 (verano)	NS *
				1736 g 1317 g	1780 g 1402 g		
<b>Channakrishnappa et al., 1999</b>	P. E (42 d)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2 kg/t 4 kg/t	1827 g	1846 g 1849 g	+1.0	NS
					g	+1.2	
<b>Stanley et al., 2000</b>	Pavos (105 d)	Levadura viva <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1026)	1 kg/t	7.09 kg	7.09 kg	0	NS
<b>Nilson et al., 2004</b>	P. E (34 d)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.5 kg/t	Ganancia de peso/día		+5.8	*
				86 g	91 g		
<b>Zhang et al., 2005</b>	P. E (35 d)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3 kg/t	Ganancia de peso total		+6.6	*
				1405 g	1498 g		
<b>Promedio del porcentaje de mejora de las levaduras con respecto al control para todas las pruebas</b>						<b>+3.3</b>	

P.E = Pollos de engorde.

NS = No significativo estadísticamente.

\* = Significativo estadísticamente (P<0.05).

### 2.3.5.1. Utilización de paredes celulares de levadura, MOS y $\beta$ -glucanos en alimentación animal

Las PCL son fuentes ricas de polisacáridos naturales del tipo  $\beta$ -glucanos y manano-oligosacáridos (MOS). Investigaciones en el área de carbohidratos o polisacáridos (Glicómica), sugieren que este tipo de moléculas cumplen funciones vitales en los procesos de comunicación a escala intestinal y del sistema inmunitario (**Osborn y Khan, 2000; Kocher, 2005**). En el caso concreto de las PCL, productos derivados de levaduras de *S. cerevisiae* y que frecuentemente son definidos como fuentes de polisacáridos naturales de tipo MOS, su utilización en avicultura como aditivos alimenticios se remonta a inicios de los 90 (**Hooge, 2004**). De acuerdo a **Rosen (2005)**, hasta la fecha los beneficios observados en la productividad animal por la suplementación de MOS en la dieta, muestran ser similares a los obtenidos con APC; esta situación podría sugerir que este tipo de aditivos pueden representar una buena herramienta para incrementar la eficiencia productiva del ave cuando los APC no estén presentes en alimento (**Ferket et al., 2002**). La suplementación de MOS en dietas para cerdos y aves, ha reportado beneficios en términos de mejora en los parámetros productivos y de la salud del animal (**Pettigrew, 2000; Hooge, 2004**).

Una de las principales empresas que comercializa este tipo de nuevos aditivos o específicamente MOS, ha realizado una serie de análisis estadísticos globales (meta-análisis) incluyendo pruebas realizadas en distintas especies, bajo diferentes condiciones experimentales y países (**Pettigrew, 2000**). En 14 de los 17 ensayos analizados, la incorporación de MOS en dietas para lechones en la fase de destete proporcionaba efectos similares a los APC en cuanto a crecimiento y eficiencia alimenticia. Más recientemente, **Hooge (2004)** ha evaluado conjuntamente 29 pruebas realizadas con la utilización de MOS en dietas de pollos de engorde. Los resultados de este análisis global muestra que la utilización de MOS en pienso representó mejoras respecto a los controles negativos (sin MOS) de +1.61% en el peso vivo, -1.99 en el índice de conversión alimenticia y de -21.4% para la mortalidad. En el **Tabla 2.15.**, se describen algunos de los efectos observados en pollos de engorde que consumieron MOS en la dieta, los efectos generales observados por la utilización de MOS incluyen: mejoras en los índices productivos, mayor resistencia ante infecciones bacterianas y coccidias, menores mortalidades y modificación de la deposición de grasa abdominal en los pollos. De estos estudios, **Waldroup et al. (2003a)** utilizando dosis de 1.0 kg/t de alimento durante 42 días, no encontraron efectos en las variables productivas y de la calidad de la canal de los

pollos. En un segundo estudio **Waldroup et al. (2003b)** emplearon MOS 1.0 kg/t de alimento más 0.1 kg de sulfato de cobre, y pudieron observar mejoras en el índice de conversión alimenticia de los pollos. De forma similar, **Waldroup et al. (2003a)** y **Hooge et al. (2003)** incluyendo 2 diferentes dosis de MOS más sulfato de cobre observaron mejoras en el índice de conversión de las aves y un efecto sinérgico al suplementar APC (**Tabla 2.15.**).

**Tabla 2.15.** Efectos de la incorporación de MOS derivados de PCL en la dieta de pollos de engorde comerciales.

Autor/Dieta	Dosis kg/tonelada	Efecto con respecto al control negativo
<b>Waldroup et al. (2003a)</b> / Maíz-soja	1.0 (1-42 d) 0.75 (42-63 d)	Sin efectos en la productividad y calidad de la canal del animal
<b>Waldroup et al. (2003b)</b> / Maíz-soja	1.0 + sulfato Cu (0.1) (1-42 d)	Mejora del índice de conversión alimenticia
<b>Hofacre et al. (2003)</b> / Maíz-soja	2.0 + Bacterias lácticas	Menor mortalidad post-desafío con <i>Eimerias</i> y <i>C. perfringens</i>
<b>Hooge et al. (2003)</b> / Maíz-soja	1.0 + sulfato Cu (0.075) (1-21 d) 0.5 + sulfato Cu (0.050) (21-49 d)	Mejora del peso e índice de conversión, en conjunto con APC se observó un efecto sinérgico
<b>Jamroz et al. (2004)</b> / Maíz-cebada-trigo	1.0 (1-42 d) 2.0 (1-42 d)	Sin efectos en la productividad, menores recuentos de <i>E. coli</i> y coliformes en yeyuno (MOS 2kg)
<b>Ao et al. (2004)</b> / Sorgo-soja	1.0 (1-21 d) 0.5 (21-35 d)	Incremento del peso vivo y uniformidad de la parvada
<b>Sun et al. (2005)</b> / Maíz-soja	1.81 (1-14 d) 0.91 (14-28 d) 0.45 (28-49 d) + Bacterias lácticas	Menor % mortalidad e índice de conversión alimenticia similar al de las dietas con APC
<b>Kannan et al. (2005)</b> / Maíz-arroz-trigo	0.5 y 1.0 (1-35 d)	Menor % de deposición de grasa abdominal en la canal

En los estudios de **Hofacre et al. (2003)** y **Sun et al. (2005)** se utilizaron en conjunto MOS y bacterias lácticas, encontrando efectos de menor mortalidad y mejoras en el índice

de conversión del alimento. Cabe destacar que la mayoría de estos estudios fueron realizados con el empleo de dietas elaboradas con maíz y torta de soja, utilizando distintas dosis de MOS en el alimento, mayores en las fases de iniciales (0-14 y 0-21 días) y menores en las fases finales (más de 21 días). De forma similar a los estudios con levadura en pollos, en estos trabajos fueron observados diferencias en las dosificaciones del mismo producto en los distintos estudios, utilización de MOS en combinación con otro tipo de aditivos como bacterias lácticas o sulfato de Cu, y pocos estudios con el uso de dietas viscosas o que emplearan cereales como trigo, cebada o centeno. En la **Tabla 2.16.**, se presentan de forma resumida estudios con suplementación de MOS en dietas para pavos. Los efectos observados en esta especie incluyen la modificación de las poblaciones bacterianas, ácidos grasos volátiles y menor colonización de bacterias patógenas como *E. coli* y *Clostridium* a nivel de los ciegos, además de efectos favorables en el índice de conversión alimenticia y peso vivo de estos animales. En gallinas de postura, la utilización de MOS represento una mayor productividad y mejora de la calidad del huevo (unidades Haugh). En una situación similar a los estudios previos con MOS en pollos de engorde, todos los estudios en pavos y el de gallinas fueron realizados con dietas elaboradas con maíz y soja, observándose diferentes dosificaciones de MOS en las dietas empleadas en pavos.

### 2.3.5.2. Principales ventajas y desventajas del empleo de fracciones de PCL

Algunas de las ventajas de la utilización de productos basados en polisacáridos de PCL, son su gran capacidad para soportar las altas temperaturas que pueden ocurrir en los procesos de paletizado del alimento de monogástricos, además de una gran capacidad para resistir las condiciones químicas y físicas impuestas durante su trayectoria por el tracto digestivo del animal (**Perry, 1995**). Por otro lado, buena parte de la investigación generada acerca del empleo de polisacáridos provenientes de PCL en dietas para animales, enfatizan más en las propiedades de las fracciones de manano-oligosacáridos o MOS cuando esta fracción representa la segunda en importancia dentro de la pared celular, después de la fracción de  $\beta$ -glucanos (**Aguilar-Uscanga et al., 2003**). De esta forma, una menor cantidad de estudios son reportados sobre las propiedades de la PCL como estructura completa, o en su caso sobre el empleo de fracciones de  $\beta$ -glucanos. De las fracciones de  $\beta$ -glucanos, la mayor parte de la investigación generada sobre sus mecanismos de acción o ventajas de su utilización, son con modelos de estudio en humanos y roedores, o forma concreta en el sector acuícola (**Raa, 2003**). Actualmente,

continúa existiendo un desconocimiento sobre el proceso de obtención u origen y sobre las características de los productos elaborados con fracciones de PCL.

**Tabla 2.16.** Efectos de la incorporación de MOS derivados de PCL en la dieta de pavos y de gallina de postura.

Autor/Dieta	Dosis kg/t		Efecto con respecto al control negativo
<b>Parks et al. (2001)</b> / Maíz-soja	1.0 (1-6 sem) 0.5 (6-20 sem)	Pavos	Incremento del peso vivo (PV), similar a dietas con APC
<b>Fairchild et al. (2001)</b> / Maíz-soja	1.0 (1-3 sem)	Pavos	Mayor PV en condiciones normales y al ser desafiados con <i>E. coli</i>
<b>Fritts y Waldroup, (2003)</b> / Maíz-soja	1.0 (1-20 sem)	Pavos	Similar respuesta en el índice de conversión alimenticia respecto al APC
<b>Sims et al. (2004)</b> / Maíz-soja	1.0 (0-6 sem) 0.5 (6-18 sem)	Pavos	Menor recuento de <i>Clostridium perfringens</i> y mayor de anaerobios y bífido bacterias en intestino grueso. Mayor PV y efecto sinérgico a la incorporación de APC (bacitracina)
<b>Zdunczyk et al. (2004)</b> / Maíz-soja	1.0 (1-8 sem) 2.5 (1-8 sem) 5.0 (1-8 sem)	Pavos	No efecto en productividad, modificación de las concentración de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGCC) en el ciego dependiendo de las dosis
<b>Zdunczyk et al. (2005)</b> / Maíz-soja	Dosis-1: 4.0 (1-8 sem) 2.0 (8-16 sem) Dosis-2: 10.0 (1-8 sem) 4.0 (8-16 sem)	Pavos	Mayor PV final, menor concentración de AGCC y conteos de <i>E. coli</i> en el ciego
<b>Dimovelis et al. (2004)</b> / Maíz-soja	1.5 (1-6 sem) 1.0 (6 sem-postura)	Gallinas	Incremento de la productividad y mejora en la calidad del huevo

### 2.3.6. Mecanismos de acción en el animal de las levaduras y paredes celulares de *S. cerevisiae* adicionadas en el alimento

Una respuesta comúnmente reportada de la inclusión de la levadura en raciones de rumiantes, es la de incrementar a escala del rumen el número total de bacterias

cultivables, la velocidad de degradación de la fibra y del flujo de proteína microbiana (**Martin y Nisbet, 1992, Offer, 1990, Wallace y Newbold, 1992, Dawson y Girad, 1997**). Este efecto ha sido atribuido a tres posibles mecanismos, por un lado las levaduras pueden servir como una fuente de vitaminas sobre todo de tiamina, vitamina capaz de estimular el crecimiento de ciertos hongos presentes en el rumen (**Chaucheyras et al., 1995**). En segundo lugar, algunas levaduras anaerobias facultativas pueden favorecer las condiciones de anaerobiosis en el rumen al eliminar el oxígeno (incremento del potencial Redox), esta condición incrementaría la proliferación de microorganismos de tipo anaeróbicos en el rumen (**Auclair, 2003**). Este efecto pudo ser constatado en estudios realizados por **Newbold et al. (1996)**, en donde se observó que ciertas cepas mutantes con un sistema de respiración deficiente, no fueron capaces de estimular el crecimiento de las bacterias del rumen. Finalmente, **Girad (1997)** sugirió que la estimulación del crecimiento bacteriano puede estar asociado a la presencia de dos factores de crecimiento localizados en distintas fracciones celulares de la levadura, uno de ellos termolábil probablemente de origen lipídico y otro termoestable con un posible origen peptídico en forma de cadenas cortas. Recientemente, **Rossi et al. (2004)** aislaron a partir de *Saccharomyces cerevisiae* dos fracciones peptídicas ricas en lisina e histidina, las cuales fueron efectivas en estimular el crecimiento y la utilización de lactato por parte de cierto tipo de bacterias rúminales (*Megasphaera elsdenii*).

No todas las levaduras de género *Saccharomyces* forman parte de la flora microbiana del tracto digestivo de animales. Además, se considera que este microorganismo es incapaz de colonizarlo por lo cual transita a lo largo de él pudiendo ejercer un efecto de barrera. De esta forma, la capacidad de acción de las levaduras en animales estará relacionada con el uso continuo y en cantidades suficientes (**Jonvel, 1993**). De acuerdo a **Cuarón (2000)**, los efectos de promoción del crecimiento de la levadura en animales monogástricos, podrían explicarse por el control de patógenos o efecto profiláctico que pueden ejercer las levaduras ante infecciones subclínicas o desafíos inmunológicos, ya que los desafíos inmunológicos pueden alterar de forma directa el consumo voluntario de alimento, la conversión alimenticia, el crecimiento y la salud del animal (**Klausing et al., 1997**). Respecto a los mecanismos de acción de las levaduras y de PCL de *S. cerevisiae* reportados en animales monogástricos, sus efectos podrían agruparse en tres distintos niveles: 1) exclusión de patógenos y micotoxinas, 2) estimulación del desarrollo de la mucosa digestiva y 3) estimulación de sistema inmune.

### 2.3.6.1 Exclusión de patógenos y micotoxinas

#### 2.3.6.1.1. Propiedades farmacodinámicas de la levadura

De acuerdo a **Buts (2005)**, la levadura *Saccharomyces* puede generar efectos farmacodinámicos semejantes a los efectos fisiológicos observados para la flora intestinal normalmente equilibrada. Diversos estudios realizados en roedores alimentados con *Saccharomyces boulardii* han descrito una mayor supervivencia de estos animales posterior al desafío con bacterias patógenas, por ejemplo: mortalidad a causa de colitis provocada por *Clostridium difficile* en hámsteres (**Toothaker y Elmer, 1984**); en ratones inoculados oralmente con *Clostridium difficile* (**Corthier et al., 1986**); o por inoculación directa de sus toxinas A y B (**Corthier et al., 1992**). En el caso de la infección intestinal causada por *Clostridium difficile*, el efecto protector que podría justificar la mayor supervivencia de los animales que consumieron células de levaduras, incluiría el siguiente mecanismo: en modelos de estudios realizados con asas intestinales de conejos infectados con *Clostridium difficile*, fue demostrado que *Saccharomyces boulardii* produjo una proteasa con un peso molecular de 54 kDa, que disminuyó las secreciones de líquidos y electrolitos de la mucosa digestiva (**Pothoulakis et al., 1993**). Posteriormente, **Castagliuolo et al. (1996; 1999)** confirmaron que la proteasa parcialmente purificada podía proteolizar directamente y específicamente la toxina A y destruir parcialmente el área del receptor en la membrana intestinal (microvellosidad) de la toxina, inhibiendo la fijación a los receptores de las toxinas A y B.

En ratones inoculados oralmente con un toxoide (toxina A), la administración de *Saccharomyces boulardii* permitió amplificar significativamente la respuesta inmune específica medida a través de la concentración sérica de la antitoxina A de anticuerpos secretores IgA e IgM (**Qamar et al., 2001**). Recientemente, estudios *in vitro* mostraron que *Saccharomyces boulardii* tiene la capacidad de inhibir la adherencia de *Clostridium difficile* a las células intestinales (**Tasteyre et al., 2002**). Otros estudios con el uso de asas intestinales ligadas a nivel del duodeno de ratones, sugirieron que la administración de *Saccharomyces boulardii* reducía significativamente la hipersecreción de sales y líquidos provocada por la inoculación previa con la toxina del cólera (*Vibrio cholerae*) (**Vidon et al., 1986**). Similares efectos de inhibición fueron confirmados en modelos *in vitro* con el uso de células epiteliales del intestino de ratas (**Czerucka et al., 1989; 1994**). La administración de *Saccharomyces boulardii* a ratones gnotoxénicos inoculados oralmente con una suspensión de *Shigella flexneri* o *Salmonella typhimurium*, mostraron efectos protectores que representaron una menor mortalidad por *Shigella flexneri* y menor

severidad de lesiones intestinales a causa de *Salmonella typhimurium* (Rodrigues *et al.*, 1996).

#### 2.3.6.1.2. Exclusión de bacterias fimbria-1 específicas

El proceso de colonización del tracto digestivo por microorganismos potencialmente patógenos, se lleva a cabo gracias al empleo de un grupo de proteínas y glicoproteínas bacterianas de superficie denominadas "lectinas". Las lectinas son glicoproteínas que se caracterizan por tener la capacidad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos de forma libre o que constituyen estructuras más complejas (Hernández *et al.*, 1999). De tal forma, microorganismos como *Salmonella*, *Escherichia coli* o *Vibrio cholerae* que presentan fimbrias tipo-1, utilizan lectinas con afinidad por la manosa con el fin de unirse a ciertos carbohidratos de superficie localizados en las células epiteliales de la mucosa digestiva, para fijarse y colonizar la mucosa digestiva (Sharon y Lis, 1993). Estudios realizados con la utilización de manano-oligosacáridos o MOS derivados de PCL, y de células de *Saccharomyces* suministrados por vía digestiva a aves, muestran ser una buena alternativa para reducir la prevalencia de colonización del ciego de pollos por cepas de *Salmonella enteritidis* (Line *et al.*, 1997; Line *et al.*, 1998; Spring *et al.*, 2000; Gil de los Santos *et al.*, 2005).

Parte de los mecanismos de acción que han sido descritos para justificar el efecto de exclusión de patógenos que pueden ejercer las levaduras y las PCL sobre bacterias patógenas, parten del estudio de la sensibilidad de las fracciones D-manosa y metil- $\alpha$ -D-manosido para unirse a las lectinas afines a receptores presentes en cierto tipo de bacterias que presentan fimbrias tipo-1 (Oyoyo *et al.*, 1988a; Oyoyo *et al.*, 1988b; Oyoyo *et al.*, 1988c). En estos estudios, se ha reportado que las fracciones D-manosa y metil- $\alpha$ -D-manosido pueden ejercer un efecto de inhibición, mayor a un 90%, de la adherencia de *Salmonella typhimurium* a las células digestivas epiteliales de pollos de un día de edad (Oyoyo *et al.*, 1988a). Posteriormente, estos estudios fueron validados en aves a los cuales se les suministro *Salmonella typhimurium* en el agua de bebida con y sin fracciones de D-manosa. Los resultados mostraron que la utilización de D-manosa redujo el porcentaje de pollos colonizados con *Salmonella typhimurium* de 78% a 28%, de 82% a 21% y de 93% a 43%, en tres experimentos respectivamente (Oyoyo *et al.*, 1988b). No obstante, debido al alto costo de las fracciones de D-manosa, su utilización en condiciones comerciales podría ser prohibitiva, incluso bajo periodos cortos de administración (Spring *et al.*, 2000).



Respecto al empleo de la levadura de *Saccharomyces*, algunos estudios han descrito que pollos de engorde alimentados con *Saccharomyces boulardii* mostraron una mejora en su eficiencia productivas al ser desafiados con *Salmonella enteritidis* (Gil de los Santos *et al.*, 2005). Por otro lado, la suplementación en la dieta con *Saccharomyces boulardii* ha resultado en un menor porcentaje de colonización del ciego con *Salmonella enteritidis* en pollos de engorde jóvenes (Line *et al.*, 1998) y pollo adultos sometidos a estrés por transporte (Line *et al.*, 1997). Con la utilización de paredes celulares de levadura, Spring *et al.*, 2000 encontraron una reducción en la colonización de *Salmonella* en el ciego de 89.8 a 55.7% en los controles y grupos con PCL respectivamente. En una serie de estudios, Fernandez *et al.* (2000; 2002) observaron que gallinas alimentadas con fracciones de MOS mostraban un incremento en las poblaciones de bacterias del ciego correspondientes a *Bifidobacterium spp* y *Lactobacillus spp*, y una disminución de *Enterobacterias*. Posteriormente, el contenido cecal (CC) de estas gallinas fue proporcionado a pollos de engorde como un producto de exclusión competitiva, observándose que aquellos pollos que consumieron CC de aves suplementadas con MOS fueron menos susceptibles a ser colonizados con *S. enteritidis*.

#### 2.3.6.1.3. Exclusión de micotoxinas

La estructura química de las PCL de *S. cerevisiae* no solo exhibe un alto grado de antigenicidad debida a sus fracciones de βglucanos y manosa. En estudios recientes (*in vitro*), se ha sugerido que esta estructura tridimensional constituida principalmente por polisacáridos, es capaz de llevar a cabo reacciones de absorción para ciertas micotoxinas de tipo zearalenona, aflatoxina y ocratoxina (Yianninkouris *et al.*, 2003; Yianninkouris *et al.*, 2004; Jouany, 2005; Ringot *et al.*, 2005). Las micotoxinas son un grupo diverso de compuestos químicos tóxicos (metabolitos secundarios) producidos por una gran variedad de hongos (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* y *Alternaria*). Debido a que los hongos contaminan los cereales frecuentemente en la mayor parte de los países, la presencia de micotoxinas en materias primas y alimentos para animales también llega a ser frecuente (Pier y Richard, 1992; Pfohl-Leszkowicz, 2000). Algunos ejemplos de micotoxinas identificadas en materias primas y alimentos contaminados de forma natural empleados en avicultura son: aflatoxinas (AF), ocratoxinas (OA), zearalenonas, toxina T-2, vomitoxina y fumonisina (Jelinek *et al.*, 1989). De forma general la intoxicación por micotoxinas puede representar efectos en la salud y productividad del individuo a distintos niveles, por ejemplo: efectos hepatotóxico,

nefrotóxicos, inmunosupresores, hepatocarcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos (**Veldman, 2004**).

En alimentación de aves, los resultados positivos encontrados en modelos *in vitro* para las PCL como absorbente de micotoxinas coinciden con los estudios in-vivo en pollos de engorde, en los cuales las levaduras de *S. cerevisiae* (**Stanley et al., 1993**) y PCL (**Santin et al., 2003; Stanley et al., 1995**) fueron capaces de contrarrestar los efectos tóxicos de piensos contaminados con aflatoxinas suministrados a las aves. En otros estudios realizados con gallinas reproductoras de estirpe pesada (**Stanley et al., 2004**), se observó una reducción en la productividad (postura, incubabilidad y mayor mortalidad embrionaria) cuando las gallinas consumían piensos contaminados con AF no obstante, cuando se les incorporaban PCL a los piensos contaminados, las aves mostraban una recuperación parcial de los parámetros de productividad. En un estudio más reciente **Zaghini et al. (2005)**, encontraron que la suplementación de MOS a piensos contaminados con AF, resultaba en una reducción en la concentración de metabolitos de aflatoxinas (AF-B1) en el hígado de gallinas alimentadas con estos piensos contaminados.

En la **Tabla 2.17.**, se presentan de forma resumida una serie de estudios realizados en aves, en los cuales se evaluó la capacidad de aditivos provenientes de PCL descritos como glucomananos esterificados para contrarrestar los efectos adversos de diferentes micotoxinas suministradas a las aves. De manera general, los glucomananos adicionados al alimento de pollos de engorde a dosis de 0.5 a 1.0 kg por tonelada, mostraron ser capaces de contrarrestar los efectos negativos de piensos contaminados con micotoxinas (AF, OA y T-2) sobre la productividad y órganos como el riñón, hígado, bolsa de Fabricio, timo y bazo de los pollos. En uno de los estudios de la **Tabla 2.17., Murthy y Devegowda (2004)**, encontraron que los gluco-mananos adicionados en el alimento contaminado con AF y proporcionado a las aves, eran capaces de reducir la absorción de la AF a escala digestiva. En el caso de gallinas de postura, los gluco-mananos adicionados a 2 kg por tonelada de alimento mostraron resultados favorables sobre el control de los efectos adversos de piensos contaminados con micotoxinas como zearalenona y deoxinivalenol (**Chowdhury y Smith, 2004**).

**Tabla 2.17.** Efectos de la incorporación de glucomananos esterificados de PCL a piensos para aves contaminados de forma experimental con diversas micotoxinas.

	<b>Dosis kg/t</b>	<b>Beneficio</b>	<b>Autor</b>
<b>Pollos de engorde Glucomananos</b>	1.0	Recuperación de parámetros productivos y de la función hepática y renal por la intoxicación con AF (300 ppb), OA (2000 ppb) y T-2 (3000 ppb)	<b>Raju y Devegowda, 2000</b>
	0.5	Recuperación de parámetros productivos y de los pesos relativos del hígado y molleja, por la intoxicación con AF (168 ppb), OA (8.4 ppb), zearalenona (54 ppb) y T-2 (32 ppb)	<b>Aravind et al., 2003</b>
	1.0	Mayor recuperación de AF en el contenido digestivo (menor absorción digestiva)	<b>Murthy y Devegowda, 2004</b>
	1.0	Recuperación de parámetros productivos y de los pesos relativos del hígado, riñón y timo, por la intoxicación con AF (2000 ppb) y T-2 (1000 ppb)	<b>Girish y Devegowda, 2004</b>
	0.5 1.0	Disminución en la severidad de las lesiones observadas en hígado, riñón, bolsa de Fabricio, timo y bazo por la intoxicación con AF (2000 ppb)	<b>Karaman et al., 2005</b>
<b>Gallinas de postura Glucomananos</b>	2.0	Prevención del incremento del ácido úrico sanguíneo y peso relativo del riñón y recuperación parcial de los parámetros productivos Deoxinivalenol (DON) (11.7 µg/mg), 15 acetil DON (0.4µg/mg), Zearalenona (0.6 µg/mg)	<b>Chowdhury y Smith, 2004</b>
	2.0	No efecto para contrarrestar la reducción de tasa de síntesis fraccional de proteínas en el hígado, reducida por Deoxinivalenol (DON) (11.7 µg/mg), 15 acetil DON (0.4µg/mg), Zearalenona (0.6 µg/mg) en el pienso	<b>Chowdhury y Smith, 2005</b>

**2.3.6.2. Efecto trófico sobre la mucosa digestiva**

Los efectos que pueden ejercer las levaduras de *Saccharomyces* sobre la fisiología digestiva de los animales continúan siendo ampliamente desconocidos. Estudios realizados en humanos y ratas con levaduras de *S. boulardii* suministradas oralmente, sugieren que la levadura podría ejercer un efecto trófico a escala de la mucosa digestiva (**Buts et al., 1986; Buts et al., 1994**). En humanos y ratas que consumieron levaduras de *S. boulardii*, se encontró un incremento significativo en la actividad específica de enzimas

(sucrasa, lactasa, maltasa) de la membrana en borde de cepillo de las células epiteliales del intestino delgado sin llegar modificarse la morfología de la mucosa (**Buts et al., 1986**). De hecho, en el caso de las ratas, un estudio posterior sugirió que el efecto trófico sobre la mucosa digestiva podría ser mediado por el estímulo en la producción y liberación endoluminal de espermina y espermidina por parte de la levadura (**Buts et al., 1994**).

En pollos de engorde, la suplementación en el alimento con levaduras de *S. boulardii* a una dosis de 0.2 kg/tonelada, resultó en una disminución del número de células caliciformes, menor profundidad en las criptas y no causó efectos en la altura y amplitud de las vellosidades del íleon (**Bradley et al., 1994**). En un estudio más reciente, **Zhang et al. (2005)**, observaron que el empleo de levaduras de *S. cerevisiae* a una dosis de 5 kg/tonelada de alimento o 25 veces mayor al estudio **Bradley et al. (1994)**, provocaba un incremento en la altura de las vellosidades y un mayor valor para la proporción altura/profundidad de las criptas de las vellosidades del íleon. Ambos trabajos (**Bradley et al., 1994; Zhang et al., 2005**) podrían sugerir que al igual que en humanos y ratas, las levaduras de *Saccharomyces* podrían ejercer un efecto trófico en la mucosa digestiva del pollo de engorde. Los resultados sobre empleo de fracciones de PCL en dietas para pollos pueden sugerir también un efecto trófico a escala de digestiva. **Santin et al. (2001)** incorporaron PCL de *Saccharomyces cerevisiae* a 2 kg/t de pienso de pollos de engorde, y encontraron una mayor altura de las vellosidades en las tres secciones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), observándose criptas menos profundas solo en el caso del yeyuno. Posteriormente este efecto fue corroborado por **Zhang et al. (2005)**, quienes adicionaron a la dieta de pollos de engorde 3 kg de PCL (*S. cerevisiae*) por tonelada, encontrando una mayor altura de vellosidades y mayor valor en la proporción de la altura de la vellosidad/profundidad de las criptas de la mucosa ileal. En los trabajos de **Santin et al. (2001)** y **Zhang et al. (2005)**, los autores sugirieron que las PCL causaron un efecto positivo en el desarrollo de la mucosa digestiva del pollo, ya que los grupos alimentados con PCL mostraron un mayor crecimiento en relación a los grupos controles sin PCL. En otro estudio **Iji et al. (2001)**, evaluaron la inclusión de MOS a 1, 3 y 5 kg por tonelada de alimento sobre la morfología y actividad enzimática de la mucosa digestiva de pollos de engorde. Los resultados a los 21 días de edad de las aves, mostraron que con la dosis de 5 kg de MOS se obtuvieron mayores alturas de vellosidades en yeyuno y con 3 y 5 kg se incrementó la actividad enzimática de la membrana en borde de cepillo de las células del epiteliales y el transporte de aminoácidos a nivel la mucosa del yeyuno.

### 2.3.6.3. Estimulación del sistema inmune

En 1900 **Von Dungern** observó que levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en la industria de panadería, interactuaban con las proteínas del complemento del sistema inmunitario. Posteriormente, **Pillemer y Ecker (1941)** encontraron que el componente activo en la levadura involucrado en esta reacción correspondía a la fracción insoluble de (1-3/1-6)  $\beta$ -glucanos, polisacárido presente en mayor concentración en la PCL, denominándolo como "Zimozan". La administración de (1-3/1-6)  $\beta$ -glucanos y de polímeros derivados de PCL de forma experimental a animales mamíferos resulta en remarcables efectos en el sistema inmunitario, que incluyen estimulación de las células del sistema reticuloendotelial, incremento de la resistencia a infecciones y regresión de tumores (**Brown y Gordon, 2003**). El mecanismo de acción propuesto es la estimulación de la inmunidad innata, específicamente a nivel de monocitos y macrófagos, células que presentan receptores para  $\beta$ -glucanos (**Czop y Austen, 1985; Czop et al., 1988; Taylor et al., 2002; Brown et al., 2002**), y que al ser estimulados inducen la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1, factor activador de plaquetas y metabolismo de los eicosanoides, conduciendo a un estado de alerta inmunológico (**Abel y Czop, 1992**).

En humanos, el consumo de levaduras (*Saccharomyces boulardii*) resultó en una serie de cambios a escala celular y humoral en los perfiles sanguíneos. Esta serie de cambios incluyeron incrementos en las células de tipo eritrocitos, leucocitos, células polimorfonucleares, neutrofilos y componentes del sistema de proteínas del complemento (C3, C5, C3d) (**Macchado-Caetano et al., 1986**). En ratas que consumieron *Saccharomyces boulardii*, se observó un incremento significativo (+57%) en las concentraciones de IgA secretora en el líquido intestinal y en las concentraciones de la porción secretora (+63%) de las células crípticas de la mucosa intestinal (**Buts et al., 1990**). Este incremento en la producción de IgAs totales y anti-*Saccharomyces boulardii* fue corroborado en estudios posteriores realizados con ratones gnotobióticos (**Rodrigues et al., 2000**).

En aves, los estudios sobre la respuesta inmunitaria con el empleo de la PCL como estructura completa, o con fracciones de  $\beta$ -glucanos muestran ser escasos. **Santin et al. (2001)** incluyeron PCL (2 kg/t pienso) a dietas contaminadas con AF (1000 ppb), proporcionadas a pollos de engorde vacunados contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). Las determinaciones de anticuerpos en días posteriores a la vacunación no mostraron una mayor respuesta de anticuerpos vacunales en las aves que

consumieron PCL, no obstante este grupo de aves sí mostró una mejor respuesta inmunológica en un posterior desafío con un virus cepa velogénica de NDV. En una serie de trabajos, **Stanley et al. (2004)** encontraron que el empleo de PCL a 1 kg/t en el alimento de pollos de engorde representó beneficios en términos de un mejor comportamiento productivo en aves mantenidas en camas recicladas, que en un primer estudio pertenecieron a aves inoculados con coccidias de tipo *Eimeria maxima* y *E. tenella*, efecto que representó un desafío inmunitario. Con el empleo de  $\beta$ -glucanos purificados, **Acevedo et al. (2001a)** vacunaron (vacuna de NVD) y suministraron por vía oral (1,3)  $\beta$ -glucanos a pollos (white leghorn). En este caso la suplementación de 5 y 10 mg/kg de pienso resultó en una mayor producción de anticuerpos (NVD). En otro trabajo, los mismos autores (**Acevedo et al., 2001b**) encontraron que pollos (white leghorn) a los cuales se les suministró de forma intraperitoneal (1,3)  $\beta$ -glucanos (5 y 10 mg/kg), mostraron una estimulación en la respuesta T inespecífica (hipersensibilidad retardada). Un estudio más reciente llevado a cabo en pollos de engorde por **Guo et al. (2003)**, demuestra la capacidad inmunomoduladora de fracciones de  $\beta$ -glucanos provenientes de PCL e incorporadas en la dieta. En estos trabajos, los  $\beta$ -glucanos adicionados a 20 y 40 mg/kg de pienso, indujeron mayor proliferación de macrófagos, mayor producción de nitritos y de interleucina-1, además de mayores pesos relativos de la bolsa de Fabricio, timo y bazo.

Con utilización de MOS, **Savage et al. (1996)**, alimentaron pavos machos durante 53 días con 0.11% de MOS en la dieta, al final del periodo experimental obtuvieron muestras de sangre y bilis. Estas muestras fueron analizadas por técnicas de inmuno-difusión radial (IDR) y por inmuno-electroforesis (IEF), a pesar de que las pruebas de IEF no mostraron diferencias en el perfil de anticuerpos, en el caso de de las pruebas de IDR se observó un incremento de las inmunoglobulinas de tipo IgG e IgA en sangre y en bilis de los pavos que consumieron MOS. En gallinas de postura, se evaluó el efecto de la suplementación de MOS en la dieta sobre la inmunidad humoral mediante la inoculación de una suspensión de albúmina sérica bovina (ASB) y de glóbulos rojos de borrego (GRB) (**Malzone et al. 2000**). Una semana post-inoculación de los antígenos, los resultados de este estudio mostraron que las gallinas suplementadas con MOS a 500 g/kg de alimento, tuvieron títulos de anticuerpos mayores de GRB, y en el caso de la ASB, sólo se obtuvieron diferencias numéricas en la 1ª y 2ª semana post-inoculación para los gallinas alimentadas con MOS (**Malzone et al. 2000**). En otro estudio realizado en gallinas de postura de estirpe pesada, la incorporación de MOS en la dieta resultó en un incremento

significativo de la respuesta de anticuerpos contra la vacuna de la infección de la bolsa de Fabricio en las madres y en la progenie (**Shashidhara y Devegowda, 2003**).

**Capítulo 3. Planteamiento y objetivos del estudio.**



#### 3.0. Planteamiento y objetivos del estudio

Los nuevos sistemas de producción animal tienen que ir adaptándose a las crecientes demandas de una población cada vez más crítica hacia los productos de origen animal que incluye en su alimentación. Aunque esta situación es mayor en los países desarrollados, terceros países son afectados de forma directa o indirecta por estas nuevas tendencias. Por ejemplo, la prohibición de APC en la UE impactará indirectamente en los sistemas de producción animal de países que pretendan importar productos avícolas o acuícola a la UE, como es el caso algunos países Latinoamericanos. Bajo este escenario, algunos de estos países deben adaptar sus sistemas de producción a esquemas de alimentación con y sin empleo de APC. En la nutrición actual y moderna, la investigación sobre el empleo de nuevos aditivos naturales que puedan ejercer efectos de mejorar la salud y productividad animal genera muchas expectativas ante la ausencia de global de APC, o por la sencilla razón de que en la mayoría de las veces, los actuales pollos de engorde comerciales pueden sufrir problemas de estrés y estar expuestos a agentes patógenos que desencadenen problemas de inmunodepresión, enfermedad y pobre productividad.

En el caso concreto del empleo en avicultura, de levaduras de *Saccharomyces* y sus fracciones (extractos, paredes celulares, beta-glucanos y manano-proteínas), sustancias que tienen grandes posibilidades para ser empleados como aditivos naturales por sus efectos de poder mejorar la salud y productividad del ave. Los resultados reportados en la literatura especializada son limitados para las levaduras y beta-glucanos, y escasos para las manano-proteínas y los extractos. Por otro lado, la investigación generada sobre el empleo en avicultura de PCL de *S. cerevisiae*, productos frecuentemente definidos como fuentes de polisacáridos naturales o tipo MOS, en la actualidad existe muy poca información acerca de las características o definición de este tipo de productos. Algunos de los cuestionamientos que podrían plantearse para estas sustancias, serían: la eficacia como promotor de crecimiento de los distintos productos generados en la industria fermentadora, o en su caso la importancia de los polisacáridos (glucanos y manano-proteínas) en el modo de acción de las PCL empleadas como aditivos alimenticios.

En la **Tabla 3.1.**, se presentan tres diferentes PCL industriales que son empleadas como aditivos polisacáridos en alimentación de aves, como puede observarse existe una marcada diferencia en la concentración de los principales polisacáridos (manosa y  $\beta$ -glucanos) de las PCL 1 y 2. En el caso de la tercera PCL, solo se encontró una referencia

### 3.0. Planteamientos y objetivos del estudio

en donde se describe su composición estructural de macromoléculas (proteína, grasa y fibra). De hecho, los autores de este estudio sugieren que las concentraciones de polisacáridos del producto la componen principalmente manosa y  $\beta$ -glucanos, definiendo a este producto como un aditivo de tipo MOS no obstante, no presentan datos de las concentraciones de sus polisacáridos.

**Tabla 3.1.** Principales constituyentes de 3 paredes celulares industriales de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* empleados como aditivos polisacáridos en alimentación animal.

(%) <sup>i</sup>	PCL-1 <sup>1</sup>	PCL-2 <sup>2</sup>	PCL-3 <sup>3</sup> <sup>ii</sup>
Materia seca	97.40	97.60	-
Beta-glucanos	22.86	26.03	-
Mánanos	17.24	21.60	-
Grasa cruda	3.17	12.96	4.00
Proteína bruta	37.01	24.89	31.00
FDA	-	-	9.40

<sup>1</sup>Nombre comercial Pronardy 500; <sup>2</sup> Nombre comercial Saf-mannan; <sup>3</sup>Nombre comercial Bio-Mos.

<sup>i</sup>Información proporcionada por el departamento de I+D de "Bio-Springer", 103, rue Jean Jaurès B.P. 17, F-94701 Maisons-Alfort Cedex, FRANCE.

<sup>ii</sup>Tomado de Iji et al., 2001. FDA = Fibra detergente ácida

Recientemente, **Rosen (2006)** sugirió la necesidad de generar una buena cantidad de información acerca de los nuevos aditivos alimenticios que comienzan a tener un uso común en avicultura, y así poder construir una adecuada base de datos que permita elaborar modelos de predicción estadísticos con límites de confianza extrapolables a condiciones prácticas sobre su eficacia y los beneficios de su utilización. En el caso de los productos de *S. cerevisiae* como las levaduras o PCL, se podría considerar que la mayoría de los estudios publicados en algunas de las principales revistas de ciencia avícola sobre su utilización fueron realizadas con el uso de dietas elaboradas con maíz, existiendo una carencia de información sobre su eficacia con el uso dietas elaboradas con cereales viscosos como el trigo. Situación un tanto crítica, ya que es bien conocido que la utilización de cereales viscosos (ricos en PNA) en las dietas de aves, puede ejercer importantes modificaciones en la fisiología digestiva del ave, y no sería extraño pensar

que los productos de levaduras *S. cerevisiae* pudieran mostrar distintas respuestas de acuerdo a las condiciones dietarias impuestas.

De hecho, el mismo autor (**Rosen, 2006**), resalta la importancia de incluir la mayor parte de la información de los estudios sobre los nuevos aditivos que se utilizan en avicultura, considerando aspectos cronológicos, dietarios, medioambientales, genéticos y nutricionales. Esta situación genera la necesidad en avicultura, de indagar más acerca de la utilización levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* y sus fracciones entre ellas PCL, extractos,  $\beta$ -glucanos y manano-proteínas bajo diferentes condiciones dietarias (distintos cereales) para tratar de esclarecer sus efectos a escala digestiva, y de esta manera poder definir mejor sus aplicaciones en alimentación de aves.

En base a estos antecedentes, en la presente tesis se presentan una serie de experimentos realizados en pollos de engorde, en los cuales fueron evaluadas las respuestas a la productividad, variables digestivas y a la salud de las aves por la suplementación de distintas levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* y sus fracciones (PCL, extractos,  $\beta$ -glucanos y manano-proteínas) en dietas que representaron distintas condiciones dietarias. A continuación se mencionan los objetivos de los distintos experimentos realizados.

#### 3.1. Objetivo general

- Evaluar los efectos de la suplementación de levaduras de *S. cerevisiae* y de sus diferentes constituyentes (paredes celulares, extractos y fracciones purificadas de manano-proteínas y 1,3/1,6  $\beta$ -glucanos) en dietas elaboradas con maíz y trigo-cebada-centeno y sus efectos sobre la productividad, variables digestivas y la salud de pollos de engorde comerciales.

*Para llevar a cabo este objetivo, se realizaron 6 experimentos en pollos de engorde bajo el siguiente esquema y con los siguientes objetivos particulares para cada uno de ellos:*

**3.2. Objetivos particulares**

**Experimentos 1 y 2** (*Evaluación preliminar de la incorporación de distintas levaduras y sus componentes en dietas elaboradas con trigo-cebada-centeno y maíz de pollos de engorde: efectos sobre parámetros productivos y digestivos del ave*):

- Evaluar la respuesta de la incorporación de APC (Avilamicina) frente a diferentes levaduras activas de *S. cerevisiae* y de sus componentes (PCL y extractos) en dietas elaboradas con trigo-cebada-centeno (gran contenido de PNA solubles) y con maíz (menor contenido de PNA solubles) sobre los parámetros productivos, recuentos bacterianos en el íleon, consumo de agua/consumo de alimento, digestibilidad ileal y viscosidad del contenido ileal de pollos de engorde.
- Encontrar la levadura o componente de la levadura (PCL o extracto) que al ser utilizado como aditivo alimenticio en las dietas formuladas con trigo-cebada-centeno o con maíz, sea capaz de inducir las mejores respuestas en la productividad y salud del pollo de engorde respecto al uso de un APC.

**Experimentos 3** (*Efectos del programa de alimentación y de la utilización de paredes celulares de levadura sobre los parámetros productivos, desarrollo de la mucosa digestiva, respuesta inmune humoral y pesos de los órganos linfoides de pollos de engorde*):

- Evaluar y validar los efectos en la productividad de pollos de engorde por la suplementación de PCL en dietas con gran contenido en PNA (trigo-cebada-centeno) y con menor contenido en PNA (maíz).
- Evaluar el efecto de la densidad de nutrientes y la suplementación de PCL en dietas elaboradas con maíz sobre la productividad y salud de los pollos de engorde.

**Experimentos 4 y 5** (*Influencia de la suplementación en la dieta de paredes celulares de levadura y de fracciones purificadas de beta-glucanos y manano-proteínas, sobre los parámetros productivos, desarrollo de la mucosa digestiva, respuesta inmune humoral y % de los pesos relativos de órganos linfoides y digestivos del pollo*):

- Estudiar el efecto de la suplementación de PCL y de sus principales fracciones purificadas (beta-glucanos y manano-proteínas) en dietas con gran contenido de PNA (trigo-cebada-centeno) sobre los parámetros productivos, respuesta a la vacunación del virus de la enfermedad de Newcastle, y porcentajes de los pesos relativos de órganos linfoides.
- Identificar el papel de la inclusión en la dieta (trigo-cebada-centeno) de fracciones de manano-proteínas y de beta-glucanos de la PCL de levadura, sobre la productividad, pesos relativos del intestino, hígado y páncreas, y la morfología de la mucosa de pollos de engorde.

**Experimentos 6** (*Efecto inmunomodulador de las paredes celulares de levadura adicionadas en dietas de pollos de engorde inoculados con lipopolisacárido de E. coli*):

- Estudiar la capacidad de inmuno-estimulación o de inmuno-modulación de las PCL suministradas en los alimentos de pollos de engorde desafiados o inmuno-estimulados con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*.
- Evaluar los efectos de la utilización en la dieta de PCL y de la inoculación de LPS en los el comportamiento productivo de pollos de engorde.

**Capítulo 4. Evaluación preliminar de la incorporación de distintas levaduras y sus componentes en dietas elaboradas con trigo-cebada-centeno y maíz de pollos de engorde: efectos sobre parámetros productivos y digestivos del ave.**

### 4.1. Resumen

Se realizaron dos experimentos con el objetivo de evaluar el efecto en los parámetros productivos, recuentos bacteriológicos en el íleon, consumo de agua/consumo de alimento, digestibilidad ileal y viscosidad del contenido ileal en pollos de engorde (Ross 308), de la suplementación de diferentes levaduras activas de *S. cerevisiae* y sus componentes (paredes celulares de levadura o PCL y extractos). Se emplearon dietas libres de aditivos (antibiótico, enzimas y anticoccidiosis) con alto contenido de polisacáridos no amiláceos (PNA) a base de trigo-cebada-centeno (TCC), y con menor contenido de PNA a base de maíz. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos (6) aleatorizados con 8 tratamientos experimentales en ambos experimentos: T-1) Control negativo (CN), sin aditivos; T-2) CN+avilamicina, 0.01 g/kg; T-3) CN+levadura-1 (uso pecuario), 2 g/kg; T-4) CN+levadura-2 (uso panadero), 1 g/kg; T-5) CN+levadura-3 ("Killer yeast"), 0.8 g/kg; T-6) CN+extracto de levadura, 0.15 g/kg; T-7) CN+PCL-1, 0.5 g/kg; y T-8) CN + PCL-2, 0.5 g/kg. Las aves fueron mantenidas en jaulas durante 42 días en el experimento 1 (960 aves) y durante 39 días en el experimento 2 (1056 aves). Bajo estas condiciones experimentales la utilización de levaduras y PCL fue más efectiva en las dietas con TCC respecto a las dietas con maíz. En las dietas TCC (0 a 42 días), el empleo de la levadura-3 y de la PCL-2 incrementó de forma significativa ( $P<0.05$ ) en un +4.6% el peso final y el consumo de alimento respecto a la dieta control, mostrando un efecto similar al de la avilamicina. En las dietas con maíz, durante los primeros 14 días, el empleo de avilamicina, levadura-1, PCL-1 y 2 mejoraron ( $P<0.05$ ) el índice de conversión respecto a la dieta control. Para los coeficientes de digestibilidad ileal (CDI) de nutrientes, en las dietas con TCC suplementadas con avilamicina y PCL-2, se encontraron mejores CDI para la grasa cruda ( $P<0.05$ ) respecto a los tratamientos que incluyeron levaduras 2 y 3. La viscosidad y los recuentos bacterianos del contenido ileal de las aves, no fueron modificadas por utilización de las distintas dietas experimentales.

### 4.2. Introducción

El empleo de antibióticos en dietas para animales con la finalidad de promover su crecimiento, es una práctica realizada de forma común en algunas regiones del planeta desde más de la mitad del siglo pasado (**Jones y Ricket, 2003; Dibner y Richards, 2005**). Recientemente, la comunidad científica está cuestionando la utilización de antibióticos con esta finalidad, debido al riesgo que podría representar esta práctica en la generación de bacterias patógenas con genes de resistencia cruzada hacia antibióticos

empleados en terapéutica humana (**Witte, 1996**). Aunado a esto, la percepción del consumidor adquiere otro peso importante, ya que actualmente existe una creciente preferencia hacia productos de origen animal producidos de forma más natural, y de mayor calidad. Por otro parte, la reciente prohibición al uso de antibióticos como promotores del crecimiento (APC) en piensos para animales, ocurrida dentro de la Unión Europea el pasado 1 de enero del 2006 (**Regulación No. 1831, 2003**), origina también oportunidades para la investigación y desarrollo de nuevas sustancias naturales que puedan ser empleadas para mejorar la salud intestinal, y la productividad del animal ante la ausencia de APC (**Brufau, 2000; Halhude, 2003**). Hasta la fecha, los mecanismos de acción descritos para los APC, son enfocados hacia el control de la flora microbiana presente en el tracto digestivo del individuo, lo cual puede resultar en beneficios en la productividad del animal (**Bedford, 2000**). En el caso de la levadura de *S. cerevisiae*, su utilización en alimentación animal y humana se remonta a varias décadas (**Lesson, y Summers, 2001**). Las levaduras de *S. cerevisiae* pueden ser utilizadas como aditivos alimenticios ya que por sí mismas podrían ejercer efectos similares a bacterias probióticas (**Buts, 2005**). En humanos, las levaduras de *Saccharomyces* son utilizadas por sus propiedades farmacodinámicas, sobretodo para controlar diarreas por *Clostridium difficile* (**Pothoulakis et al., 1993**); en alimentación animal, las levaduras fueron utilizadas en un principio debido a sus propiedades nutricionales (**Lesson, y Summers, 2001**), en la actualidad este tipo de aditivos son utilizados en alimentación de rumiantes por sus efectos positivos sobre la modificación del micro-ambiente del tracto digestivo (**Newbold, 1996**). En el caso de sus componentes, las paredes celulares de levadura (PCL) están constituidas por polisacáridos de tipo (1,3/1,6) b-glucanos y manano-proteínas, de estas estructuras se menciona que pueden ejercer efectos de fijación de bacterias patógenas digestivas (**Spring, 2000**), micotoxinas (**Ringot, 2005**) y de estimulación del sistema inmune (**Guo et al., 2003**); los extractos de levadura, a su vez pueden servir como fuentes de nutrientes, nucleótidos y péptidos (**Oriol, 2004**). Aparentemente, las características de las levaduras y de sus componentes podrían sugerir que este tipo de sustancias pueden ser útiles para promover la salud digestiva y favorecer el crecimiento del ave. No obstante, debido a que la industria de la producción de levaduras genera diversos productos (levaduras activas, extractos y paredes celulares), que pueden ser originados a partir de diferentes procesos de fabricación y de diferentes cepas industriales (panadería, cervecería, vino o pecuario). Muchos de estos productos pueden mostrar cambios en su estructura y origen, difiriendo en sus características o efectos nutricionales en el animal. El estudio de las mejores aplicaciones y efectos, además del



establecimiento de controles de calidad para estas nuevas sustancias destinadas para un uso específico en alimentación animal, sigue representando una gran área de estudio. Basados en estos antecedentes, se realizaron dos experimentos con pollos de engorde, empleando diferentes levaduras activas y sus componentes, paredes celulares (de diferente proceso industrial de producción) y extractos. El objetivo fue el de evaluar los efectos de estas sustancias naturales y compáralos con los de un APC (avilamicina) sobre los parámetros productivos y digestivos del ave. La eficacia de estas sustancias fue evaluada bajo dos condiciones dietarias: empleando dietas a base de trigo-cebada-centeno (mayor desafío por una mayor concentración de polisacáridos no amiláceos o PNA) y dietas a base de maíz (menor desafío y menor concentración de PNA), situaciones que representaban dietas similares a las empleadas en Europa o América respectivamente.

### 4.3. Material y métodos

#### 4.3.1. Animales y alojamientos

Se realizaron dos experimentos empleando pollos de engorde machos de 1 día de edad de la estirpe Ross 308, 960 y 1056 para los experimento 1 y 2 respectivamente. Las aves fueron alojadas en una caseta experimental limpiada y desinfectada previamente (instalaciones de Nutrición Animal del IRTA, en Mas de Bover), provista con sistema de ventilación forzada, calefacción e iluminación artificial. A la recepción las aves fueron alojadas al azar dentro de jaulas experimentales de 1m<sup>2</sup>, 20 y 22 aves para el experimento 1 y 2 respectivamente. Cada jaula contó con un comedero en forma de tolva de aproximadamente 5 kg de capacidad y 2 bebederos de tetina. La temperatura dentro de la caseta a la recepción fue de 33-35° C, disminuyéndola 3° C cada semana hasta los 22° C al final de la prueba. El calendario de iluminación fue de 23 h de luz durante los primeros cuatro días, 20 h hasta los 10 días y 18 h hasta el final de la prueba. Cada día se realizaron dos inspecciones dentro de la caseta para revisar el estado general de la parvada, disponibilidad del agua y el alimento, condiciones de temperatura, calefacción e iluminación y presencia de mortalidad. El agua y el alimento fueron suministrados *ad-libitum* durante todo el periodo experimental.

#### 4.3.2. Diseño y tratamientos experimentales

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos (6) aleatorizados, que incluyo 8 tratamientos experimentales para ambos experimentos: T-1) Control negativo (CN), sin

aditivos; T-2) CN + avilamicina o APC (0.01g/kg); T-3) CN + levadura activa-1 (uso pecuario, *S. cerevisiae Sc47*)<sup>\*</sup> (2 g/kg); T-4) CN + levadura activa-2 (uso panadero)<sup>\*\*</sup> (1 g/kg); T-5) CN + levadura activa-3 ("Killer yeast") (0.8 g/kg); T-6) CN + extracto de levadura (0.15 g/kg); T-7) CN + PCL-1 (proceso industrial-1) (0.5 g/kg); y T-8) CN + PCL-2 (proceso industrial-2) (0.5 g/kg)<sup>†</sup>. La eficacia de los productos fue evaluada en dietas básicas únicas, durante 42 y 39 días para los experimentos 1 y 2 respectivamente. Ambas dietas fueron formuladas para ser isocalóricas (3000 kcal/kg) e isoproteicas (20% proteína cruda), el contenido de aminoácidos, vitaminas y minerales fueron incluidos a niveles cercanos o superiores a las recomendaciones del **NRC-2004 (Tabla 4.1.)**. En la elaboración de las dietas del experimento 1, se emplearon trigo, cebada y centeno o dietas con mayor contenido en polisacáridos no amiláceos solubles; mientras que en las dietas del experimento 2 se utilizó maíz o dietas con menor contenido en polisacáridos no amiláceos (**Tabla 4.1.**). Ambas dietas fueron en forma de harina y con excepción del tratamiento 2, no fueron adicionados APC, drogas anticoccidiales ni enzimas al resto de las dietas experimentales. La composición analítica de los principales ingredientes y alimentos fue estimada usando métodos estándares (**AOAC, 1990**), incluyendo materia seca (método 934.01), proteína bruta<sup>1</sup> (método 968.06), grasa bruta<sup>2</sup> (920.39) y energía bruta empleando una bomba calorimétrica adiabática<sup>3</sup> (**DIN, 1977**). Las composiciones de los principales azúcares o polisacáridos de las paredes celulares de levadura se presentan en la **Tabla 4.2.** (*Información proporcionada por el departamento de I+D de "Lesaffre Feed Additives" y "Bio-Springer", 103, rue Jean Jaurès B.P. 17, F-94701 Maisons-Alfort Cedex, France*).

#### 4.3.3. Parámetros evaluados

Se realizaron pesajes de los animales en grupo, del alimento suministrado y del alimento sobrante para cada unidad experimental o jaula, a los días 0 (recepción), 14 y final de los experimentos. Posteriormente, fueron estimados los promedios por tratamiento experimental, para el peso vivo, ganancia de peso por día, consumo de alimento por día,

---

<sup>\*</sup> Biosaf<sup>®</sup>, <sup>†</sup> Saf-mannan<sup>®</sup>, <sup>\*\*</sup> Saf-instant<sup>®</sup>, las levaduras, extractos y paredes celulares de levadura fueron proporcionados por Lesaffre feed Additives, Rue du Haut Touquet 1,59520 Marquette-Lez-Lille, France.

<sup>1</sup> LECO<sup>®</sup> FP-528, Protein/Nitrogen Determination, USA.

<sup>2</sup> Buchi Extraction System B-811, Buchi Labortechnik AG, Flewil, Switzerland).

<sup>3</sup> Calorimeter C-4000 A, IKA Analysentrchnik GMBH, Heitersheim, Germany.

<sup>4</sup> Brookfield digital viscometer, model LVTDVCP-II, Brookfield Engineering Laboratories, Stouhton, MA.

índice de conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad. Para calcular el índice de conversión alimenticia, fueron tomados en cuenta los pesos de los animales muertos o sacrificados para la obtención de muestras durante la prueba. De los 28 a los 32 días (experimento 1), y de los 34 a los 39 días (experimento 2) de experimentación, se determinó la relación entre los consumos de agua con respecto al consumo de alimento. Para calcular el consumo de agua fue colocado un depósito de plástico en cada jaula, que se llenaba cada día con agua limpia y fresca, mientras que el agua sobrante del día anterior fue medida para posteriormente llevar a cabo el cálculo de consumo de agua por ave y día.

### **4.3.3.1. Digestivos**

Del día 21 al 24 del ensayo, las aves fueron alimentadas con un alimento que incluía un marcador (dióxido de titanio a 0.5 g/kg de alimento). El día 24 del ensayo, seis aves de cada lote experimental o jaula fueron seleccionadas con un peso cercano a la media del lote, posteriormente estas aves fueron sacrificadas mediante la aplicación de una inyección intravenosa de pentobarbital sódico en la vena radial del ave (procedimiento experimental num. 688, aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal del IRTA). Posteriormente, se tomaron muestras de contenido digestivo para realizar las siguientes mediciones:

#### **4.3.3.1.1. Viscosidad del contenido intestinal**

Muestras de contenido digestivo de las secciones del ileón (divertículo de Meckel hasta 15 cm anteriores a la unión ileocecal) fueron colectadas y conservadas en hielo. Se realizó un pool de muestras de los seis animales por jaula, analizando una muestra por jaula y 6 muestras por cada tratamiento. Posteriormente las muestras frescas se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos a 15° C y se recuperó el sobrenadante. La medición de la viscosidad del sobrenadante del contenido digestivo fue realizada manteniendo la muestra a una temperatura de 30° C, realizando la medición después de 1 minuto en un viscosímetro Brookfield<sup>4</sup>.

#### **4.3.3.1.2. Absorción de nutrientes**

Se recolectaron y mezclaron los contenidos digestivos de segmentos intestinales ileales (15cm anteriores a la unión ileocecal) de 6 aves para formar una muestra, un total 6 muestras por cada tratamiento. Cada muestra fue liofilizada y molturada para realizar la medición de la digestibilidad ileal aparente para los principales nutrientes. La proteína

bruta (nitrógeno x 6.25) fue estimada mediante la metodología de Dumas<sup>2</sup> (AOAC, 1990 método 968.06); la grasa bruta por la técnica de Soxhlet mediante una previa hidrólisis ácida de la muestra (Fireth *et al.*, 1985; Ngeh-Ngwainbi *et al.*, 1997); y la energía bruta con el empleo de una bomba calorimétrica adiabática<sup>3</sup>. La concentración del dióxido de titanio en la muestras fue analizada de acuerdo a la metodología de Short *et al.* (1996).

Los coeficientes de digestibilidad ileal fueron calculados empleando la siguiente ecuación:

$$CD = 1 - [(Ti_{\text{alimento}} / Ti_{\text{digesta}}) \times (C_{\text{digesta}} / C_{\text{alimento}})]$$

De la cual: **CD** = coeficiente de digestibilidad para un nutriente del alimento; **Ti<sub>digesta</sub>** = concentración del marcador en el alimento; **Ti<sub>digesta</sub>** = concentración del marcador en la digesta; **C<sub>digesta</sub>** = concentración del nutriente en la digesta; **C<sub>alimento</sub>** = concentración del nutriente en el alimento.

#### 4.3.3.1.3. Recuentos de poblaciones bacterianas en el contenido digestivo

Los recuentos de las poblaciones bacterianas fueron realizadas en el CRESA (Centre de Reserca en Sanitat Animal, IRTA-Universidad Autónoma de Barcelona). Cada muestra fue constituida por el contenido de 2 muestras ileales (sección media del ileon), un total de 12 aves por cada tratamiento (dos animales por jaula). En el experimento 1 (dietas trigo-cebada-centeno), se realizaron los recuentos de las poblaciones bacterianas correspondientes a *Lactobacillus sp.*, *E. coli* y *Clostridium perfringens*; en el experimento 2 (dietas de maíz), se contabilizaron *Lactobacillus sp.*, *E. coli* y *Enterococcus sp.* Cada muestra fue diluída en una solución buffer de agua con peptona (APT, Merck), posteriormente cada solución fue sometida a diluciones seriadas. Para los recuentos de bacterias *E. coli* se empleo el medio de cultivo Fluorocoult VRB-Agar (Merck) y para *Clostridium perfringens*, Perfringens Agar (Oxoid) con A y B suplementos (Oxoid). Las placas fueron incubadas 18 h a 37° C en condiciones aerobias para *E. coli*, y en anaerobiosis para *Clostridium*. Para los recuentos de *Lactobacillus* se utilizo medio de cultivo agar rogosa (Oxoid, Ref. CM 627) y para los *Enterococcus* agar MacConkey (Oxoid, Ref. CM 115, Oxoid S. A, Madrid Spain), las placas fueron incubadas durante 48 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) y 24h (37°C) respectivamente. Los resultados se expresaron como valores de logaritmo de unidades formadoras de colonias o UFC/g de digesta fresca.

---

#### 4.3.4. Análisis estadístico

El diseño del experimento era de bloques al azar y los datos se analizaron con un análisis de la varianza de dos vías (8 tratamientos y 6 bloques), mediante el procedimiento GLM de SAS<sup>®</sup> (versión 8.0). Las diferencias entre tratamientos fueron establecidas por el test de Duncan de rango múltiple, a un nivel de confianza de ( $P < 0.05$ ) la prueba de Duncan. Previo al análisis estadístico, los datos expresados en porcentaje fueron transformados a valores de arco seno y los datos de viscosidad en Ln.

El modelo estadístico fue:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Bloque}_i + \text{Tratamiento}_j + e_{ij}$$

$Y_{ij}$  = Variable dependiente.

$\mu$  = Promedio.

$\text{Bloque}_i$  = Efecto del bloque.

$\text{Tratamiento}_j$  = Efecto del tratamiento.

$e_{ij}$  = Error residual.

#### 4.4. Resultados

##### 4.4.1. Parámetros productivos

Los promedios de los parámetros productivos del experimento 1 se muestran en la **Tabla 4.3**. Durante los primeros 14 días de vida, los pollos alimentados con PCL-2 mostraron un mayor crecimiento ( $P < 0.05$ ) respecto a las aves alimentados con las otras dietas experimentales que incluían productos a base de levadura, este incremento a su vez fue similar al observado en los pollos alimentadas con APC (avilamicina). Aparentemente, el mayor crecimiento observado con PCL-2, podría estar relacionado con un mayor consumo de alimento, ya que las aves que consumieron PCL-2 también mostraron un mayor consumo diario de alimento ( $P < 0.05$ ) respecto a otros grupos (levadura 2 y 3, extracto y PCL-1), y un consumo diario de alimento similar al de los grupos que consumieron APC y levadura-1. El índice de conversión no fue modificado significativamente por ninguna dieta experimental. De los 14 a los 42 días, los mayores pesos promedio ( $P < 0.05$ ) correspondieron a los tratamientos con APC, levadura-3 y PCL-2 en relación a los tratamientos control, levadura-2 y PCL-1. De los 14 a los 42 días, no se observaron diferencias significativas para los pesos promedio entre los tratamientos con APC, levadura-3 y PCL-2 y los que incluyeron levadura-1 y extracto de levadura. Las mayores ganancias de peso por día de los 14 a los 42 días, correspondieron a los pollos

alimentados con la levadura-3 respecto a los grupos de aves alimentados con la dieta control, levadura-2 y PCL-1 ( $P < 0.05$ ). A su vez, las ganancias de peso por día de las aves que consumieron levadura-3 fueron similares estadísticamente a los grupos de aves alimentados con APC, levadura-1, extracto de levadura y PCL-2. Los consumos diarios de alimento mostraron una tendencia ( $P < 0.08$ ) a ser mayores en las aves alimentadas con APC, levadura-3 y PCL-2, respecto a los demás grupos en el periodo de 14 a 42 días. Para el índice de conversión no se observaron diferencias significativas entre las dietas experimentales durante el periodo de 14 a 42 días. En el periodo global del experimento (1-42 días), fueron constatados los mayores crecimientos y las ganancias de peso por día ( $P < 0.05$ ) para los pollos alimentados con APC, levadura-3 y PCL-2 respecto a los pollos alimentados con la dieta control, levadura-2 y PCL-1, sin observarse diferencias entre estos grupos y los tratamientos que incluyeron la levadura-1 y el extracto de levadura. El consumo de alimento de 0 a 42 días, era mayor ( $P < 0.05$ ) en los tratamientos con APC, levadura-3 y PCL-2 respecto a los tratamientos con levadura-2, extracto de levadura y PCL-1; sin encontrarse diferencias entre los tratamientos control, APC, levadura-1, levadura-2, levadura-3 y PCL-2. El índice de conversión del alimento para el periodo completo de experimentación (0-42 días) no fue modificado por ninguna dieta experimental.

En la **Tabla 4.4.**, se presentan los promedios de los parámetros productivos del experimento 2. Durante la fase de 0 a los 14 días, los mejores índices de conversión alimenticia en las aves fueron obtenidos con las dietas con APC, levadura-1, PCL-1 y PCL-2, respecto a las dietas control y con levadura-2. Los grupos que incluyeron levadura-3 y extracto de levadura, no mostraron diferencias significativas en el índice de conversión del alimento respecto al resto de las dietas experimentales en los primeros 14 días del ensayo. A pesar de no haber obtenido efectos significativos en los parámetros productivos entre las distintas dietas experimentales de los 14 a los 39 días del ensayo, si que se observaron mayores promedios numéricos ( $P > 0.05$ ) en los pesos vivos, ganancias de peso por día y consumo diario de alimento en aquellas aves alimentadas con APC y productos de levadura de *S. cerevisiae* (levaduras, extractos y paredes celulares), respecto a la dieta control. De hecho, en el resumen global de 0-39 días de ensayo, los mayores promedios numéricos de las ganancias de peso correspondieron también a los tratamientos con APC y productos de levadura de *S. cerevisiae* (levaduras, extractos y paredes celulares), en relación a la dieta control. En el caso del consumo diario de alimento de los 0 a 39 días, los tratamientos con la levadura-1, 2 y 3 y con las PCL-1 y 2,

mostraron mayores valores numéricos respecto a los tratamientos control, con APC y con extracto de levadura.

#### **4.4.2. Parámetros digestivos**

En la **Tabla 4.5.**, se presentan los resultados obtenidos para los parámetros relación consumo de agua / consumo de alimento y viscosidad de contenido intestinal ileal de los experimentos 1 y 2. En ambos experimentos la utilización de avilamicina, levaduras, extractos de levaduras y paredes celulares de levadura no represento ninguna modificación significativa de estos parámetros. No obstante, en las dietas elaboradas con trigo, cebada y centeno, los animales que consumieron los distintos productos de levadura de *S. cerevisiae* mostraron valores numéricos menores de viscosidad intestinal respecto al empleo de la dieta control, observándose los menores valores en los grupos alimentados con la PCL-2. En la **Tabla 4.6.**, se presentan los valores de recuentos bacterianos del contenido digestivo del ileón para los experimentos 1 y 2. A los 24 días de ensayo, la incorporación de avilamicina, levadura, extracto y paredes celulares de levadura en las diferentes dietas (trigo-cebada-centeno y maíz), no representó ninguna modificación significativa de las poblaciones bacterianas del ileon: *E. coli*, *Clostridium perfringens* y *Lactobacillus sp.*, en el experimento 1 y *E. coli*, *Enterococcus sp.* y *Lactobacillus sp.*, en el experimento 2. Los valores promedios de los coeficientes de digestibilidad ileal (CDI) de nutrientes para los experimentos 1 y 2 se presentan en la **Tabla 4.7.** En el experimento 1 (dietas trigo-cebada-centeno), se observó un incremento del CDI de la grasa bruta ( $P<0.05$ ) con la utilización de avilamicina y PCL-2, respecto a los tratamientos con levadura-2 y 3, siendo similares a los de los tratamientos control, levadura-1, extracto de levadura y PCL-1. Por otro lado, los valores de los CDI de la energía bruta y la proteína bruta no se vieron modificados por las distintas dietas experimentales. En el experimento 2, no se observaron diferencias significativas en los CDI de la grasa bruta de los distintos tratamientos. En el caso de los CDI de la energía y proteína bruta, se observó que las aves que consumieron PCL-2 mostraron una tendencia a tener valores más altos de los CDI de la energía ( $P<0.07$ ) y la proteína bruta ( $P<0.08$ ), respecto a los otros tratamientos. Aunque el diseño estadístico no comparó los efectos en las aves del empleo de las dietas con mayor concentración de PNA (experimento 1) contra dietas con menor concentración de PNA (experimento2), de forma esperada la menor productividad animal, los mayores valores de viscosidad ileal y los menores valores de los CDI aparente (grasa, proteína y energía bruta), correspondieron a las aves alimentadas con dietas elaboradas

con trigo-cebada y centeno respecto a las aves alimentadas con dietas elaboradas con maíz.

#### 4.5. Discusión

Con el empleo de dietas trigo-cebada-centeno (TCC) (experimento 1), los pollos de engorde alimentados con avilamicina, levadura-3 y PCL-2 mostraron efectos positivos en sus pesos finales (42 días) cercanos a un +4.6% respecto aquellos pollos alimentados con la dieta control. Este mayor crecimiento pudiera estar relacionado a un mayor consumo de alimento, ya que de manera general las aves que consumieron APC, levadura-3 y PCL-2 también manifestaron incrementos en el consumo diario del alimento de alrededor de un 4%, con respecto al tratamiento control. Con el empleo de dietas de maíz (experimento 2), a pesar de no haber logrado observar efectos significativos en los parámetros productivos de los diferentes tratamientos experimentales durante los 39 días de edad, los resultados globales si mostraron efectos numéricos, que fueron positivos para el crecimiento (+3%), en aquellas aves que consumieron levadura-1, extracto y PCL (1 y 2), respecto al tratamiento control. De hecho, las aves que consumieron levadura-1, extracto y PCL (1 y 2) mostraron efectos numéricos ligeramente mayores en el crecimiento, y similares para el índice de conversión del alimento en el caso de los tratamientos con extracto y PCL-2 (alrededor de -2.5%), respecto a las aves que consumieron avilamicina. En ambos tipos de dietas, la utilización de PCL-2 representó efectos en la productividad del ave similar o ligeramente mejor a los observados con avilamicina. Los beneficios obtenidos en los parámetros de producción del pollo de engorde a partir de las PCL de *S. cerevisiae*, han sido demostrados por otros autores (**Santin *et al.*, 2001; 2003; Zhang *et al.*, 2005**). Recientemente **Arce-Menocal *et al.* (2005)**, realizaron dos experimentos con pollos de engorde adicionando PCL (similar a la PCL-2 de este estudio) a dietas elaboradas con sorgo y soja a diferentes dosis (250, 500, 1000 y 1500 ppm). Los resultados a los 49 días mostraron que la utilización de PCL a 500 ppm produjo efectos similares a la inclusión de avilamicina a 10 ppm, y de forma similar nuestros resultados, la utilización en la dieta de PCL a 500 ppm, representó beneficios de +3.6% y +2.6% en el peso, y -2.6% y -3.6% en el índice de conversión del alimento de los pollos (Exp. 1 y 2, respectivamente). Con el empleo de levaduras, se observó que en las dietas elaboradas con TCC, los grupos de aves alimentados con la levadura-3 ("killer yeast") mostraron una mejora en los parámetros productivos, de forma similar a la avilamicina y PCL-2. En las dietas de maíz, el uso de la levadura-1 aparentemente podría brindar algunos beneficios en la productividad del ave sin embargo,



al igual que la levadura-2, ambas mostraron resultados menos consistentes respecto a la avilamicina y la PCL-2 en las diferentes dietas.

Muchas levaduras son producidas de forma industrial para llevar a cabo diferentes funciones (industria del pan, vino, cervecera, pecuario o terapéutico) (**Oriol, 2004**) por lo cual, hablar de *Saccharomyces cerevisiae* es un tanto inespecífico ya esta especie agrupa a diferentes cepas. **Sarkar et al. 1997** evaluaron el efecto de la suplementación de *S. cerevisiae* Sc47 (similar a la levadura-1 de este estudio) a 1000 ppm en dietas a base de maíz para pollos de engorde. De forma similar a los resultados de este estudio, los resultados finales mostraron solo efectos numéricos en el peso final del ave respecto a la dieta control (+3.4%). En un trabajo más reciente, **Zhang et al. (2005)** utilizaron *S. cerevisiae* (no mencionan la cepa) a 3000 ppm kg/t (dietas de maíz), encontrando efectos significativos en el peso final de los pollos, +6.6% respecto a la dieta control. En nuestros estudios los beneficios obtenidos en el peso del ave, por la incorporación en la dieta de levadura de *S. cerevisiae* Sc47 (levadura-1), fueron del orden de +1.97% (dieta TCC) y +3.1% (dieta maíz). Probablemente y de forma similar al empleo de levaduras en rumiantes, en pollos, los efectos de las levaduras pueden ser dependientes de su frecuencia de uso, tipo o cepa de levadura y dosis (**Jonvel, 1993**). La importancia de la cepa recae en las características de las células, entre ellas el tamaño, el cual puede ser relacionado con el número de células viables presentes en el alimento capaces de ejercer un efecto en el animal (**Auclair, 2003**). Esta última aseveración podría justificar el pobre o nulo efecto de la levadura-2 (panadería) sobre la productividad del ave, ya que la levadura-2, fue incluida a la mitad de la dosis respecto a la levadura-1. Por otro lado, la finalidad industrial de la levadura, al parecer influye de forma importante en los efectos en animal o en su tracto digestivo. Este es el caso de la levadura-3 ("killer yeast"), que fue incluida a la menor dosis (800 ppm) respecto a las otras levaduras, y que a pesar de esto mostró efectos similares a la PCL-2 y a la avilamicina con las dietas de TCC. Las levaduras tipo "killer" son capaces de producir toxinas letales para otras levaduras y microorganismos, usualmente las "killer yeast" son empleadas en la industria vinícola para llevar a cabo un control sobre otras levaduras que podrían contaminar y afectar los procesos de fermentación del vino (**Marquina et al., 2002**). Probablemente, esta característica podría brindar beneficios en el control de ciertos microorganismos del tracto digestivo que pudieran afectar el estatus de salud del ave, sobretodo cuando fueron alimentados con dietas elaboradas con dietas a base de TCC, o dietas que pueden representar un mayor desafío al tracto digestivo del ave. No obstante, esta es solo una

aseveración que tendría que ser evaluada en futuros estudios, ya que actualmente la carencia de literatura disponible para las "killer yeast" no permite tener alguna referencia de su empleo en alimentación animal. En relación a los extractos de levadura (EL), se conoce que los EL son fuentes ricas de nutrientes (aminoácidos, vitaminas y minerales) y nucleótidos (**Oriol, 2004; Stone, 2006**). Los resultados del presente estudio no mostraron un efecto consistente del empleo de EL en dietas (TCC y maíz) para pollos de engorde. En una situación similar a las "killer yeast", poca información esta disponible acerca del uso de EL en alimentación de aves, ya que comúnmente los EL son utilizados en la industria alimenticia como potenciadores del sabor o para enriquecer los medios de cultivos microbiológicos (**Oriol, 2004; Stone, 2006**), situación que hace difícil su extrapolación a alimentación animal.

En el presente estudio, los resultados de los parámetros digestivos evaluados en las aves, no permitieron elucidar efectos claros de la utilización de levadura y sus componentes sobre el consumo de agua/consumo de alimento, la viscosidad del contenido ileal y los recuentos de colonias bacterianas del contenido ileal. En otro sentido, aunque no se realizó un análisis estadístico para evaluar los efectos de la dieta sobre el comportamiento productivo de las aves y sus variables digestivas, de forma esperada la utilización de dietas elaboradas con trigo-cebada-centeno o ricas en polisacáridos no amiláceos (PNA), resultó en mayores valores de viscosidad ileal, menor digestibilidad ileal y menor productividad del animal. Estos y otros efectos negativos de la utilización de dietas ricas en PNA en pollos de engorde han sido descritos por varios autores (**Choct y Anninon, 1992ab; Iji et al., 2001; Maisonniers et al., 2001; Preston et al., 2002**). Para los coeficientes de digestibilidad ileal de nutrientes, se observaron efectos poco claros de la suplementación de levaduras y sus componentes. Los mayores valores de los CDI de la grasa bruta en las dietas de trigo-cebada-centeno correspondieron a los tratamientos con avilamicina y PCL-2, no obstante este efecto solo fue estadísticamente significativo en relación al tratamiento que incluyó la levadura-2 y 3.

En las dietas elaboradas con maíz, los tratamientos que incluyeron PCL-2 mostraron una tendencia hacia mayores valores del CDI para la energía y proteína bruta. Los mayores CDI de la grasa cruda de los grupos que consumieron avilamicina y PCL-2, podrían justificar en parte el mayor crecimiento observado en estos pollos. En modelos de estudio con el empleo de cereales viscosos **Maisonniers et al. (2001)**, encontraron también un mayor crecimiento en las aves que mostraban una mayor digestibilidad de la grasa. Si el

mecanismo de acción por el cual las PCL-2 incrementaron el crecimiento de los pollos, se debiera a la modificación de la digestibilidad ileal de nutrientes, los parámetros digestivos evaluados en estos dos primeros experimentos no fueron del todo capaces de sustentar esta aseveración. Por otro lado, el mayor crecimiento de los pollos alimentados con APC y PCL-2, fue debido a una mayor capacidad digestiva de estas aves ya que su consumo del alimento fue significativamente mayor en el caso de las dietas con TCC. A pesar de que esta aseveración no pudo ser corroborada en este estudio, algunos investigadores han encontrado un efecto por parte de las PCL de promover el desarrollo de la mucosa digestiva de pollos (**Santón *et al.*, 2001; Iji *et al.*, 2001**) situación que podría brindarle beneficios al ave, entre ellos un mayor consumo de alimento.

Aparentemente, las condiciones dietarias pudieron influir en la respuesta de las diferentes sustancias evaluadas, ya que los efectos de la incorporación de diferentes cereales en la dietas experimentales provocaron por si solas modificaciones en la fisiología digestiva del ave. Probablemente, las dosificaciones elegidas para las diferentes sustancias evaluadas en estos ensayos pudieron ser inadecuadas en algunos casos, sobretodo cuando las condiciones del tracto digestivo representaron situaciones de mayor o menor desafío. En el caso de las 2 PCL, a pesar de fueron utilizadas a similares dosis en los alimentos de los pollos, mostraron diferentes respuestas, encontrándose efectos más consistentes con el uso de la PCL-2. Las diferencias de estos efectos, podrían estar relacionadas con la composición y concentración de sus principales polisacáridos ( $\beta$ -glucanos y manano-proteínas). De acuerdo a **Perry (1995)**, los efectos nutricionales de los polisacáridos pueden depender fuertemente de su estructura química. En base a esta aseveración, la PCL-1 contenía menores concentraciones de  $\beta$ -glucanos y manano-proteínas en relación a la PCL-2 (17 y 22% vs 21 y 26% respectivamente), esto podría sugerir que la PCL-1 era un producto más diluido en componentes activos y con diferentes propiedades nutricionales respecto a la PCL-2. Actualmente, una buena cantidad de productos a base de levaduras o sus componentes (células vivas, PCL, PCL descritas como manano-oligosacáridos) son comercializados para su empleo en alimentación animal por lo cual, se necesita disponer de mucha más información sobre sus aplicaciones y respuestas, axial como de sus mecanismos de acción, para poder optimizar su empleo en alimentación animal. Su aplicación debería sustentarse en un mayor conocimiento de las características propias de estas sustancias (origen y composición), ya que algunas ellas son producidas con una finalidad específica para nutrición animal y otras se originan de diversas industrias (subproductos de la industria panadera y cervecera). Desafortunadamente, y

más específicamente para el caso de los productos a base de PCL, su origen industrial y su composición (polisacáridos) generalmente son omitidas en algunos productos y estudios realizados. De aquí parte la necesidad de establecer un adecuado control de calidad sobre estos nuevos productos, con un gran potencial para ser utilizados como nuevos aditivos naturales.

#### **4.6. Conclusión**

Los resultados de estos experimentos sugieren que la utilización en dietas de pollos de engorde, de la PCL-2 y la levadura-3 ("killer yeast") derivados de *S. cerevisiae*, puede representar efectos en la productividad del ave similares a los obtenidos con APC (avilamicina). Estos beneficios, fueron más significativos en los animales alimentados con dietas con alto contenido de PNA presentes en los cereales trigo, cebada y centeno, mientras que en dietas de mejor calidad (maíz) esto efectos fueron menos consistentes. Aunque, los mecanismos de acción de estos productos no fueron elucidados en estos experimentos, el uso de levaduras activas ("killer yeast") y de las PCL-2 adicionadas a dietas de pollos de engorde puede representar una alternativa para mejorar la productividad del ave cuando los APC no son empleados en sus dietas. De los distintos productos de levadura podría citarse que sus respuestas en la productividad del ave, pueden estar ligadas a las características químicas de las PCL o de las cepas en el caso de las levaduras.

## 4.8. Tablas y figuras

**Tabla 4. 1.** Composición de las dietas experimentales.

Ingrediente %	Experimento 1	Experimento 2
Trigo	43.7	-
Cebada	15.0	-
Centeno	5.0	-
Maíz	-	61.8
Torta de soja (48% PB)	18.6	30.4
Soja integral extrusionada	11.0	3.0
Grasa animal (manteca)	3.0	1.0
DL-metionina	0.261	0.290
L-Lisina HCL	0.115	0.013
Carbonato de calcio	1.181	1.131
Fosfato dicálcico	1.451	1.588
Cloruro de sodio	0.300	0.337
Colina	0.005	0.070
Minerales y vitaminas*	0.400	0.400
Contenido calculado de nutrientes		
EM (kcal/kg)	3000	3000
PB (%)	20.0	20.4
Metionina (%)	0.55	0.58
Met + Cis (%)	0.90	0.90
Lisina (%)	1.10	1.10
Calcio (%)	0.90	0.90
Fósforo total (%)	0.60	0.64
Fósforo disponible (%)	0.40	0.42

\*Un kg de alimento contiene: vitamina A, 12 000 UI; vitamina D<sub>3</sub>, 2400 UI; vitamina E, 30 mg; vitamina K<sub>3</sub>, 3 mg; vitamina B<sub>1</sub>, 2,2 mg; vitamina B<sub>2</sub>, 8 mg; vitamina B<sub>6</sub>, 5 mg; vitamina B<sub>12</sub>, 11 µg; ácido fólico, 1,5 mg; biotina, 150 µg; pantotenato de calcio, 25 mg; ácido nicotínico, 65 mg; Mn, 60 mg; Zn, 40 mg; I, 0,33 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Se, 0,15 mg; y etoxiquin, 150 mg.

**Tabla 4.2.** Principales constituyentes de las 2 paredes celulares de levadura (PCL) de *S. cerevisiae* producidas de forma industrial y empleadas en las dietas experimentales.

Porcentaje*	PCL-1	PCL-2
Materia seca	97.40	97.60
Beta-glucanos	22.86	26.03
Manano-proteínas	17.24	21.60
Grasa bruta	3.17	12.96
Proteína bruta	37.01	24.89

*Información proporcionada por el departamento de I+D de "Lesaffre Feed Additives" y "Bio-Springer", 103, rue Jean Jaurès B.P. 17, F-94701 Maisons-Alfort Cedex, FRANCE. Beta-glucanos (1,3/1,6), la mayor parte corresponden a (1,3) Beta-glucanos.*

**Tabla 4.3.** Efecto de la suplementación dietaria (dietas de trigo-cebada-centeno) de antibiótico promotor del crecimiento (APC o Avilamicina), levaduras de *S. cerevisiae* y sus constituyentes (extractos y paredes celulares), sobre los parámetros productivos de pollos de engorde: peso vivo, ganancia de peso por día (GPD), consumo de alimento por día (CAD) e índice de conversión alimenticia (ICA). Experimento 1.

Tratamiento	0-14 días				14-42 días				0-42 días			
	Peso promedio (g)	GPD (g)	CAD (g)	ICA (g/g)	Peso promedio (g)	GPD (g)	CAD (g)	ICA (g/g)	GPD (g)	CAD (g)	ICA (g/g)	Mortalidad (%)
<i>Control</i>	298 <sup>b</sup>	18.1 <sup>b</sup>	25.7 <sup>b</sup>	1.418	1878 <sup>b</sup>	56.4 <sup>c</sup>	108.9	1.930	43.7 <sup>b</sup>	80.5 <sup>abc</sup>	1.844	3.3
<i>APC</i>	307 <sup>ab</sup>	18.8 <sup>ab</sup>	26.5 <sup>ab</sup>	1.412	1959 <sup>a</sup>	59.0 <sup>ab</sup>	113.7	1.926	45.6 <sup>a</sup>	83.8 <sup>a</sup>	1.839	1.7
<i>Levadura-1</i>	303 <sup>b</sup>	18.5 <sup>b</sup>	26.7 <sup>ab</sup>	1.442	1915 <sup>ab</sup>	57.5 <sup>abc</sup>	110.4	1.917	44.5 <sup>ab</sup>	81.9 <sup>abc</sup>	1.839	6.7
<i>Levadura-2</i>	294 <sup>b</sup>	17.9 <sup>b</sup>	25.5 <sup>b</sup>	1.426	1881 <sup>b</sup>	56.7 <sup>c</sup>	109.0	1.923	43.7 <sup>b</sup>	80.3 <sup>bc</sup>	1.837	5.8
<i>Levadura-3</i>	304 <sup>b</sup>	18.6 <sup>b</sup>	26.2 <sup>b</sup>	1.412	1964 <sup>a</sup>	59.3 <sup>a</sup>	113.8	1.920	45.7 <sup>a</sup>	83.5 <sup>ab</sup>	1.827	8.3
<i>Extracto</i>	306 <sup>b</sup>	18.7 <sup>b</sup>	26.4 <sup>b</sup>	1.410	1927 <sup>ab</sup>	57.9 <sup>abc</sup>	109.1	1.884	44.8 <sup>ab</sup>	80.1 <sup>c</sup>	1.787	5.8
<i>Pared celular-1</i>	296 <sup>b</sup>	18.0 <sup>b</sup>	25.6 <sup>b</sup>	1.420	1887 <sup>b</sup>	56.8 <sup>bc</sup>	108.8	1.915	43.9 <sup>b</sup>	79.8 <sup>c</sup>	1.819	4.1
<i>Pared celular-2</i>	322 <sup>a</sup>	19.8 <sup>a</sup>	28.0 <sup>a</sup>	1.411	1964 <sup>a</sup>	58.6 <sup>abc</sup>	113.0	1.927	45.7 <sup>a</sup>	83.9 <sup>a</sup>	1.838	3.3
<i>Error est. Media</i>	12.3	0.88	1.20	0.043	54.1	0.70	1.58	0.018	1.28	2.86	0.041	1.68
<i>Probabilidad (F)</i>	0.02	0.02	0.03	NS	0.02	0.03	0.08	NS	0.02	0.05	NS	NS

Los parámetros evaluados son el resultado de promedios obtenidos de seis réplicas por cada tratamiento de 20 aves de 0 a 24 días y 14 aves de 24 a 42 días.

<sup>a, b, c</sup> Dentro de una misma columna, medias con distinta letra son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ); NS=  $P > 0.05$ .

**Tabla 4.4.** Efecto de la suplementación dietaria (dietas de maíz) de antibiótico promotor del crecimiento (APC o Avilamicina), levaduras de *S. cerevisiae* y sus constituyentes (extractos y paredes celulares), sobre los parámetros productivos de pollos de engorde: peso vivo, ganancia de peso por día (GPD), consumo de alimento por día (CAD) e índice de conversión alimenticia (ICA). Experimento 2.

Tratamiento	0-14 días				14-39 días				0-39 días			
	Peso				Peso				GPD	CAD	ICA	Mortalidad
	promedio	GPD	CAD	ICA	promedio	GPD	CAD	ICA				
(g)	(g)	(g)	(g/g)	(g)	(g)	(g)	(g/g)	(g)	(g)	(g/g)	(%)	
<i>Control</i>	326	20.1	30.4	1.519 <sup>b</sup>	1950	65.0	112.6	1.732	48.9	82.0	1.678	6.1
<i>APC</i>	331	20.4	29.1	1.429 <sup>a</sup>	1999	66.7	114.0	1.708	50.1	81.9	1.633	3.0
<i>Levadura-1</i>	347	21.6	30.4	1.414 <sup>a</sup>	2010	66.5	117.5	1.766	50.4	83.7	1.662	12.1
<i>Levadura-2</i>	323	19.8	30.3	1.527 <sup>b</sup>	1987	66.6	114.4	1.718	49.8	83.8	1.683	7.6
<i>Levadura-3</i>	333	20.6	30.3	1.475 <sup>ab</sup>	1986	66.1	115.1	1.740	49.8	83.0	1.666	9.1
<i>Extracto</i>	335	20.7	30.5	1.473 <sup>ab</sup>	2003	66.7	113.5	1.703	50.2	82.1	1.637	9.8
<i>Pared celular-1</i>	336	20.8	29.9	1.439 <sup>a</sup>	2012	67.0	117.2	1.748	50.4	83.9	1.666	8.3
<i>Pared celular-2</i>	333	20.6	29.6	1.441 <sup>a</sup>	2014	67.2	115.4	1.717	50.5	82.5	1.635	8.3
<i>Error est. Media</i>	15.5	1.10	1.27	0.058	61.1	0.94	2.06	0.020	1.57	3.89	0.059	2.28
<i>Probabilidad (F)</i>	NS	NS	NS	0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Los parámetros evaluados son el resultado de promedios obtenidos de seis réplicas por cada tratamiento de 22 aves de 0 a 24 días, y 14 aves de 24 a 42 días.

<sup>a, b, c</sup> Dentro de una misma columna, medias con distinta letra son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ); NS=  $P > 0.05$ .



**Tabla 4.5.** Valores promedio por día del consumo de agua en relación al consumo de alimento y de la viscosidad intestinal (contenido ileal), de pollos de engorde alimentados con una dieta control libre de aditivos y dietas con APC (avilamicina), levaduras de *S. cerevisiae* y sus componentes (extractos y paredes celulares).

<i>Tratamiento</i>	Dieta trigo-cebada-centeno (Exp.1)		Dieta maíz (Exp.2)	
	Consumo	Viscosidad	Consumo	Viscosidad
	agua/alimento (g/g)	contenido intestinal (cps)	agua/alimento (g/g)	contenido intestinal (cps)
<i>Control</i>	1.89	7.50	1.89	2.60
<i>APC</i>	2.03	7.27	1.91	2.13
<i>Levadura-1</i>	1.96	6.02	1.86	2.31
<i>Levadura-2</i>	2.01	6.29	1.93	2.36
<i>Levadura-3</i>	2.01	6.92	1.96	2.52
<i>Extracto</i>	1.88	5.94	1.93	2.23
<i>Pared celular-1</i>	1.95	5.96	1.87	2.27
<i>Pared celular-2</i>	1.85	5.76	1.87	2.29
<i>Error est. Media</i>	0.21	1.38	0.09	0.30
<i>Probabilidad (F)</i>	NS	NS	NS	NS

Los parámetros evaluados son el resultado de promedios obtenidos de seis réplicas por cada tratamiento. El consumo de agua se realizó de los 28 a los 32 días en el Exp.1, y de los 34 a los 39 en el Exp. 2. La viscosidad intestinal fue medida el día 24 del ensayo.

<sup>a, b, c</sup> Dentro de una misma columna, medias con distinta letra son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ); NS=  $P > 0.05$ .

Viscosidad en cps=centipoises.

**Tabla 4.6.** Valores promedio de recuentos de colonias bacterianas del contenido ileal de pollos de engorde, alimentados con una dieta control libre de aditivos y dietas con APC (avilamicina), levaduras de *S. cerevisiae* y sus componentes (extractos y paredes celulares).

Tratamiento	Dieta trigo-cebada-centeno (Exp. 1)			Dieta maíz (Exp. 2)		
	(Log UFC/g digesta)					
	<i>E.coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>E.coli</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>
Control	6.41	0.43	8.03	6.44	7.53	6.29
APC	5.90	0.82	8.28	6.37	7.80	6.14
Levadura-1	5.70	0.73	8.02	6.31	7.79	6.04
Levadura-2	5.94	1.15	8.10	5.41	8.09	6.28
Levadura-3	6.31	0.69	8.37	6.76	8.20	6.01
Extracto	6.33	0.88	7.91	5.07	8.26	6.11
Pared celular-1	5.68	1.76	7.73	6.14	7.39	5.99
Pared celular-2	5.85	0.49	7.97	5.00	7.87	6.46
Error est. Media	0.92	0.77	0.66	1.54	0.76	0.55
Probabilidad (F)	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Los parámetros evaluados son el resultado de promedios obtenidos de seis réplicas por cada tratamiento, a los 24 días del ensayo.

<sup>a,b,c</sup> Dentro de una misma columna, medias con distinta letra son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ); NS=  $P > 0.05$ .

**Tabla 4.7.** Valores promedio de los coeficientes de digestibilidad ileal de nutrientes de pollos de engorde, alimentados con una dieta control libre de aditivos y dietas con APC (avilamicina), levaduras de *S. cerevisiae* y sus componentes (extractos y paredes celulares).

<i>Tratamiento</i>	Dieta trigo-cebada-centeno (Exp. 1)			Dieta maíz (Exp. 2)		
	Grasa	Energía	Proteína	Grasa	Energía	Proteína
	bruta (%)	bruta (%)	bruta (%)	bruta (%)	bruta (%)	bruta (%)
<i>Control</i>	73.3 <sup>ab</sup>	71.9	78.0	80.8	75.9	82.0
<i>APC</i>	77.3 <sup>a</sup>	70.7	78.8	81.5	74.8	81.5
<i>Levadura-1</i>	71.7 <sup>ab</sup>	65.9	75.6	78.7	75.5	81.2
<i>Levadura-2</i>	69.2 <sup>b</sup>	71.6	79.5	79.8	74.7	80.3
<i>Levadura-3</i>	69.1 <sup>b</sup>	69.4	77.9	82.5	76.2	81.9
<i>Extracto</i>	71.4 <sup>ab</sup>	68.8	77.5	82.6	75.5	82.2
<i>Pared celular-1</i>	74.0 <sup>ab</sup>	69.4	77.8	80.7	76.0	81.6
<i>Pared celular-2</i>	75.8 <sup>a</sup>	69.6	77.7	81.9	77.9	83.0
<i>Error est. Media</i>	4.37	2.93	2.08	2.92	1.69	1.38
<i>Probabilidad (F)</i>	0.04	NS	NS	NS	0.07	0.08

Los parámetros evaluados son el resultado de promedios obtenidos de seis réplicas por cada tratamiento, a los 24 días del ensayo.

<sup>a, b, c</sup> Dentro de una misma columna, medias con distinta letra son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ); NS=  $P > 0.05$ .

**Capítulo 5. Efectos del programa de alimentación y de la utilización de paredes celulares de levadura sobre los parámetros productivos, desarrollo de la mucosa digestiva, respuesta inmune humoral y pesos de los órganos linfoides de pollos de engorde.**

**5.1. Resumen**

Se realizó un experimento con el objetivo de evaluar el efecto de la utilización de paredes celulares de levadura (PCL) de *S. cerevisiae*, sobre el comportamiento productivo, morfología de la mucosa digestiva, respuesta inmune humoral y órganos linfoides de pollos de engorde alojados en jaulas y alimentados con distintos programas de alimentación. Para evaluar las respuestas de la utilización de PCL en la dieta, se emplearon tres programas de alimentación: programa-1) dieta única marginal en nutrientes (0-43 días) elaborada con maíz (1DM); programa-2) 2 dietas estándar en nutrientes, elaboradas con maíz (2DM), iniciación (0-21 días) y crecimiento (22-43 días); y programa-3) similar al programa-2 con dietas basadas en trigo-cebada-centeno (2DTCC). Ninguna de las dietas experimentales incluyó antibiótico promotor del crecimiento, coccidiostato o enzimas. Se utilizó un modelo factorial 3 x 2 con distribución aleatorizada, siendo un factor el programa de alimentación (1DM, 2DM y 2DTCC) y el otro la inclusión de PCL (0 y 500 mg/kg de alimento). Cada tratamiento experimental fue replicado 5 veces y cada réplica contó con 23 aves. Para evaluar la respuesta inmune de tipo humoral, las aves fueron vacunadas contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), aplicando una dosis vía agua de bebida a los 9 días (virus vivo atenuado cepa "La sota") y una segunda dosis mediante una inyección subcutánea en la región media dorsal de la tabla del cuello del ave (vacuna inactivada en emulsión) a los 14 días. Las variables digestivas y la morfología de la mucosa del yeyuno fueron evaluadas el día 22 de edad del ave. Durante los 43 días de duración de la prueba, la utilización de las PCL en los diferentes programas de alimentación mejoró el peso vivo final (+3.4%) ( $P<0.01$ ), la ganancia diaria de peso (+3.4%) ( $P<0.01$ ), y el consumo diario de alimento (+2.3%) ( $P<0.05$ ). Durante la fase de iniciación (0-21 días), la utilización de PCL mejoró el peso vivo ( $P<0.01$ ), la ganancia diaria de peso ( $P<0.01$ ) y el índice de conversión del alimento ( $P<0.001$ ); mientras que durante la fase de crecimiento (22-43 días), las PCL incrementaron el consumo diario del alimento ( $P<0.01$ ) y la ganancia diaria de peso ( $P<0.01$ ). En relación a los diferentes programas de alimentación, durante los 43 días de prueba, las aves con mayor peso vivo ( $P<0.01$ ) correspondieron a los programas 2DM y 2DTCC en relación a las aves del programa 1DM; mientras que los mejores índices de conversión del alimento ( $P<0.01$ ) se obtuvieron con el programa 2DM. A escala de la mucosa del yeyuno (interacción PCL x Programa de alimentación,  $P<0.06$ ), la utilización de PCL, incremento la altura de las vellosidades en mayor magnitud en las dietas elaboradas con maíz, alrededor del +34.2% en 1DM y +33.0% en 2DM; y en menor magnitud en el programas 2DTCC +18.0% en los grupos con PCL, ya que la sola utilización de la dietas control del programa 2DTCC provoco un estímulo de mayor altura (+21%) de las vellosidades del

yeyuno en relación al uso de dietas control con maíz (1DM y 2DM. La interacción estadísticamente significativa ( $P<0.05$ ) de los factores PCL x Programa de alimentación para el grosor de la mucina digestiva, mostró que las PCL incrementaron el grosor de la capa de mucina en las dietas con maíz en +69.3% en 1DM y +73.6% en 2DM; observándose un mayor estímulo de +88.6% en los grupos con PCL del programa 2TCC, que incluso fue significativamente mayor respecto a los efectos de las PCL en los programas 1DM y 2DM. El día 22 de experimentación, las PCL incrementaron el de forma significativa ( $P<0.01$ ) el número de células caliciformes sin importar el tipo de programa de alimentación. Por otra parte, la utilización del programa 2DTCC provocó un incremento ( $P<0.05$ ) en el número de células caliciformes de la mucosa digestiva del ave de similar magnitud al empleo del programa 2DM y mayor respecto al programa 1DM. De forma independiente a las PCL, el empleo de las dietas del programa 2DTCC, representó incrementos en la viscosidad del contenido ileal ( $P<0.0001$ ), altura de las vellosidades ( $P<0.01$ ), grosor de la capa de mucina ( $P<0.01$ ) y del número de células caliciformes ( $P<0.05$ ). Por otro lado, la utilización de PCL no afectó la respuesta de la producción de anticuerpos contra la vacuna de NDV a los 26 días posteriores a la primera vacunación, sin embargo el empleo del programa 1DM, representó un incremento ( $P<0.05$ ) en la producción de anticuerpos vacunales de NDV, con respecto a los programas con dos dietas. De hecho, la utilización de los programas 2DM y 2DTCC resultaron en incrementos de los pesos relativos del bazo (PRB) ( $P<0.05$ ) y menores valores numéricos de los pesos relativos de la bolsa de Fabricio (PRBF) respecto al empleo del programa 1DM, por lo cual, la proporción PRBF/PRB evaluada el día 36 de edad del ave, mostró un valor mayor con el empleo del programa 1DM en relación a los programas 2DM y 2DTCC.

## **5.2. Introducción**

Las paredes celulares de levadura (PCL) de *S. cerevisiae*, constituidas principalmente por polisacáridos (1,3/1,6  $\alpha$ -glucanos y manano-proteínas) (**Aguilar-Uscanda y François, 2003**), pueden ejercer efectos diversos en la salud intestinal y eficiencia productiva de pollos de engorde cuando son ingeridas de forma conjunta con el alimento (**Hooge et al., 2003; Hooge, 2004**). Los efectos positivos que las PCL ejercen sobre el crecimiento y la eficiencia alimenticia del pollo, fueron constatados con el empleo de dietas estándares elaboradas con cereales como sorgo + soja (**Arce-Menocal et al., 2005**), y maíz + soja (**Zhang et al., 2005**). Los beneficios en la salud del pollo observados por la utilización de PCL, incluyen un posible efecto de poder evitar la adhesión e invasión a la mucosa digestiva de algunas bacterias patógenas fimbrias tipo-1 específicas como *Salmonella* (**Oyfo, 1989; Spring, 2000**). Por otro lado, el empleo en la dieta de (1,3/1,6)  $\alpha$ -

glucanos purificados de PCL (*S. cerevisiae*), puede resultar en modificaciones de los parámetros inmunitarios de pollos de engorde (Guo *et al.*, 2003). En gallinas reproductoras de estirpe pesada alimentadas con PCL como fuentes de manano-oligosacáridos (MOS) en la dieta, fue reportado un efecto de mayor estimulación en la producción de anticuerpos contra el virus vacunal de la infección de bolsa de Fabricio en las gallinas y en su progenie (Shashidhara y Devegowda, 2003). Un tercer efecto de la utilización de PCL en dietas de pollos de engorde, es que las PCL pueden favorecer el desarrollo de la mucosa digestiva al incrementar la altura de las vellosidades (Santin *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005) y la actividad enzimática de algunas enzimas digestivas (Iji *et al.*, 2001). En el área de nutrición animal, la utilización de sustancias naturales con efectos nutricionales e inmunitarios cobra un especial interés ante una tendencia global de la eliminación de antibióticos APC, o por la presencia de estrés y de enfermedades infecciosas en las instalaciones avícolas (Adams, 2004; Dibner y Richards, 2004). Cabe destacar, que los efectos positivos observados en la productividad y mucosa digestiva del ave por la inclusión en la dieta de PCL, han sido obtenidos con el empleo de dietas elaboradas con cereales considerados no viscosos (maíz o sorgo). No obstante, mantener o favorecer las condiciones de salud digestivas que pueda brindarle al ave beneficios de una mejor utilización de nutrientes o respuestas ante enfermedades, podría depender de diversos factores o de sus interacciones, entre ellos: cambios de dietas o cambios en la composición de los ingredientes, desequilibrios nutricionales en las raciones y presencia de estrés (García-Rubio, 2003). En alimentación de pollos de engorda, la utilización de cereales viscosos (trigo, cebada y centeno) en la dieta, puede alterar la estructura y función de la mucosa digestiva (Campbell *et al.*, 1987; Antoniou *et al.*, 1981; Choct y Annison, 1992). Por otro lado, la presencia de estrés o estimulación del sistema inmune del ave, provoca alteraciones en su consumo de alimento y en la utilización de los nutrientes (Klasing, 1997). Con estos antecedentes se realizó un experimento con el objetivo de evaluar la eficacia de la utilización de PCL (PCL-2 previos estudios) en dietas para pollos de engorde, bajo diferentes programas de alimentación que representaron distintos escenarios alimenticios (diferentes densidades de nutrientes y tipos de cereales en las dietas). Se evaluaron los efectos que las PCL pueden ejercer sobre los parámetros productivos, la morfología de la mucosa digestiva, la respuesta inmune humoral y el peso relativo de los órganos linfoides del pollo. La pared celular de levadura 2, fue seleccionada del resto de los productos de levadura de *S. cerevisiae* evaluados en los primeros 2 estudios, debido a la mayor consistencia mostrada para estimular el crecimiento del ave respecto a la PCL-1, y también por su mayor capacidad para soportar altas temperaturas en relación a las

levaduras, en el caso de que las dietas fuesen peletizadas.

### 5.3. Material y métodos

#### 5.3.1. Animales y alojamientos

Se realizó un experimento empleando 690 pollos de engorde machos de 1 día de edad de la estirpe Ross 308. Las aves fueron alojadas en una caseta experimental limpiada y desinfectada previamente (instalaciones del Departamento de Nutrición Animal del IRTA de Mas de Bover), provista con sistema de ventilación forzada, calefacción e iluminación artificial. A la recepción las aves fueron distribuidas al azar en jaulas experimentales de 1m<sup>2</sup>, 23 aves en cada jaula. Cada jaula contó con un comedero en forma de tolva de aproximadamente 5 kg de capacidad y 2 bebederos de tetina. La temperatura dentro de la caseta a la recepción fue de 33-35° C, disminuyéndola 3° C cada semana hasta los 22° C al final de la prueba. El calendario de iluminación fue de 23 h de luz durante los primeros cuatro días, 20 h hasta los 10 días y 18 h hasta el final de la prueba. Cada día se realizaron dos inspecciones dentro de la caseta para revisar el estado general de la parvada, disponibilidad de agua y alimento, condiciones de temperatura, calefacción e iluminación y presencia de mortalidad. El agua y el alimento fueron suministrados *ad-libitum* durante todo el periodo experimental.

#### 5.3.2. Diseño y tratamientos experimentales

Se utilizó un diseño factorial 3x2 (3 programas de alimentación y utilización de PCL) con una distribución de bloques al azar, con cinco réplicas de 23 aves por cada combinación de factores. Los tres programas de alimentación fueron: programa-1) dieta única elaborada con maíz (1DM) proporcionada de 0 a los 43 días de prueba; programa-2) 2 dietas elaboradas con maíz (2DM), que incluyeron una dieta de iniciación (0-21 días) y otra de crecimiento (22-43 días); y programa-3) 2 dietas elaboradas con trigo-cebada-centeno (2DTCC), que incluyeron una dieta de iniciación (0-21 días) y otra de crecimiento (22-43 días). El otro factor fue la suplementación en la dieta de paredes celulares de levadura (PCL-2 a 0 o 500 mg/kg de alimento)<sup>i</sup>. Las dietas experimentales (**Tabla 5.1.**) fueron formuladas a niveles cercanos en el caso de la energía y proteína, y superiores para el contenido de aminoácidos, vitaminas y minerales respecto a las recomendaciones establecidas en el **NRC (1994)**. Todas las dietas experimentales fueron suministradas en forma de harina, y en su elaboración no fueron incluidos antibióticos promotores del

---

<sup>i</sup>Saf-mannan



crecimiento, anticoccidianos ni enzimas. La composición analítica de los principales ingredientes y alimentos fue estimada usando métodos estándares (**AOAC, 1990**), incluyendo materia seca (método 934.01), proteína bruta (método 968.06), grasa bruta (920.39) y energía bruta empleando una bomba calorimétrica adiabática (**DIN, 1977**). La PCL-2, utilizada en este ensayo corresponde a una cepa de *S. cerevisiae* seleccionada a partir de cepas de panadería, su composición de polisacáridos fue descrita en los 2 experimentos previos de esta tesis (estudio preliminar).

### **5.3.3. Parámetros evaluados**

Se realizaron pesajes de los animales en grupo, del alimento suministrado y del alimento sobrante para cada unidad experimental o jaula, a los días 0 (recepción), 21 y final del experimento. Posteriormente, fueron estimados los promedios por tratamiento experimental, para el peso vivo, ganancia de peso por día, consumo de alimento por día, índice de conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad. Para calcular el índice de conversión alimenticia, fueron tomados en cuenta los pesos de los animales muertos o sacrificados para la obtención de muestras durante la prueba.

#### **5.3.3.1. Digestivos**

Los días 16 y 41 de experimentación, se colocaron bandejas debajo de las jaulas de las aves para coleccionar muestras de excretas (10 muestras por jaula o lote, de 10 diferentes puntos de muestreo). Posteriormente, las muestras fueron secadas en una estufa eléctrica 103°C durante 24 horas para estimar su porcentaje de materia seca (MS). El día 22, de cada jaula experimental se seleccionaron 3 aves con un peso cercano al promedio de grupo, posteriormente las aves fueron sacrificadas con una inyección intravenosa (vena radial) de pentobarbital sódico (procedimiento experimental num. 688, aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal del IRTA). De estas mismas aves, se coleccionaron muestras de contenido digestivo y de segmentos intestinales para realizar las siguientes mediciones:

##### **5.3.3.1.1. Viscosidad del contenido intestinal**

Muestras de contenido digestivo de las secciones del ileón (divertículo de Meckel hasta 15 cm anteriores a la unión ileocecal) fueron coleccionadas y conservadas en hielo. Se realizó un pool de muestras de los tres animales por jaula, analizando una muestra por jaula y 5 muestras por cada tratamiento. Posteriormente las muestras frescas se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos a 15° C. La medición de la viscosidad del sobrenadante del contenido digestivo fue realizada manteniendo la muestra a una temperatura de 30° C,

realizando la medición después de 1 minuto en un viscosímetro Brookfield<sup>1</sup>.

#### **5.3.3.1.2. Morfología de la mucosa del yeyuno**

Para realizar la evaluación de la morfología de la mucosa del yeyuno, por cada tratamiento experimental, se tomaron muestras de 10 segmentos de intestinos (correspondientes a 10 aves) de 5 cm de longitud de la porción del yeyuno proximal (medidos a partir de los 2 cm posteriores a la porción final del asa duodenal descendente). Las muestras de yeyuno fueron fijadas en solución de Carnoy\*, deshidratadas en alcohol y sometidas a una inclusión en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes (4 a.m.) y tinción (Ausol Fase Blue/PAS) de la muestras, para la observación y medición a escala de la mucosa del yeyuno de la altura de las vellosidades, grosor de la capa de mucina, y número de células caliciformes en al menos tres vellosidades por laminilla o 30 vellosidades por tratamiento.

#### **5.3.3.2. Respuesta inmune humoral**

Para la llevar a cabo la estimación de la respuesta inmunológica de tipo humoral, todas las aves del experimento fueron vacunadas contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV o Newcastle disease virus por sus siglas en ingles), la vacunación comprendió 2 aplicaciones: la primera dosis fue aplicada el día 9 de edad de las aves, a través del agua de bebida (vacuna virus vivo atenuado cepa la Sota) y la segunda el día 14, mediante una inyección subcutánea en la porción media dorsal de la tabla del cuello del ave (vacuna inactivada en emulsión). Para evaluar los niveles de anticuerpos maternos del NDV en las aves previo a la vacunación, fueron colectadas muestras de sangre los días 0 (19 aves) y 9 de edad (30 aves) de las aves. Para evaluar la respuesta a la vacunación o respuesta humoral post-vacunación, se colectaron muestra de sangre de 18 aves por cada tratamiento experimental los días 14, 21 y 27 post-1<sup>a</sup> vacunación. La determinación de los títulos de anticuerpos contra el NDV, se realizo por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (**Beard, 1991**).

#### **5.3.3.3. Porcentajes de los pesos relativos de los principales órganos linfoides del ave**

El día 36 de edad de las aves, se seleccionaron siete aves por cada tratamiento experimental, se pesaron y sacrificaron. De estas aves, se colectaron y pesaron

---

<sup>1</sup> Brookfield digital viscometer, model LVTDVCP-II, Brookfield Engineering Laboratories, Stouhton, MA.

\* 60% de etanol absoluto, 30% de cloroformo, 10% de ácido acético glacial.

individualmente la bolsa de Fabricio, el timo (l6bulos de las porciones derecha e izquierda) y el bazo. Posteriormente, se realizaron c6lculos para expresar los pesos individuales de estos 6rganos como porcentaje relativo al peso corporal del ave.

#### 5.3.4. An6lisis estad6stico

Los datos del presente experimento fueron analizados mediante un an6lisis de varianza correspondiente a arreglo factorial 3 x 2 de los tratamientos, empleando el paquete estad6stico de SAS® (Versi3n 8.0). Un factor correspondi3 a los tres programas de alimentaci3n y el otro a la utilizaci3n de PCL. Las diferencias entre los factores estudiados, as6 como sus interacciones fueron establecidas por el test de Duncan de rango m6ltiple, a un nivel de confianza de ( $P < 0.05$ ). Previo al an6lisis estad6stico, los datos expresados como porcentajes fueron transformados a valores de arco-seno, los datos de los t6tulos de anticuerpos expresados en valores de diluciones fueron transformados a valores de Log2 y los datos de viscosidad en Ln.

El modelo estad6stico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha_i\beta_{ij}) + e_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  = Variable dependiente.

$\mu$  = Promedio.

$\alpha_i$  = Programa de alimentaci3n.

$\beta_j$  = PCL.

$\alpha\beta_{ij}$  = Interacci3n.

$e_{ijk}$  = Error residual.

#### 5.4. Resultados

##### 5.4.1. Par6metros productivos

Los resultados de productividad del presente experimento son presentados en la **Tabla 5.2**. Durante los primeros 21 d6as de experimentaci3n, la utilizaci3n de pared celular de levadura en los distintos programas de alimentaci3n result3 en una mejora de la productividad del animal en t6rminos de mayor peso promedio ( $P < 0.01$ ), ganancia diaria de peso ( $P < 0.01$ ) y un mejor 6ndice de conversi3n del alimento ( $P < 0.01$ ), en relaci3n a los animales alimentados con las dietas control. En el segundo periodo (21 a 43 d6as), el efecto positivo de las PCL se mantuvo y las aves alimentadas con pared celular incrementaron su peso vivo ( $P < 0.01$ ), la ganancia diaria de peso ( $P < 0.01$ ) y el consumo diario de alimento ( $P < 0.01$ ), sin mostrar efecto sobre el 6ndice de conversi3n del alimento. De esta manera los beneficios globales por la utilizaci3n de pared celular durante los 43

días de experimentación, fueron mayores ganancia de peso ( $P<0.01$ ) y consumos diarios del alimento ( $P<0.05$ ), observándose solo una tendencia a mejorar el índice de conversión del alimento ( $P<0.07$ ), respecto a las aves que consumieron dietas control.

Durante los primeros 21 días de experimentación, el programa de alimentación afectó el crecimiento o en su caso el peso vivo ( $P<0.01$ ) y la ganancia diaria de peso ( $P<0.01$ ) de las aves, observándose que los mejores crecimientos correspondieron al programa 2DTCC, el segundo fue para el programa 2DM y el tercero o menor correspondió para el programa 1DM, existiendo diferencias estadísticas entre los tres programas. En los primeros 21 días, los mejores índices de conversión del alimento ( $P<0.01$ ) en las aves, fueron obtenidos con los programas 2DM y 2DTCC respecto al programa 1DM. En el segundo periodo (22 a 43 días), la utilización de los programas con 2DM y 2DTCC, representaron los mejores pesos vivos finales ( $P<0.01$ ), y las ganancias diarias de peso ( $P<0.01$ ) en relación al programa 1DM. En el caso del consumo de alimento durante el segundo periodo experimental, las aves del programa 2DTCC incrementaron su consumo diario de alimento ( $P<0.01$ ) respecto a las aves de los programas con maíz (1DM y 2DM). En el índice de conversión del alimento, el empleo de los programas de alimentación 1DM y 2DTCC representaron efectos similares en este parámetro, siendo peores ( $P<0.01$ ) en relación al programa con 2DM. De los 0 a los 43 días de prueba, la utilización del programa 1DM represento menores ganancias de peso ( $P<0.01$ ) en relación a los programas 2DM y 2DTCC; a su vez, el consumo de alimento del programa 2DTCC mostró un mayor consumo diario del alimento ( $P<0.01$ ) respecto al programa con 1DM y similar al del programa con 2DM. El empleo del programa de alimentación 2DM representó mejores índices de conversión del alimento ( $P<0.01$ ) respecto a las dietas 1DM y 2DTCC. En ningún parámetro valorado se observó una interacción significativa entre los programas de alimentación y la adición de PCL.

#### **5.4.2. Variables digestivas**

Los resultados de las variables digestivas evaluadas en el presente experimento, que incluyeron las siguientes determinaciones: porcentaje de materia seca en excretas (16 y 41 días); y viscosidad y materia seca del contenido ileal (22 días) son presentados en la **Tabla 5. 3**. A los 16 días de experimentación, se observó una interacción significativa ( $P<0.05$ ) entre programa y PCL en el porcentaje de materia seca en excretas (%MSE). El contenido en MSE de los animales alimentados con TCC fue mayor que el de los animales alimentados con maíz y mientras que la adición de PCL tendió a aumentar la MSE con los programas 2DTCC y 2DM, la disminuyó significativamente en los animales del programa 1DM. A los 41 días de experimentación, se encontró un efecto significativo para el factor

programa de alimentación, en este caso, los mayores valores de % MSE ( $P < 0.01$ ) fueron para el programa de alimentación 2DTCC en comparación a los programas 1DM y 2DM. A los 22 días de prueba, los valores del % de materia seca en contenido ileal no fueron afectados ( $P > 0.05$ ) por ninguno de los dos factores evaluados en esta prueba no obstante, la viscosidad del contenido ileal fue incrementada ( $P < 0.01$ ) por el empleo del programa 2DTCC respecto a los programas 1DM y 2DM.

#### **5.4.3. Morfología mucosa intestinal**

Respecto a los datos de la morfología de la mucosa evaluada a los 22 días de prueba (**Tabla 5.4**). Tanto el empleo de la PCL como el programa alimentario modificaron de forma significativa, la altura de las vellosidades intestinales, el grosor de la capa de mucina así como el número de células caliciformes de la mucosa digestiva del yeyuno de ave. La interacción significativa ( $P < 0.06$ , PCL x Programa de alimentación) para la altura de las vellosidades de la mucosa del ave, mostró que la utilización de PCL en la dieta, incrementó la altura de las vellosidades en mayor magnitud en las dietas elaboradas con maíz, alrededor del +34.2% en 1DM y +33.0% en 2DM; en el caso de la dieta elaborada con trigo-cebada- centeno (TCC), el incremento en la altura de la vellosidad de los pollos que consumieron PCL con el programa 2DTCC fue de +18.0%. Por otra parte, la sola utilización de las dietas control TCC provocó un incremento en la altura de las vellosidades del yeyuno del ave de alrededor de un +21% en relación al uso de las dietas control elaboradas con maíz (1DM y 2DM). Respecto al grosor de la capa de mucina, la interacción estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) de los factores PCL x Programa de alimentación observada a los 22 días de prueba, mostró que la utilización de PCL en las dietas con maíz, incrementó el grosor de la capa de mucina en +69.3% en 1DM y +73.6% en 2DM; observándose un mayor estímulo en el caso del programa 2TCC o de +88.6% en los grupos con PCL, que incluso fue significativamente mayor respecto a los efectos de las PCL en los programas 1DM y 2DM. El día 22 de experimentación, las PCL incrementaron el de forma significativa ( $P < 0.01$ ) el número de células caliciformes sin importar el tipo de programa de alimentación. Por otra parte, la utilización del programa 2DTCC provocó un incremento ( $P < 0.05$ ) en el número de células caliciformes de la mucosa digestiva del ave de similar magnitud al empleo del programa 2DM y mayor respecto al programa 1DM.

#### **5.4.4. Variables inmunitarias**

En el **Tabla 5.5.**, se presentan los datos de los títulos de anticuerpos contra la vacuna del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). En relación a la respuesta a la vacunación o

medición de la inmunidad de tipo humoral en las aves, la utilización de PCL en los diferentes programas de alimentación no representó ninguna modificación significativa en la producción de anticuerpos contra la vacuna del NDV a los 14, 21 y 27 días post-vacunación. Solo en el caso del factor programa de alimentación, a los 27 días post-vacunación, fue observada una mayor respuesta ( $P < 0.05$ ) en la producción de anticuerpos (vacuna del NDV) en las aves del programa 1DM respecto a los programas 2DM y 2DTCC. Los datos de los porcentajes de los pesos relativos de los principales órganos linfoides del pollo estimados el día 36 del experimento, se presentan en la **Tabla 5. 6**. En el día 36 de experimentación, no se observaron efectos significativos de los diferentes factores evaluados en los % de los pesos relativos de la bolsa de Fabricio y timo. En el caso del % relativo del peso del bazo, se observó una interacción significativa ( $P < 0.05$ ) entre los factores estudiados (P. de alimentación x PCL), Los animales del tratamiento 1DM control presentaban un menor % del peso relativo del bazo respecto a los tratamientos 2DM control y 2DTCC control y la adición de PCL redujo significativamente el peso relativo del bazo solamente en los animales del programa 2DTCC Finalmente, la expresión de los resultados de los % relativos de los órganos linfoides de la bolsa de Fabricio (BF) y el bazo (B) en forma de proporción (%BF/%B) evaluada a lo 36 días de prueba, mostró que las aves del programa de alimentación 1DM mantuvieron una proporción mayor ( $P < 0.01$ ) al de las aves del programa 2DTCC y similar respecto al de las aves del programa 2DM.

### **5.5. Discusión**

Los resultados de este experimento, mostraron que los principales efectos observados en la productividad del pollo por la utilización de PCL en la dieta, fueron: para la fase de iniciación (0-21 días), un mayor crecimiento asociado a un mejor índice de conversión del alimento; y para la fase de crecimiento (21-43 días), un mayor crecimiento relacionado con un mayor consumo de alimento. De esta manera, los beneficios globales (0-43 días) por la utilización de las PCL en los diferentes programas de alimentación empleados en los pollos de engorde, representaron beneficios en su productividad del orden del +3.5% en el peso vivo, +2.3% en el consumo de alimento y -1.2% en el índice de conversión del alimento, en relación a los pollos alimentados con las dietas control. Aunque pocos trabajos han sido publicados acerca del uso concreto de PCL en dietas para aves, los resultados productivos de este estudio coinciden con los estudios realizados con PCL en pollos de engorde reportados por otros autores (**Santin *et al.*, 2001; 2003; Zhang *et al.*, 2005; Arce-Menocal *et al.*, 2005**). Otro hallazgo importante observado el día 22 de edad de las aves, fue que los animales alimentados con PCL incrementaron de forma

marcada la altura de las vellosidades del yeyuno respecto a las aves alimentadas con dietas control en los diferentes tipos de dietas, llegándose a observar incrementos mayores en caso de las dietas con maíz (+34% con 1DM+PCL y +32% con 2DM+PCL) y menores en las dietas con trigo (+18% con 2DTCC+PCL). Estudios realizados en pollos de engorde sugieren que una mayor altura de las vellosidades de la mucosa digestiva podría estar relacionada con un mayor crecimiento del animal, ya que la altura de la vellosidad ha sido relacionada también con el área de superficie de la vellosidad o una mayor superficie para la absorción de nutrientes (**Sklan y Noy, 2003; Wu et al., 2004**). La utilización de PCL en las dietas de las aves por un lado, pudieron haber promovido un mayor desarrollo de la mucosa digestiva del ave durante los primeros 22 días de vida, este efecto podría justificar la mejora en la eficiencia alimenticia del ave observada durante la fase inicial de la prueba (0-21 días), y en otro sentido, pudieron haber favorecido la capacidad digestiva del ave durante la fase de crecimiento (22-43 días). Este mecanismo de acción o de efecto trófico de las PCL sobre la mucosa digestiva del pollo, también fue descrito en estudios previos realizados con cereales como maíz (**Santin et al., 2001; Zhang et al., 2005**).

Un segundo aspecto observado con la utilización de PCL sobre la mucosa digestiva, fue un mayor grosor de la capa de mucina y un mayor número de células caliciformes, respecto a los grupos sin PCL. La mucina y las células caliciformes (MCC) de la mucosa digestiva forman parte de un sistema complejo involucrado en funciones de protección (ante agentes físicos, químicos y microbianos), de lubricación y del control del transporte de nutrientes del lumen intestinal a través de la pared digestiva (**Deplancke y Gasking, 2001**). Estudios en ratones sugieren que la mucina digestiva tiene un importante papel en la resistencia a la infección por *Salmonella*, observando que una reducción en el grosor de la capa de mucosidad incrementa la translocación de *Salmonella* a través de las placas de Peyer (**Sakamoto et al., 2004**). Debido a que diversos factores de tipo alimenticio y microbiano son relacionados con la activación y modificación del sistema mucina-células-caliciformes (**Dabbagah et al., 1999; Cohn et al., 1999**), en la actualidad existe una gran cantidad de dudas acerca de su funcionamiento en condiciones de normalidad o anormalidad. Probablemente, la activación del sistema MCC por parte de las PCL pudo haber representado beneficios en términos de mayor protección de la mucosa digestiva, ya que los parámetros de productividad del ave también fueron incrementados.

Por otro lado, el programa de alimentación también impactó en la morfología de la mucosa digestiva; un ejemplo fue observado con el empleo de dietas viscosas o ricas en

PNA del programa 2DTCC, que representó un incremento en la viscosidad del contenido ileal, de la altura de las vellosidades y del grosor de la capa de mucina, respecto a los programas que incluyeron dietas con maíz (1DM y 2DM). De hecho, el programa 2DTCC también incrementó el número de células caliciformes de la mucosa respecto al programa 1DM. Los efectos observados en la morfología de la mucosa digestiva del ave a causa de las dietas del programa 2DTCC, han sido bien descritos en diversos estudios en donde se emplearon cereales ricos en PNA solubles o a base de trigo, cebada (**Choct y Anninson, 1992ab; Langhout, 1998; Iji et al., 2001b**). Algunos de estos estudios sugieren que un exceso en la estimulación de la tasa de renovación celular, de la mucina y de las células caliciformes de la mucosa digestiva del animal a causa del empleo de cereales ricos en PNA, se puede reflejar en mayores pérdidas endógenas por parte la mucosa digestiva con un claro empeoramiento de la productividad del animal, y de mayores contenidos de MS en las excretas (**Piel et al., 2005**). Estas observaciones, podrían justificar el mayor o peor índice de conversión alimenticia observado en las aves del programa 2DTT respecto a las del programa 2DM y del mayor porcentaje de MS en las excretas del ave (día 41 de edad) en los pollos del programa 2DTCC respecto a los pollos de los programas con maíz (1DM y 2DM). El menor % de MS en excretas (interacción significativa  $P < 0.05$ ) observado a los 16 días en el grupo con PCL en el programa 1DM, y el menor valor numérico de la viscosidad del contenido intestinal (22 días) del grupo con PCL en las dietas del programa 2TCC, podrían sugerir que la utilización de PCL pudo favorecer las condiciones digestivas para una mejor reabsorción de líquidos. De esta manera, los efectos de las PCL sobre la mucosa digestiva del ave (altura de vellosidades y mucina) pudieron ser favorables ya que los animales mostraron también mejores crecimientos.

En este experimento, la utilización de PCL en las distintas dietas experimentales no influyó significativamente la respuesta inmune de tipo humoral o la producción de anticuerpos de la vacuna del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). De forma contraria a nuestros resultados, **Sashidhara y Devegowda, (2003)**, reportaron que la utilización de manano-oligosacáridos procedentes de PCL de *S. cerevisiae* en la dietas de aves, resultaron en mayores respuestas en la producción de anticuerpos vacunales de la infección de la bolsa de Fabricio en gallinas reproductoras y su progenie. No obstante, y de forma similar con nuestros resultados, **Shafey et al. (2001)** observaron respuestas nulas en la producción de anticuerpos vacunales del NDV en aves alimentadas con MOS en la dieta. Probablemente, las variaciones en las mediciones en las respuestas de la producción de anticuerpos ante antígenos vacunales de los trabajos de **Sashidhara y**



**Devegowda (2003)**, de **Shafey *et al.* (2001)** y los nuestros, podrían depender no solo de la utilización de PCL en la dieta, si no además, el tipo de virus vacunal o antígeno, el calendario de vacunación y/o la presencia de anticuerpos maternos, y los tiempos de monitoreo de las respuestas vacunales podrían estar involucrados. Por otro lado, los programas de alimentación ejercieron una modificación sobre las variables inmunológicas del pollo. Las dietas del programa 1DM resultaron en una menor productividad del ave, en relación a las dietas 2DM y 2DTCC, probablemente esto pudo ser consecuencia de un menor consumo de nutrientes ya que las dietas 1DM pudieron ser marginales en algunos periodos de crecimiento del ave. No obstante, las dietas 1DM también resultaron en una mayor producción de anticuerpos vacunales del NDV (día 27 post-aplicación de la 1ª vacuna) respecto a los programas de 2 dietas (2DM y 2DTCC) y en mayores valores en la proporción del peso relativo de la bolsa de Fabricio respecto al bazo, en relación al programa 2DTCC. En pollos de engorde, algunos investigadores han descrito mejoras en la optimización de la respuesta inmune del pollo mediante prácticas de restricción de la alimento (**Klasing, 1988; Juul-Madsen *et al.*, 2004**). En este estudio, el empleo del programa 1DM también pudo ejercer alguna forma de restricción del alimento y en su caso de nutrientes en las aves. **Cheema *et al.* (2003)** evaluaron dietas únicas que representaban dietas de 1957 (con niveles marginales de nutrientes) en estirpes de pollos de engorde actuales (2002), y al igual que nuestros resultados, las dietas únicas de 1957 impactaron de forma negativa en la productividad del ave, pero también incrementaron la respuesta de anticuerpos contra glóbulos rojos de borrego o respuesta inmune humoral.

La utilización de programas de restricción de nutrientes en el ave, en un sentido puede ir en perjuicio del crecimiento del ave y en otro sentido puede favorecer el estatus inmunitario del ave. Los resultados obtenidos en este estudio para los % de los pesos relativos de los principales órganos linfoides del ave, también podrían estar en concordancia con la previa aseveración. Al día 36 de edad, los mayores valores numéricos de los % de los pesos relativos de la bolsa de Fabricio (BF) y del timo correspondieron al programa 1DM, respecto a los programas 2DTCC y 2DM. Además, la utilización de la dieta control del programa de alimentación 1DM representó menores % del peso relativo del bazo en las aves, respecto a la utilización de las dietas control de los programas 2DM y 2DTCC y similares al de la dietas con PCL del programa 2DTCC. El valor del % peso relativo de la bolsa de Fabricio es utilizado como indicador del estado de la inmunocompetencia en el pollo de engorde, ya que el papel de la bolsa de Fabricio es indispensable para el correcto funcionamiento de la respuesta inmune de tipo humoral. En pollos de engorde una involución temprana de la bolsa de Fabricio puede ser asociada a

un proceso de la inmuno-supresión (**Dohms y Saif, 1984**). El bazo a su vez, forma parte importante del tejido linfoide del sistema retículo-endotelial encargado de la captación de antígenos y del desarrollo de la repuesta inmune de tipo específica hacia un antígeno. Estudios en aves describen la interrelación que existe entre la bolsa de Fabricio y el bazo, un menor tamaño del peso de la bolsa de Fabricio puede ser el resultado de la funcionalidad del bazo (**Glick, 1967**). En aves, los estímulos antigénicos pueden provocar una disminución en el peso relativo de la bolsa de Fabricio como resultado de una depleción, o por movilización de los linfocitos B de la bolsa de Fabricio hacia los órganos linfoides secundarios (**Nakamura *et al.*, 1986 y ELTayeb *et al.*, 2001**). Al parecer, la utilización de las dietas del programa 2DTCC representaron valores menores para los títulos de anticuerpos del NDV y para la proporción de los % de los pesos relativos de la BF/Bazo respecto a la utilización del programa 1DM. A pesar de que los resultados de las variables inmunitarias observadas en este estudio pudieran sugerir alguna relación entre el valor de la proporción del % del peso relativo BF/bazo y la respuesta en la producción de anticuerpos de NDV, en este trabajo no se llevo acabo algún análisis estadístico para comprobarlo. Por lo cual, estos efectos tendrían que ser corroboradas en posteriores modelos de estudios planteados de forma específica para esclarecer estas hipótesis.

### **5.6. Conclusión**

Los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales planteadas en el presente estudio, mostraron que la utilización de PCL en dietas para pollos de engorde, mejoró los índices de productividad del pollo del orden de +3.5% el peso vivo, +2.3% el consumo de alimento y -1.2% el índice de conversión del alimento en relación a la utilización de dietas control. Parte de las mejoras observadas en la productividad de las aves que consumieron PCL, podrían estar relacionadas con un mejor desarrollo de la mucosa digestiva del ave. Ya que a los 22 días de prueba, las PCL incrementaron la altura de vellosidades, el grosor de la capa de mucina y el numero de células caliciformes de la mucosa digestiva del yeyuno. A pesar de que la utilización de PCL no represento efectos en las respuestas de la producción de anticuerpos del NDV de las aves. Los resultados de este estudio, podrían sugerir un efecto de los distintos programas de alimentación empleados no solo a nivel productivo del pollo si no además, factores inmunitarios y digestivos en el ave podrían ser influenciados por el tipo de dieta empleada para su alimentación.

## 5.7. Tablas y Figuras

**Tabla 5.1.** Composición de las dietas experimentales.

Ingrediente %	Programa 1		Programa 2 dietas		
	dieta con maíz		Maíz	Trigo-cebada-centeno	
	0-42 d	0-21 d	21-43 d	0-21 d	21-43 d
Maíz	61.8	55.1	57.0	-	-
Trigo	-	-	-	42.8	53.8
Cebada	-	-	-	10.7	5.0
Centeno	-	-	-	5.0	3.6
Torta de soja (48% PB)	28.5	31.0	22.0	20.9	12.8
Soja integral extrusionada	3.0	6.0	11.7	11.5	14.0
Grasa animal (manteca)	3.0	3.5	5.2	4.5	6.4
Carbonato de calcio	1.050	1.130	0.970	1.190	1.030
Fosfato dicálcico	1.620	1.850	1.730	1.730	1.630
DL-Metionina	0.210	0.280	0.240	0.300	0.270
L-Lisina HCL	0.120	0.220	0.220	0.340	0.390
L-Treonina	-	0.050	0.080	0.120	0.160
L-Arginina	-	-	-	-	0.060
Cloruro de sodio	0.350	0.340	0.330	0.330	0.330
Colina	0.090	0.140	0.090	0.120	0.080
Minerales y vitaminas*	0.400	0.400	0.400	0.400	0.400
Análisis calculado de nutrientes					
EM (kcal/kg)	3000	3000	3200	3000	3200
PC (%)	20.0	22.0	20.0	22.0	20.0
Metionina (%)	0.51	0.60	0.54	0.60	0.54
Met + Cis (%)	0.90	1.00	0.92	0.95	0.86
Lisina (%)	1.10	1.30	1.18	1.30	1.18
Calcio (%)	0.90	1.00	0.90	1.00	0.90
Fósforo total (%)	0.63	0.69	0.65	0.68	0.64
Fósforo disponible (%)	0.40	0.45	0.42	0.45	0.42
Grasa bruta (%)	6.1	7.0	10.05	8.13	10.56

\*Un kg de alimento contiene: vitamina A, 12 000 UI; vitamina D<sub>3</sub>, 2400 UI; vitamina E, 30 mg; vitamina K<sub>3</sub>, 3 mg; vitamina B<sub>1</sub>, 2,2 mg; vitamina B<sub>2</sub>, 8 mg; vitamina B<sub>6</sub>, 5 mg; vitamina B<sub>12</sub>, 11 µg; ácido fólico, 1,5 mg; biotina, 150 µg; pantotenato de calcio, 25 mg; ácido nicotínico, 65 mg; Mn, 60 mg; Zn, 40 mg; I, 0,33 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Se, 0,15 mg; y etoxiquin, 150 mg.

**Tabla 5.2.** Efectos de la utilización de paredes celulares de levadura y de distintos programas de alimentación, sobre los parámetros de productividad\* de pollos de engorde en sus diferentes fases productivas.

<i>Periodo</i>	0 a 21 días				21 a 43 días				0 a 43 días			
	Peso				Peso							
	vivo (g)	GPD (g)	CAD (g)	ICA (g/g)	vivo (g)	GPD (g)	CAD (g)	ICA (g/g)	GPD (g)	CAD (g)	ICA (g/g)	Mortalidad (%)
<u>Pared celular</u>												
0 mg/kg	714 <sup>b</sup>	31.9 <sup>b</sup>	44.6	1.401 <sup>b</sup>	2462 <sup>b</sup>	79.4 <sup>b</sup>	137.3 <sup>b</sup>	1.729	56.2 <sup>b</sup>	90.0 <sup>a</sup>	1.602	3.8
500 mg/kg	736 <sup>a</sup>	32.9 <sup>a</sup>	44.5	1.354 <sup>a</sup>	2548 <sup>a</sup>	82.4 <sup>a</sup>	142.8 <sup>a</sup>	1.734	58.2 <sup>a</sup>	92.1 <sup>b</sup>	1.582	3.2
<u>Programa de alimentación</u>												
1 dieta maíz	699 <sup>c</sup>	31.2 <sup>c</sup>	43.9	1.412 <sup>a</sup>	2424 <sup>b</sup>	78.4 <sup>b</sup>	137.0 <sup>b</sup>	1.748 <sup>a</sup>	55.3 <sup>b</sup>	89.3 <sup>b</sup>	1.615 <sup>a</sup>	2.2
2 dietas maíz	724 <sup>b</sup>	32.3 <sup>b</sup>	44.5	1.376 <sup>b</sup>	2551 <sup>a</sup>	83.0 <sup>a</sup>	139.0 <sup>b</sup>	1.674 <sup>b</sup>	58.3 <sup>a</sup>	90.8 <sup>ab</sup>	1.558 <sup>b</sup>	3.9
2 dietas trigo-cebada- centeno	752 <sup>a</sup>	33.7 <sup>a</sup>	45.3	1.345 <sup>b</sup>	2540 <sup>a</sup>	81.3 <sup>a</sup>	144.2 <sup>a</sup>	1.773 <sup>a</sup>	58.0 <sup>a</sup>	93.0 <sup>a</sup>	1.603 <sup>a</sup>	4.3
<i>Error estándar de la media</i>	<i>10.0</i>	<i>0.48</i>	<i>0.77</i>	<i>0.015</i>	<i>34.2</i>	<i>1.3</i>	<i>2.1</i>	<i>0.020</i>	<i>0.80</i>	<i>1.14</i>	<i>0.013</i>	<i>1.8</i>
<i>Fuente de variación</i>	<i>-----Probabilidad (F)-----</i>											
Pared celular	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	0.92	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	0.73	<i>0.01</i>	<i>0.05</i>	<i>0.07</i>	0.46
Programa de alimentación	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	0.22	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	0.69
Interacción	0.26	0.26	0.80	0.20	0.23	0.14	0.40	0.53	0.23	0.49	0.31	0.61

Los parámetros evaluados son el resultado de promedios obtenidos de 5 réplicas por cada tratamiento de 23 aves de 0 a 21 días, y 14 aves de 21 a 43 días.

<sup>a-c</sup> Los promedios por factor dentro de una misma columna con diferente letra son diferentes estadísticamente a una probabilidad de P<0.05.

\*GPD = ganancia de peso por día; CAD = consumo de alimento por día; e ICA = índice de conversión alimenticia.

**Tabla 5.3.** Efectos de la utilización de paredes celulares de levadura (PCL) y de distintos programas de alimentación, sobre el contenido de materia seca en excretas y contenido digestivo y sobre la viscosidad del contenido ileal.

		% de materia seca excretas		Contenido ileal, 22 días	
		16 días	41 días	Materia seca (%)	Viscosidad, (cps)
<u>Pared celular</u>					
	0 mg/kg	20.2	17.7	21.9	4.05
	500 mg/kg	20.0	17.7	21.7	3.43
<u>Programa de alimentación</u>					
	1 dieta maíz	20.0	17.2 <sup>b</sup>	22.1	2.09 <sup>b</sup>
	2 dietas maíz	19.0	16.5 <sup>b</sup>	22.3	2.28 <sup>b</sup>
	2 dietas trigo-cebada-centeno	21.3	19.3 <sup>a</sup>	21.1	6.86 <sup>a</sup>
<i>Fuente de variación</i>		<i>Probabilidad (F)</i>			
	Pared celular	0.70	0.95	0.84	0.30
	Programa de alimentación	0.01	0.01	0.23	0.01
	Interacción	0.05	0.85	0.90	0.36
Programa*	PCL				
1DM	0 mg/kg	20.8 <sup>a</sup>	17.2	22.2	2.1
1DM	500 mg/kg	19.2 <sup>b</sup>	17.3	21.9	2.1
2DM	0 mg/kg	18.6 <sup>b</sup>	16.6	22.2	2.3
2DM	500 mg/kg	19.4 <sup>b</sup>	16.3	22.5	2.9
2DTCC	0 mg/kg	21.1 <sup>a</sup>	19.2	21.3	7.8
2DTCC	500 mg/kg	21.5 <sup>a</sup>	19.5	20.8	5.9
<i>Error estándar de la media</i>		0.42	0.57	0.80	0.70

Los promedios obtenidos por tratamiento para el % de MS en excretas son el resultado de 5 réplicas (10 muestras de excremento por réplica). Los promedios obtenidos por tratamiento para el % de MS y viscosidad del contenido ileal son el resultado de 5 réplicas (pool del contenido intestinal de 3 aves por réplica).

<sup>a-c</sup> Los promedios por factor dentro de una misma columna con diferente letra son diferentes estadísticamente a una probabilidad de  $P < 0.05$ .

\*1DM = 1 dieta de maíz; 2DM = 2 dietas basadas en maíz (iniciación y crecimiento); 2DTCC = 2 dietas basadas en trigo-cebada-centeno (iniciación y crecimiento).

**Tabla 5.4.** Efectos de la utilización de paredes celulares de levadura (PCL) y de distintos programas de alimentación, sobre la morfometría de la mucosa del yeyuno de pollos de engorde (22 días).

		Altura vellosidad ( $\mu\text{m}$ )	Grosor de la mucina ( $\mu\text{m}$ )	Células caliciformes (num)
<u>Pared celular</u>				
	0 mg/kg	1013b	38.8	399 <sup>b</sup>
	500 mg/kg	1291a	68.6	1208 <sup>a</sup>
<u>Programa de alimentación</u>				
	1 dieta maíz	1116	51.3	791 <sup>b</sup>
	2 dietas maíz	1092	51.8	807 <sup>ab</sup>
	2 dietas trigo-cebada- centeno	1248	58.0	814 <sup>a</sup>
<i>Fuente de variación</i>		<i>Probabilidad (F)</i>		
	Pared celular	0.01	0.01	0.01
	Programa de alimentación	0.01	0.01	0.05
	Interacción	0.06	0.05	0.93
Programa*	PCL			
1DM	0 mg/kg	953 <sup>d</sup>	38.1 <sup>c</sup>	384
1DM	500 mg/kg	1279 <sup>ab</sup>	64.5 <sup>b</sup>	1198
2DM	0 mg/kg	941 <sup>d</sup>	38.0 <sup>c</sup>	403
2DM	500 mg/kg	1243 <sup>b</sup>	65.6 <sup>b</sup>	1210
2DTCC	0 mg/kg	1145 <sup>c</sup>	40.2 <sup>c</sup>	411
2DTCC	500 mg/kg	1350 <sup>a</sup>	75.8 <sup>a</sup>	1217
<i>Error estándar de la media</i>		26.5	1.98	9.1

Los parámetros evaluados son el resultado de promedios obtenidos de 10 animales (al menos tres determinaciones por laminilla del intestino de un ave).

<sup>a-c</sup> Los promedios por factor dentro de una misma columna con diferente letra son diferentes estadísticamente a una probabilidad de  $P < 0.05$ .

\*1DM = 1 dieta de maíz; 2DM = 2 dietas basadas en maíz (iniciación y crecimiento); 2DTCC = 2 dietas basadas en trigo-cebada-centeno (iniciación y crecimiento).

**Tabla 5.5.** Efectos de la utilización de paredes celulares de levadura (PCL) y de distintos programas de alimentación, sobre la respuesta inmunitaria de tipo humoral contra la vacuna del virus de la enfermedad Newcastle (NDV).

		Anticuerpos vacunales del NDV (Log <sub>2</sub> )		
		días post-vacunación		
		14	21	27
<u>Pared celular</u>				
	0 mg/kg	3.71	5.72	6.21
	500 mg/kg	3.33	5.63	6.38
<u>Programa de alimentación</u>				
	1 dieta maíz	3.47	5.47	6.70 <sup>a</sup>
	2 dietas maíz	3.50	5.86	6.11 <sup>b</sup>
	2 dietas trigo-cebada-centeno	3.59	5.69	6.07 <sup>b</sup>
<i>Fuente de variación</i>		----- Probabilidad (F) -----		
	Pared celular	0.17	0.52	0.45
	Programa de alimentación	0.94	0.09	0.05
	Interacción	0.81	0.76	0.58
Programa*	PCL			
1DM	0 mg/kg	3.61	5.55	6.63
1DM	500 mg/kg	3.33	5.38	6.77
2DM	0 mg/kg	3.61	5.83	6.16
2DM	500 mg/kg	3.39	5.88	6.05
2DTCC	0 mg/kg	3.89	5.77	5.82
2DTCC	500 mg/kg	3.28	5.61	6.31
<i>Error estándar de la media</i>		0.33	0.17	0.28

Los parámetros evaluados son el resultado de promedios obtenidos de 18 observaciones (18 aves).

<sup>a-c</sup> Los promedios por factor dentro de una misma columna con diferente letra son diferentes estadísticamente a una probabilidad de P<0.05.

\*1DM =1 dieta de maíz; 2DM = 2 dietas basadas en maíz (iniciación y crecimiento); 2DTCC = 2 dietas basadas en trigo-cebada-centeno (iniciación y crecimiento).

NVD = Newcastle disease virus.

**Tabla 5.6.** Efectos de la utilización de paredes celulares de levadura (PCL) y de distintos programas de alimentación, sobre los porcentajes de los pesos relativos de los principales órganos linfoides del pollo de engorde.

		Pesos relativos en %, 36 días			
		Bazo	Bolsa de Fabricio	Timo	Bolsada Fabricio/Bazo
<u>Pared celular</u>					
	0 mg/kg	0.122	0.205	0.521	1.8
	500 mg/kg	0.107	0.219	0.480	2.1
<u>Programa de alimentación</u>					
	1 dieta maíz	0.106	0.235	0.554	2.3 <sup>a</sup>
	2 dietas maíz	0.117	0.214	0.455	1.9 <sup>ab</sup>
	2 dietas trigo-cebada-centeno	0.121	0.186	0.492	1.6 <sup>b</sup>
<i>Fuente de variación</i>		----- Probabilidad (F) -----			
	Pared celular	0.06	0.45	0.43	0.07
	Programa de alimentación	0.19	0.11	0.24	0.01
	Interacción	0.05	0.51	0.92	0.08
Programa*	PCL				
1DM	0 mg/kg	0.102 <sup>c</sup>	0.239	0.566	2.4
1DM	500 mg/kg	0.110 <sup>bc</sup>	0.231	0.542	2.2
2DM	0 mg/kg	0.124 <sup>ab</sup>	0.195	0.490	1.6
2DM	500 mg/kg	0.109 <sup>bc</sup>	0.233	0.421	2.2
2DTCC	0 mg/kg	0.139 <sup>a</sup>	0.180	0.507	1.3
2DTCC	500 mg/kg	0.103 <sup>bc</sup>	0.192	0.476	1.9
<i>Error estándar de la media</i>		0.009	0.023	0.055	0.22

Los parámetros evaluados son el resultado de promedios obtenidos de 7 observaciones (7 aves).

<sup>a-c</sup> Los promedios por factor dentro de una misma columna con diferente letra son diferentes estadísticamente a una probabilidad de  $P < 0.05$ .

\*1DM = 1 dieta de maíz; 2DM = 2 dietas basadas en maíz (iniciación y crecimiento); 2DTCC = 2 dietas basadas en trigo-cebada-centeno (iniciación y crecimiento).

NVD = Newcastle disease virus.



**Capítulo 6. Influencia de la suplementación en la dieta con paredes celulares de levadura y fracciones purificadas de beta-glucanos y manano-proteínas, sobre los parámetros productivos, desarrollo de la mucosa digestiva, respuesta inmune humoral y % de los pesos relativos de órganos linfoides y digestivos del pollo.**

**6.1. Resumen**

Dos experimentos fueron realizados para evaluar el efecto de la incorporación en la dieta de paredes celulares de la levadura (PCL) de *S. cerevisiae* y de sus principales polisacáridos purificados, beta-glucanos (BG), y manano-proteínas (MP), en los parámetros de crecimiento, digestivos y de la respuesta inmune de pollos de engorde. En el experimento-1 (Exp. 4), se incluyeron seis dietas experimentales: T-1) Dieta control (CD), T-2) DC + avilamicina (10mg/kg de alimento); T-3) DC + PCL (500 mg/kg de alimento); T-4) DC + MP (95 mg/kg de alimento) similar al contenido de MP de la PCL (500 mg) del T-3; T-5) DC + BG (145mg/kg) similar al contenido de BG de la PCL (500 mg) del T-3; y T-6) DC con MP (T-4) + BG (T-5). En el experimento-1, todos los pollos fueron vacunados al día 9 de edad vía el agua de bebida, con una vacuna virus vivo atenuado de la enfermedad de Newcastle (NDV). El experimento-2 (Exp. 5), se utilizaron cuatro grupos experimentales: T-1) Dieta del control (DC); T-2) DC + PCL (500 mg/kg de alimento); T-3) DC + MP (190 mg/kg) similar al contenido de MP de la PCL (500 mg) del T-3; y T-4) DC + BG (227 mg/kg) similar al contenido de BG de la PCL (500 mg) del T-2. En ambos experimentos se utilizaron dietas en harina elaboradas con trigo-cebada-centeno y libres de antibióticos promotores del crecimiento, drogas anticoccidias y enzimas para los cereales. Los resultados del Exp.1, mostraron que aunque los pollos que consumieron avilamicina, PCL, MP+BG y BGF tenían un mayor peso vivo respecto a los pollos que consumieron la dieta control, no fueron encontrados efectos estadísticos significativos ( $P > 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos experimentales al día 42 de experimentación. En día 23 y 36 de experimentación, la utilización de las diferentes dietas experimentales no afectó la respuesta en la producción de anticuerpos de la vacuna de NDV en los pollos. No obstante, el empleo de la dieta experimental de MP+BG purificados resultó en mayores % de los pesos relativos del timo ( $P < 0.05$ ) respecto al empleo de las dietas control, y similares respecto a la utilización en la dieta de PCL y de BG purificado (37 días de edad). Los resultados productivos del Exp. 2 (42 días de prueba), no mostraron efectos consistentes de utilización de PCL en el peso vivo de las aves, solo el índice de conversión del alimento fue numéricamente mejor o menor en los pollos alimentados con PCL, MP y BG respecto a los pollos alimentados con la dieta control. A los 21 días de prueba, la utilización en la dieta de PCL, MP y BG incrementó de forma significativa ( $P < 0.01$ ) la altura de las vellosidades de la mucosa del yeyuno respecto a la utilización de la dieta control. Por otra parte, el % del peso relativo del hígado fue menor ( $P < 0.01$ ) en los pollos alimentados con PCL y BG respecto a los pollos que consumieron la dieta control (21 días).

## 6.2. Introducción

La utilización de paredes celulares de levadura (PCL) en alimentación de aves, es una práctica realizada de forma común desde inicios de los años 90. Uno de los principales objetivos de esta práctica, es la de mejorar la salud intestinal del animal y por consecuencia su eficiencia productiva (Hooge, 2004; Rosen, 2005). De forma contraria a los mecanismos de la acción reportados para los APC empleados en producción animal, sustancias que pueden ejercer efectos directos sobre el control del crecimiento microbiano del tracto digestivo del animal. Los mecanismos de acción reportados en avicultura sobre la utilización de PCL, son más diversos y podrían depender de los polisacáridos estructurales presentes en la pared celular. Estructuralmente las PCL son compuestos constituidos por 3 grupos de polisacáridos: polímeros de (1,3/1,6) beta-glucanos, polímeros de manosa o manano-proteínas, y polímeros de quitina (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2004). De estos tres grupos de polisacáridos, los beta-glucanos y las manano-proteínas se encuentran en concentraciones importantes en la pared celular, pudiendo ejercer efectos diversos en la salud y productividad del animal. Acerca de las fracciones de manano-proteínas o fuentes de manano-oligosacáridos (MOS), algunos estudios en aves enfatizan sobre la capacidad de poder unirse a las fimbrias (tipo-1) de algunos patógeno bacterianos y evitar su unión y colonización a la mucosa digestiva del huésped (Spring *et al.*, 2000). Por otro lado, las fracciones de 1,3/1,6-beta-glucanos presentes en mayor concentración en la PCL, tienen la capacidad de estimular el sistema inmune innato del individuo al incrementar la actividad funcional de sus células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) (Tzianabos, 2000). Esta situación ha motivado el estudio de la aplicación de fracciones purificadas de 1,3/1,6-beta-glucanos, como una sustancia capaces de estimular el sistema-inmune diversas especies de animales (mamíferos, aves, camarones y peces) (Mansell *et al.*, 1978; Dritz, *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2003). De hecho, se sugiere que este mecanismo podría brindarle beneficios a los animales mantenidos en sistemas de producción intensivos, que pueden ser traducidos en términos de una mayor resistencia para afrontar ciertas enfermedades, o de incrementar su supervivencia bajo condiciones de estrés (Raa, 2003; Huff *et al.*, 2006). A escala digestiva, la incorporación de fracciones completas de PCL en dietas de pollos de engorde, resulta en un mayor desarrollo de las vellosidades de la mucosa digestiva del ave (Santin *et al.*, 2001; Iji *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005). En otros estudios, fue descrito que la suplementación de PCL a alimentos contaminados con micotoxinas, fue capaz de reducir los efectos adversos que las micotoxina ejercieron sobre el estado de salud y la productividad de las aves que no consumieron PCL (Stanley *et al.*, 1995; Aravind *et al.*, 2003). Aparentemente, los resultados de estas

investigaciones pueden suponer que la utilización de PCL en la dieta, podría representar una buena alternativa para mejorar el estado de salud y la eficiencia productiva del ave cuando no son utilizados APC. No obstante, los estudios en alimentación de pollos de engorde realizados con productos procedentes de PCL, muestran ser pocos, y frecuentemente la información de la composición de los polisacáridos presentes en las sustancias evaluadas es omitida. En el caso concreto de la investigación generada sobre la utilización de fracciones purificadas de manano-proteínas y 1,3/1,6-beta-glucanos en avicultura, los pocos estudios que existen se limitan al uso de beta-glucanos. Un último aspecto a considerar es que tampoco se han realizado estudios con los polisacáridos purificados (beta-glucanos y manano-proteínas) de la PCL, suministrados a las dietas de forma individual para poder indagar más sobre los mecanismos de acción de la PCL, o quizás para identificar la importancia de alguno de ellos en estos mecanismos. En los primeros tres estudios realizados en la presente tesis, fueron constatados los efectos positivos que la utilización de la PCL-2 puede ejercer en la productividad de pollos de engorde, y que pudieran estar relacionados con su capacidad para favorecer el desarrollo de la mucosa digestiva del ave. Por otro lado, fue identificada una diferencia en la eficacia de los productos de PCL (primeros 2 estudios) que pudiera ser relacionada con su composición de polisacáridos (manano-proteínas y beta-glucanos). Para indagar más acerca de los mecanismos de acción de este tipo de productos y de sus principales polisacáridos, se realizaron 2 experimentos en pollos de engorde para evaluar los efectos de la utilización de PCL-2 y de sus principales polisacáridos purificados (beta-glucanos y manano-proteínas) en dietas de pollos de engorde: en el experimento 1, se evaluaron los efectos de la utilización de las fracciones de PCL, manano-proteínas, beta-glucanos y de APC (avilamicina) sobre las variables productivas, e inmunes del ave; y en el experimento 2, se evaluaron los efectos de las fracciones de PCL, manano-proteínas, beta-glucanos sobre la morfometría de la mucosa digestiva y órganos digestivos. Uno de los objetivos de estos 2 experimentos, fue el de validar los efectos positivos observados (primeros tres experimentos) en la productividad de pollos de engorde por la suplementación de PCL-2 en la dieta; un segundo objetivo fue el de evaluar los efectos de los principales polisacáridos (manano-proteínas y beta-glucanos) de la PCL-2 en la productividad del ave, además de poder identificar la importancia de los polisacáridos sobre unos de los mecanismos de acción encontrados para la PCL-2 o de favorecer el desarrollo de la mucosa digestiva.

### **6.3. Materiales y método**

#### **6.3.1. Animales y alojamientos**

Los experimentos incluidos en este capítulo fueron realizados en las instalaciones del Departamento de Nutrición Animal del IRTA de Mas de Bover. En el experimento 1, se emplearon 828 pollos de engorde machos de 1 día de edad de la estirpe Ross 308, alojados dentro jaulas en una caseta experimental con condiciones ambientales similares a los 3 experimentos previos reportados en este trabajo. En el experimento 2, se emplearon 820 aves de 1 día de edad de la estirpe Ross 308, las cuales fueron alojadas en el suelo dentro de corrales de 4m<sup>2</sup>, con cama de viruta de pino en una distinta caseta experimental respecto a los previos experimentos. La nave experimental contó con luz artificial, calefacción de gas y sistema de ventilación natural. El programa de temperatura fue el siguiente: 32-34° C de los 0 a los 2 días de edad; 27-30° C de los 3 a los 7 días; 25-27° C durante la semana 2; 24-27° C durante la semana 3; y 22-25° C de la semana 4 al final del experimento. Respecto al programa de iluminación, durante los primeros 4 días de edad se utilizaron 23 horas de luz; 20 horas de luz hasta los 10 días y 18 horas de luz de los 10 días al final. En cada corral o lote experimental, fue incluido un 1 bebedero automático tipo campana y 2 comederos en forma de tolva (15 kg. aprox.). De forma similar a las otras pruebas cada día fueron inspeccionadas al menos 2 veces al día, las condiciones generales de la parvada y de la nave, el suministro de agua y del alimento y la presencia de mortalidad. El suministro de agua y de alimento fue *ad-libitum* durante todo el periodo experimental.

### **6.3.2. Dietas experimentales**

En la elaboración de las dietas experimentales se emplearon trigo, cebada y centeno, sus composiciones se presentan en la **Tabla 6.1**. En el experimento 1, se utilizaron dietas únicas formuladas para ser isocalóricas (3000 kcal/kg) e isoproteicas (20% proteína cruda), y el contenido de aminoácidos, vitaminas y minerales fueron incluidos a niveles cercanos o superiores a las recomendaciones del NRC-2004. En el experimento 2, se utilizaron dos dietas correspondientes a las fases de iniciación (0-21 días) y crecimiento (22-43 días) de las aves. Para la formulación de estas dietas se tomaron como referencia las recomendaciones establecidas por el **NRC (1994)**, a un nivel cercano para el contenido de energía y de proteína y a niveles superiores para el contenido de aminoácidos, vitaminas y minerales. Todas las dietas experimentales fueron elaboradas en forma de harina, sin el empleo de antibióticos promotores del crecimiento, drogas anticoccidias ni enzimas para el alimento. La composición analítica de los principales ingredientes y de las dietas experimentales fueron estimadas usando métodos estándares (**AOAC, 1990**), incluyendo materia seca (método 934.01), proteína bruta (método 968.06), grasa bruta (920.39) y energía bruta empleando una bomba calorimétrica

adiabática (DIN, 1977). Las composiciones de polisacáridos de la pared celular de levadura, y de las fracciones se presentan en la **Tabla 6.2.**

### **6.3.2.1. Experimento 1**

El primer experimento se realizó con la finalidad de evaluar el efecto de la utilización en la dieta de paredes celulares de levadura y de sus principales polisacáridos (manano-proteína y beta-glucanos) suministrados de forma individual y conjunta, sobre la productividad, respuesta inmune humoral (virus de la enfermedad de Newcastle), y de los pesos relativos de los principales órganos linfoides (bazo, timo y Bursa de Fabricio) del pollo de engorde. A la recepción, las aves fueron distribuidas al azar en jaulas dentro de la caseta experimental en seis grupos experimentales: T-1) Dieta control (DC); T-2) DC+Avilamicina (10mg/kg); T-3) DC+PCL-2 (500mg/kg); T-4) DC+manano-proteínas (95mg/kg) a una concentración similar a las manano-proteínas presentes en la PCL-2 del T-3; T-5) DC+beta-glucanos (145mg/kg) a una concentración similar a los beta-glucanos presentes en la PCL-2 del T-3; y T-6) Como el T-4 + T-5 o con similar concentración de manano-proteínas y de beta-glucanos presentes en la PCL-2 del T-3. Cada tratamiento experimental fue replicado 6 veces y en cada réplica se incluyeron 23 pollos. Para este estudio no se tomaron en cuenta los valores reales de los % de manosa y beta-glucanos, presentes en las fracciones purificadas de la PCL de manano-proteínas y beta-glucanos respectivamente. Por lo cual, los aportes de manosa y beta-glucanos de dichas fracciones fueron considerados con valores de 100% en las dietas experimentales. El día 9 de experimentación, todas las aves de la prueba fueron vacunadas vía agua de bebida con una vacuna virus vivo atenuado (cepa "la Sota") de la enfermedad de Newcastle (NDV).

Se realizaron pesajes de los animales en grupo, del alimento suministrado y del alimento sobrante por cada unidad experimental o jaula, a los días 0 y final de los experimentos (42 días). Posteriormente, se estimaron los promedios por tratamiento experimental, para el peso vivo, ganancia de peso por día, consumo de alimento por día, índice de conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad. Para calcular el índice de conversión alimenticia, fueron tomados en cuenta los pesos de los animales muertos, o sacrificados para la obtención de muestras. El día 37 de experimentación, se seleccionaron 8 aves con un peso cercano al promedio del grupo, posteriormente las aves fueron sacrificadas con una inyección intravenosa (vena radial) de pentobarbital sódico (procedimiento experimental num. 688, aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal del IRTA). De estas aves, se diseccionaron y pesaron individualmente la bolsa de Fabricio, el timo (lóbulos de las porciones derecha e izquierda) y el bazo. Posteriormente, se realizaron cálculos para

expresar los pesos individuales de estos órganos como porcentaje relativo al peso corporal del ave. Para evaluar la respuesta inmune humoral o la producción de anticuerpos del NDV, se colectaron 18 muestras de sangre de 18 aves por cada tratamiento (procedimiento experimental num. 1563, aprobado por el comité ético de IRTA) los días 23 y 36 de experimentación. La determinación de los títulos de anticuerpos del NDV, se realizó por medio de la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (falta referencia de la técnica).

### **6.3.2.2. Experimento 2**

El segundo estudio fue realizado para evaluar el efecto de utilización en la dieta de paredes en la celulares de levadura y de sus principales polisacáridos (manano-proteínas y beta-glucanos) sobre la productividad, morfología de la mucosa del yeyuno y los pesos relativos de órganos digestivos (intestino, páncreas e hígado) del ave. Para este estudio los valores de los polisacáridos de la PCL-2, manano-proteínas y beta-glucanos, fueron considerados con valores de aportes de 55% como fuentes de manosa y beta-glucanos respectivamente. En este caso, la inclusión en las dietas experimentales de las fracciones de MP y BG fue incrementada respecto al experimento 1, ya que fueron corregidos a la concentración reales de los polisacáridos de MP y de BG analizadas en las PCL-2 (**Tabla 6.2.**) A la recepción, las aves fueron distribuida al azar en cuatro grupos experimentales: T-1) Dieta control (DC); T-2) DC + PCL (500 mg/kg); T-3) DC + manano-proteínas (190 mg/kg) similar a las manano-proteínas presentes en la PCL del T-2; y T-4) DC + beta-glucanos (227 mg/kg) similar a los beta-glucanos presentes en la PCL del T-2, cada tratamiento experimental fue replicado 5 veces y cada réplica contó con 41 pollos.

Los parámetros productivos del ave fueron evaluados de forma similar al realizado en el Experimento 1. El día 21 de experimentación, todos los pollos fueron sometidos a un ayuno de 4 horas mediante la modificación del programa de iluminación de la caseta experimental. Después, por cada corral se seleccionaron y sacrificaron 10 pollos por tratamiento experimental. De estas aves, se diseccionaron y pesaron de forma individual el intestino completo (de la unión del duodeno con la molleja a la unión del recto con la cloaca), el páncreas y el hígado. La grasa abdominal adherida a estos órganos fue quitada para realizar el pesaje de cada órgano y para calcular su peso relativo expresado como porcentaje del peso corporal del ave. De las mismas aves sacrificadas, se colectaron 10 segmentos de intestinos de 5cm de longitud, correspondientes a la porción proximal del yeyuno (medidos a partir de 2cm posteriores a la porción final del asa duodenal

descendente). Las muestras de yeyuno fueron fijadas en solución de Carnoy\*, deshidratadas en alcohol, y sometidas a una inclusión en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes (4 µm) y tinción (Luxol Fast Blue/PAS) de la muestras, para la observación y medición de la altura de las vellosidades de la mucosa del yeyuno en al menos tres vellosidades por laminilla o 30 vellosidades por tratamiento.

### 6.3.3. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por Análisis de varianza (2 vías): 6 tratamientos con 6 bloques en el Exp. 1; y 4 tratamientos con 5 bloques en el Exp. 2, empleando el procedimiento GLM de SAS®. Las diferencias entre tratamientos fueron establecidas mediante el test de Duncan de rango múltiple a un nivel de confianza de (P<0.05). Previo al análisis estadístico, los datos expresados como porcentajes fueron transformados a valores de arco-seno y los datos de expresados en valores de diluciones (títulos de anticuerpos) fueron transformados a valores de Log2.

El modelo estadístico fue:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Bloque}_i + \text{Tratamiento}_j + e_{ij}$$

$Y_{ij}$  = Variable dependiente.

$\mu$  = Promedio.

$\text{Bloque}_i$  = Efecto del bloque.

$\text{Tratamiento}_j$  = Efecto del tratamiento.

$e_{ij}$  = Error residual.

## 6.4. Resultados

### 6.4.1. Experimento 1

Los resultados productivos en 42 días de experimentación del experimento 1 se presentan en la **Tabla 6.3**. Durante los 21 días de experimentación, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales para el peso, ganancia de peso y consumo de alimento de los pollos. No obstante, en este periodo (0-21 días), el índice de conversión del alimento fue incrementado ( $P<0.01$ ) en los grupos de pollos que consumieron PCL respecto a los grupos control, APC, MP y BG, sin observarse diferencias estadísticas para el índice de conversión alimenticia, entre el grupo con PCL y el grupo con MP+BG. En el segundo periodo productivo (21-42 días), los pollos de los

---

\* 60% de etanol absoluto, 30% de cloroformo, 10% de ácido acético glacial.



grupos con APC, PCL, MP, BG y MP+BG mostraron incrementos numéricos ( $P>0.05$ ) en el peso, ganancia de peso y consumo de alimento, y mejoras en el índice de conversión respecto al grupo control. Por lo cual, en 42 días de prueba, el empleo de avilamicina, PCL, fracciones de beta-glucanos y el conjunto de manano-proteínas y beta-glucanos resultó en mayores ( $P>0.05$ ) pesos y ganancias de peso numéricas en los pollos, respecto al empleo de la dieta control. Otras variables productivas como el consumo diario de alimento, índice de conversión alimenticia y mortalidad no fueron modificados ( $P>0.05$ ) por las diferentes dietas experimentales empleadas en el periodo de 0 a 43 días. Los resultados de los pesos relativos de los principales órganos linfoides y de la producción de anticuerpos de la vacunación contra el virus de la enfermedad de Newcastle de las aves se presentan en la **Tabla 6.4**. El día 37 de experimentación, la utilización de la dieta experimental con la inclusión conjunta de fracciones de manano-proteínas y beta-glucanos, resultó en mayores ( $P<0.05$ ) porcentajes de pesos relativos del timo respecto a la utilización de las dietas control, con avilamicina y con MP, y en pesos relativos del timo similares al empleo de las dietas con beta-glucanos y PCL. A pesar de que los % de los pesos relativos de la bolsa de Fabricio y el bazo no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes dietas experimentales ( $P>0.05$ ), el empleo de avilamicina, PCL y las fracciones (MP, BG y MP+BG) de PCL mostraron mayores % de pesos relativos de la bolsa de Fabricio respecto al empleo de la dieta control. Por otro lado, los mayores valores numéricos del % del peso relativo del bazo se obtuvieron con el empleo de las PCL y las fracciones (MP, BG y MP+BG) de PCL respecto a la utilización de las dietas control y con avilamicina. Las estimaciones de la producción de anticuerpos del NDV realizadas los días 23 y 36 de experimentación, no mostraron cambios estadísticamente significativos ( $P>0.05$ ) debidos a la utilización de las distintas dietas experimentales.

#### **6.4.2. Experimento 2**

Los resultados obtenidos en 42 días de prueba para los parámetros productivos del experimento 2 se presentan en la **Tabla 6.5**. En el período de 0-21 días, los pesos promedio, ganancias de peso y consumos de alimento en los pollos no se vieron afectados por el empleo de las distintas dietas experimentales ( $P>0.05$ ). Por otra parte, el índice de conversión alimenticia mostró una mejora numérica ( $P>0.05$ ) en los grupos con MP y BG respecto al grupo control. Durante el segundo periodo de 21 a 42 días, los grupos con PCL, MP y BG mostraron menores valores numéricos ( $P>0.05$ ) de consumo de alimento en relación al grupo control por lo cual, se continuaron observando las mejoras numéricas ( $P>0.05$ ) en el índice de conversión alimenticia de los pollos que consumieron MP, BG y

PCL respecto al grupo control. No obstante, los pesos y las ganancias de peso de los pollos no mostraron cambios ( $P>0.05$ ) por el empleo de las distintas dietas experimentales. En el periodo experimental completo (0-42 días), la ganancia de peso, el consumo diario de alimento y la mortalidad no fueron afectados estadísticamente ( $P>0.05$ ) por el empleo de alguna de las dietas experimentales. En 42 días de prueba, los pollos alimentados con PCL, manano-proteínas y beta-glucanos mostraron valores numéricos mejores ( $P>0.05$ ) en el índice de conversión del alimento respecto a los pollos que consumieron la dieta control. Los resultados de la altura de las vellosidades de la mucosa del yeyuno y de los porcentajes de los pesos relativos de los órganos digestivos del pollo evaluados el día 21 de edad, se presentan en la **Tabla 6.6**. A los 21 días de prueba, los pollos alimentados con las dietas que incluyeron PCL, manano-proteínas y beta-glucanos incrementaron de forma significativa ( $P<0.01$ ) la altura de las vellosidades de la mucosa del yeyuno, respecto a los pollos alimentados con la dieta control. Los porcentajes de los pesos relativos del intestino y del páncreas no fueron afectados estadísticamente ( $P<0.05$ ) por la utilización de ninguna de las dietas experimentales. No obstante, el empleo de la PCL y de las fracciones de beta-glucanos en las dietas de los pollos resultaron en menores porcentajes de los pesos relativos del hígado ( $P<0.01$ ), en relación al empleo de la dieta control o la dieta con MP.

### 6.5. Discusión

En el experimento 1, durante el periodo de 21 días de prueba, los pollos que consumieron PCL mostraron un incremento en el índice de conversión alimenticia de forma similar al del grupo con MP+BG, y mayor respecto a los grupos control, APC, MP y BG. De forma contraria con nuestros resultados, en un estudio reciente (**Zhang *et al.*, 2005**) con el empleo de dietas de maíz (nivel estándar en nutrientes) suplementadas con 3 kg/ton de PCL, encontraron mejoras en el índice de conversión alimenticia en los pollos que consumieron PCL durante 21 días. En nuestras propias experiencias con el empleo de dietas con trigo-cebada-centeno, la suplementación de PCL mostró mejorar el índice de conversión de pollos de engorde de 21 días de edad con dietas estándares en nutrientes, y aves desafiadas con la vacuna del virus de la enfermedad de Newcastle (capítulo 5); y no efectos a edades más tempranas (14 días) con el uso de dietas marginales en nutrientes (similar a la empleada en este estudio) y animales no desafiados (capítulo 4). Basados en estos hallazgos, podría recalcarse la importancia de las interacciones que pueden ocurrir entre las características de la dieta, y la presencia de desafíos inmunitarios en la eficacia de los productos de PCL para mejorar la productividad de los pollos. Los resultados del índice de conversión de los pollos durante los primeros 21 días de prueba,

podrían sugerir una mayor estimulación en los grupos con PCL y MP+BG, esta mayor estimulación coincide con los mayores porcentajes de pesos relativos del timo encontrados en los mismo grupos experimentales. Efectos que podrían sugerir una posible mayor estimulación de las PCL y MP+BG a escala inmunitaria del ave, situación que corroboraría que estimular el sistema inmune puede ser incompatible con una mejor eficiencia alimenticia del individuo (**Klasing, 1987**). No obstante, habría que considerar la importancia de la dieta, la cual fue elaborada con cereales viscosos, única y marginal en nutrientes, factor que aunado con el estrés ocasionado por la vacunación, pudo haber predispuerto un desequilibrio nutricional en estos grupos de aves. Por otra parte, en aves jóvenes la aplicación de una primera vacuna de Newcastle virus vivo, puede considerarse un manejo agresivo ya que generalmente este tipo de vacunación ocasiona reacciones post-vacunales severas y menor producción de títulos de anticuerpos, ambas situaciones fueron observadas en este estudio. De hecho, en el siguiente periodo (21-42 días) los mayores valores numéricos del peso, ganancias de peso y consumos de alimento en los grupos con APC, PCL, BG y MP+BG, podrían sugerir un efecto compensatorio post-vacunación o post-inmunoestimulación. Efecto que coincide con el descrito en mamíferos jóvenes que fueron sometidos a un proceso de desafío o estrés inmunitario (**Samuels y Baracos, 1995**).

En 43 días de prueba, los pollos alimentados con avilamicina en la dieta, incrementaron su productividad en un +5% crecimiento, +2.6% consumo de alimento y -2.4% índice de conversión del alimento respecto a los pollos alimentados con la dieta control. Aunque estos efectos no fueron estadísticamente significativos, si mostraron estar dentro del rango reportado para los efectos del empleo de APC en la dieta de pollos de engorde. **Rosen (1995)** y **Bedford (2000)**, sugirieron que los efectos globales observados en la productividad del ave debidos a la utilización de APC en sus dieta, son de entre +3 y +4% (rango de 0 a 5%) en el crecimiento respecto al uso de dietas sin APC. En el experimento 1, la inclusión en la dieta de las aves de PCL, beta-glucanos y BG+MP representaron incrementos numéricos en el crecimiento del ave de alrededor del +3% respetan a grupo de control. En el segundo experimento, no se observaron efectos claros en el crecimiento de los pollos cuando se utilizaron PCL, MP y BG en sus dietas. En relación al primer estudio, habría que mencionar que el empleo de dietas marginales en nutrientes, un menor numero de animales alojados en jaulas y desafiados con la vacuna de Newcastle, pudieron favorecer mayores condiciones de estrés que pudieron incrementar la variación de los resultados productivos, por lo cual los efectos positivos encontrados para el APC y los productos de PCL no llegaron a ser significativos. En el experimento 2, la

suplementación de PCL, MP y BG represento una mejora numérica del índice de conversión alimenticia del pollo de -2.7%, -3.6% y -4.6% respectivamente, en relación al empleo de la dieta control. Recientemente, algunos investigadores realizaron estimaciones de los beneficios globales en la productividad del pollo de engorde por la utilización de MOS de PCL de *S. cerevisiae* en la dieta, estas estimaciones fueron realizadas a partir de revisiones de literatura reportadas para el empleo de PCL como fuentes de MOS y evaluadas por medio de meta-análisis, los resultados encontrados sugirieron que la utilización de MOS puede representar efectos en la productividad del ave de: +1.6% peso corporal y -2.0% en el índice de conversión del alimento de acuerdo a **Hooge, 2004**; o de +1.5% pesos corporal y de -2.1% en el índice de conversión del alimento de acuerdo a **Rosen, 2005**. En la relación a éstas estimaciones, nuestros resultados con PCL y sus polisacáridos no solo muestran ser positivos, sino además son mejores que los reportados por **Hooge, 2004** y **Rosen, 2005**.

Los resultados del experimento 1, no mostraron efectos en la producción de anticuerpos del NDV (post-vacunación) en los pollos de engorde, debidos a la utilización de PCL, MP y BG en la dieta. Algunos trabajos realizados con pollos de engorde (**Santin et al., 2003**; **Shafey et al., 2001**) mostraron efectos similares a los obtenidos en nuestros estudios, o de pobres efectos de estimulación de la producción de anticuerpos del NDV por la utilización en la dieta de PCL. Por otro lado, **Guo et al., 2003**, encontraron que la utilización en la dieta de beta-glucanos purificados de PCL, representó un incremento de la producción de anticuerpos contra glóbulos rojos de borrego inoculados a los pollos de engorde. Estos hallazgos podrían sugerir un efecto de estimulación de la respuesta inmune humoral en el pollo, por parte de las fracciones de beta-glucanos procedentes de PCL y administradas en la dieta. Nuestros resultados con el empleo de fracciones de beta-glucanos no pudieron corroborar este efecto con la vacuna del NDV. En el caso del empleo de fracciones de manano-proteínas, la carencia de información sobre su utilización en alimentación de pollos de engorde hace difícil hacer alguna comparación. A escala de los órganos linfoides del ave, el primer experimento mostró que los pollos alimentados con fracciones de MP+BG incrementaron el peso relativo del timo respecto a los pollos alimentados con las dietas control, avilamicina y MP. Por otro lado, los efectos de la incorporación de MP+BG en el timo de las aves, fueron semejantes a los obtenidos en los pollos que consumieron PCL y BG en la dieta, sugiriendo que la fracción de BG de las PCL pudieran ser las responsables de la modificación del tamaño del timo. Un aumento del tamaño del timo podría ser el resultado de una mayor estimulación antigénica a escala digestiva, los estímulos antigénicos pueden provocar una modificación de los pesos

relativo de los órganos linfoides como resultado de la movilización de linfocitos (**Nakamura *et al.*, 1986** y **ELTayeb *et al.*, 2001**). De hecho en aves, se considera que los linfocitos T de la mucosa digestiva tienen un origen tímico (**Back, 1970 ab**). De acuerdo a **Ferket *et al.* (2002)**, las PCL suministradas en la dieta del ave pueden ejercer un efecto de antígeno microbiano no patógeno y estimular el sistema inmune asociada al tracto digestivo, ejerciendo un efecto similar al de un adyuvante. Estudios realizados en mamíferos, sugieren que algunos de los efectos que ejerce el contenido microbiano del tracto digestivo sobre el sistema inmunitario del animal, involucra una estimulación y un mayor desarrollo del tejido linfóide asociado al tracto digestivo y sistémico (**Pabst *et al.*, 1988**). En un sentido, los animales mantenidos en ambientes convencionales presentan un mayor desarrollo de las placas de Peyer de la mucosa digestiva respecto a los animales mantenidos en condiciones libres de microorganismos (**Pabst *et al.*, 1988**; **Rothkötter *et al.*, 1991**). Además, los animales libres de microorganismos muestran también un menor desarrollo del timo respecto a los animales mantenidos en ambientes convencionales (**Bealmear, 1980**). Estas aseveraciones podrían explicar los menores pesos relativos del timo de las aves del grupo control y en concreto de las aves alimentadas con APC (avilamicina). Ya que hasta la fecha, los mecanismos de acción establecidos para el empleo en la dieta de sustancias antibióticas promotoras del crecimiento, recaen sobre el control de ciertos microorganismos del tracto digestivo del ave, y de evitar una excesiva estimulación sobre el sistema inmunitario a escala digestiva por parte de estos microorganismos (**Roura *et al.*, 1992**).

En este estudio, las aves alimentadas con dietas que incluyeron PCL, MP, BG, y MP+BG incrementaron de forma numérica también los pesos de la bolsa de Fabricio y del bazo respecto a las aves alimentadas con las dietas control. La aseveración de que las partículas dietarias presentes puedan estimular el desarrollo de los órganos linfoides del ave no parece extraña, si consideramos que en el previo capítulo de esta tesis, fue observado que la utilización de dietas con diferente composición de cereales (viscosos y no viscosos), provocaba modificaciones en los pesos relativos de la bolsa de Fabricio y bazo del ave. Otros ejemplos con PCL, son los **Ao *et al.* (2004)**, quienes reportaron que las fracciones completas de PCL, incrementaron de forma numérica los pesos relativos de la bolsa de Fabricio de pollos de engorde. En otros estudios (**Guo *et al.*, 2003**), fue observado un incremento significativo en los pesos relativos del bazo y de la bolsa de Fabricio y un incremento numérico para el peso relativo del timo de pollos de engorde que consumieron fracciones de beta-glucanos (*S. cerevisiae*) en la dieta.

En el segundo experimento, a los 21 días de prueba, fue observado un efecto de estimulación del desarrollo de las vellosidades de la mucosa digestiva del yeyuno en las aves que consumieron PCL, manano-proteína y beta-glucanos en la dieta. Estos resultados no solo concuerdan con los resultados obtenidos para el empleo de PCL en dietas de pollos realizados por **Santin et al. (2001)** y **Zang et al. (2005)** y los nuestros (capítulo 5), sino además sugieren que la utilización de las fracciones purificadas de beta-glucanos y manano-proteínas en dietas de pollos también pueden ejercer este efecto (desarrollo de mucosa digestiva). La carencia de literatura sobre los efectos de estas sustancias (beta-glucanos y manano-proteínas) en la mucosa del ave, no nos permitió realizar alguna comparación o aclaración sobre este efecto. Probablemente, el haber favorecido el desarrollo de la mucosa digestiva del ave con la utilización de PCL, MP y BG en la dieta, pudo resultar en una mejora del índice de conversión del alimento observado en estos mismos grupos experimentales durante los 42 días experimentación. Algunos autores sugieren que una mayor altura de vellosidad puede estar asociada a una mayor superficie de la misma, con posibles beneficios en la capacidad digestiva del ave al aumentar el área absorptiva de la mucosa (**Sklan y Noy, 2003; Wu et al., 2004**). En el segundo experimento, se observó que los pollos alimentados con PCL y BG, mostraron pesos relativos del hígado menores en relación a las aves de los grupos control y suplementados con MP. Aunque, la interpretación de esta observación es difícil de esclarecer, estudios realizados en pollo de engorde han sugerido que un incremento en el peso del hígado puede estar asociado a un efecto hepatotóxico (**Kubena et al., 1997; Aravind et al., 2003**) o respuesta inflamatoria en la fase aguda, ya que el hígado es el sitio donde se realiza la síntesis de proteínas de fase aguda (**Xie et al., 2000**). Las fracciones de PCL y los BG, pudieron ejercer efectos indirectos en el la salud del ave, al evitar posibles agresiones al hígado por parte de factores externos no contemplados en el diseño experimental (presencia de bacterias patógenas o toxinas). En pollos de engorde, los mecanismos de acción de las PCL y sus polisacáridos a escala digestiva, incluyen efectos de exclusión de bacterias patógenas (**Spring, 2000**) y micotoxinas (**Santin et al., 2003; Stanley et al., 2004; Karaman et al., 2005**), probablemente estos efectos podrían representar beneficios en el estado de salud del animal. De hecho, en un estudio reciente (**Jouany et al., 2005**), se sugiere que las PCL pueden aliviar los efectos colaterales del consumo de micotoxinas, al poder ejercer interacciones químicas de absorción entre la PCL y las micotoxinas, que podrían involucrar en mayor magnitud a las fracciones de beta-glucanos, polisacáridos presente en una mayor cantidad en la PCL.

Los resultados del experimento 1, sugirieron que la utilización de forma individual de

fracciones de BG en dietas para pollos engorde causo efectos similares a los obtenidos con el empleo de las PCL de forma completa, o reconstituida con sus fracciones de polisacáridos purificados (MP+BG). Esta apreciación no parece extraña si tomamos en cuenta los estudios de **Guo et al. (2003)** y (**Huff et al. 2006**), quienes utilizando beta-glucanos purificados de *S. cerevisiae* a niveles de inclusión dietarios (de 20 a 40mg/kg de alimento) menores en relación con nuestros estudios, observaron efectos en la productividad, sistema inmunitario, y pesos relativos del corazón e hígado de pollos de engorde (**Guo et al., 2003; Huff et al., 2006**). De hecho, en los estudios de **Huff et al. (2006)**, de forma similar con nuestros resultados, la suplementación de beta-glucanos a 20 mg/kg de alimento resulto en menores porcentajes de pesos relativos del hígado de pollos de engorde. Probablemente, la menor eficacia observada para las fracciones de MP o fuentes de manano-oligosacáridos, podría relacionarse con su menor dosificación en las dietas de los pollos. Las dosificaciones recomendadas en alimentos para las aves de aditivos de PCL o MOS son de 0.5 a 2.0 g/kg de alimento (**Hooge, 2004**). No obstante, a pesar de que una buena parte de la literatura acerca del empleo de componentes de la pared celular de *S. cerevisiae* describe a las PCL como una fuente de manano-oligosacáridos (MOS), la comparación entre MOS o PCL y de fracciones purificadas de manano-proteínas no sería la más adecuada. Ya que como puede observarse en la **Tabla 6.2.**, incluso las fracciones purificadas de manano-proteínas muestran un porcentaje de manosa de 55%, el cual sería dependiente del grado de purificación de las moléculas. Por otra parte, en el experimento 2, la utilización de fracciones de manano-proteínas a 190 mg/kg de alimento de pollos de engorde ejerció efectos en la mucosa digestiva del pollo, situación que puede sugerir un efecto de las MP incluso a bajas dosis. La importancia de incluir más información acerca del origen, definición y concentraciones de polisacáridos (MP y BG) de los productos de PCL que son evaluados en alimentación de aves, podría brindar beneficios en el esclarecimiento de sus posibles mecanismos de acción y en la optimización de su utilización en las dietas.

### 6.6. Conclusión

Los resultados de estos estudios indicaron que el uso de PCL y de MP + de BG sólo representaron efectos positivos numéricos en los parámetros productivos del pollo de engorde. A escala inmunitaria, el peso relativo del timo fue incrementado con el empleo de MP+BG en la dieta respecto al empleo de una dieta sin aditivos, avilamicina o MP. Por otro lado, la utilización de PCL y BG representaron pesos más ligeros de los hígados en los pollos de engorde. Además, la suplementación en la dieta de PCL, MP y BG representaron un estímulo en el desarrollo de las vellosidades intestinales a escala de la mucosa del

yeyuno de los pollos de engorde. Los resultados de estos estudios podrían sugerir un mayor efecto de la fracción de beta-glucanos en los mecanismos de acción de la PCL completa. Probablemente, los efectos positivos de las PCL y BG observados en los pesos relativos de los órganos linfoides e hígado, y en la mucosa digestiva del pollo podrían estar relacionados con una mejora del estado de salud del ave.



## 6.8. Tablas y Figuras

Tabla 6.1. Composición de las dietas experimentales.

Ingrediente %	Experimento 1	Experimento 2	
	0-42 d	0-21 d	21-42 d
Maíz	-	-	-
Trigo	43.7	38.0	51.9
Cebada	15.0	12.5	6.3
Centeno	5.0	5.0	2.5
Torta de soja (48% PB)	18.6	23.2	15.3
Soja extrusionada	11.0	12.0	14.0
Grasa animal (manteca)	3.0	4.8	5.8
Carbonato de calcio	1.181	1.200	1.000
Fosfato dicálcico	1.451	1.700	1.600
Almidón de maíz	-	0.200	0.200
DL-Metionina	0.261	0.270	0.210
L-Lisina HCL	0.115	0.220	0.270
L-Treonina	-	0.080	0.070
Cloruro de sodio	0.300	0.320	0.320
Colina	0.005	0.110	0.060
Minerales y vitaminas*	0.400	0.400	0.400
Análisis calculado de nutrientes			
EM (kcal/kg)	3000	3000	3150
PB (%)	20.0	22.0	20.0
Metionina (%)	0.55	0.58	0.50
Met + Cis (%)	0.90	0.94	0.83
Lisina (%)	1.10	1.27	1.15
Calcio (%)	0.90	1.00	0.90
Fósforo total (%)	0.60	0.68	0.64
Fósforo disponible (%)	0.40	0.45	0.42

\*Un kg de alimento contiene: vitamina A, 12 000 UI; vitamina D<sub>3</sub>, 2400 UI; vitamina E, 30 mg; vitamina K<sub>3</sub>, 3 mg; vitamina B<sub>1</sub>, 2,2 mg; vitamina B<sub>2</sub>, 8 mg; vitamina B<sub>6</sub>, 5 mg; vitamina B<sub>12</sub>, 11 µg; ácido fólico, 1,5 mg; biotina, 150 µg; pantotenato de calcio, 25 mg; ácido nicotínico, 65 mg; Mn, 60 mg; Zn, 40 mg; I, 0,33 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Se, 0,15 mg; y etoxiquin, 150 mg.

**Tabla 6.2.** Principales constituyentes de la pared celular de levadura (*S. cerevisiae*) y de sus fracciones de polisacáridos purificadas empleadas en las dietas experimentales.

	Manosa (%)	Beta-glucanos (%)
Experimento 1		
Pared celular de levadura (PCL)	19	29
Manano-proteína (MP)	ND	ND
Beta-glucanos (BG)	ND	ND
Experimento 2		
Pared celular de levadura (PCL)	21	25
Manano-proteína (MP)	--	55
Beta-glucanos (BG)	55	--

<sup>i</sup>Expresado en base húmeda, Información proporcionada por el departamento de I+D de "Lesaffre Feed Additives" y "Bio-Springer", 103, rue Jean Jaurès B.P. 17, F-94701 Maisons-Alfort Cedex, FRANCE. *Beta-glucanos (1,3/1,6)*, la mayor parte corresponden a (1,3) *Beta-glucanos*. \*ND = no determinado.

**Tabla 6.3.** Efectos de la utilización en la dieta de avilamicina (APC), paredes celulares de levadura (PCL), manano-proteínas (MP) y beta-glucanos (BG) sobre los parámetros de productividad\* de pollos de engorde (42 días de experimentación) (**Experimento 1**).

	Control	APC	PCL	MP	BG	MP+BG	Error Estánd.	Prob. (F)
<b>0-21 días</b>								
Peso (g)	677	668	651	655	661	647	9.9	NS
GPD (g)	30.1	29.6	28.8	29.0	29.4	28.6	0.47	NS
CAD (g)	44.0	43.2	43.8	42.8	42.6	43.1	0.80	NS
ICA (g/g)	1.463 <sup>c</sup>	1.458 <sup>c</sup>	1.519 <sup>a</sup>	1.474 <sup>bc</sup>	1.452 <sup>c</sup>	1.507 <sup>ab</sup>	0.013	0.01
<b>21-42 días</b>								
Peso (g)	2244	2361	2313	2284	2312	2310	37.2	NS
GPD (g)	74.6	80.6	79.2	77.6	78.6	79.2	1.64	NS
CAD (g)	134.2	139.8	136.8	135.1	138.4	137.3	3.49	NS
ICA (g/g)	1.800	1.733	1.727	1.741	1.762	1.734	0.022	NS
<b>0-42 días</b>								
GPD (g)	52.3	55.1	54.0	53.3	53.9	53.9	0.88	NS
CAD (g)	87.7	90.1	89.4	87.7	89.1	89.1	1.82	NS
ICA (g/g)	1.675	1.634	1.654	1.645	1.650	1.652	0.014	NS
Mort. (%)	2.0	0.0	6.0	2.8	2.0	7.7	2.45	NS

Valores promedios obtenidos de 6 réplicas (23 aves de 0 a 21 días y 13 aves de 21 a 42 día por cada réplica).

La avilamicina fue adicionada a 10 mg/kg de alimento, las PCL a 500 mg/kg, las MP a 95 mg/kg y los BGF a 145 mg/kg.

<sup>a, b, c</sup> Dentro de una misma columna, medias con distinta letra son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ); NS =  $P > 0.05$ .

\*GPD = ganancia de peso por día; CAD = consumo de alimento por día; e ICA = índice de conversión alimenticia.

**Tabla 6.4.** Efectos de la utilización en la dieta de avilamicina (APC), paredes celulares de levadura (PCL), manano-proteínas (MP) y beta-glucanos (BG) sobre los pesos relativos de los principales órganos linfoides (37 días de edad) y la producción de anticuerpos de la vacuna del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) de pollos de engorde (**Experimento 1**).

	Control	APC	PCL	MP	BG	MP+BG	Error Estándar	Prob. (F)
% del peso relativo <sup>1</sup>								
Bazo	0.115	0.118	0.138	0.123	0.143	0.149	0.01	NS
Bolsa de Fabricio	0.216	0.262	0.248	0.265	0.271	0.266	0.02	NS
Timo (%)	0.452 <sup>bc</sup>	0.433 <sup>c</sup>	0.567 <sup>ab</sup>	0.459 <sup>bc</sup>	0.489 <sup>abc</sup>	0.582 <sup>a</sup>	0.04	0.03
Promedios geométricos de los títulos de anticuerpos del NDV (Log2) <sup>2</sup>								
23 días de edad	1.08	1.11	1.22	1.50	1.72	1.56	0.26	NS
36 días de edad	1.39	1.89	1.17	1.11	1.28	1.39	0.28	NS

<sup>1</sup> Valores promedios obtenidos de 8 observaciones (8 aves); <sup>2</sup> Valores promedios obtenidos de 18 observaciones (18 aves).

La avilamicina fue adicionada a 10 mg/kg de alimento, las PCL a 500 mg/kg, las MP a 95 mg/kg y los BGF a 145 mg/kg.

<sup>a-c</sup> Los promedios por tratamiento dentro de una misma fila con diferente letra son diferentes estadísticamente a una probabilidad de  $P < 0.05$ . NS =  $P > 0.05$ .

**Tabla 6.5.** Efectos de la utilización en la dieta de paredes celulares de levadura (PCL) manano-proteínas (MP) y beta-glucanos (BG) sobre los parámetros de productividad\* de pollos de engorde (42 días de experimentación) (**Experimento 2**).

	Control	PCL	MP	BG	Error estándar	Prob. (F)
<b>0-21 días</b>						
Peso	717	723	749	734	14.2	NS
GPD (g)	32.0	32.3	33.5	32.8	0.67	NS
CAD (g)	52.3	51.9	52.6	51.3	1.18	NS
ICA (g/g)	1.635	1.608	1.569	1.562	0.029	NS
<b>21-42 días</b>						
Peso	2404	2431	2419	2430	36.2	NS
GPD (g)	80.3	81.3	79.6	80.8	1.80	NS
CAD (g)	134.1	131.6	128.4	128.4	2.15	NS
ICA (g/g)	1.672	1.619	1.616	1.596	0.028	NS
<b>0-42 días</b>						
GPD	56.2	56.8	56.5	56.8	0.86	NS
CAD	93.1	91.8	90.4	89.8	1.20	NS
ICA	1.660	1.615	1.600	1.584	0.024	NS
Mort. (%)	13.7	9.3	7.3	12.7	1.73	NS

Valores promedios obtenidos de 5 réplicas (41 aves de 0 a 21 días y 30 aves de 21 a 42 días por cada réplica).

Las PCL fueron adicionadas a las dietas a 500 mg/kg, las MP a 190 mg/kg y los BGF a 227 mg/kg.

NS=  $P > 0.05$ .

\*GPD = ganancia de peso por día; CAD = consumo de alimento por día; e ICA = índice de conversión alimenticia.

**Tabla 6.6.** Efectos de la utilización en la dieta de paredes celulares de levadura (PCL), manano-proteínas (MP) y beta-glucanos (BG) sobre la altura de las vellosidades del yeyuno (21 días de edad) y pesos relativos de algunos órganos digestivos (21 días de edad) (**Experimento 2**).

	Control	PCL	MP	BG	Error estándar	Prob. (F)
Altura de las vellosidades del yeyuno <sup>1</sup> (µm)	957 <sup>b</sup>	1159 <sup>a</sup>	1156 <sup>a</sup>	1090 <sup>a</sup>	39.1	0.0001
% del peso relativo <sup>2</sup>						
Intestino	9.5	8.9	9.4	9.7	0.25	NS
Hígado	3.4 <sup>a</sup>	2.9 <sup>b</sup>	3.4 <sup>a</sup>	3.1 <sup>b</sup>	0.08	0.0004
Páncreas	0.412	0.368	0.398	0.381	0.018	NS

<sup>1</sup>Valores promedios obtenidos de 10 segmentos de yeyuno o del promedio de la altura de 30 vellosidades.

<sup>2</sup>Valores promedios obtenidos de órganos.

<sup>3</sup> Error estándar

Las PCL fueron adicionadas a las dietas a 500 mg/kg, las MP a 190 mg/kg y los BGF a 227 mg/kg.

<sup>a-b</sup> Los promedios por tratamiento dentro de una misma fila con diferente letra son diferentes estadísticamente a una probabilidad de  $P < 0.05$ ;  $NS = P > 0.05$ .

**Capítulo 7. Efecto inmunomodulador de las Paredes Celulares de Levadura  
adicionadas en dietas de pollos de engorde inoculados con  
lipopolisacárido de E. coli.**

### **7.1 Resumen**

Con el objetivo de estudiar la capacidad de inmuno-modulación de las paredes celulares de levadura (PCL) de *S. cerevisiae*, suministradas en el alimento de pollos inoculados con LPS de *E. coli*, se realizó un experimento con 192 pollos de engorde (Ross 308) machos de 1 día de edad. Las aves se alojaron en jaulas (baterías Petersime) durante 28 días de prueba. Los tratamientos experimentales fueron asignados de acuerdo a un arreglo factorial 2x2: desafío con LPS (0 y 1 mg LPS/kg de peso vivo) y PCL en la dieta (0 y 500 mg/kg). Cada combinación de factores fue replicada 6 veces y en cada réplica se incluyeron 8 pollos al inicio. Se utilizaron dietas experimentales (maíz-trigo-cebada) en harina sin coccidiostáticos, antibióticos promotores crecimiento, ni enzimas para el alimento. Los parámetros inmunológicos se evaluaron mediante la reacción de hipersensibilidad cutánea tardía (RHCT) o respuesta inmune mediada por células, a través de la inoculación intradérmica (membrana interdigital de los dedos del ave) con fitohemaglutinina-P (PHA-P) (150 µg/ave) el día 14 de prueba. A los 14 y 21 días de experimentación, se estimaron los pesos relativos del bazo y la bolsa de Fabricio de los pollos. De 0 a 21 ( $P<0.04$ ) y 0 a 28 ( $P<0.01$ ) días de prueba, la suplementación en la dieta con PCL mejoró significativamente el índice de conversión alimenticia de los pollos de engorde. Durante los 21 días de prueba, los pollos desafiados con LPS de *E. coli* mostraron menores ( $P<0.001$ ) ganancias de peso, menores consumos de alimento ( $P<0.009$ ) y peores índices de conversión alimenticia ( $P<0.02$ ). En el día 14 de prueba, la respuesta de RHCT fue incrementada ( $P<0.004$ ) en los grupos de pollos que consumieron PCL en la dieta. A los 21 días de prueba, se observó una reducción significativa (Interacción PCLxLPS,  $P<0.03$ ) del peso relativo de la bolsa de Fabricio en los grupos inoculados con LPS respecto al grupo control, con PCL y con PCL+LPS. Los resultados de este estudio mostraron que las PCL suministradas en el alimento de pollos de engorde fueron capaces de contrarrestar los efectos adversos del estrés inmunitario por la inyección de LPS (*E. coli*) sobre la eficiencia alimenticia y reducción del % de peso relativo de la bolsa de Fabricio del ave. Estos efectos aunados al incremento de la respuesta inmune mediada por células (RHCT) por parte de las PCL de *S. cerevisiae*, podrían sugerir una capacidad inmunomoduladora de las PCL adicionadas en dietas de pollos de engorde.

### **7.2. Introducción**

La presencia de infecciones o desafíos microbianos en las granjas comerciales de pollos de engorde, ocasiona cuantiosas pérdidas económicas a la industria avícola (**Guy, 1998; Porter, 1998; McDougald, 1998**). Estas pérdidas están relacionadas con los efectos



que las enfermedades pueden ejercer sobre la productividad del ave, incremento en la mortalidad y medidas sanitarias extras para controlarlas (**Fussell, 1998; Dekich, 1998**). El correcto funcionamiento del sistema inmunitario, es esencial para defender al ave ante los desafíos microbianos o no microbianos presentes en el medio ambiente (**Klasing, 1998**). Por lo cual, la modulación del sistema inmune puede adquirir gran relevancia ante la actual situación de restricciones graduales de APC, y de medicamentos empleados en producción animal. Las PCL adicionadas en las dietas de pollos de engorde pueden servir como fuentes de polisacáridos de tipo  $\beta$ -1,3/1,6-glucano y mananoglicosacáridos (**Aguilar-Uscanga, 2003**). Los polisacáridos de tipo 1,3/1,6-beta-glucanos, presentes en mayor concentración en la PCL, tienen la capacidad de estimular el sistema inmune innato del individuo al incrementar la actividad funcional de las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) (**Abel y Czop, 1992**). De hecho, la capacidad inmuno-estimulante de los 1,3/1,6-beta-glucanos ha sido evaluada en diversas especies de animales (mamíferos, aves, camarones y peces) (**Mansell et al., 1978; Dritz, et al., 1995; Chang et al., 2000; Guo et al., 2003**). Por otra parte, en avicultura, diversos estudios muestran que la utilización de PCL en la dieta, puede representar beneficios en la productividad y estado de salud de pollos de engorde mantenidos bajo diferentes condiciones de desafíos: grandes densidades de población (**Hooge et al., 2003**); aves inmunizadas contra coccidias (**Sun et al., 2005**) y aves criadas en "camas calientes" o recicladas de animales previamente infectados con coccidias (**Stanley et al., 2004**). En nuestros experimentos previos, la utilización de PCL en dietas de pollos de engorde representó beneficios en términos de una mejor eficiencia productiva del ave; además, las PCL ejercieron modificaciones en los pesos relativos de los órganos linfoides y en la producción de mucina y células caliciformes de la mucosa digestiva en el ave, situaciones que podrían sugerir algún efecto a escala inmunitaria de este tipo de sustancias. En nutrición animal, uno de los principales interrogantes acerca del empleo de inmuno-estimulantes, es la dificultad que existe para predecir hasta que punto puede llegar a ser estimulado el sistema inmune de un individuo para mantenerlo activo y capaz de defenderlo ante desafíos medioambientales, sin que esto le represente una reducción en su crecimiento o eficiencia alimenticia (*inmunomodulación*) (**Adams, 2004**). Algunas investigaciones (**Lochmiller y Deerenberg, 2002**) sugieren que en aves silvestres y probablemente en aves domesticas, los mecanismos de defensa inmunitarios representan un costo para el huésped ya que los nutrientes derivados de los alimentos pueden redireccionarse hacia estrategias endógenas encaminadas a garantizar la supervivencia del ave y no para su crecimiento. Los lipopolisacáridos (LPS) o endotoxinas bacterianas, son consideradas sustancias con gran capacidad inmunoestimulante, estos componentes forman parte integral de las membranas externas de bacterias gram-negativas (*E. coli* y *Salmonella*)

pudiendo estar presentes de forma común en el polvo procedente del material orgánico en las granjas comerciales de aves (**Petkov y Tsutsumanski, 1975; Zucker et al., 2000**). Frecuentemente los LPS, son empleados en modelos de estudios orientados a comprobar los efectos cuantitativos de la susceptibilidad del animal ante los microorganismos patógenos presentes en el medio ambiente, y para evaluar su adaptación al estrés inmunitario (**Wang et al., 2003**). En pollos, la inoculación de LPS bacteriano resulta en menores crecimientos y consumos de alimento del ave; parte de estos efectos están relacionados con la estimulación de la producción de interleucinas (IL-1) inflamatorias de fase aguda (**Klausing et al., 1987; Mireles et al., 2005**). En un efecto contrario, recientemente **Huff et al. (2006)**, encontraron que la suplementación dietaria con  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos procedentes de PCL, fue capaz de reducir las pérdidas en la productividad de los pollos causada por la infección derivada de la inoculación con *E. coli*. Con la finalidad de indagar más sobre los mecanismos de acción de las PCL, y en concreto sobre sus mecanismos de estimulación del sistema inmune del ave, se planteó un experimento con pollos de engorde donde el objetivo fue estudiar la capacidad de inmuno-estimulación o de inmuno-modulación de las PCL suministradas en los alimentos de pollos de engorde desafiados o inmuno-estimulados con LPS de *E. coli*.

### **7.3. Materiales y método**

#### **7.3.1. Animales y alojamientos**

En el presente experimento, se utilizaron 192 pollos de engorde machos (Ross 308) de 1 día de edad. Las aves fueron alojados en jaulas (baterías Petersime) dentro una caseta experimental higienizada previamente (instalaciones del Departamento de Nutrición Animal del IRTA de Mas de Bover), y provista con sistema de ventilación forzada, calefacción e iluminación artificial. A la recepción las aves fueron distribuidas al azar en 24 jaulas, 8 aves por jaula durante los primeros 14 días, 6 aves de los 14 a los 21 días, y 5 aves de los 21 a los 28 días. La temperatura dentro de la caseta experimental fue de 32-35°C a la recepción, de 27-30°C de los 3 a 7 días, disminuyéndola 3°C cada semana hasta el final de la prueba. El calendario de iluminación fue de 23 h de luz durante los primeros cuatro días, 20 h hasta los 10 días y 18 h hasta el final de la prueba. Cada día se realizaron al menos dos inspecciones dentro de la caseta experimental para revisar el estado general de la parvada, disponibilidad de agua y alimento, condiciones de temperatura, calefacción e iluminación y presencia de mortalidad. El agua y el alimento fueron suministrados ad-libitum durante todo el periodo experimental de 28 días.

#### **7.3.2. Dietas experimentales**

Las dietas empleadas en este estudio fueron elaboradas con maíz, trigo y cebada, e incluyeron solo una fase de alimentación iniciación (0-28 días). La composición de las

dietas se presenta en la **Tabla 7.1**. Para su formulación se tomaron en cuenta las recomendaciones establecidas por el NRC (1994), a un nivel cercano para el contenido de energía y de proteína y a niveles superiores para los contenidos de aminoácidos, vitaminas y minerales. Todas las dietas experimentales fueron elaboradas en forma de harina, sin el empleo de antibióticos promotores del crecimiento, drogas anticoccidias ni enzimas para el alimento. La composición analítica de los principales ingredientes y de las dietas experimentales fueron estimadas usando métodos estándares (AOAC, 1990), incluyendo materia seca (método 934.01), proteína bruta (método 968.06), grasa bruta (920.39) y energía bruta empleando una bomba calorimétrica adiabática (DIN, 1977). La PCL empleada en este estudio, corresponde a las utilizadas en los previos experimentos denominada como PCL-2.

### **7.3.3. Tratamientos y diseño experimental**

A la recepción, las aves fueron distribuidas al azar dentro de 6 bloques. A su vez, los tratamientos experimentales fueron asignados de acuerdo a un arreglo factorial 2x2: desafío con LPS (0 y 1 mg LPS/kg de peso vivo) y PCL en la dieta (0 y 500 mg/kg), Cada combinación de factores fue replicada 6 veces y en cada réplica se incluyeron 8 pollos al inició.

### **7.3.4. Desafío o inoculación con LPS**

Para la preparación del inóculo, se utilizó lipopolisacárido de *E. coli* (LPS 055:B5, Sigma Chemical Co.) diluido en solución salina fisiológica estéril (SSFE) a una concentración de 1mg/ml de solución. El inóculo de LPS fue aplicado (1mg/kg de peso vivo) a los pollos por vía intraperitoneal el día 4 y por vía subcutánea el día 9 (**Webel *et al.*, 1998; Mireles *et al.*, 2005**).

### **7.3.5. Parámetros evaluados**

#### **7.3.5.1. Productividad de las aves**

Con la finalidad de evaluar los efectos de la suplementación de PCL e inoculación de LPS en la productividad de las aves, se realizaron pesajes de los animales en grupo, del alimento suministrado y del alimento sobrante para cada unidad experimental (jaula), los días 0, 21 y 28. Posteriormente, fueron estimados los promedios por tratamiento de los periodos de 0-21, y 21-28 días y para periodos globales de 0-21 y 0-28 días, de los parámetros siguientes: peso vivo, ganancia de peso por día (GPD), consumo de alimento por día (CAD), índice de conversión alimenticia (ICA) y porcentaje de mortalidad. Para calcular el índice de conversión alimenticia, fueron tomados en cuenta los pesos de los animales muertos o sacrificados para la obtención de muestras durante la prueba.

### **7.3.5.2. Porcentajes de los pesos relativos de los órganos linfoides del ave**

A los días 14, y 21 de experimentación se seleccionaron, pesaron y sacrificaron (procedimiento experimental num. 688, Comité Ético de Experimentación Animal del IRTA) 9 y 11 aves respectivamente por cada tratamiento experimental. De estas aves, se colectaron y pesaron individualmente la bolsa de Fabricio, el timo (lóbulo de las porciones derecha e izquierda) y el bazo. Posteriormente, se realizaron cálculos para expresar los pesos individuales de estos órganos como porcentaje relativo al peso corporal del ave.

### **7.3.5.3. Reacción cutánea para la evaluación de la prueba de hipersensibilidad tardía (Corrier y DeLoach, 1990)**

Ocho pollos de cada grupo fueron seleccionados al azar a los 14 de experimentación, las aves fueron inyectadas intradérmicamente entre el tercero y cuarto dígito de la pata derecha con 150 µg de fitohemaglutinina-P (PHA-P) en 0.10 ml de SSFE y 0.10 ml de SSFE en la pata izquierda como control. El grosor de la piel fue medido antes de la inyección y 24 horas después mediante un micrómetro o vernier. La intensidad de la reacción de hipersensibilidad cutánea tardía (RHCT) fue calculada por la siguiente ecuación:

$$\text{RHCT} = (\text{Grosor de la piel post-inyección, pata derecha}) - (\text{grosor de la piel pre-inyección, pata derecha}).$$

La reacción de hipersensibilidad cutánea tardía, es una determinación in-vivo de la inmunidad mediada por células (Corrier y DeLoach, 1990). La finalidad de utilizar este parámetro fue la de evaluar los efectos del estrés inmunitario por el LPS y el de la utilización de PCL en el estado de inmunocompetencia de ave.

### **7.3.6. Análisis estadístico**

Se empleó un diseño experimental en bloques al azar, y los datos se analizaron con un análisis de la varianza factorial 2 x 2 (desafío o no con LPS y adición o no de PCL) mediante el procedimiento GLM de SAS<sup>®</sup> (versión 8.0). Las diferencias entre tratamientos fueron establecidas por el test de Duncan de rango múltiple, a un nivel de confianza de ( $P < 0.05$ ). Previo al análisis estadístico, los datos expresados en porcentaje fueron transformados a valores de arco seno. Para los parámetros productivos la unidad experimental fue la jaula y para las demás determinaciones el animal.

El modelo estadístico fue:

---

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

$Y_{ijk}$  = Variable dependiente.

$\mu$  = Promedio.

$\alpha_i$  = desafío con LPS (*E. coli*).

$\beta_j$  = PCL.

$\alpha\beta_{ij}$  = Interacción.

$e_{ijk}$  = Error residual.

#### 7.4. Resultados

Los resultados productivos de los pollos en 28 días de prueba se presentan en la **Tabla 7.2**. En el período experimental de 0 a 21 días, se observaron menores pesos ( $P < 0.001$ ), ganancias de peso ( $P < 0.001$ ), consumos de alimento ( $P < 0.009$ ) y peores índices de conversión en los grupos desafiados con LPS. Por otra parte, los pollos que consumieron PCL mostraron mejoras ( $P < 0.04$ ) en el índice de conversión alimenticia durante este periodo productivo. A pesar de que no fue encontrada una interacción estadísticamente significativa ( $P > 0.19$ ) para los factores PCL x desafío con *E. coli* a los 21 días de prueba, los resultados podrían sugerir que las mejoras observadas en el índice de conversión de los pollos por la utilización de PCL en la dieta fueron más marcadas en los grupos desafiados con LPS. En el segundo periodo (21 a 28 días), se observaron mayores ( $P < 0.06$ ) ganancias de peso, efectos de mayores valores numéricos ( $P > 0.023$ ) de consumo de alimento y tendencia estadísticas de mejores ( $P < 0.09$ ) índices de conversión alimenticia en los pollos desafiados con LPS. Durante el periodo global de 0 a 28 días, la ganancia de peso y el consumo de alimento no mostraron efectos estadísticamente significativos para los factores PCL o desafío con LPS. No obstante, el índice de conversión de los pollos desafiados con LPS fue peor ( $P < 0.06$ ) en relación a los grupos no desafiados; mientras que la suplementación de PCL mostró mejorar ( $P < 0.01$ ) el índice de conversión alimenticia de los pollos, observándose que la mejora del índice de conversión de las aves alimentadas con PCL fue más marcado en los grupos desafiados con LPS (similar efecto al observado en los primeros 21 días de prueba).

Los resultados para parámetros inmunológicos se muestran en la **Tabla 7.3**. En los primeros 14 días de prueba no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos de pollos desafiados con LPS o alimentados con PCL. No obstante, las aves desafiadas con LPS mostraron valores numéricos mayores para el % de peso relativo del bazo y menores para el % de peso relativo de la bolsa de Fabricio y el timo. A los 21 días de prueba, se observaron incrementos numéricos en el % de peso relativo del bazo en los pollos desafiados con LPS; mientras que la interacción de factores (PCL x LPS,  $P < 0.03$ ), para el

% de pesos relativos de la bolsa de Fabricio, mostró que los pollos desafiados con LPS redujeron el peso de la bolsa de Fabricio respecto a los grupos control no desafiado, grupo no desafiado con PCL y grupo desafiado con PCL. El día 14 de edad, los pollos alimentados con PCL mostraron un incremento ( $P<0.004$ ) en intensidad de la reacción de hipersensibilidad cutánea tardía (RHCT) o respuesta inmune mediada por células. Por otra parte, los pollos inoculados con LPS incrementaron numéricamente ( $P>0.13$ ) la RHCT respecto a los pollos del grupo control o no desafiado.

### **7.5. Discusión**

Los resultados productivos de este estudio mostraron que las PCL adicionadas en dietas de los pollos de engorde, represento beneficios en el índice de conversión alimenticia durante los periodos de 0 a 21 y 0 a 28 días de edad del ave. De forma similar con nuestros resultados, **Santin et al., 2001** y **Zhang et al., 2005**, obtuvieron mejoras en el índice de conversión de pollos empleando dietas elaboradas con maíz suplementadas con 2 y 3 kg/ton de PCL de *Saccharomyces* respectivamente. Por otro parte, las aves desafiadas con la inyección de LPS de *E. coli*, mostraron empeoramientos del índice de conversión (0-21 y 0-28 días), reducciones en el crecimiento (0-21 días) y consumo del alimento (0-21 días). A escala de los órganos linfoides a los 14 días de prueba, los grupos desafiados con LPS, mostraron incrementos numéricos en el % de peso relativo del bazo y reducciones numéricas en el % de peso relativo de la bolsa de Fabricio. En los 21 días de edad, las aves desafiadas con LPS mostraron % de pesos relativos de la bolsa de Fabricio significativamente menores y valores numéricos mayores de % de pesos relativos del bazo. Nuestros resultados del modelo de inoculación con LPS en los pollos, muestran una clara similitud con otros estudios (**Klasing et al., 1987; Roura et al., 1992; Webel et al., 1998**), donde se observo que el estrés inmunitario provocado por LPS provocó una reducción del crecimiento, consumo de alimento y empeoramiento de la eficiencia alimenticia del ave. Los efectos adversos que los LPS bacterianos pueden ejercer en la productividad o salud del ave, son mediados por la producción de interleucinas inflamatorias de fase aguda (IL-1, e IL-6) (**Klasing, 1987**). En pollos se sugiere, que la reducción en el consumo del alimento causada por la acción de interleucinas inflamatorias ocasiona solo en parte las pérdidas en eficiencia alimenticia del ave, pudiendo ser considerados otros factores como incrementos en la tasa metabólica basal, cambios en la absorción de nutrientes y cambios en la acreción de tejidos corporales del ave (**Klasing, 1987**). El incremento en el peso relativo del bazo en pollos inoculados con LPS, ha sido asociado a una mayor actividad de este órgano, ya que el bazo es uno de los principales órganos linfoides involucrado en el procesamiento de antígenos (**Roura et al., 1992**). Los modelos de estrés inmunitario en pollos, muestran que la inoculación de LPS puede resultar en incrementos de los niveles séricos de IL-6 y

corticosterona en el ave (**Nakamura et al., 1998**). De hecho, en un estudio más reciente **Xie et al. (2000)**, sugirieron que la reducción en el peso relativo de la bolsa de Fabricio de pollos inoculados con LPS, puede ser consecuencia de un proceso de atrofia como resultado del estrés, por el incremento en la producción de corticosteroides estimulado por el LPS (efecto inmuno-depresor).

A pesar de que la suplementación de PCL en las dietas de las aves desafiadas no fue capaz de reducir los efectos adversos de la inoculación de LPS en su crecimiento, la utilización de PCL si pudo contrarrestar los efectos adversos del LPS (*E. coli*) sobre la eficiencia alimenticia (0-21 y 0-28 días) y sobre el proceso de reducción del tamaño de la bolsa de Fabricio (21 días) de los pollos. Estos resultados podrían corroborar las apreciaciones que se tienen acerca de muchos aditivos alimenticios entre ellos los APC, de que su eficacia para mejorar la productividad animal es mas evidentes bajo condiciones de mayor estrés o desafío microbiano. El incremento en la reacción de hipersensibilidad cutánea tardía (RHCT), observado de forma consistente en los grupos de pollos que consumieron PCL podría sugerir un mejor estado de inmunocompetencia de estas aves. La RHCT es prueba que se utiliza para evaluar de forma *in-vivo* la respuesta inmune mediada por células (respuesta inmune celular). A pesar de la carencia de estudios con PCL y sus efectos sobre la RHCT en pollos, que nos permitan llevar a cabo alguna comparación o confirmación de los resultados obtenidos en nuestro experimento, se considera que las PCL suministradas en dietas de aves, pueden ejercer un efecto de antígeno microbiano no patógeno y estimular el sistema inmune asociado al tracto digestivo (**Ferket et al., 2002**). Esta apreciación pudiera justificar el efecto de una mayor estimulación en la inmunidad mediada por células (RHCT) en los grupos con PCL. Para poder aclarar un poco más este efecto podríamos basarnos en algunos estudios en aves, donde fue demostrado que la suplementación de fracciones purificadas de 1,3/1,6 beta-glucanos procedentes de PCL en la dieta, pudo incrementar la RHCT en aves Leghorn (**Acevedo y Pedroso, 2001b**) y en pollos de engorde (**Guo et al., 2003**). Los autores de estos estudios (**Guo et al., 2003**), sugieren la probable presencia de receptores para beta-glucanos en las células fagocíticas de las aves que pudieran estar involucrados en su activación y producción de citocinas o interleucinas. En este caso, la actividad quimioatrayente de las citocinas provocaría que neutrófilos, monocitos, macrófagos y basófilos se acumularan en los sitios de inyección de la PHA-P incrementando la reacción local característica (**Chang et al., 1994**). A pesar de la carencia de trabajos realizados en pollos de engorde para comprobar los efectos de la utilización de PCL en pollos desafiados con LPS de *E. coli*, en avicultura ha sido reportado que el empleo de PCL en dietas de pavi-pollos (**Fairchild et al., 2001**) y de 1,3/1,6 beta-glucanos en dietas de pollos de engorde (**Huff et al., 2006**) pudo reducir las pérdidas en productividad de

pollos infectados con *E. coli*. Aparentemente, el estímulo o estrés inmunitario en el pollo inducido por la inoculación con LPS los días 4 y 9 de prueba, fue más marcado en los primeros 21 días de edad de las aves. En el periodo de 21 a 28 días, los pollos desafiados con LPS de *E. coli* (sin PCL y con PCL) mostraron incrementos numéricos en la ganancia de peso y en el consumo de alimento, además de mejoras numéricas en el índice de conversión respecto a las aves de los grupos no desafiados, resultados que podrían sugerir algún efecto de compensación. De forma similar con nuestros resultados, **Samuels y Baracos (1995)** describieron crecimientos compensatorios acompañados con mayores consumos de alimento en mamíferos jóvenes que habían sido sujetos a un periodo previo de estrés inmunitario. Los resultados de este estudio pudieran sugerir un efecto de anti-estrés o de inmunomodulación por parte de las PCL adicionadas a las dietas de pollos, estos efectos fueron más evidentes y ventajosos en los pollos sometidos a estrés inmunitario (inoculados con LPS de *E. coli*). No obstante, en futuras investigaciones sería importante considerar el empleo de técnicas moleculares para evaluar la capacidad inmunomoduladora de productos de PCL, e indagar aun más sobre los efectos de este tipo de aditivos empleados en dietas de pollos de engorde.

### **7.6. Conclusión**

Los resultados de este estudio pueden sugerir un efecto de inmunomodulación por parte de las PCL adicionada en las dietas de pollos, este efecto pudo corroborarse con el incremento en el estímulo de la reacción de hipersensibilidad cutánea o del estado de la inmunidad mediada por células en los pollos que consumieron PCL. El estrés inmunitario inducido en los pollos por la inoculación de LPS, claramente provocó una reducción en la eficiencia productiva y en el peso relativo de la bolsa de Fabricio del ave. El efecto de inmunomodulación por parte de las PCL, pudo brindar beneficios en las aves inoculadas con LPS de *E. coli*; observándose que los pollos alimentados con PCL y desafiados con LPS mostraron índices de eficiencia alimenticia y pesos relativos de la bolsa de Fabricio similares a los pollos del grupo control o sin estrés inmunitario.



## 7.7. Tablas y Figuras

**Tabla 7.1.** Composición de las dietas experimentales.

Ingrediente (%)	Iniciación (0-28 días)
Maíz	25.0
Trigo	10.0
Cebada	24.2
Torta de soja (48% PB)	27.1
Soja extrusionada	4.00
Aceite de soja	4.75
Carbonato de calcio	1.700
Fosfato dicálcico	1.770
DL-Metionina	0.320
L-Lisina HCL	0.300
L-Treonina	0.080
Cloruro de sodio	0.340
Colina	0.060
Minerales y vitaminas*	0.400
<b>Análisis calculado de nutrientes</b>	
EM (kcal/kg)	3000.0
PC (%)	21.5
Lisina (%)	1.270
Met. + Cis. (%)	0.962
Calcio (%)	1.190
Fósforo total (%)	0.678
Fósforo disponible (%)	0.450
Grasa cruda (%)	7.742

\*Un kg de alimento contiene: vitamina A, 12 000 UI; vitamina D<sub>3</sub>, 2400 UI; vitamina E, 30 mg; vitamina K<sub>3</sub>, 3 mg; vitamina B<sub>1</sub>, 2,2 mg; vitamina B<sub>2</sub>, 8 mg; vitamina B<sub>6</sub>, 5 mg; vitamina B<sub>12</sub>, 11 µg; ácido fólico, 1,5 mg; biotina, 150 µg; pantotenato de calcio, 25 mg; ácido nicotínico, 65 mg; Mn, 60 mg; Zn, 40 mg; I, 0,33 mg; Fe, 80 mg; Cu, 8 mg; Se, 0,15 mg; y etoxiquin, 150 mg.

**Tabla 7.2.** Efectos de la incorporación en la dieta de paredes celulares de levadura (PCL), sobre los parámetros productivos\* (0-21 días) de pollos inoculados con lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*.

	0 a 21 días				21 a 28 días				0 a 28 días				
	Peso (g)	GPD (g)	CAD (g)	ICA (g/g)	Peso (g)	GPD (g)	CAD (g)	ICA (g/g)	GPD (g)	CAD (g)	ICA (g/g)	Mortalidad (%)	
<b>Pared celular</b>													
0 mg/kg	717	32.0	43.8	1.367	1177	65.7	100.9	1.538	40.5	57.3	1.417	14.35	
500 mg/kg	719	32.1	42.9	1.336	1179	65.8	99.8	1.519	40.6	56.5	1.393	14.76	
<b>LPS de <i>E. coli</i></b>													
Sin desafío	747	33.5	44.6	1.333	1192	63.6	98.2	1.547	41.0	57.2	1.396	14.1	
Con desafío	689	30.7	42.1	1.370	1164	67.9	102.6	1.509	40.0	56.6	1.414	15.0	
<b>Fuente de variación</b>	-----Probabilidad (F)-----												
Pared celular	0.92	0.92	0.35	0.04	0.89	0.95	0.76	0.40	0.89	0.47	0.01	0.92	
LPS de <i>E. coli</i>	0.001	0.001	0.009	0.02	0.17	0.06	0.23	0.09	0.17	0.69	0.06	0.83	
Interacción	0.65	0.65	0.85	0.16	0.88	0.54	0.66	0.68	0.89	0.57	0.16	0.28	
<i>Pared celular</i>	<i>LPS (E. coli)</i>												
0 mg/kg	Sin desafío	749	33.6	45.0	1.338	1189	62.8	98.0	1.562	40.9	57.3	1.401	16.2
500 mg/kg	Sin desafío	744	33.4	44.3	1.328	1195	64.3	98.5	1.533	41.1	57.2	1.391	12.0
0 mg/kg	Con desafío	685	30.5	42.6	1.396	1164	68.5	103.9	1.514	40.0	57.4	1.433	12.5
500 mg/kg	Con desafío	693	30.9	41.6	1.345	1164	67.3	101.2	1.505	40.0	55.8	1.396	17.5
<i>Error estándar de la media</i>		15.73	0.74	0.89	0.013	22.11	2.34	3.83	0.21	0.78	1.27	0.009	4.03

Los parámetros evaluados son el resultado de promedios obtenidos de seis réplicas por cada tratamiento de 6 aves a los 21 días y 5 aves de 21 a 28 días.

<sup>a, b</sup>, Dentro de una misma columna, medias con distinta letra son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ); NS=  $P > 0.05$ .

\*GPD = ganancia de peso por día; CAD = consumo de alimento por día; e ICA = índice de conversión alimenticia.

**Tabla 7.3.** Efectos de las PCL sobre los pesos relativos de los principales órganos linfoides expresados como % del peso del ave (21 días) y la reacción de hipersensibilidad cutánea tardía de pollos inoculados con LPS de *E. coli*.

	Órganos linfoides (%)					Reacción de hipersensibilidad cutánea tardía 14 días (mm)
	14 días			21 días		
	Bazo	Bolsa de Fabricio	Timo	Bazo	Bolsa de Fabricio	
<b>Pared celular</b>						
0 mg/kg	0.096	0.227	0.295	0.125	0.290	0.293
500 mg/kg	0.096	0.250	0.292	0.112	0.304	0.446
<b>LPS de <i>E. coli</i></b>						
Sin desafío	0.090	0.252	0.304	0.117	0.331	0.331
Con desafío	0.102	0.225	0.280	0.120	0.263	0.408
<b>Fuente de variación</b>	-----Probabilidad (F)-----					
Pared celular	0.96	0.33	0.91	0.42	0.525	0.004
LPS de <i>E. coli</i>	0.16	0.26	0.27	0.84	0.006	0.13
Interacción	0.72	0.66	0.84	0.24	0.030	0.44
<i>Pared celular</i> <i>LPS (E. coli)</i>						
0 mg/kg Sin desafío	0.088	0.235	0.306	0.114	0.348 <sup>a</sup>	0.238
500 mg/kg Sin desafío	0.091	0.268	0.308	0.120	0.314 <sup>a</sup>	0.414
0 mg/kg Con desafío	0.104	0.219	0.283	0.136	0.232 <sup>b</sup>	0.365
500 mg/kg Con desafío	0.101	0.232	0.276	0.105	0.294 <sup>a</sup>	0.467
Error estándar de la media	0.009	0.023	0.026	0.016	0.024	0.050

Las medias obtenidas por tratamiento para los pesos relativos de órganos linfoides son el resultado de 9 observaciones el día 14 y 11 observaciones el día 21. Las medias obtenidas por tratamiento para la reacción de hipersensibilidad cutánea tardía son el resultado de 8 observaciones.

<sup>a, b</sup>. Dentro de una misma columna, medias con distinta letra son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ); NS=  $P > 0.05$ .

**Capítulo 8. Discusión General**

## **8.0. Discusión General**

### **8.1. Productos de levadura y sus efectos en la productividad del ave**

Los **experimentos 1 y 2**, mostraron que la composición de la dieta puede tener importantes implicaciones en la eficacia o respuestas de los distintos productos de levadura de *S. cerevisiae* (levaduras, PCL y extractos). Por un lado, con el uso de dietas elaboradas con trigo, cebada y centeno (**experimento 1**), las levaduras-1 (uso pecuario) y 3 (killer), y la PCL-2 (procedente de cepas de panadería), ejercieron beneficios en el peso vivo e índice de conversión de los pollos similares a los obtenidos con el empleo de avilamicina o APC (**Tabla 1 y 2**). En el caso de las dietas elaboradas con maíz (**experimento 2**), los resultados productivos de los pollos mostraron aparentemente una menor respuesta por la utilización de los distintos aditivos en las dietas (APC y productos de levadura). La suplementación de avilamicina en las dieta con maíz, represento una mejora numérica de +2.5% en el peso vivo y -2.7 del índice de conversión de los pollos en relación a la dieta control sin aditivos. El empleo de la levadura-1, extracto, PCL-1 (procedente de cepas de cervecería) y PCL-2, resultaron en mayores pesos promedios numéricos de los pollos respecto del empleo de la dieta control y con avilamicina (**Tabla 1**). A pesar de que la PCL-1 y la PCL-2, fueron utilizadas a una misma dosis en las dietas, solo los tratamientos con PCL-2 mejoraron el peso promedio e índice de conversión alimenticia de los pollos en similar magnitud a la obtenida en las aves alimentadas con avilamicina (**experimentos 1 y 2**). Las diferencias en las respuestas de las PCL, podrían estar relacionadas con su composición y concentración de los principales polisacáridos ( $\beta$ -glucanos y manano-proteínas). Las menores proporciones de  $\beta$ -glucanos y manano-proteínas de la PCL-1 (**experimentos 1 y 2**), podrían sugerir una sustancia más diluida y con menores efectos respecto a la PCL-2, situación que no pudo ser corroborada en estos estudios utilizando dosis mayores de 500 g/kg por tonelada de alimento de la PCL-1. Los resultados productivos sugirieron que el empleo de la PCL-2 brindaba ventajas respecto al empleo de la PCL-1 y de las levaduras activas. Además, la resistencia de la PCL para soportar los procesos de peletización frecuentemente utilizados en las dietas para monogástricos, podría representar otra característica favorable respecto a la utilización de levaduras activas. Por lo tanto, la PCL-2, fue seleccionada sobre los otros productos de levadura para realizar los siguientes **experimentos (3, 4, 5 y 6)** y profundizar más acerca de sus mecanismos de acción.

En el **experimento 3**, las mejoras observadas en la productividad de las aves que consumieron PCL-2, +3.5% peso promedio y -1.2% el índice de conversión, validaron la respuesta favorables de su inclusión en dietas elaboradas con trigo-cebada-centeno y

maíz. **En el experimento 4**, la utilización de avilamicina en la dieta, resultó en una mejora del peso promedio de los pollos de +5.2% y -2.4% del índice de conversión respecto al uso de la dieta libre de aditivos, a pesar de que esta respuesta fue la de mayor magnitud observada en los experimento donde se evaluó el APC, los beneficios solo fueron numéricos. En una misma tendencia a la observada en los 3 previos experimentos, en **el experimento 4**, las aves que consumieron PCL-2 en la dieta incrementaron el peso vivo +3.1% e índice de conversión alimenticia -1.3% respecto a las aves alimentadas con dietas control. En el **experimento 5**, se encontró una pobre respuesta en el peso de las aves por la utilización de la PCL-2 no obstante, el índice de conversión fue numéricamente menor en los grupos con PCL en -2.7% respecto a los grupos control. En el **experimento 6**, el empleo de la PCL-2 mejoró significativamente el índice de conversión alimenticia de los pollos en -1.7% respecto a los controles sin PCL-2. No obstante, los resultados de este experimento reflejaron que los efectos más importantes de la suplementación de PCL en las dietas de pollos de engorde ocurrieron en los animales con estrés inmunitario o desafiados con LPS de *E. coli*.

Los efectos promedio encontrados en la presente tesis por el empleo de la PCL-2 (en 6 experimentos) en distintas dietas (TCC o maíz) y condiciones (jaulas y suelo con cama de viruta de madera) fueron de +2.6% en el peso vivo y de -1.6% en el índice de conversión alimenticia respecto a la utilización de dietas controles (**Tablas 11.1. y 11.2. Apéndice**). Recientemente, dos análisis estadísticos globales (meta-análisis) realizados para productos de PCL de tipo MOS de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizados en dietas de pollos de engorde sugirieron que los beneficios encontrados por su utilización en el pollo de engorde fueron de alrededor de +1.61% peso vivo y -1.99% del índice de conversión (**Hooge, 2004**), o de +1.5% peso vivo y -2.1% del índice de conversión (**Rosen, 2005**). A pesar de que nuestros resultados no muestran ser muy distintos a las estimaciones de **Hooge (2004)** y **Rosen (2005)**, sería relevante considerar que en los meta-análisis análisis reportados por Hooge (**2004**) y Rosen (**2005**) se incluyeron una mayor cantidad de estudios respecto a los realizados en la presente tesis. Por lo cual, sería interesante considerar que si se realizara un meta-análisis que incluya una mayor cantidad de estudios con PCL similares a la PCL-2 utilizada en este tesis, se podría verificar si nuestras estimaciones en los promedios de mejora sobre la productividad del ave para la PCL-2 se mantienen o cambian. Y la segunda, en el caso de los análisis globales realizados por **Hooge (2004)** y **Rosen (2005)**, cabe destacar que se trata del mismo producto donde probablemente se incluyeron los mismos experimentos para realizar los análisis respectivos, y en los cuales la dosificación de las PCL o MOS varío de 1 kg a más de 2 kg/ton de alimento en algunos casos, situación distinta a nuestros estudios donde la PCL-

2 fue evaluada a una misma dosis en todos los estudios (0.5 kg/ton de alimento), condición que podría sugerir diferencias en las características de la PCL-2 de esta tesis y las consideradas en los análisis de **Hooge (2004)** y **Rosen (2005)**.

### **8.2. Manano-proteínas y $\beta$ -glucanos, efectos en la productividad del ave**

En los experimentos 4 y 5 (dietas TCC), fueron evaluados los 2 principales polisacáridos de la PCL, manano-proteínas (MP) y  $\beta$ -glucanos (BG). En el experimento 4, el empleo de fracciones purificadas de BG, y de MP+BG de manera conjunta a niveles cercanos a los contenidos en la PCL-2, resultó en efectos en la productividad del pollo similares a los obtenidos con la PCL-2 completa (500 mg/kg de alimento) y menores en relación al APC. En este caso, los efectos observados por la inclusión en la dieta de BG y MP+BG fueron de alrededor de +3.0% en el pesos promedio y de -1.5% del índice de conversión alimenticia en los pollos en relación del uso de dietas sin aditivos. En el **experimento 5**, se observó un pobre efecto en el peso de las aves por el empleo de MP y BG en sus dietas, no obstante las aves que consumieron manano-proteínas y  $\beta$ -glucanos purificados a niveles cercanos a los contenidos en la PCL-2 (500 mg/kg de alimento), mejoraron numéricamente el índice de conversión alimenticia en -3.6% y -4.6% respectivamente respecto del uso de la dieta control. Al parecer, la utilización de forma individual de fracciones de BG en dietas para pollos engorde demostró efectos similares a los obtenidos con el empleo de las PCL de forma completa, o reconstituida con sus fracciones de polisacáridos purificados (MP y BG). Esta apreciación no parece extraña si consideramos que el empleo de  $\beta$ -glucanos purificados procedentes de levaduras de *S. cerevisiae*, utilizados a niveles de inclusión dietarios menores a los utilizados en nuestros estudios (20 a 40 mg/kg de alimento) han mostrado ejercer efectos en la productividad, y sistema inmunitario del ave por si mismos (**Guo et al., 2003; Huff et al., 2006**). De hecho, en un estudio reciente (**Jouany et al., 2005**), fue sugerida una mayor importancia para las fracciones de polisacáridos tipo beta-glucanos de la PCL, en las interacciones químicas de absorción que las PCL pueden ejercer hacia micotoxinas presentes en el alimento de aves y que pueden afectar su salud y productividad. Situación importante si consideramos que la mayor parte de las veces los aditivos elaborados con PCL son definidos como fuentes de MOS, pudiendo ser considerados también como fuentes de  $\beta$ -glucanos.

### **8.3. Mecanismos de acción de los productos de levadura y de las PCL y sus fracciones**

Las variables digestivas evaluadas el día 24 de edad de los pollos de los **experimento 1** (dietas TCC) y 2 (dietas maíz), entre ellas la viscosidad del contenido ileal, recuentos de colonias bacterianas del ileón y los consumos de agua expresados en proporción al

consumo del alimento no fueron modificadas por el empleo de las dietas experimentales (control, APC o productos de levadura). En las dietas con TCC (**experimento 1**), la suplementación de avilamicina y PCL-2, resultaron en un incremento en el coeficiente de digestibilidad ileal de la grasa bruta ( $P < 0.05$ ) respecto a los tratamientos que incluyeron levaduras 2 y 3. En las dietas con maíz (**experimento 2**), los coeficientes de digestibilidad ileal para la energía bruta ( $P < 0.07$ ) y proteína cruda ( $P < 0.08$ ) tendieron a ser mayores en las aves que consumieron PCL-2 en el alimento. No obstante, las tendencias de una mayor absorción de algunos nutrientes a escala ileal observada en las aves que consumieron dietas experimentales con APC y PCL-2 (**experimentos 1 y 2**) solo podrían justificar en parte las mejoras obtenidas en su productividad, ya que este efecto no pudo asociarse con algún otro efecto de mejora a escala digestiva como la viscosidad y los recuentos bacterianos ileales. En el **experimento 3**, los pollo que consumieron dietas elaboradas con maíz y TCC suplementadas con la PCL-2, incrementaron de forma altamente significativa la altura de las vellosidades, el grosor de la capa de mucina y el número de células caliciformes a escala de la mucosa del yeyuno; observándose también que el tipo de cereal empleado en la dieta era importante en la magnitud del estímulo que las PCL podían ejercer sobre la mucosa digestiva del ave. En el **experimento 5** (dietas TCC), no solo fue validado el incremento en la altura de las vellosidades de la mucosa del yeyuno por parte de las PCL-2 dietarias además, los resultados de este estudio mostraron que las fracciones purificadas de MP y BG adicionadas en la dieta también incrementaban de forma significativa ( $P < 0.01$ ) la altura de las vellosidades de la mucosa del yeyuno respecto a la utilización de dietas de sin aditivos. Situación que coincidía con la mejora encontrada en el índice de conversión de los pollos alimentados con PCL-2, MP y BG en el **experimento 6**. Estas observaciones, podrían sugerir que uno de los mecanismos de acción de la PCL-2 que podrían justificar la mejora en productividad de los pollos y absorción de nutrientes, podría estar relacionada con la capacidad de la PCL-2 de favorecer el desarrollo de la mucosa digestiva. Estudios en ratas, sugieren que el efecto trófico o de estimulación del desarrollo de la mucosa digestiva que las levaduras de *S. cerevisiae* ejercen sobre la mucosa digestiva del individuo podría ser mediado por el estímulo en la producción y liberación endoluminal de espermina y espermidina por parte de la levadura a escala digestiva (**Buts et al., 1994**). En el caso de la utilización de fracciones de PCL, algunos autores (**Santín et al., 2001; Iji et al., 2001; Zhang et al., 2005**) atribuyen el efecto de favorecer el desarrollo de la mucosa digestiva del ave a un efecto de exclusión de patógenos que las PCL podrían ejercer a escala digestiva, y que resultaría en un menor daño a la mucosa por agentes agresivos (microorganismos o toxinas) permitiendo su mejor desarrollo. De hecho, en el **experimento 5**, la utilización de PCL represento % de pesos relativos del hígado



significativamente menores en los pollos, este efecto podría estar relacionados con un menor proceso inflamatorio en el ave, ya que el hígado es el sitio de producción de las proteínas de fase aguda de la inflamación (**Xie et al., 2000**).

En nuestros estudios (**experimento 3**) observamos que las PCL estimularon la producción de mucina y células caliciformes de la mucosa digestiva del ave, importante mecanismo de resistencia innato ante agresiones por parte de la mucosa digestiva. Por otra parte, en el **experimentos 4**, fue observado que el empleo de MP+BG purificados en las dietas resulto en mayores % relativos del peso del timo ( $P<0.05$ ) similares a los observados con la PCL-2 y mayores respecto al empleo de las dietas control, y APC. En el **experimento 6**, la suplementación de PCL pudo contrarrestar los efectos adversos o del estrés inmunitario (inoculación de LPS de *E coli*) sobre el % de peso relativos de la bolsa de Fabricio de ave; por otra parte, las PCL incrementaron la reacción de hipersensibilidad cutánea tardía o respuesta inmune mediada por células en el ave, situaciones que podrían sugerir que las aves que consumieron PCL en la dieta mantuvieron un mejor estado de inmunocompetencia. Una hipótesis planteada para justificar estos efectos, es que las PCL pudieron ejercer un efecto moderado de estimulación del sistema inmunitario del ave a escala digestiva que le permitió mantener un sistema inmune menos vulnerable ante agresiones o desafíos ambientales. Esta observación pudiera tener importantes implicaciones ya que recientemente fue sugerido que el desarrollo digestivo o maduración funcional esta estrechamente relacionado con el desarrollo local del sistema inmunitario (**Bar-Shira y Friedman, 2005**), situación que podría justificar el mayor desarrollo de la mucosa digestiva de las aves que consumieron PCL en la dieta en nuestros experimentos.

Por otra parte, los **experimentos 3 y 4**, no mostraron efecto en la respuesta inmune humoral de la vacuna del virus de la enfermedad de Newcastle debido al empleo de PCL en la dieta de los pollos. Probablemente, el gran dinamismo y complejidad que representa el sistema inmunitario del ave puede ser difícil de evaluar a partir del empleo de este tipo de modelos, ya que generalmente otros factores indirectos involucrados con las respuestas a las vacunaciones en los pollos, pueden estar relacionados con la inmunidad pasiva del ave, edad optima de vacunación del ave, tipo de virus y vía de aplicación de la vacuna, así como del correcto monitoreo de anticuerpos de la respuesta vacunal (**Dekich, 1998; Abbas, 2004**).

Los resultados de estos experimentos mostraron que las PCL adicionadas a dietas de pollos de engorde pudieron mejorar su eficiencia productiva, parte de los mecanismo de acción para llevar a cabo este efecto pueden estar asociados con efectos positivos para

favorecer un mejor estado de la salud intestinal que le permite llevar a cabo un mejor desarrollo y también podría estar relacionado con una mejora de los mecanismo de resistencia innata a escala digestiva permitiendo mantener un mejor estado de inmunocompetencia del ave, situación que puede dar beneficios cuando las aves son mantenidas bajo condiciones de estrés o en ambientes con presencia de mayores desafíos microbianos.

**Capítulo 9. Conclusiones**

## **9.0. Conclusiones**

Basados en los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados en la presente tesis se puede concluir lo siguiente:

- Las características propias de las distintas levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* y de sus componentes (extractos y paredes celulares de levadura), adquieren importantes implicaciones en las respuestas que pueden ejercer en los animales de acuerdo del tipo de dieta o cereales de las dietas, donde pretendan ser utilizados como aditivos alimenticios.
- Las paredes celulares de levadura de *S. cerevisiae* con un mayor contenido de manano-proteínas y  $\beta$ -glucanos como la PCL-2, adicionadas a una dosis de 500 mg/kg de alimento elaborado con trigo-cebada-centeno o maíz de pollos de engorde, fueron capaces de mejorar el peso vivo y el índice de conversión alimenticia del ave de forma similar al empleo de avilamicina 0.01 mg/kg del alimento y mayor respecto del empleo de dietas sin aditivos.
- Las levaduras activas como la levadura-3 o "killer yeast" de *S. cerevisiae* adicionadas a 800 mg/kg de alimento de pollos de engorde elaborado con cereales como trigo-cebada-centeno, incrementó la productividad del ave de forma similar al empleo de avilamicina a 0.01 mg/kg del alimento.
- La utilización de levaduras activas, paredes celulares de levadura y extractos de levadura en dietas elaboradas con trigo-cebada-centeno y con maíz, no afectaron a escala ileal variables como la viscosidad del contenido y los recuentos bacterianos, ni el consumo de agua de las aves.
- El empleo de la PCL-2 en dietas elaboradas con trigo-cebada-centeno o maíz, favoreció el desarrollo de la mucosa digestiva del ave al incrementar la altura de vellosidades, el grosor de la capa de mucina y el número de células caliciformes de la mucosa digestiva del yeyuno. Además, la utilización en la dieta (trigo-cebada-centeno) de manano-proteínas y  $\beta$ -glucanos purificados de PCL utilizados individualmente (*S. cerevisiae*), resultó en mayor altura de las vellosidades de la mucosa del yeyuno del ave.
- El empleo de manano-proteínas+ $\beta$ -glucanos en concentraciones parecidas a las presentes en la PCL-2, representó un incremento similar al de la PCL-2 en el peso relativo del timo respecto del empleo de dietas sin aditivos y con avilamicina. La

utilización de la PCL-2 y de  $\beta$ -glucanos purificados en la dieta de pollos, resultó en pesos relativos más ligeros del hígado del ave respecto del empleo de dietas sin aditivos o dieta control.

- Las PCL adicionada en las dietas, incrementaron la reacción de hipersensibilidad cutánea tardía o del estado de la inmunidad mediada por células en los pollos. El estrés inmunitario inducido en los pollos por la inoculación de LPS, provocó una fuerte reducción en la eficiencia productiva y de los % de pesos relativos de la bolsa de Fabricio del ave. El efecto de inmunomodulación de las PCL, pudo brindar beneficios en las pollos inoculadas con LPS de *E. coli*, los cuales fueron traducidos en mejores eficiencias alimenticias y % de pesos relativos de la bolsa de Fabricio similares a los observados en pollos sin estrés inmunitario (no desafiados con LPS).

**Capítulo 10. Referencias bibliográficas**

**10.0. Referencias bibliográficas**

- Aarestrup, F. M. 1995.** Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological farms. *Microb. Drug Resist.* 1: 255-257.
- Abbas, A. K., and A. H. Lichtman. 2004.** Basic Immunology: *Function and disorders of the immune system.* Philadelphia, SAUNDERS.
- Abel, G., and J. K. Czop. 1992.** Stimulation of human monocyte  $\beta$ -glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1. *Int. J. Immunopharmacol.* 14: 1363-1373.
- Acevedo, A. M., y M. Pedroso. 2001a.** Efecto del tratamiento con b1-3 glucano particulado lineal por vía oral sobre la respuesta humoral a la vacuna de Newcastle en pollos. *Rev. Cub. Cie. Aví.* 25: 101-106.
- Acevedo, A. M., y M. Pedroso. 2001b.** B 1-3 glucano. Influencia sobre la inmunidad mediada por células en pollos jóvenes. *Rev. Cub. Cie. Aví.* 25: 107-112.
- Adams, C. 1999.** Nutricines. Pages 99-106 in Food components in health and nutrition. Nottingham University Press. Nottingham, UK.
- Adams, C. A. 2004.** Nutricines in poultry production: focus on bioactive feed ingredients. *Nutrition Abstracts and Reviews: Series B.* 74: 1N-12N.
- Aguilar-Uscanga, B., and J. M. François. 2003.** A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 268-274.
- Almirall, M., and E. Esteve-Gracia. 1994.** Rate of passage of barley diets with chromium oxide: influence of age and poultry strain and effect of b- glucanase supplementation. *Poult. Sci.* 73:1433-1440.
- Almirall, M., M. Francesch, A.M. Perez-Vendrell, J. Brufau, and E. Esteve-Garcia. 1995.** The differences in intestinal viscosity produced by barley and  $\beta$ -glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broilers than in chicks. *J. Nutr.* 125:947-955.
- Amagase, H., B.L. Petesch, H. Matsuura, S. Kasuga and Y. Itakura. 2001.** Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 131: 955S-962S.
- Anadón, A. 2006.** The EU ban of antibiotics as feed additives (2006): alternatives and consumer safety. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29 (Suppl. 1): 41-46.
- Anderson, D. B., J. J. McCracken, R. I. Aminov, J. M. Simpson, R. I. Mackie, M. W. A. Verstegen, and H. R. Gaskins. 1999.** Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. *Pig News & Information*, 20; 115N-122N.
- Angkanaporn, K., M. Choct, W. L. Bryden, E. F. Annison, and G. Annison. 1994.**

- Effects of wheat pentosans on endogenous amino acids losses in chickens. *J. Sci. Food Agr.* 66: 399-404.
- Anonymous. 1997.** Government Official Reports 1997:132 Ministry of Agriculture. Report from the Commission on Antimicrobial Feed Additives 1997. Stockholm, Sweden. Pp. 9-10.
- Anonymous. 1998.** Antimicrobial growth promoters. Health Council of the Netherlands: Committee on Antimicrobial growth promoters. Gezondheidsraad. No. 1998/15E, Rijswijk, the Netherlands.
- Anonymous. 1999.** Antibiotic growth promoters. Ross Tech 99/37.
- Anonymous. 2003.** Yeast from the east. Mitsubishi Monitor. 17 (4): <http://www.mitsubishi.or.jp/e/monitor/0308/NP.html#f>. Accessed Aug. 17. 2006.
- Antoniou, T., and R. R. Marquardt. 1981.** Influence of rye pentosans on the growth of chicks. *Poult. Sci.* 60: 1898-1904.
- Antoniou, T., R. R. Marquardt, and P. E. Cansfield. 1981.** Isolation, partial characterisation and antinutritional activity of a factor (pentosans) in rye grain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 28: 1240-1247.
- Ao, Z., A. Kocher, L.F. Tucker, and M. Choct. 2004.** The use of oligosaccharides to improve broiler performance. CD in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- Apajalahti, J. 2003.** Assessment of the relationship between nutrition and gut flora. Pages 145-150 in Proceedings of 14th European Symposium on Poultry Nutrition, August 10-14. WPSA, World's Poultry Science Association. Lillehammer, Norway.
- Apajalahti, J. and M. R. Bedford. 1999.** Improve bird performance by feeding its microflora. *World Poult.* 15: 20-23.
- Apajalahti, J. H. A., A. Kettunen, M. R. Bedford, W. E. Holben. 2001.** Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5656-5667.
- Aravind, K. L., V. S. Patil, G. Devegowda, B. Umakantha, and P. Ganpule. 2003.** Efficacy of esterified glucomannans to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poult. Sci.* 82: 571-576.
- Arce-Menocal, J., E. Ávila-González, C. López-Coello, A. García-Estefan, y F. García-García. (2005).** Efecto de paredes celulares (*Saccharomyces cerevisiae*) en el alimento de pollo de engorda sobre los parámetros productivos. *Téc. Pecu. Méx.* 43: 155-162.
- Arnold, S., B. Gassner, T. Giger, and R. Zwahlen. 2004.** Banning antimicrobial growth promoters in feedstuffs does not result in increased therapeutic use of



- antibiotics in medicated feed in pig farming. *Pharmacoepidemiol. Drug Safety*. 13: 323-331.
- Arstila, P. T., O. Vainio, and O. Lassila. 1994.** Central role of CD4<sup>+</sup> T cell in avian immune response. *Poult. Sci*. 73: 1019-1026.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990).** Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Auclair, E. 2003.** Las levaduras como un ejemplo del modo de acción de los probióticos en especies monogástricas y en rumiantes. *Prod. Animal*. Febrero (185): 32-42.
- Back, O. 1970a.** Studies on the Lymphocytes in the intestinal epithelium of the chicken. III. Effect of thymectomy. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 39: 192-200.
- Back, O. 1970b.** Studies on the Lymphocytes in the intestinal epithelium of the chicken. IV. Effect of bursectomy. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 39: 342-351.
- Back, O. 1972.** Studies on the lymphocytes in the intestinal epithelium of the chicken. I. Ontogeny. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. A*. 80: 84-90.
- Baidya, N., L. Mandal, and G.C. Banerjes. 1993.** Efficiency of feeding antibiotic and probiotics in broilers. *J. Vet. and Animal. Sci*. 24: 120-124.
- Barnes E. M., G. C. Mead, and N. M. Griffiths. 1973.** The microbiology and sensory evaluation of pheasant hung at 5, 10 and 15°C. *Br. Poult. Sci*. 14: 229-240.
- Barnes, E. M. 1977.** Ecological concepts of the anaerobic flora in the avian intestine. *Am. J. Clin. Nutr.* 30:1793-1798.
- Barnes, E. M., C. S. Impey, and B. J. H. Stevens. 1979.** Factors affecting the incidence and anti-salmonella activity of the anaerobic caecal flora of the young chick. *J. Hyg.* 82: 263-283.
- Barnes, E. M., G. C. Mead, D. A. Barnum, and E. G. Harry. 1972.** The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *Br. Poult. Sci*. 13: 311-326.
- Bar-Shira E, D. Sklan, and A. Friedman. 2003.** Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. *Develop. Comp. Immunol.* 27: 147-57.
- Bar-Shira, E. and A. Friedman. 2005.** Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 60: 42-50.
- Bates, E.M., J.Z. Jordens, and D.T. Griffiths. 1994.** Farm animals as a putative reservoir for vancomycin resistant enterococcal infections in man. *J. Antimicrob. Chemoth.* 34:507-16.
- Bealmeear, P. M. 1980.** Host defence mechanisms in gnotobiotic animal. In: Gershwin E., Marchant B. (eds.) *Immunologic Defects in Laboratory Animals*, Plenum Press, New York, Vol.2., pp.261-350.

- Beard, C. D. 1991.** Serological procedures in: A laboratory Manual for isolation and identification for avian pathogens. Ch 44.3<sup>er</sup> Ed. A. M. Ass of Pathology.
- Bedford, M. R., and H. Schulze. 1998.** Exogenous enzymes for pigs and poultry. **Nutr. Res. Rev.** 11:91-114.
- Bedford, M.R. 2000a.** Exogenous enzymes in monogastric nutrition their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology.* 86: 1-13.
- Bedford, M.R. 2000b.** Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems. *W. Poult. Sci. J.* 56: 347-365.
- Bedford, M.R., and H. L. Classen. 1992.** Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *Journal of Nutrition.* 122: 560-569.
- Befus, A. D., N. Johnston, G. A. Leslie, and J. Bienenstock. 1980.** Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. *J. Immunol.* 125: 2626-2632.
- Berg, R. D. 1996.** The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4:430-435.
- Berg, R.D., and D. C. Savage. 1972.** Immunological responses and microorganisms indigenous to the gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 25:1364-1371.
- Berghman, L. R., D. Abi-Ghanem, S. D. Waghela, and S. C. Ricke. 2005.** Antibodies: An alternative for antibiotics?. *Poult. Sci.* 84: 660-666.
- Bergone-Eérézin, E. 1999.** Impact intestinal de l'antibiothérapie. Phase 5, Editions Médicales. Paris, France.
- Beutler, B., and J. Hoffmann. 2004.** Innate immunity. *Current Opinion in Immunology.* 16:1-3.
- Bezuidenhout, A. J., and G. Van Aswegen. 1990.** A light microscopic and immunocytochemical study of the gastrointestinal tract of the ostrich (*Struthio camelus L.*). *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 57: 37-48.
- Bienenstock, J., and A. D. Befus. 1980.** Mucosal immunology. *Immunology.* 41: 249-270.
- Bienenstock, J., J. Gauldie, and D. Y. E. Perey. 1973.** Synthesis of IgG, IgA, IgM by chicken tissues immunofluorescent and <sup>14</sup>C amino acid incorporation studies. *J. Immunol.* 111: 1112-1118.
- Bienenstock, J., K. Croitoru, P. B. Ernst, R. H. Stead, and A. Stanis. 1989.** Neuroendocrine regulation of mucosal immunity. *Immunol. Invest.* 18: 69-85.

- Biviano, A. B., C. Martinez del Rio, and D. L. Phillips. 1993.** Ontogenesis of intestine morphology and intestinal disaccharidases in chickens (*Gallus gallus*) fed contrasting purified diets. *J. Comp. Physiol. (B)*. 163: 508-18.
- Bontempo, V., A. Di Giancamillo, G. Savoini, V. Dell'Orto, and C. Domeneghini. 2006.** Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129: 224-236.
- Bradley, L. G., F. T. Savage, and I. K. Timm. 1994.** The effect of supplementation diets with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on male poult performance and ileal morphology. *Poult. Sci.* 73: 1766-1770.
- Brenes, A., M. Smith, W. Guenter, and R. R. Marquardt. 1993.** Effect of enzymes supplementation on the performance and digestive tract size of broiler chickens fed wheat and barley based diets. *Poult. Sci.* 72: 1731-1739.
- Brockus, C. W., M. W. Jackwood, and B. G. Harmon. 1998.** Characterization of beta-defensin prepropeptide mRNA from chicken and turkey bone marrow. *Animal Gen.* 29: 283-289.
- Brodin, E., J. Alumets, R. Hakanson, S. Leander, and F. Sundier. 1981.** Immunoreactive substance P in the chicken gut: distribution, development and possible functional significance. *Cell Tiss. Res.* 216: 455-469.
- Brown, G. D., and S. Gordon. 2003.** Fungal  $\beta$ -Glucans and mammalian immunity. *Immunity.* 19: 311-315.
- Brown, G.D., P.R. Taylor, D.M. Reid, J.A. Willment, D.L. Williams, L. Martinez-Pomares, S.Y.C. Wong, and S. Gordon. 2002.** Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 296:407-412.
- Brufau, J. 2000.** The European Union ban of Antibiotics performance enhancer in animal feeding and consequences: Potential alternatives. Pages 93-106 in *Selected Topics in Animal Nutrition, Biochemistry and Physiology*, Winnipeg, Canada.
- Brufau, J., M. Francesch, and A. M. Pérez-Vendrell. 2006.** The use of the enzymes to improve cereal diets for animal feeding. *Journal of Science of Food and Agriculture.* 86: 1705-1713.
- Brul S., and P. Coote. 1999.** Preservative agents in foods, mode of action and microbial resistance mechanisms. *Intl. J. Food Microbiology.* 50:1-17.
- Bryan, L., P. J. Buttery, and C. Fisher. 1983.** Protein synthesis in the grower broiler chicken. Page 53 in Proc. IV Int. Symp. Prot. Metab. Nutr., Clermont-Ferrand, France.
- Bucy, R. P., C.-L. H. Chen, J. Cihak, U. Losch, and M. D. Cooper. 1988.** Avian T cells expressing gamma/delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J. Immunol.* 141: 2200-2205.
- Burgents, J. E., K. G. Burnett, and L. E. Burnett. 2004.** Disease resistance of Pacific

- white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture*. 231: 1-8.
- Burns, R. B., and Maxwell, M. H. 1981.** Probable occurrence of IgE in the adult domestic fowl (*Gallus domestic*) after horse serum stimulation. *Vet. Res. Commun.* 5: 67-72.
- Butaye, P., L.A. Devriese, and F. Haesebrouck. 2003.** Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well know antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 175-187.
- Buts, J. P. 2005.** Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. *Rev. Gastroenterol. Perú.* 25: 176-188.
- Buts, J. P., N. De Keyser, and L. De Raedemaeker. 1994.** *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatr. Res.* 36: 522-527.
- Buts, J. P., P. Bemasconi, M. P. Van Craynest, P. Maldague, and R. De Meyer. 1986.** Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatr. Res.* 20:192-196.
- Buts, J. P., P. Bernasconi, J. P. Vaerman, and C. Dive. 1990.** Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Dig. Dis. Sci.* 35:251-256.
- Bywater, R. J. 1998.** Benefits and microbial risk of feeding additive antibiotics. *IFIF II Conference of Mixed-Feed Manufacturers in the Mediterranean.* 1-5.
- Cahaner, A., and N. Deeb. 2004.** Breeding broilers for adaptability to hot condition. *In XXII World's poultry congress of WAPSA, June 8-13, 2004, Istanbul, Turkey. 2004;* CD-rom.
- Callensen, J., and J.N. Kjeldsen. 2005.** Terminated use of antimicrobial growth promoters: effects on pig welfare and productivity. Page 34 in *Antimicrobial Growth Promoters: Worldwide Ban on the Horizon?. Bastiaanse Communication, Noordwijk aan Zee, the Netherlands.*
- Campbell, G. L., Rossnagel, B. F., Classen, H. L., and Thacker, P. A. 1989.** Genotypic and environmental differences in extract viscosity of barley and their relationship to its nutritive value for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology.* 26: 221-230.
- Cannon, J. G., and B. A. St. Pierre. 1997.** Gender differences in host defense mechanisms. *J. Psychiat. Res.* 31:99-113.
- Cant, J. P., B. W. McBride, and W. J. Croom, Jr. 1996.** The regulation of intestinal metabolism and its impact on whole animal energetics. *J. Anim. Sci.* 74:2541-2553.
- Carré, B. (1993).** Digestibility of carbohydrates in poultry. In: *Preliminary Proceedings*
-

9<sup>th</sup> European Symposium on Poultry Nutrition, September 5-9, Jelenia Gora, Poland, pp120-131.

- Casewell, M., C. Friis, E. Marco, P. McMullin, and I. Phillips. 2003.** The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J. Antimicrob. Chemoth.* 52: 159-161.
- Castagliuolo, I., M. F. Riegler, L. Valenick, J. T. Lamont, and C. Pothoulakis. 1999a.** *Saccharomyces boulardii* Protease Inhibits the Effects of *Clostridium difficile* Toxins A and B in Human Colonic Mucosa. *Infect. Immun.* 67: 302–307.
- Castagliuolo, L., J. T. Lamont, S. T. Nikulasson, and C. Pothoulakis. 1996.** *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect. Immun.*; 12: 5225-5232.
- Castagliuolo, L., M. F. Riegler, L. Valenick, and J. T. Lamont, and C. Pothoulakis. 1999b.** *Saccharomyces boulardii* protease mediates *Clostridium difficile* toxin A and B effects in human colonic mucosa. *Infect. Immun.* 67: 302-307.
- Cebra, J. J. 1999.** Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:1046S–1051S.
- Cerero-Briz, R. 2005.** Retirada de los Antibióticos Promotores de Crecimiento en la Unión Europea: Causas y consecuencias. XII Congreso Bienal Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Avícola (AMENA). Octubre 2005. Puerto-Vallarta, Jalisco (México).
- Chai, J. Y., and H. S. Lillehoj. 1988.** Isolation and functional characterization of chicken intestinal intraepithelial lymphocytes showing natural killer cell activity against tumor target cells. *Immunology.* 63: 111-117.
- Chamblee, T.N., J.R. Thompson and J.P. Thaxton. 1992.** Effects of day old vaccination on broiler performance. *Poult. Sci.* 71(Suppl. 1):144 (Abstr.).
- Chang, C. F., H. Y. Chen, M. S. Su, and I. C. Liao. 2000.** Immunomodulation by dietary beta 1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shell fish Immunol.* 10:505–514.
- Chang, W., S. Judith, H. Ham, R. Rodney, G. Dietert, J. R. Combs, and J. Marsh. 1994.** Effect of dietary E and surface marker expression. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 16: 203-223.
- Channakrishnappa, K., G. Devegowda, and H.V.L.N. Swamy. 1999.** Effect of supplementation of inactivated yeast to the aflatoxin containing diet on performance of broilers. *Indian J. Poult. Sci.* 34: 177-181.
- Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin, and P. Guet. 1995.** Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth and cellulolytic

- activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MCH3. *Curr. Microbiol.* 31: 201-205.
- Chaveerach, P., D. A. Keuzenkamp, L. J. A. Lipman, and F. Van Knapen. 2004.** Effect of Organic Acids in Drinking Water for Young Broilers on *Campylobacter* Infection, Volatile Fatty Acid Production, Gut Microflora and Histological Cell Changes. *Poult. Sci.* 83: 330-334.
- Cheema, M. A., M. A. Qureshi, and G. B. Havenstein. 2003.** A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 randombred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Sci.* 82: 1519-1529.
- Chen, C. H., T. W. F. Göbel, T. Kubota, and M. D. Cooper. 1994.** T cell development in the chicken. *Poultry Science.* 73: 1012-1018.
- Chen, C. L., J. E. Lehmeyer, and M. D. Cooper. 1982.** Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes. *J. Immunol.* 129: 2580-2585.
- Chen, Chen-Lo H., J. M. Pickel, J. M. Lahti, and M. D. Cooper. 1991.** Surface markers on avian immune cells: In "*Avian Cellular Immunology*" (J. M. Sharma, Ed), pp. 1-22. CRC press, Boca Raton, FL.
- Chen, Chen-Lo H., L. L. Ager, E. L. Gartland, and M. D. Cooper. 1986.** Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. *J. Exp. Med.* 164: 375-380.
- Chesson, A. 2005.** Phasing out antibiotic additives in the EU: worldwide relevance for animal food production. Pages 20-22 in *Antimicrobial Growth Promoters: Worldwide Ban on the Horizon?*. *Bastiaanse Communication*, Noordwijk aan Zee, the Netherlands.
- Chew, B. P. 1993.** Role of the carotenoids in the immune response. *Journal of Dairy Science.* 76: 2804-2811.
- Choct, M. and G. Annison. 1992a.** Anti-nutritive effect of wheat pentosans in broiler-chickens: Role of viscosity and gut microflora. *Br. Poult. Sci.* 33:821-834.
- Choct, M., and G. Annison. 1990.** The anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. *Br. Poult. Sci.* 31: 81 1-821.
- Choct, M., and G. Annison. 1992b.** The inhibition of nutrient digestion by wheat pentosans *Br. Nutr.* 67: 123-132.
- Chowdhury, S. R., and T. K. Smith. 2004.** Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on performance and metabolism of laying hens. *Poult. Sci.* 83: 1849-1856.
- Chowdhury, S. R., and T. K. Smith. 2005.** Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on hepatic fractional protein synthesis rates of laying hens and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *Poult. Sci.* 84:1671-1674.
- Ciriaco, E., P. P. Pinera, B. Diaz-Esnal, and R. Laura. 2003.** Age-related changes in
-

- the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Microsc. Res. Tech.* 62: 482-487.
- Coates, M. E., J. E. Ford, and G. F. Harrison. 1968.** Intestinal synthesis of vitamins of the B complex in chicks. *Br. J. Nutr.* 22: 493-498.
- Coates, M.E., and G.F. Harrison. 1969.** Observations on the growth-promoting effects of procaine penicillin and zinc bacitracin in chicks in different environments. *J. Sci. Food. Agric.* 20:183.
- Cogburn, L. A., and B. Glick. 1983.** Functional lymphopoiesis in the chicken pineal gland. *Am. J. Anat.* 102: 131-142.
- Cohn L, R. J. Homer, H. MacLeod, M. Mohrs, F. Brombacher, and K. Bottomly. (1999).** Th2-induced airway mucus production is dependent on IL-4Ra, but not on eosinophils. *J. Immunol.* 162:6178-83.
- Collins, M. D., and G. R. Gibson. 1999.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nut.* 69(Suppl. 1):1042S-1057S.
- Cook, M. E. 2004.** Nutritional optimization of the immune system: Protection against immune-induced damage. CD in XXII World's Poultry Congress and Exhibition. June 8-13. Istanbul, Turkey.
- Corrier, D., and J. DeLoach. 1990.** Interdigital skin test for evaluation of delayed hypersensitivity and cutaneous basophil hypersensitivity in young chickens. *Am. J. Vet. Res.* 51: 950-953.
- Corthier, G., F. Dubois, and R. Ducluzeau. 1986.** Prevention of *Clostridium difficile* induced mortality in gnotobiotic mice by *Saccharomyces boulardii*. *Clin. J. Microbiol.* 32: 294-296.
- Corthier, G., F. Lucas, S. Jouvert, and F. Castex. 1992.** Effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatment on the activity of *Clostridium difficile* toxins in mouse digestive tract. *Toxicon.* 30: 1583-1589.
- Cuaron, I. J. A. 2000.** La influencia de la levadura en la dieta, respuesta microbiológica antagonista. Proc. Anais do Simpósio sobre Aditivos Alternativos na Nutrição Animal. 16-17 agosto, 2000. Campinas. SP.
- Cunningham-Rundles C. 2001.** Physiology of IgA and IgA deficiency. *J Clin. Immunol.* 21:303-309.
- Czerucka, D., J. L. Nano, P. Bernasconi, and P. Rampal. 1989.** Réponse à la toxine cholérique de deux lignées de cellules épithéliales intestinales. Effet de *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterol Clin Biol.* 13: 383-387.
- Czerucka, D., L. Roux, and P. Rampal. 1994.** *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3', 5' -cyclic monophosphate induction in intestinal
-

- cells. *Gastroenterol.* 106: 65-72.
- Czop, J. K., A. V. Puglish, D. Z. Miorandi, K. F. Austen. 1988.** Perturbation of  $\alpha$ -glucans receptors on human neutrophils initiates phagocytosis and leukotriene B4 production. *J. Immunol.* 141: 3170-3176.
- Czop, J.K., and K.F. Austen. 1985.** A beta-glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *J. Immunol.* 134:2588–2593.
- Dabbagh K, K. Takeyama, H. M. Lee, I. F. Ueki, J. A. Lausier, and J. A. Nadel. 1999.** IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 62:6233–7.
- DANMAP. 2004.** Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. ISSN 1600-2032. <http://www.svs.dk>, accessed February 23 2006.
- Davidson, G. P., P. B. Whyte, E. Daniels, K. Franklin, H. Nunan, P. I. McCloud, A. G. Moore, and D. J. Moore. 1989.** Passive immunisation of children with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *Lancet.* 2:709-712.
- Dawson, K.A., and I.D. Girard. 1997.** Biochemical and physiological basis for the stimulatory effects of yeast preparations on ruminal bacteria. In: *Biotechnology in the Feed Industry*, ed T.P. Lyons and K.A. Jacques, Nottingham University Press, Nottingham, UK, p 293.
- De Ritis, G., Z. M. Falchuk, and J. S. Trier. 1975.** Differentiation and maturation of cultured fetal rat jejunum. *Dev. Biol.* 45:304–317.
- Dekich, M. A. 1998.** Broiler industry strategies for control of respiratory and enteric diseases. *Poult. Sci.* 77: 1176-1180.
- Deloyer, P., G. Dandrifosse, C. Bartholomeus, N. Romain, M. Klimek, J. Salmon, P. Gerard, and G. Goessens. 1996.** Polyamine and intestinal properties in adults rats. *Br. J. Nutr.* 76:627-637.
- Denbow, D. M. 1994.** Appetite and its control. *Poult. Sci. Rev.* 5: 209-229.
- Denbow, D. M. 2000.** Gastrointestinal Anatomy and physiology. Pages 299-325 in *Sturkie's Avian physiology*. 5<sup>th</sup> edition. G. C. Whittow, ed. *Academic Press*. San Diego, USA.
- Deplanske, B., and H. R. Gaskins. 2001.** Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(Suppl.):1131S–1341S.
- Deutsches Institut für Normung (DIN). 1977.** DIN 51900. Determination of the gross calorific value by the bomb calorimeter and calculation of the net calorific value.
-



Deutsches Institut für Normung e. V., Berlin, Germany.

- Development of Animal Nutrition (DAN), and Lesaffre Feeds Additives (LFA). 2005.** "Saf-mannan", manual técnico 2005. "Levaduras y sus derivados: nuevos retos y posibilidades en Nutrición Animal". Compact disk in DAN-LFA Joint Symposium, Zaragoza, Spain, April 14, 2005.
- Dibner, J. J., and J. D. Richards. 2004.** The digestive system: challenges and opportunities. *J. Appl. Poult. Res.* 13: 86-93.
- Dibner, J. J., and J. D. Richards. 2005.** Antibiotics growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poult. Sci.* 84:634-643.
- Dibner, J. J., C. D. Knight, M. L. Kitchell, C. A. Atwell, A. C. Downs, and F. J. Ivey. 1998.** Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. *J. Appl. Poult. Res.* 7: 425-463.
- Diertert, R. R., and S. J. Lament. 1994.** Avian immunology: from fundamental immune mechanism to the negative management of poultry. *Poult. Sci.* 73: 975-978.
- Dimovelis, P., E. Chistaki, A. Tserveni-Goussi, and A. B. Spais. 2004.** Performance of layer fed a diet with mannan-oligosaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Mos). Compact disk in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- Dohms J., and M. Saif. 1984.** Criteria for evaluating immunosuppression. *Avian Dis.* 28: 305-310.
- Donovan, J. L., A. S. Meyer, and A. L. Waterhouse. 1998.** Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *J. Agric. Food Chem.* 46:1247-1252.
- Dritz, S. S., J. Shi, T. L. Kielian, R. D. Goodband, J. L. Nelssen, M. D. Tokach, M. M. Chengappa, J. E. Smith, and F. Blecha. 1995.** Influence of dietary  $\beta$ -glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to *Streptococcus suis* infection in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 73:3341-3350.
- Dubos, R., R. W. Schaedler, R. Costell, and P. Costell, and P. Hoet. 1965.** Indigenous, normal and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 122:67-76.
- Dunnington, E. A., and P. B. Siegel. 1996.** Long-term divergent selection for eight-week body weight in white Plymouth Rock chickens. *Poult. Sci.* 75: 1168-1179.
- Dunon, D., D. Courtois, O. Vainio, A. Six, C. H. Chen, M. D. Cooper, J. P. Dangy, and B. A. Imhof. 1997.** Ontogeny of the immune system: gamma/delta and alpha/beta T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves. *J Exp Med.* 186: 977-88.
- EEC 70/524. 2004.** Update (situation as 30 April 2004) of the list of the authorised

- 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). Accessed Aug. 2006.
- Ehrlich, P. 1892.** Ueber Immunität durch Verebung und Zeugung. *Z. Hyg. Infektionskr.* 12:183-203.
- El Tayeb, A., and R. Hanson. 2001.** The interaction between Newcastle disease virus and Escherichia coli endotoxin in chickens. *Avian diseases.* 45: 313-320.
- Elwinger, K. and B. Teglof. 1991.** Performance of broiler chickens as influenced by a dietary enzyme complex and without antibiotic supplementation. *Arch.Geflugelk.* 55:69-73.
- Emborg, H., A. K. Ersboll, O. E. Heder, and H. C. Wegener. 2001.** The effect of discontinuing the use of antimicrobial growth promoters on the productivity in the Danish broiler production. *Prevent. Vet. Medicine.* 50: 53-70.
- Engster, H. M., D. Marvil, and B. Stewart-Brown. 2002.** The effect of withdrawing growth promoting antibiotics from broiler chickens: A long-term commercial industry study. *J. Appl. Poult. Res.* 11: 431-436.
- Ernst, P. B., A. D. Befus, and J. Bienenstock. 1985.** Leukocytes in the intestinal epithelium, an unusual immunological compartment. *Immunol. Today.* 6: 50-55.
- Evans, E. W., G. G. Beach, J. Wunderlich, and B. G. Harmon. 1994.** Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. *J. Leukoc. Biol.* 56: 661-665.
- Ewing, W. N. and D. J. A. Cole. 1994.** The living gut: An introduction to microorganisms in nutrition. *Context, Dungannon, N. Ireland.*
- Fairchild, A. S., J. L. Grimes, F. T. Jones, M. J. Wineland, F. W. Edens and A. E. Sefton. 2001.** Effects of hen age, Bio-Mos,<sup>®</sup> and Flavomycin<sup>®</sup> on poult susceptibility to oral *Escherichia coli* challenge. *Poult. Sci.* 80: 562-571.
- Fairchild, A. S., J. L. Grimes, F. T. Jones, M. J. Wineland, F. W. Edens, and A. E. Sefton. 2001.** Effects of hen age, Bio-Mos, and Flavomycin on poult susceptibility to oral *Escherichia coli* challenge. *Poult. Sci.* 80: 562-571.
- Fearon, D. T., and R. M. Locksley. 1996.** The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50-54.
- Ferket, P. R., 1996.** Enzymes offer way to reduce waste, improve performance. *Feedstuffs.* 68: 30-34.
- Ferket, P. R., C. W. Parks and J. L. Grimes. 2002.** Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. 22 Pages. In: Proc. Multi-State Poultry Feeding and Nutr. Conf., Indianapolis, Indiana USA. May14-16. [http://etd.fcla.edu/UF/UFE0004720/spearman\\_k.pdf](http://etd.fcla.edu/UF/UFE0004720/spearman_k.pdf). Accessed June 14, 2004.
-

- Fernandez, F, R. Sharma, M. H. Hinton, and M. R. Bedford, 2000.** Diet influences the colonization of *Campylobacter jejuni* and distribution of mucin carbohydrates in chick intestinal tract. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1793-1801.
- Fernandez, F., M. Hilton, and B. Van Gils. 2000.** Evaluation of the effect of mannan-oligosaccharides on the competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* colonization in broiler chicks. *Avian Pathol.* 29:575-581.
- Fernandez, F., M. Hilton, and B. Van Gils. 2002.** Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. *Avian Pathol.* 31:49-58.
- Fireth, N.L., D.A. Toss, and M.L. Thonney. 1985.** Comparison of ether and chloroform for Soxhlet extraction of freeze-dried animal tissues. Association official analysis chemistry. 68 (6): 1228-1231.
- Fleet, G. H. 1991.** Cell walls. Pages 199–277 in *The Yeasts*, 2nd edn, vol 4, A. H. Rose, and J. S. Harrison, eds. Academic Press, New York.
- Food and Drug Administration. (FDA).** Consumer: Staking a claim to good health. World Wide Web: <http://www.vm.cfsan.fda.gov/~dms/fdhclm.html>.
- Forstner, J. F., and G. G. Forstner. 1994.** Gastrointestinal mucus. Pages 1255-1284 in *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3<sup>rd</sup> ed. (Johnson Leonard, R., ed.), *Raven Press*, New York, NY.
- Forstner, J. F., M. G. Oliver, and F. A. Sylvester. 1995.** Production, structure and biologic relevance of gastrointestinal mucins. Pages 71-88 in *Infections of the gastrointestinal tract* (Blaser, m. J., Smith, P. D., Ravdin, J. I., Greenberg, H. B. and Guerrant, R. L., eds.), *Raven Press*, New York, NY.
- Fortun-LaMothe L., and S. Boullier. 2004.** Interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity, and strategies to improve digestive health in young rabbits. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Puebla (Mexico) Sept. 2004, WRSA ed.* 1035-1067.
- Freedman, D. J., C. O. Tacket, A. Delehanty, D. R. Maneval, J. Nataro, and J. H. Crabb. 1998.** Milk immunoglobulin with specific activity against purified colonization factor antigens can protect against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 177:662-667.
- Friedman, A., E. Bar-Shira, and D. Sklan. 2003.** Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *World's Poultry Science Journal.* 59: 209-219.
- Fritts, C. A., and P. W. Waldroup. 2003.** Evaluation of Bio-Mos<sup>®</sup> mannan oligosaccharide as a replacement for growth promoting antibiotics in diets for turkeys. *Int. J. Poult. Sci.* 2: 19-22.
- Fuller, R. 1973.** Ecological studies on the lactobacillus flora associated with the crop

- epithelium of the fowl. *J. Appl. Bacteriol.* 36: 131-139.
- Fuller, R. 1989.** Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365–378.
- Fuller, R., and A. Turvey. 1971.** Bacteria associated with the intestinal wall of the fowl (*Gallus domesticus*). *J. Appl. Bacteriol.* 34:611-617.
- Furness, J. B., and M. Costa. 1980.** Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience.* 5: 1-20.
- Fussell, L. W. 1998.** Poultry industry strategies for control of immunosuppressive diseases. *Poult. Sci.* 77: 1193-1196.
- Gallego, M., and B. Glick. 1988.** The proliferative capacity of the avian Harderian gland. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 157-166.
- Garcia-Rubio, M. E. 2003.** Alternativas terapéuticas para el control del estrés en las aves. in *VIII Jornadas Médico Avícolas (FMVZ-UNAM), febrero 19-21, México D.F, México*; CD-rom.
- Gaskins, H. R. 2001.** Intestinal bacteria and their influence on swine growth. Pages 585–608 in Swine nutrition. A. J. Lewis and L. L. Southern, eds. 2nd ed. *CRC Press*, Boca Raton, FL.
- Gauthier, R.** Organic acids and essential oils, a realistic alternative to antibiotic growth promoter in poultry. Pages 148-157 in I Fórum Internacional de Avicultura. 17- 19 agosto de 2005-Foz do Iguaçu-PR, Brasil.
- Gewirtz A. T., Y. Liu, S. V. Sitaraman, and J. L. Madara. 2002.** Intestinal epithelial pathobiology: past, present and future, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 16: 851–867.
- Geyra A, Z, Uni, and D. Sklan. 2001a.** [Enterocyte dynamics and mucosal development in the post hatch-chick.](#) *Poult. Sci.* 80:776-782.
- Geyra A., Z. Uni, and D. Sklan. 2001b.** The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. *Br. J. Nutr.* 86: 53-61.
- Gibson, G. R., and M. B. Roberfroid. 1995.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125:1401–1412.
- Gibson, G. R., and R. Fuller. 2000.** Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probióticos and prebiotics for human use. *J. Nutr.* 130:391S-395S.
- Gil de Los Santos, J. R., O. B. Storch, and C. Gil-Turnes. 2005.** *Bacillus cereus* var. toyoi and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. *Br. Poult. Sci.* 46: 494-497.
- Gilmour, D. G., A. Brand, N. Donnelly, and H. A. Stone. 1976.** Bu-1 and Th-1, two loci determining surface antigens of B and T lymphocytes in chickens.
-

- Immunogenetics*. 3: 549-563.
- Girard, I.D. 1996.** The mechanisms of action of yeast culture in stimulating ruminal fermentation. *Feed Compound*. 1611: 16-17.
- Girish, C. K. and G. Davegowda. 2004.** Efficacy of modified glucomannan Mycosorb<sup>®</sup> and HSCAS to alleviate the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. Compact disk in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- Glick, B. 1967.** Antibody and gland studies in cortisone and ACTH-injected birds. *J. Immunol.* 98:1076-1084.
- Glick, B. 1983.** Bursa of Fabricius In "*Avian Biology*" (D. S. Farner, R. King, and K. C. Parkes, eds) Vol. 7, pp. 443-500. Academic Press, New York.
- Glick, B. 2000.** Immunophysiology. In "*Avian Physiology*" (P.D. Sturky, ed), pp. 657-670. Academic Press, San Diego, California.
- Glick, B., K. A. Holbrook, I. Olah, W. D. Perkins, and R. Stinson. 1981b.** An electron and light microscope study of the caecal tonsil, the basic unit of the caecal tonsil. *Dev. Comp. Immunol.* 5: 95-102
- Glynn, M. K., Bopp, C., Dewitt, W., and Dadbey, P. 1998.** Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 infections in the United State. *N. Engl. J. Med.* 338: 1333-1338.
- Gobel, T. W. F. 1996.** The T-dependent immune system. Pages 31–46 in: *Poultry Immunology*. T. F. Davison, T. R. Morris, and L. N. Payne, ed. *Poultry Science Symposium Series*. Vol. 24. Carfax Publishing, Oxfordshire, UK.
- Goddeeris, B. M. and J. Mast 1999.** Basic immunology: how important is it in the nutritional practice. In *Proceedings of 12th European Symposium on Poultry Nutrition*, Veldhoven, The Netherlands, WPSA-Dutch Branch.
- Gong, J., Forster, R. J., Yu, H., Chambers, J. R., Wheatcroft, R., Sabour, P. M. and Chen, J. 2002.** Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiol. Ecology*. 41: 171–179.
- Gonzalez, A. y L. Valenzuela. 2006.** *Saccharomyces cerevisiae*. [http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_20/Capitulo20.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_20/Capitulo20.pdf).  
Acceded Aug. 2006.
- Groschke, A. C., and R. J. Evans. 1950.** Effect of antibiotics, synthetic vitamins, vitamin B12 and an APF supplement on chick growth. *Poult. Sci.* 29:616-618.
- Gross, W. B. 1992.** Effects of ascorbic acid on stress and disease in chickens. *Avian Diseases*. 36: 688-692.
- Guo, C., G. Cao, E. Sofic, and R. L. Prior. 1997.** High-performance liquid
-

- chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables: Relationship to oxygen radical absorbance capacity. *J. Agric. Food Chem.* 45:1787–1796.
- Guo, Y., R. A. Ali, and A. M. Qureshi. 2003.** The influence of B-glucan on immune response in broiler chicks. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 25:461-472.
- Guy, J. S. 1998.** Virus infection of the gastrointestinal tract of poultry. *Poult. Sci.* 77:1116-1175.
- Haddad, S.G., and Goussous, S.N. 2005.** Effect of yeast culture supplementation on nutrient intake, digestibility and growth performance of Awassi lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 118: 343–348.
- Halevy, O., Y. Nadel, M. Barak, I. Rozenboim, and D. Sklan. 2003.** Early Posthatch feeding stimulates satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in turkey poults. *J. Nutr.* 133: 1376-1382.
- Halfhide, B. 2003.** Role of European probiotic association (EPA). Pages 3-4 in Role of probiotics and their link to the demands of European consumers. 11 February 2003, ID-Lelista report 03/0002713.
- Han, P. F. S., and J. R. Smyth. 1972.** The influence of growth rate on the development of Marek's disease in chickens. *Poultry Sci.* 51: 975-985.
- Hanisch, F.G. 2001.** O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem.* 382:143-149.
- Harmon, G. B. 1998.** Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science.* 77: 972-977.
- Hennig-Pauka, I., I. Stelljes, and K. H. Waldmann. 2003.** Studies on the effect of specific egg antibodies against *Escherichia coli* infections in piglets. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 110:49-54.
- Hernández, P., O. Martín, Y. Rodríguez, y F. GANEM. 1999.** Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 15:91-5.
- Herre, J., S. Gordon and G. D. Brown. 2004.** Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol. Immunol.* 40:869–76.
- Hoerr, F. J. 1998.** Pathogenesis of enteric diseases. *Poult. Sci.* 77: 1150-1155.
- Hofacre, C. L., T. Bearcorn, S. Collett, and G. Mathis. 2003.** Using competitive exclusion Mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. *J. Appl. Poult. Res.* 12: 60-64.
- Hofshagen, M., and M. Kaldhusdal. 1992.** Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 1. Effect on small intestinal bacterial flora and performance. *Poult. Sci.* 71: 959-69.
- Holmberg, T., Kaspersson, A., Larsson, K. and Pettersson, H. 1989.** Aflatoxin production in moist barley treated with suboptimal doses of formic and propionic acid.
-

---

*Acta Agriculturae Scandinavica*. 39: 457–464.

- Homo-Delarche, F., F. Fitzpatrick, N. Christeff, E. A. Nunez, J. F. Bach, and M. Dardenne. 1991.** Sex steroids, glucocorticoids, stress, and autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40:619-637.
- Hooge, D. M. 2004.** Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993-2003. *Int. J. Poult. Sci.* 3:163-174.
- Hooge, D. M., M. D. Sims, A. E. Sefton, A. Connolly, and P. Spring. 2003.** Effect of dietary mannan oligosaccharide, with or without bacitracin or virginiamycin, on live performance of broiler chickens at relative high stocking density on new litter. *J. Appl. Poult. Res.* 12: 461-467.
- Hoskins, L. C. 1984.** Mucin degradation by enteric bacteria: ecological aspects and implications for bacterial attachment to gut mucosa. In: Boedeker, E.C. (Ed.), Attachment of organisms to the gut mucosa. CRC Press, Boca Raton, pp. 51–67.
- Houdijk, J. G. M., M. W. Bosch, S. Tamminga, M. W. A. Verstegen, E. B. Berenpas, and H. Knoop. 1999.** Apparent ileal and total-tract nutrient digestion by pigs as affected by dietary on digestible oligosaccharides. *J. Anim. Sci.* 77: 148–158.
- Huff, G. R., W. E. Huff, J. M. Balog, and N. C. Rath. 1999.** Sex Differences in the Resistance of Turkeys to *Escherichia coli* Challenge After Immunosuppression with Dexamethasone. *Poult. Sci.* 78:38–44.
- Huff, G. R., W. E. Huff, N. C. Rath, and G. Tellez. 2006.** Limited Treatment with  $\beta$ -1,3/1,6-Glucan Improves Production Values of Broiler Chickens Challenged with *Escherichia coli*. *Poult. Sci.* 85: 613-618.
- Hutanen, C. N., and J. M. Pensack. 1965.** The development of the intestinal flora of the young chick. *Poult. Sci.* 44:825-830.
- Huyghebaert, G. 1995.** The effect of a wheat-fat-interaction on the efficacy of a multi-enzyme preparation in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology.* 68: 55–66.
- Huyghebaert, G. 2003.** Replacement of antibiotics in poultry. 55-78 in Eastern Nutrition Conference, 8-9 May. Québec, Canada.
- Iji, P. A., A. A. Saki, and D. R. Tivey. 2001a.** Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 1. Intestinal weight and mucosal development. *Br. Poult. Sci.* 42: 505-513.
- Iji, P. A., A. A. Saki, and D. R. Tivey. 2001b.** Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 2. Development and characteristics of intestinal enzymes. *Br. Poult. Sci.* 42: 514-522.
- Iji, P. A., A. A. Saki, and D. R. Tivey. 2001c.** Intestinal development and body growth of broiler chicks on diets supplemented with non-starch polysaccharides. *Anim. Feed*
-

- Sci. Technol.* 89, 175–188.
- Iji, P. A., A. S. Ali, and D. R. Tivey. (2001d).** Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. *J. Sci. Food. Agric.* 81: 1186-1192.
- Ikemori, Y., M. Kuroki, R. C. Peralta, H. Yokoyama, and Y. Kodama. 1992.** Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.* 53:2005-2008.
- Ikemori, Y., M. Ohta, K. Umeda, F. C. Icatlo, Jr., M. Kuroki, H. Yokoyama, and Y. Kodama. 1997.** Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet. Microbiol.* 58:105-111.
- Jamroz, D., A. Wiliczekiewicz, J. Orda, T. Wartecki, and J. Skorupska. 2004.** Response of broiler chickens to the diets supplemented with feeding antibiotic or mannanoligosaccharides. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities.* 7: <http://www.ejpau.media.pl/volume7/issue2/animal/art-06.html>. Accessed, 19 may, 2006.
- Jankovic, B. D., and K. Mitrovic. 1967.** Antibody producing cells in the chicken, as observed by fluorescent antibody technique. *Folia. Biol.* 237: 406-410.
- Jelinek, C. F., A. E. Ponland, and G. E. Wood. 1989.** World wide occurrence of mycotoxins in foods and feeds, an update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72: 223-230.
- Jeurissen, S. H. M., E. M. Janse, and G. Koch. 1988.** Meckel's diverticle, a gut-associated lymphoid organ in chickens. In *Histophysiology of the immune System*, ed. Fossum, S. and Rolstad, B., Plenum Press, New York, pp. 599.
- Jeurissen, S. H. M., E. M. Janse, G. Koch, and G. F. de Boer. 1989.** Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. *Cell Tissue Res.* 258: 119-124.
- Jeurissen, S. H., F. Lewis, J. D. van der Klis, Z. Mroz, J. M. Rebel, and A. A. ter Huurne. 2002.** Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity integrity, and functionality. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 3: 1-14.
- Jeurissen, S. H., F. Wagenaar, and E.M. Janse. 1999.** Further characterization of M cells in gut-associated lymphoid tissues of the chicken. *Poult. Sci.* 78: 965-972.
- Jolly, C. A. 2004.** Dietary restriction and immune function. *J. Nutr.* 134: 1853-1856.
- Jones, F. T., and C. Ricket. 2003.** Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poult. Sci.* 82:613-617.
- Jongbloed, A. 1998.** Cited by the Committee on Antimicrobial Growth Promoters. Health



- Council of the Netherlands, Rijswijk Publication no. 1998/15E.
- Jonvel, S. 1993.** Use of Yeast in monogastrics. *Feed Mix*. 1 4.
- Jorgensen, H., X. Q. Zhao, K. E. Knudsen, and B. O. Eggum. 1996.** The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract digestibility and energy metabolism in broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 75: 379-395.
- Jouany, J. P., A. Yiannikouris, and G. Bertin. 2005.** How yeast cell wall components can alleviate mycotoxicosis in animal production and improve the safety of edible animal products. *J. Anim. Feed Sci.* 14:171-191 Suppl. 1.
- Józefiak, D., A. Rutkowski, and S. A. Martin. 2004.** Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. *A. Feed Sci. and Technol.* 113: 1-15.
- Jukes, T. H. 1972.** Antibiotics in animal feeds and animal production. *Bioscience.* 22:526-534.
- Juul-Madsen, H. R., G. Su, and P. Sørensen. (2004).** Influence of early or late start of first feeding on growth and immune phenotype of broilers. *Br. Poult. Sci.* 45: 210-222.
- Kaldhusdal, M. 2003.** Maintaining gut health in meat-type poultry without antibacterial growth promoters and ionophores. Pages 151-157 in Proceedings of 14th European Symposium on Poultry Nutrition, August 10-14. WPSA, World's Poultry Science Association. Lillehammer, Norway.
- Kaldhusdal, M., and M. Hofshagen. 1992.** Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. *Poult Sci.* 71:1145-53.
- Kamel, C. 2000.** A novel look at a classic approach of plant extracts. *Feed Mix Special* 2000: 19-21.
- Kannan, M., R. Karunakaran, V. Balakrishnan and T.G. Prabhakar. 2005.** Influence of Prebiotics Supplementation on Lipid Profile of Broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 4: 994-997.
- Karaman, M., H. Basmacioglu, M. Ortatatli, and H. Oguz. 2005.** Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histology. *Br. Poult. Sci.* 46:394-400.
- Ketels, E., and G. De Grote. 1988.** The nutritional value for broilers of fats characterized by short-chain fatty acids as affected by level of inclusion and age. *A. Feed Sci. and Technol.* 22: 105-118.
- Kidd, T. M. 2000.** Recent research on threonine needs of commercial broilers. Biokyowa Technical Review-11, US. Nutri-Quest, Inc.
- King, A. S. and J. McLelland. 1979.** Form and Function in birds, Vol. 1. *Academic Press.* New York.

- King, I. S., J. Y. F. Paterson, M. A. Peacock, M. W. Smith, and G. Syme. 1983.** Effect of diet upon enterocyte differentiation in the rat jejunum. *J. Physiol.* 344: 465-481.
- Klasing, K. C. 1988.** Influence of acute feed deprivation or excess feed intake on immunocompetence of broiler chicks. *Poult. Sci.* 67: 626-634.
- Klasing, K. C. 1998a.** Nutritional Modulation of Resistance to Infectious Diseases. *Poultry Science* 77:1119–1125
- Klasing, K. C., D. E. Laurin, R. K. Peng, and D. M. Fry. 1987.** Immunologically mediated growth depression in chicks: influence of feed intake, corticosterone and interleukin-1. *J. Nutr.* 117:1629-1637.
- Klis, F. M. 1994.** Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast.* 10: 851-869.
- Klis, F. M., A. Boorsma, and P. W. J. De Groot. 2006.** Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 23:185-2002.
- Klis, F., P. Mol, K. Hellingwerf, and S. Brul. 2002.** Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 239–256.
- Kocher, A. 2005.** Glycomics-The new frontier in poultry nutrition. Pages 53-56 in Proc. 17<sup>th</sup> Annual Australian Poultry Science Symposium. The Poultry Research Foundation U. Sydney, World's Poultry Science Association Australian Branch. 7-9 february, 2005. Sydney, New South Wales.
- Kogut, M. H. 2005.** The impact of innate immunity on disease resistance and susceptibility in *Poultry XXX Convención Anual de ANECA*, April 27-30, 2005, Puerto Vallarta, México. 2005; CD-rom.
- Kollár, R., B. B. Reinhold, E. Petráková, H. J. C. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonová, J. C. Kapteyn, F. M. Klis, and E. Cabib. 1997.** Architecture of yeast cell wall:  $\alpha$ (1-6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\alpha$ (1-3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* 272: 17762-17775.
- Kollár, R., E. Petráková, G. Ashwell, P. W. Robbins, and E. Cabib. 1995.** Architecture of yeast cell wall: The linkage between chitin and  $\alpha$ 1-3-glucan. *J. Biol. Chem.* 270: 1170-1178.
- Körösi, L and A. Körösi-Molnár. 2003.** Effects of BIO-MOS™ on productive parameters and immunological state of broilers. Pages 117 in 14<sup>th</sup> Eur. Symp. Nutr., Aug 2003, Lillehammer, Norway.
- Kruse, H. 2005.** Non-human usage of antimicrobials: recent developments at FAO/WHO/OIE. Pages 25-28 in Antimicrobial Growth Promoters: Worldwide Ban on the Horizon?. Bastiaanse Communication, Noordwijk aan Zee, the Netherlands.
- Kubena, L. F., T. S. Edrington, R. B. Harvey, S. A. Buckley, T. D. Phillips, G. E. Rottinghaus, and H. H. Caspers. 1997.** Individual and combined effects of
-

- fumonisin B<sub>1</sub> present in *Fusarium moniliforme* culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. **Poult. Sci.** 76:1239-1247.
- Kuroki, M., M. Ohta, Y. Ikemori, R. C. Peralta, H. Yokoyama, and Y. Kodama. 1994.** Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. *Arch. Virol.* 138:143-148.
- Laine, T., M. Yliaho, V. Myllys, T. Pohjanvirta, M. Fossi, and M. Anttila. 2004.** The effect of antimicrobial growth promoter withdrawal on the health of weaned pigs in Finland. *Prevent. Vet. Medicine.* 66: 163-174.
- Lamont, J. S. 1998.** Impact of genetic on disease resistance. *Poult. Sci.* 77: 1111-1118.
- Langhout D. J., J. B. Schutte, J. de Jong, H. Sloetjes, M. W. A. Verstegen, and S. Tamminga. 2000.** Effect of viscosity on digestion of nutrients in conventional and germ-free chicks. *Br. J. Nut.* 83: 533-540.
- Langhout, D. J. 1998.** Effect of viscosity on digestion of nutrients in conventional and germ-free chicks in: The role of the intestinal flora as affected by non-starch polysaccharides in broilers chicks. PhD thesis, Wageningen Agricultural University., ILOB Wageningen.
- Langhout, D. J., J. B. Schutte, P. Van Leeuwen, J. Wiebenga, J. Wiebenga, and S. Tamminga. 1999.** Effect of dietary high and low methylated citrus pectin on activity of the ileal microflora and morphology of the small intestine wall of broiler chicks. *Brithis Poultry Science* 40: 340-347.
- Langhout, D.J. 1998.** The role of intestinal flora as affected by non-starch polysaccharides in broiler chicks. *Ph.D Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.* 162pp.
- Lawrence, E. C., F. Arnaud-Battandier, J. Grayson, I. R. Koski, N. J. Dooley, A. V. Muchmore, R. M. Blaese. 1981.** Ontogeny of humoral immune function in normal chickens: a comparison of immunoglobulin-secreting cells in bone marrow, spleen, lungs and intestine. *Clin Exp Immunol.* 43: 450-457.
- Le Douarin, N. M., C. Martin, H. Ohki-Hamazaki, M. Belo, M. D. Coltey, and C. Corbel. 1990.** Development of the immune system and self/non-self-recognition studied in avian embryo. In *"The Avian Model in Developmental Biology: From Organism to Genes"* (N. Le Douarin, F. Dieterlen-Lievre, and J. Smith, eds.), pp.219-237. Edition Du Centre National De la Recherche Scientifique, Paris, France.
- Le Douarin, N. M., F. Dieterlen-Lievre, and P. D. Oliver. 1984.** Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *Am. J. Anat.* 170: 261-299.
- Lebacq-Verheyden, A. M., J. P. Vaerman, and J. F. Heremans. 1972.** A possible homologue of mammalian IgA in chicken serum and secretions. *Immunology.* 22: 165-175.

- Leeson, E. 2006.** Temas de interés presentes y futuros en nutrición de aves. Páginas 143-150 en *Anvances en nutrición y alimentación animal*. XXII Curso de Especialización FEDNA. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 16-17 de octubre Barcelona, España.
- Leeson, S., and J. D. Summers. 2001.** *Scott's Nutrition of the chicken*. 4<sup>th</sup> edition. *Universitary Books*. Guelph-Ontario, Canada.
- Lehrer, R. I., and T. Ganz. 1996.** Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 797: 228-239.
- Lehrer, R. I., and T. Ganz. 2002.** Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 96-102.
- Leser, T. D., J. Z. Amenuvor, T. K. Jensen, R. H. Lindecrona, M. Boye, and K. Moller. 2002.** Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 673-690.
- Leslie, G. A. and L. N. Martin. 1973.** Studies on the secretory immunologic system of fowl. III. Serum and secretory IgA of the chicken. *J. Immunol.* 110:1-9.
- Leslie, G. A., and L. W. Clem. 1969.** Phylogen of immunoglobulin structure and function. Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.* 130: 1337-1352.
- Lesson, S. and J. D. Summers 2001.** Non-Nutritive Feed Additives. Pages 452-453 in *Scott's Nutrition of the chicken*. S. Lesson, and J. D. Summers eds. Guelph, Ontario, Canada.
- Lilja, C. 1983.** A comparative study of postnatal growth and development in some species of birds. *Growth.* 47:317-386.
- Lillehoj, H. S. 1993.** Avian gut-associated immune system: implication in coccidial vaccine development. *Poult. Sci.* 72: 1306-1311.
- Lillehoj, H. S., and J.-Y. Chai. 1988.** Comparative natural killer cell activities of thymic, bursal, splenic, and intestinal intraepithelial Lymphocytes of chickens. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 629-643.
- Line, J. E., J. S. Bailey, A. N. Cox, and J. N. Stern. 1997.** Yeast treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* populations associated with broiler chickens subjected to transport stress. *Poult. Sci.* 76: 1227-1231.
- Line, J. E., J. S. Bailey, A. N. Cox, N. J. Stern, and T. Tompkins. 1998.** Effects of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poult. Sci.* 77: 405-410.
- Lloyd, A. B., R. B. Cummings, and R. D. Kent. 1977.** Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. *Aust. Vet. J.* 53: 82-87.

- Lochmiller, R. L., and C. Deerenberg. 2000.** Trade-offs in evolutionary immunology: Just what is the cost of immunity?. *Oikos*. 88:87–98.
- Long, J. F. 1967.** Gastric secretions in anaesthetized chickens. *Am. J. Physiology*. 212: 1303-1.307.
- Losa, R., and B. Köhler. 2001.** Prevention of colonisation of *Clostridium perfringens* in broilers intestines by essential oils. Pages 133-134 in Proceedings of the 13<sup>th</sup> European Symposium on Poultry Nutrition. WPSA, Blankenberge, Belgium.
- Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer, and M. D. Lee. 2003.** Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6816–6824.
- Machado-Caetano, J. A., M. T. Paramés, M. J. Babo, A. Santos, A. Bandeira-Ferreira, A. A. Freitas, M. R. Clemente-Coelho, and A. Matthioli-Mateus. 1986.** Immunopharmacological effects of *Saccharomyces boulardii* in healthy human volunteers. *Int. J. Immunopharmacol.* 8: 245-259.
- Mack, D. R., S. Michail, S. Wei, L. McDougall, and M. A. Hollingsworth. 1999.** Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* 276: G941–950.
- Mack, S., D. Hoffmann, and J. Otte. 2005.** The contribution of poultry rural development. *Wild's Poult. Sci. J.* 61: 7-14.
- Mackie, R. I., A. Sghir, and H. R. Gaskins. 1999.** Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 1035S.
- Mahajan, P., J. Sahoo, and P. C. Panda. 1999.** Effects of probiotic feeding and seasons on the growth performance and carcass quality of broilers. *Indian J. Poult. Sci.* 32: 167-176.
- Maisonnier, S., J. Gomez, and B. Carré. 2001.** Nutrient digestibility and intestinal viscosities in broiler chickens fed on wheat diets, as compared to maize diets with added guar gum. *Br. Poult. Sci.* 42:102-110.
- Malzone, A., B. Paluch, M.S. Lilburn, and A.E. Sefton. 2000.** Modulation of humoral immunity in commercial laying hens by a dietary probiotic. *Poult Sci.* 79 Suppl 1, 165.
- Mandal, S. K., T. K. Biswas, and L. Mandal. 1994.** Efficiency of different growth promoters on the performance of broilers. *Indian J. Poult. Sci.* 291: 13-17.
- Mansell, P. W. A., G. Rowden, and C. Hammer. 1978.** Clinical experiences with the use of glucan. In *Immune Modulation and Control of Neoplasia by Adjuvant Therapy*. Raven Press, New York, NY.
- Maramatsu, T., O. Takasu, M. Furuse, I. Tasaki, and J. Okumura. 1987.** Influence of the gut microflora on protein synthesis in tissues and in the whole body of chicks. *Biochem. J.* 246: 475-479.

- Marchaim, U., and R. G. Kulka. 1967.** The non-parallel increase of amylase, chymotrypsinogen and procarboxypeptidase in the developing chick pancreas. *Biochimica Biophysica Acta.* 146: 553-559.
- Marquardt, R. R., L. Z. Jin, J. W. Kim, L. Fang, A. A. Frohlich, and S. K. Baidoo. 1999.** Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23:283-288.
- Marquina, D., A. Santos, and J. M. Peinado. (2002).** Biology of killer yeast. *Int. Microbiol.* 5: 65-71.
- Martin, S.A., and D.J. Nisbet. 1992.** Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75, 1736.
- Martinez-Pomares, L, S. A. Linehan, P. R. Taylor, and S. Gordon. 2001.** Binding properties of the mannose receptor. *Immunobiology.* 204:527–35.
- Mashaly, M. M., G. L. Hendricks, M. A. Kalama, A. E. Gehad, A. O. Abbas, and P. H. Patterson. 2004.** Effect of heat stress on production parameter and immune response of commercial laying hens. *Poultry Sci.* 83:889-894.
- Masteller, L. M., and B. C. Thompson. 1994.** B cell development in the chicken. *Poultry Science.* 73: 1012-1018.
- Mateos, G. G., R. Lazaro, and P. Medel. 2000.** Feeding strategies for intensive livestock production without in feed antibiotic growth promoters. In: III Conf. On sow feed manufacturing in the Mediterranean region. March, 22-24, Reus, Spain.
- Mayer, L. 2003.** Mucosal immunity. *Pediatrics.* 111: 1595-1600.
- McCorkle, F. M., R. S. Stinson, I. Olah, and B. Glick. 1979.** The chicken's femoral lymph nodules. T&B cells and the immune response. *J. Immunol.* 123: 667-669.
- McDougald, L. R. 1998.** Intestinal protozoa important to poultry. *Poult. Sci.* 77: 1156-1158.
- McLelland, J. 1975.** Avian digestive system. Pages 1857-1882 in Sisson and Grossman's The Anatomy of the Domestic Animals. R. Getty, ed. Vol. 2, *Saunders, Philadelphia.*
- McLelland, J. 1979.** Digestive system. Pages 69-181 in Form and function in birds. A. S. King and J. McLelland, eds. *Academic Press,* London.
- Mead, G. C 1989.** Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. *J. Exp. Zool. Supplement* 3:48-54.
- Mead, G. C. and B. W. Adams. 1975.** Some observations on the caecal microflora of the chick during the first two weeks of life. *Br. Poult. Sci.* 16: 169–176.
- Medina, B., I. D. Girard, E. Jacotot, and V. Julliand. 2002.** Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *J. Anim. Sci.* 80: 2600-2609.
-

- Medzhitov, R., and C. A. Jr. Janeway. 1997.** Innate immunity: impact of the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9:4-9.
- Mewes, H. W., K. Alberman, M. Bahr, D. Frishmann, A. Gleissner, J. Hani, K. Heumann, K. Kleine, A. Maieri, S. G. Oliver, F. Pfeifer, and A. Zollner. 1997.** Overview of the yeast genome. *Nature.* 387: 7-9
- Mireles, A. J., S. M. Kim, and K. C. Klasing. 2005.** An acute inflammatory response alters bone homeostasis, body composition, and the humoral immune response of broiler chickens. *Poult. Sci.* 84: 553-560.
- Mitsch, P., K. Zitter-Eglseer, B. Köhler, C. Gabler, R. Losa, and I. Zimpnik. 2004.** The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Science.* 83: 669-675.
- Mitscher, L. A., S. Drake, S. R. Gollapudi, and S. K. Okwute. 1987.** A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *J. Nat. Prod.* 50:1025–1040.
- Mitsuoka, T. 1978.** Intestinal Bacteria and health: An Introductory narrative. Tokyo, Japan, Iwanami Shoten.
- Mockett, A. P. A. 1986.** Monoclonal antibodies used to isolate IgM from chicken bile and avian sera and to detect specific IgM in chicken sera. *Avian Pathol.* 15:337-348.
- Moncada, D. M., and K. Chadee. 2002.** Production, structure, and function of gastrointestinal mucins. Pages 57-79 in *Infections of the gastrointestinal tract.* M. J. Blaser, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg, and R. L. Guerrant, eds. 2nd ed. *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, Pa.
- Moncada, D. M., S. J. Kammanadiminti, and K. Chadee. 2003.** Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *TRENDS in Parasitol.* 19: 305-311.
- Monsan, P., and F. Paul. 1995.** Oligosaccharide feed additives. Pages 233–245 in *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding.* R. J. Wallace and A. Chesson, ed. VCH, New York.
- Montagne, L., C. Piel, and J. P. Lalles. 2004.** Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. *Nutr. Rev.* 62: 105-114.
- Montagne, L., J. R. Pluske, and D. L. Hampson. 2003.** A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108: 95-117.
- Moog, F. 1950.** The functional differentiation of the small intestine. I. The accumulation of alkaline phosphomonoesterase in the duodenum of chicks. *J. Exp. Zool.* 115: 109-130.
- Moore, P. R., A. Evenson, T. D. Luckey, E. McCoy, C. A. Elvehjam, and E. B.**
-

- Hart. 1946.** Use of sulfasuxidine, streptothricin and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J. Biol. Chem.* 165:437-441.
- Moran Jr, E. T. 1982.** Comparative nutrition of fowl & swine. The gastrointestinal system. *University of Guelph*. Ontario, Canada.
- Moran Jr, E. T. 1985.** Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. *J. Nutr.* 115:665-674.
- Moran Jr, E. T. 1996.** Intestinal physiology influencing enteric disease in fowl. 39<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association of Avian Pathology, Louisville, KY. July 21, 1996.
- Morris, G.J., L. Winters, G. E. Coulson, and K. J. Clarke. 1986.** Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2023–2034.
- Mroz, Z. 2003.** Organic acids of various origin and physicochemical forms as potential growth promoter for pigs. Pages 267-294 in 9<sup>th</sup> Symposium Digestive Physiology in Pigs. Banff, Canada.
- Mueller, A., K. Sato, and B. Glick. 1971.** The chicken lacrimal gland, gland of Harder, caecal tonsil, and accessory spleens as sources of antibodies producing cells. *Cell. Immunol.* 2: 140-152.
- Mukhopadhyay, S., J. Herre, D. G. Brown, and S. Gordon. 2004.** The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology.* 112: 521-530.
- Muramatsu, T., S. Nakajima, and J. Okumura. 1994.** Modification of energy metabolism by the presence of the gut microflora in the chicken. *Br. J. Nutr.* 71:709-717.
- Murray, B. E. 2000.** Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N. Engl. J. Med.* 342:710-21.
- Murray, D. L., J. Brake, and J. P. Thaxton. 1987a.** Effect of adrenocorticotropin and dietary ascorbic acid on cutaneous basophil hypersensitivity to phytohemagglutinin in chickens. *Poultry Sci.* 66:1846–1852.
- Murray, D. L., J. Brake, J. P. Thaxton, and R. P. Gildersleeve. 1987b.** Effects of adrenocorticotropin and dietary ascorbic acid on delayed type hypersensitivity to human gamma globulin in chickens. *Poultry Sci.* 66:1859–1969.
- Murthy, K. K, J. L. Pace, B. O. Barger, D. L. Dawe, and W. L. Ragland. 1984.** Localization and distribution by age and species of a thymus-specific antigen. *Thymus.* 6: 43-56
- Murthy, T. N. K., and G. Devegowda. 2004.** Efficacy of modified glucomannan Mycosorb<sup>®</sup> to adsorb aflatoxin B<sub>1</sub> in gut conditions of broiler chickens. Compact disk



- in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- Nakamura, K., Y. Imada, and M. Maeda. 1986.** Lymphocytic depletion of bursa of fabricius and thymus in chickens inoculated with *Escherichia coli*. *Vet. Pathol.* 23: 712-717.
- Nakamura, K., Y. Mitarai, M. Yoshioka, N. Koizumi, T. Shibahara, and Y. Nakajima. 1998.** Serum levels of interleukin-6, alpha1-acid glycoprotein, and corticosterone in two-week-old chickens inoculated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Poult. Sci.* 77: 908-911.
- Nam, K. C., and D. U. Ahn. 2003.** Use of antioxidants to reduce lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated pork homogenates and patties. *Meat Sci.* 63:1-8.
- National Research Council (NRC). 1994.** Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Newbold, C. J. 2003.** Probiotics. Principles for the use in ruminant nutrition. Pages 29-40 in Role of probiotics and their link to the demands of European consumers. 11 February 2003, ID-Lelstad report 03/0002713.
- Newbold, C.J. 1996.** Probiotics for ruminants. *Ann. Zootech.* 45, Suppl.: 329-335.
- Ngeh-Ngwainbi, J., J. Lin, and A. Chandler. 1997.** Determination of total, saturated, unsaturated, and monounsaturated fats in cereal products by acid hydrolysis and capillary gas chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC international* 80: 2: 359-372.
- Nguyen, T. H., G. H. Fleet, and P. L. Rogers. 1998.** Composition of the cell wall of several yeast species. *App. Microbiol. Biotechnol.* 50: 206-212.
- Nickel, R., A. Schummer, E.Seiferle, W. G. Siller, and P. A. L. Wight. 1977.** "*Anatomy of the domestic birds.*" Springer-Verlag, New-York.
- Nilson, A. J., M. F. Peralta, and R. D. Miazzo. 2004.** Use of Brewer's yeast (*S. cerevisiae*) to replace part of the vitamin mineral premix in finisher diets. Compact disk in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- Nir, I., D. Yam, and M. Perek. 1975.** Effects of stress on the corticosterone content of the blood plasma and adrenal gland of intact and bursectomized *Gallus domesticus*. *Poultry Sci.* 54:2101-2110.
- Nir, I., Z. Nitsan, and M. Mahagna. 1993.** Comparative growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler and egg type chicks after hatching. *Br. Poult. Sci.* 34: 523-532.

- Nitsan, Z., E. A. Dunnington, and P. B. Siegel. 1991b.** Organ growth and digestive enzyme levels to fifteen days of age in lines of chickens differing in body weight. *Poult. Sci.* 70: 2040-2048.
- Nitsan, Z., G. Ben-Aviaham, Z. Zoref, and J. Nir. 1991a.** Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. *Br. Poult. Sci.* 32: 515-523.
- Nitta, K., and F. Kobayashi. 1999.** Brewer's yeast as health foodstuff. *New Food Ind. (Japan)*. 41: 17-23.
- Noack, J., B. Kleessen, A. Lorenz, and M. Blaut. 1996.** The effect of alimentary polyamine depletion on germ-free and conventional rats. *J. Nutr. Biochem.* 7:560-566.
- Nockels, C. F. 1979.** Protective effect of supplemental vitamin E against infection. *Fed. Proc.* 38: 2134-2138.
- Noy, Y., and D. Sklan. 1998.** Yolk utilisation in the newly hatched poult. *Br. Poult. Sci.* 39:446-451.
- Noy, Y., and D. Sklan. 1999.** Different types of early feeding and performance in chicks and poults. *J. Appl. Poult. Res.* 8: 16-24.
- O'Doherty, P. J. A., and A. Kuksis. 1975.** Effect of puromycin *in vitro* on protein and glycerolipid biosynthesis in isolated epithelial cells of rat intestine. *Int. J. Biochem.* 6:435-441.
- Ochi, Y., T. Mitsuoka, and T. Segal, 1964.** Untersuchungen über die Darmflora des Huhnes II Mitteilun: Die Entwicklung der Darmflora von Küken bis zum huhn. *Zentralblad der Bakteriologie und Parsitenkunde Infectionskriege und hygiene Abt. I.* 193:80-95.
- Odend'haI, S. and J. E. Brezaile, 1980.** An area of T cell localization in the cloacal bursa of white leghorn chickens. *Am. J. Vet. Res.* 41: 255-267.
- Offer, N.W. 1990.** Maximising fiber digestion in the rumen: the role of yeast culture. In *Biotechnology in the Feed Industry* ed T.P. Lyons. Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky. pp. 79.
- Olah, I., and B. Glick, 1983.** Avian lymph node: Light and electron microscopic study. *Anat. Rec.* 205: 287-289.
- Olah, I., and B. Glick. 1984.** Meckel's diverticulum. I. Extramedullary myelopoiesis in the yolk sac of hatched chickens (*Gallus domesticus*). *Anat. Rec.* 208: 243-252.
- Olah, I., and B. Glick. 1985.** Lymphocyte migration through the lymphatic sinuses of the chicken's lymph node. *Poult. Sci.* 64: 159-168.
- Olah, I., and B. Glick. 1991.** An Ig A-like substance in the chicken's pineal. *Experiential.* 147:202-205.
- Olsen, N. J., and W. J. Kovacs. 1996.** Gonadal steroids and immunity. *Endocr. Rev.*

17:369–384.

- Orban, J. I., J. A. Patterson, A. L. Sutton, and G. N. Richards. 1997.** Effect of sucrose thermal oligosaccharide caramel, dietary vitamin-mineral level, and brooding temperature on growth and intestinal bacterial populations in broiler chickens. *Poult. Sci.* 76:482-490.
- Oriol, E. 2004.** SAF-Mannan: Origen, Producción y Análisis. CD in VI Seminario Internacional (Microbiología aplicada a Nutrición Animal). Lesaffre Feed Additives/Saf Agri. Nov. 4, Veracruz, México.
- Orlans, E., and M. E. Rose. 1970.** Antibody formation by transferred cell in inbred fowls. *Immunology.* 18: 473-482.
- Orleans, P. 1997.** Biogenesis of yeast wall and surface components. Pages 229-362 in *Cell Cycle and Cell Biology*, vol 3, J. R. Pringle, J. R. Broach, E. W. Jones, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Ortuño, J., A. Cuesta, A. Rodríguez, M. A. Esteban, and J. Meseguer. 2002.** Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 85: 41-50.
- Osborn, H.M.I. and Khan, T.H. 2000.** *Oligosaccharides : Their Synthesis and Biological Roles.* Oxford Chemistry Masters, OUP, 2000.
- Osumi, M. 1998.** The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron.* 29: 207-233.
- Owusu-Asiedu, A., C. M. Nyachoti, S. K. Baidoo, R. R. Marquardt, and X. Yang. 2003.** Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody. *J. Anim. Sci.* 81:1781-1789.
- Oyofe, B. A., J. R. DeLoach, D. E. Corrier, J. O. Norman, R. L. Ziprin, and H. H. Mollenhauer. 1989a.** Effect of carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. *Avian Dis.* 33:531–534.
- Oyofe, B. A., J. R. DeLoach, D. E. Corrier, J. O. Norman, R. L. Ziprin, and H. H. Mollenhauer. 1989b.** Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poultry Sci.* 68:1357–1360.
- Oyofe, B. A., J. R. DeLoach, D. E. Corrier, J. O. Norman, R. L. Ziprin, and H. H. Mollenhauer. (1989).** Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poultry Sci.* 68:1357–1360.
- Oyofe, B. A., R. E. Droleskey, J. O. Norman, H. M. Mollenhauer, R. L. Ziprin, D. E. Corrier, and J. R. DeLoach. 1989c.** Inhibition by mannose of *in vitro* colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. *Poultry Sci.* 68:1351–1356.

- Pabst, R., M. Geist, H. J. Rothkötter, and F. J. Fritz. 1998.** Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ilea Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunol.* 64:539-544.
- Page, S. W. 2005.** Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: the benefits. Page 11-13 in *Antimicrobial Growth Promoters: Worldwide Ban on the Horizon?*. Bastiaanse Communication, Noordwijk aan Zee, the Netherlands.
- Paik, Y. K., T. Fujioka, and M. Yasuda. 1974.** Comparative and topographical anatomy of the fowl. LXXVIII. Division of pancreatic lobes and distribution of pancreatic ducts. *Jap. J. Vet. Sci.* 36: 213-229.
- Palermo-Neto, J. 2005.** Residues feed additives and veterinary medicine barriers to product availability and trade. Pages 92 in *Poultry production and diminishing availability of pharmaceuticals*. XXII World's Poultry Congress, WPSA. June 8-13, Istanbul-Turkey.
- Parks, C. W., P. R. Ferket, and J.L. Grimes. 2002.** Growth performance and immune status of turkey fed antibiotics and mannanoligosaccharide. Bremen-11th European poultry Conference. September 2002-WPSA, European Federation World's Poultry Service Association: 115 Abst..
- Partanen, K.H. and Z. Mrzoz. 1999.** Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews* 12: 117-145.
- Patterson, J. A. and K. M. Burkholder. 2003.** Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. *Poultry Science.* 82:627-631.
- Patterson, J. A., J. I. Orban, A. L. Sutton, and G. N. Richards. 1997.** Selective enrichment of bifidobacteria in the intestinal tract of broilers by thermally produced kestoses and effect on broiler performance. *Poult. Sci.* 76:497-500.
- Paz, S., A. G. Pellegrini, M. C. Fornari, J. S. Tapia, and A. R. Diez. 2003.** Observación preliminar: Efectos de la suplementación dietaria con levadura de cerveza (*Saccharomyces uvarum*) sobre el estallido respiratorio de neutrófilos en equinos criollos en entrenamiento. *Vet. Méx.* 34: 103-110.
- Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon. 2002.** Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 14:123-28.
- Perez-Vilar, J., and R. L. Hill. 1999.** The structure and assembly of secreted mucins. *J. Biol. Chem.* 274: 31751-31754.
- Perry, F. G. 1995.** Biotechnology in animal feeds and feeding, an overview. Pages 1-15 in *Biotechnology in animal feeds and feeding*. R. J. Wallace and A. Chesson, eds. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim and New York.
- Petkov, G., and V. Tsutsumanski. 1975.** Comparative study of microbial and mold pollution of the air in locations for poultry-keeping in various technologies. *Vet. Med.*

- Nauki*.12:14–19.
- Pettigrew, J. E. 2000.** Mannan oligosaccharides effects on performance reviewed. *Feedstuffs*. 25: 12-14.
- Pfohl-Leszkwicz A. 2000.** Risques mycotoxicologiques pour la santé des animaux et de l'homme. *Cah. Nutr. Diét.* 35: 389–397.
- Philips, S. M., and R. Fuller. 1983.** The activities of amylase and a trypsin like protease in the gut contents of germ-free and conventional chickens. *Br. Poult. Sci.* 24: 115-121.
- Phillips, I., M. Casewell, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston, and J. Waddell. 2004.** Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemoth.* 53: 28-52.
- Piel, C., L. Montagne, B. Sève, and J. P. Lallès. 2005.** Increasing digesta viscosity using carboxymethylcellulose in weaned piglets stimulates ileal goblet cell number and maturation. *J. Nutr.* 135:86-91.
- Pier A.C., and J.L.Richard. 1992.** Mycoses and mycotoxicoses of animals caused by aspergilli. *Biotechnol.* 23: 233–248.
- Pillemer, L., and E. E. Ecker 1941.** Anticomplementary factor in fresh yeast. *J. Biol. Chem.* 137:139-142.
- Piva, A. 1998.** Non-conventional feed additives. *J. Anim. Feed Sci.* 7:143–154.
- Pluske, P. M., Z. Durmic, D.W. Pethick, B.P. Mullan, and D.J. Hampson. 1998.** Confirmation of the role of rapidly fermentable carbohydrates in the expression of swine dysentery in pigs after experimental infection. *J. Nutr.* 128:1737-1744.
- Pluske, J. R., P.M. Siba, D.W. Pethick, Z. Durmic, B.P. Mullan, and D.J. Hampson. 1996.** The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine. *J. Nutr.* 126:2920-2933.
- Pokorny, J. 1999.** Antioxidants in food preservation. Pages 307-337 in Handbook of Food Preservation. M. S. Rahman, ed. Marcel Dekker, New York.
- Pond, W. G. and J. T. Yen. 1987.** Effect of supplemental carbadox, an antibiotic combination, or clinoptilolite on weight gain and organ weights of growing swine fed maize or rye as the grain sources. *Nutr. Rep. Int.* 35: 801–809.
- Porter Jr, R. E. 1998.** Bacterial enteritides of poultry. *Poult. Sci.* 77: 1159-1165.
- Pothoulakis, C., C. P. Kelly, M.A. Joshi, N. Gao, C. J. O'Keane, I. Castagliuolo, and J. T. Lamont 1993.** *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterol.* 104: 1108-1115.
- Prado, R. O. F., M. S. Buenos, M. Aldana, F. Torres, M. L. J. García, B. C. A Chapula, M. M. Martínez, E. M. A. Juárez, y L. J. A. Quintana. 2005.** Factores
-

- que afectan al pollo de engorda desde la planta incubadora hasta la granja en diferentes épocas del año. *in Poultry XXX Convención Anual de ANECA*, April 27-30, 2005, Puerto Vallarta, México. 2005; CD-rom.
- Presser K. A., D. A. Ratkowsky, and T. Ross. 1997.** Modeling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2335-2360.
- Preston, M.C., K. J. McCracken, and M. R. Bedford. (2002).** Effect of wheat content, fat source and enzyme supplementation on diet metabolisability and broiler performance. *Br. Poult. Sci.* 42:625-632.
- Proudfoot, F. G., and H. W. Hulan. 1982.** Effect of reduced feeding time using mash or crumble-pellet dietary regimens on chicken broiler performance, including the incidence of acute death syndrome. *Poult. Sci.* 61: 750-754.
- Puvadolpirod, S. and J. P. Thaxton 2000b.** Model of physiological stress in chickens 2. Dosimetry of Adrenocorticotropin. *Poultry Sci.* 79: 370-376.
- Puvadolpirod, S. and J. P. Thaxton 2000c.** Model of physiological stress in chickens 3. Temporal patterns of response. *Poultry Sci.* 79: 377-382.
- Puvadolpirod, S. and J. P. Thaxton 2000d.** Model of physiological stress in chickens 4. Digestion and metabolism. *Poultry Sci.* 79: 383-390.
- Puvadolpirod, S., and J. P. Thaxton. 2000a.** Model of Physiological Stress in Chickens 1. Response Parameters. *Poultry Sci.* 79: 363-369.
- Qamar, A., S. Aboudola, M. Warny, et al. 2001.** *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infect. Immun.* 69: 2762-2765.
- Quiroz, 2000.** Factores que causan inmunodepresión en las aves y su impacto económico. *in Poultry XXV Convención Anual ANECA*, Mayo 27-30, 2000, Cancún, Q. Roo, México. 2000; 12-18.
- Qureshi, M. A. 1998.** Role of macrophages in avian health and disease. *Poultry Science*. 77: 978-982.
- Qureshi, M. A., I. Hussain, and C. L. Heggen. 1998.** Understanding immunology in disease development and control. *Poult. Sci.* 77: 1126-1129.
- Raa, J. 2003.** The use of immune-stimulant to enhance disease resistance and growth performance of fish and shrimp. Pages 67-75 in XI Congreso nacional de AMENA y I Congreso Latino-Americano de nutrición animal. Cancún, Qroo (México).
- Ragae, S. M., G. L. Campbell, G. J. Scoles, J. G. McLeod, and R. T. Tyler. 2001.** Studies on rye (*Secale cereale* L.) lines exhibiting a range of extract viscosities. 2. Rheological and baking characteristics of rye and rye/wheat blends and feeding value for chicks of wholemeals and breads. *J. Agric. Food Chem.* 49:2446-2453.
-

- Raju, M. V. L. N. and G. Devegowda. 2000.** Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and hematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin. *Br. Poult. Sci.* 41: 640-650.
- Ratcliff, M.J.H., E. Paramithiotis, A. Coumidis, C. Sayegh, and S. Demaries. 1996.** The bursa of Fabricius and its role in avian B lymphocyte development. Pages 317–325 in: *Poultry Immunology*. T. F. Davison, T. R. Morris, and L.N. Payne, ed. Poultry Science Symposium Series. Vol. 24. Carfax Publishing, Oxfordshire, UK.
- Regulation (EC) No 1831/2003. (2003).** On additives for use in animal nutrition, Official Journal of the European Union, 18.10.2003. [http://europa.eu.int/eur-ex/pri/en/oj/dat/2003/1\\_268/1\\_26820031018en00290043.pdf](http://europa.eu.int/eur-ex/pri/en/oj/dat/2003/1_268/1_26820031018en00290043.pdf). Accessed, July 2005.
- Richards, J. D., J. Gon, and C. F. M. de Lange. 2005.** The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with emphasis on pigs: Current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Can. J. Anim. Sci.* 85: 421-435.
- Ricke, S. C. M. M. Kundinger, D. R. Miller, and J. T. Keeton. 2005.** Alternatives to antibiotics: chemical and physical antimicrobial interventions and food borne pathogen response. *Poult. Sci.* 84: 667–675.
- Riddell, C., and R. Springer. 1985.** An epizootiological study of acute death syndrome and leg weakness in broiler chickens in western Canada. *Avian Dis.* 29: 90-102.
- Ringot, D., B. Lerzy, J. P. Bonhoure, E. Auclair, E. Oriol, and Y. Larondelle. 2005.** Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochem.* 40: 3008-3016.
- Robredo, B., K. V. Singh, F. Baquero, B. E. Murray, and C. Torres. 2000.** Vancomycin resistant enterococci isolated from animals and food. *Int. J. Food Microbiol.* 54:197-204.
- Rodrigues, A. C. P., D. C. Cara, S. H. G. G. Fretez, F. Q. Cunha, E. C. Vieira, J. R. Nicoli and L. Q. Vieira. 2000.** *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.* 89: 404-414.
- Rodrigues, A. C. P., R. M. Nardi, E. A. Bambirra, E.C. Viera, and J.R. Nicoli. 1996.** Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* conventional and gnotobiotic mice. *J Appl Bacteriol.* 91: 251-256.
- Romagnani, S. 1995.** Biology of human TH1 and TH2 cells. *J. Clin.Immunol.* 15:121–129.
- Romanoff, A. L. 1960.** The Avian Embryo: Structural and function development. *The McMillan Company*, New York.

- Romero, R., and J. Gomez-Basauri. 2003.** Yeast and Yeast products, past present and future: From flavour to nutrition and health. Pages 365-371 in Beyond the tornado natural technologies: The calm after the storm. Nutritional biotechnology in the feed and food industries. T. P. Lyons and K. A. Jacques, eds. *Nottingham University Press*, Nottingham, UK.
- Rose, M. E., E. Orlans, A. W. R. Payne, and P. Hesketh. 1981.** The origin of IgA in chicken bili, its rapid active transport from the blood. *Eur. J. Immunol.* 11: 561-564.
- Rosen, G. D. 1995.** Antibacterials in poultry and pig nutrition. In: Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding. Wallace, R.J. and A. Chesson (Eds.), VCH Verlagsgesellschaft: 143-472.
- Rosen, G. D. 2005.** Halo-analysis of the effects of genetic, managerial, chronological and dietary variables on the efficacy of a pronutrient mannanoligosaccharide in broilers. *Br. Poult. Sci. Abstracts.* 1:27-29.
- Rosen, G. D. 2006.** Holo-Analysis. *Poult. Sci.* 85: 957-959.
- Rossi, F., A. Di Luccia, D. Vincenti, P. and S. Cocconcelli. 2004.** Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. *Anim. Res.* 53: 177-186.
- Rothkötter, H. J., H. Ulrich, and R. Pabst. 1991.** The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs. *Pediatr. Res.* 29:237-242.
- Roura, E. 2003.** Alternativas a los promotores de crecimiento antibióticos en producción porcina. *Anaporc.* 23: 168-176.
- Roura, E., J. Homedes, and K. C. Klasing. 1992.** Prevention of immunologic stress contributes to the growth-promoting ability of dietary antibiotics in chicks. *J. Nutr.* 122:2283-2290.
- Sakamoto, K., Y. Mori, H. Takagi, H. Iwata, T. Yamada, N. Futamara, T. Sago, T. Ezaki, Y. Kawamura, and H. Hirose. 2004.** Translocation of *Salmonella typhimurium* in rats on total parenteral nutrition correlates with changes in intestinal morphology and mucus gel. *Nutrition.* 20: 372-376.
- Salanitro, J. P., I. G. Fairchild and Y. D. Zgomicki. 1974.** Isolation, culture characteristics and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. *Appl. Microbiol.* 27: 678-687.
- Salanitro, J.P., I.G. Blake, P.A. Muirhead, M. Maglio, and J.R. Goodman. 1978.** Bacteria isolated from the duodenum, ileum and cecum of young chicks. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 782-790.
- Sams, A. 2005.** Profitability and competitiveness through efficiency. in *Poultry XXX Convención Anual de ANECA*, April 27-30, 2005, Puerto Vallarta, México. 2005; CD-



rom.

- Samuels, S. E., and V. E. Baracos. 1995.** Tissue protein turnover is altered during catch-up growth following *Escherichia coli* infection in weanling rats. *J. Nutr.* 125:520-530.
- Sánchez Vizcaíno, J. M. 2000.** "Curso de introducción a la inmunología porcina". Web page: [www.revista-anaporc.com/curso/inicio.htm](http://www.revista-anaporc.com/curso/inicio.htm). Accessed October 2005.
- Santin, E., A. Maiorka, M. Macari. 2001.** Performance and intestinal mucosa development of broilers chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Appl. Poult. Res.* 10:236-244.
- Santin, E., A. Maiorka, M. Macari. 2001.** Performance and intestinal mucosa development of broilers chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Appl. Poult. Res.* 10:236-244.
- Santin, E., A.C. Paulillo, A. Majorka, L. S. N. Okada, M. Macari, da-S. A. V. Fischer, and A. C. Alessi. 2003.** Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 2: 341-344.
- Santomá, G., P. Pérez de Ayala, y A. Gutiérrez del Álamo. 2006.** Producción de broilers sin antibióticos promotores del crecimiento. Conocimientos actuales. Pages 23-55 in XLIII Symposium Científico de Avicultura. Sección Española de la Asociación Mundial de Avicultura Científica, WPSA- AECA. 18-19 de octubre Barcelona, España.
- Sarkar, S., S. K. Mandal, and G. C. Baneerjee. 1997.** Effect of feeding yeast and antibiotic on the performance of broilers. *Indian J. Poult. Sci.* 32: 126-131.
- Sarra, P.G., F. Dellaglio, and V. Bottazzi. 1985.** Taxonomy of lactobacilli isolated from the alimentary tract of chickens. *System Appl. Microbiol.* 6: 86-89.
- SAS Institute. 1996.** SAS User's Guide. Release 6.12 Edition: SAS institute Inc., Cary, NC.
- Savage, D. C. 1977.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:107-133.
- Savage, D. C. 1986.** Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 6: 155-178.
- Savage, T. F., P. F. Cotter, and E. I. Zakrzewska. 1996.** The effect of feeding a mannanoligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgA, and bile IgA of Wrolstad MW male turkeys. *Poult. Sci.* 75 Suppl 1.
- Sayegh, C. E., S. L. Demaries, K. A. Pike, J. E. Friedman, and M. J. Ratcliffe. 2000.** The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development. *Immunol. Rev.* 175:187-200
- Schat, K. A., and T. J. Myers. 1991.** Avian intestinal immunity. *Crit. Rev. Poultry Biol.*

3: 19-34.

**Scholz, W., D. Garcia-Díaz, D. Ricque, L. E. Cruz-Suarez, F. Vargas-Albores, and J. Latchford. 1999.** Enhancement of vivriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*. 176: 271-283.

**Schuurs, A.H.W.M., and H.A.M. Verheul. 1990.** Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J. Steroid Biochem.* 35:157-172.

**Scoles, G. J., G. L. Campbell, and J. G. McLeod. 1993.** Variability for grain extract viscosity in bred lines and an F2 population of rye (*Secale cereale* L.). *Can. J. Plant Sci.* 73:1-6.

**Scott, T. R. and M. L. Savage. 1996.** Immune cell proliferation in the Harderian gland: An avian model. *Microscopy Res. Tech.* 29: 149-155.

**Shafey, T. M., S. Al-Mufarej, G. B. Havenstein, and A. J. Jarelnabi. 2001.** Effects of mannan oligosaccharides on antibody response to infectious bronchitis, infectious bursal disease and Newcastle disease in chickens. *J. Appl. Anim. Res.* 19: 117-127.

**Sharon, N., and H. Lis. 1993.** Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am.* 268: 82-89.

**Shashidhara, R.G., and G. Devegowda. 2003.** Effect of dietary mannanoligosaccharide on breeder production traits and immunity. *Poult Sci.* 82: 1319-1325.

**Shea-Donohue, T., E. D. Dorval, E. Montcalm, H. El-Bayer, A. Durakovich, J. J. Conklin, and A. Dubois. 1985.** Alterations in gastric mucus secretion in rhesus monkeys after exposure to ionizing radiation. *Gastroenterol.* 88:685-690.

**Sherman, P., J. F. Forstner, N. Roomi, I. Kharti, and G. G. Forstner. 1985.** Mucin depletion in the intestine of malnourished rats. *Am. J. Physiol.* 248:G418-G423.

**Shire, A., J. R. Thompson, B. V. Turner, P. M. Kennedy, and Y. K. Goh. 1987.** Rate of passage of corn-canola meal and corn-soybean meal diets through the gastrointestinal tract of broiler and White leghorn chickens. *Poult. Sci.* 66:289-298.

**Short, F.J., P. Gorton, J. Wiseman, and K.N. Boorman. (1996).** Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim. Feed Sci. Technol.* 59:215-221. Spring, P., C. Wenk, A. K. Dawson, and E. K. Newman. 2000. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broilers chicks. *Poult. Sci.* 79:205-211.

**Shub, M. D., K. Y. Pang, D. Swann, and W. A. Walker. 1983.** Age related changes in chemical composition and physical properties of mucus glycoprotein from rat small intestine. *Biochem. J.* 215:405-411.

**Siegel, P. B., and W. B. Gross. 1980.** Production and persistence of antibodies in

- chickens to sheep erythrocytes. 1. Directional selection. *Poultry Sci.* 59: 1-5.
- Sifire, M. 2005.** Informal nutrition symposium: digestive physiology, metabolic challenges, and nutritional opportunities. *J. Appl. Poult. Res.* 14: 425.
- Silva, S. S. P., and R. R. Smithard. 1996.** Exogenous enzymes in broiler diets: crypt cell proliferation, digesta viscosity, short chain fatty acids and xylanase in the jejunum. *Br. Poult. Sci.* 37 (Supplement): S77-S79.
- Simmering, R., and M. Blaut. 2001.** Pro- and prebiotics-the tasty guardian angels? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:19–28.
- Simon, O. 2003.** Probiotics in poultry production. Pages 61-89 in Role of probiotics and their link to the demands of European consumers. 11 February 2003, ID-Lelistad report 03/0002713.
- Sims, M. D., K. A. Dawson, K. E. Newman, P. Spring, and D. M Hoogell. 2004.** Effects of dietary mannan Oligosaccharide, bacitracin Methylene Disalicylate, or both on the live performance and intestinal microbiology of turkeys. *Poult. Sci.* 83: 1148-1154.
- Skerra, A. 2003.** Imitating the humoral immune response. *Current Opinion in Chemical Biology.* 7:683-693.
- Sklan, D. 2001.** Development of the digestive tract of poultry. *World's Poult. Sci. J.* 57: 415-428.
- Sklan, D. 2005.** Development of defense mechanism in the digestive tract of the chick. *J. Appl. Poult. Res.* 14: 437-443.
- Sklan, D. and Y. Noy. 2003.** Functional development and intestinal absorption in the young poult. *Br. Poult. Sci.* 44:651-658.
- Sklan, D., and Y. Noy. 2000.** Hydrolysis and absorption in the intestine of newly hatched chicks. *Poult. Sci.* 79: 1306-1310.
- Sklan, D., N. Cohen, and S. Hurwitz. 1996.** Intestinal uptake and metabolism of fatty acids in the chick. *Poult. Sci.* 75: 1104-1108.
- Smirnov, A., D. Sklan, and Z. Uni. 2004.** Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. *J. Nutr.* 134:736–742.
- Smirnov, A., E. Tako, P. R. Ferket, and Z. Uni. 2006.** Mucin Gene Expression and Mucin Content in the Chicken Intestinal Goblet Cells Are Affected by In Ovo Feeding of Carbohydrates. *Poult. Sci.* 85:669–673.
- Smirnov, A., R. P. E. Amit-Romach, D. Sklan, and Z. Uni. 2005.** Mucin dynamics and microbial populations in chickens small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. *J. Nutr.* 135: 187-192.
- Smith, H. W. 1965.** The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J. Pathol. Bacteriol.* 90:495-513.
-

- Smith, H. W. and J. E. T. Jones. 1963.** Observation on the alimentary tract and its bacterial flora in healthy and diseased pigs. *J. Pathol. Bacteriol.* 86: 387.
- Smith, K. E., J. M. Besser, C. W. Hedberg, F. T. Leano, J. B. Bender, J. H. Wicklund, B. P. Johnson, K. A., Moore, and M. T. Osterholm. 1999.** Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. *N. Engl. J. Med.* 340: 1525-1532.
- Smith, M. W., M. A. Mitchell, and M. A. Peacock. 1990.** Effects of genetic selection on growth rate and intestinal structure in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 97A: 57-63.
- Smits, C. H. M., and G. Annison. 1996.** Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition towards a physiologically valid approach to their determination. *World's Poultry Sci. J.* 52: 203-221.
- Solari, R. and J. P. Kraehenbuhl. 1985.** The biosynthesis of secretory component and its role in the transepithelial transport of IgA dimer. *Immunol. Today.* 6: 17-20.
- Soravari, R., A. Naukkarinen, and T. E. Sorvari. 1977.** Analsucking-like movements in the chicken and chick embryo followed by the transportation of environmental materials to the bursa of Fabricius, ceca and ceecal tonsils. *Poult. Sci.* 56: 1426-1429.
- Sparks, M., Paschertz, and J. Kamphues. 2005.** Yeast different sources and levels as protein source in diets of reared piglets: effects on protein digestibility and N-metabolism. *J. Ani. Physiol. Ani. Nutr.* 89: 184-188.
- Spiro, R. 2002.** Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 12:43R-56R.
- Spring, P., C. Wenk, A. K. Dawson, and E. K. Newman. 2000.** The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broilers chicks. *Poult. Sci.* 79:205-211.
- Stacewicz-Sapuntzakis, M., P. E. Bowen, E. A. Hussain, B. I. Damayanti-Wood, and N. R. Farnsworth. 2001.** Chemical composition and potential health effects of prunes: A functional food?. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 41:251-286.
- Stanley, V. G., A. E. Sefton, and H. Chkwe. 1995.** The interaction of temperature, mannanoligosaccharides and aflatoxin on broiler chicks. Pages 2-7 in Proc. 10<sup>th</sup> World's Poultry Sci. Assoc. Conf. On Poultry Nutr., Antalya, Turkey.
- Stanley, V. G., C. Brown, and A. Sefton. 2000.** Comparative evaluation of a yeast culture, mannanoligosaccharides and an antibiotic on performance of turkeys. *Poult. Sci. Annual Meeting Abstracts.* Poscal 79 Suppl. 1: 117 Abst.
- Stanley, V. G., C. Gray, M. Daley, W. F. Krueger, and A. E. Sefton. 2004.** An alternative to antibiotic-based drugs in feed for enhancing performance of broilers grown on *Eimeria* spp.-infected litter. *Poult. Sci.* 83:39-44.

- Stanley, V. G., M. Winsman, C. Dunkley, T. Ogunleye, M. Daley, W. F. Krueger, A. E. Sefton, and Jr. A. Hilton. 2004.** The impact of yeast culture residue on the suppression of dietary aflatoxin on the performance of broiler breeder hens. *J. Appl. Poul. Res.* 13:533-539.
- Stanley, V. G., R. Ojo, S. Woldesenbet, D. H. Hutchinson, and L. F. Kubena. 1993.** The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* 70: 1867-1872.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute. 1996.** SAS User's Guide. Release 6.12 Edition: SAS institute Inc., Cary, NC.
- Stewart, G, G, and I. Russell. 1998.** An Introduction to brewery science & technology. Series III. Brewer's yeast. The institute of brewing, 33 Clarges street, London W1Y 8EE, England.
- Stokstad, E.L.R., and T. H. Jukes. 1950.** Growth promoting effect of aureomycin on turkey poults. *Poult. Sci.* 29:611-612.
- Stone, C. W. 2006.** Yeast Products in the Feed industry. A Practical Guide for Feed Professionals. <http://www.diamondv.com/articles/booklet/booklet.html>. Accessed Apr. 2006.
- Sturkie, P. D. 1976.** Alimentary canal: anatomy, prehension, deglutition, feeding, drinking, passage of ingesta, and motility. Pages 185-195 in Avian Physiology. P. D. Sturkie ed. 3<sup>rd</sup> edition. *Springer-Verlag*, New York, USA.
- Sugiarto, H., and P-L. Yu. 2004.** Avian antimicrobial peptides: the defense role of (beta)-defensins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 323: 721-727.
- Summers, M. 1991.** Energy metabolism in broiler chick. PhD. Thesis. University of Guelph, Ontario, Canada.
- Sun, X., A. McElroy, K. E. Webb, Jr., A. E. Sefton, and C. Novak. 2005.** Broiler Performance and Intestinal Alterations when Fed Drug-Free Diets. *Poult. Sci.* 84:1294-1302.
- Sun, X., A. McElroy, K. E. Webb, Jr., A. E. Sefton, and C. Novak. 2005.** Broiler Performance and Intestinal Alterations when Fed Drug-Free Diets. *Poult. Sci.* 84:1294-1302.
- Swann Committee Report. 1969.** Report of the Joint Committee of the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. London: HMSO, 1969.
- Tacket, C. O., G. Losonsky, H. Link, Y. Hoang, P. Guesry, H. Hilpert, and M. M. Levine. 1988.** Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.* 318:1240-1243.
- Tako, E., P. R. Ferket, and Z. Uni. 2004.** Effects of In Ovo Feeding of Carbohydrates and  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylbutyrate on the Development of Chicken Intestine. *Poult. Sci.*
-

83:2023–2028.

- Tasteyre, A., M.C. Bare, T. Karjalainen, P. Bourlioux, and A. Collignon. 2002.** Inhibition of in vivo cell adherence of *Clostridium difficile* by *Saccharomyces boulardii*. *Microbiol. Pathogen.* 32: 219-225.
- Taylor, D. J. 2001.** Effects of antimicrobials and their alternatives. *Br. Poult. Sci.* 42 (Suppl.1): S67-S68.
- Taylor, P. R., G. D. Brown, D. M. Reid, J. A. Willment, L. Martinez-Pomares, S. Gordon, and S. Y. C. Wong. 2002.** The beta-glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/ macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol.* 269: 3876–3882.
- Teeter, R. G., L. McKinney, and A. Becker. 2003.** Valor calórico efectivo y energía-valores nutricionales en broilers comerciales. Pages 95-104 in XL Symposium Sec. Esp. WPSA, Girona, 1-3/10/03.
- Thaxton, J. P., 1991.** Development of immunity in chickens. *Zootechnica Internl.* 10:49-52.
- Thaxton, J. P., J. Gilbert, P. Y. Hester, and J. Brake. 1982.** Mercury toxicity as compared to adrenocorticotropin-induced physiological stress in the chicken. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 11:509–514.
- Thaxton, P., C. R. Sadler, and B. Glick. 1968.** Immune response of chickens following heat exposure or injections with ACTH. *Poultry Sci.* 47:264–266.
- Thomke, S. and K. Elwinger. 1998.** Growth promotants in feeding pigs and poultry. I. Growth and feed efficiency responses to antibiotic growth promotants. *Ann. Zootech.* 47:85-97.
- Thompson, J. L., and M. Milton. 1997.** Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diets of hens on *Salmonellas* in the crop. *Br. Poult. Sci.* 38: 59-65.
- Toothaker, R. D., and G. W. 1984.** Elmer. Prevention of Clindamycin-induced mortality in hamster by *Saccharomyces boulardii*. *Antimicrobial. Ag. Chemother.* 26: 552-556.
- Torres, C., J. A. Reguera, M. J. San-Martín, J. C. Pérez-Díaz, and F. Baquero. 1994.** Van A-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in sewage. *J. Antimicrob. Chemoth.* 33:553-561.
- Trowell, H., D. A. T. Southgate, T.M.S. Wolever, A. R. Leeds, M. A. Gassull, and D. J. A. Jeskins. (1976).** Dietary fibre redefined. *Lancet.* 1:967.
- Turk, D. E. 1982.** The anatomy of the avian digestive tract as related to feed utilization. *Poult. Sci.* 61: 1225-1244.
- Umetsu, D.T., and R.E. de Kruyff. 1997.** Th1 and Th2 CD4+ cells in the pathogenesis of allergic diseases. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215:1–20.
- Uni, Z. Y. Noy, and D. Sklan. 1995.** Post hatch changes in morphology and function of

- the small intestine in heavy and light strain chicks. *Poult. Sci.* 74:1622-1629.
- Uni, Z., A. Geyra, H. Ben-Hur, and D. Sklan. 2000.** Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. *Br. Poult. Sci.* 41: 544-551.
- Uni, Z., A. Smirnov, and D. Sklan. 2003b.** Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. *Poult. Sci.* 82:320-327.
- Uni, Z., and P. R. Ferket. 2004.** Methods for early nutrition and their potential. *World's Poult. Sci. J.* 60:101-111.
- Uni, Z., E. Tako, O. Gal-Garber, and D. Sklan. 2003a.** Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. *Poult. Sci.* 82:1747-1754.
- Uni, Z., P. R. Ferket, E. Tako, and O. Kedar. 2005.** In Ovo Feeding Improves Energy Status of Late-Term Chicken Embryos. *Poult. Sci.* 84:764-770.
- Uni, Z., R. Platin, and D. Sklan. 1998a.** Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. *J. Comp. Physiol. B.* 168:241-247.
- Uni, Z., S. Ganot, and D. Sklan. 1998b.** Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poult. Sci.* 77:75-82.
- Uni, Z., Y. Noy, and D. Sklan. 1996.** Developmental parameters of the small intestines in heavy and light strain chicks pre and post-hatch. *Br. Poult. Sci.* 36:63-71.
- Uni, Z., Y. Noy, and D. Sklan. 1999.** Posthatch development of small intestinal function in the poul. *Poult. Sci.* 78: 215-222.
- Van der Klis, J. D., and A. J. M. Jansman. 2002.** Optimising nutrient digestion, absorption and gut barrier function in monogastric: reality or illusion?. Pages 15-36 in *Nutrition and Health of the Gastrointestinal Tract*. M. C. Block, H. A. Vahl, L. de Lange, A. E. van de Braak, G. Hemke, and M. Hessing, ed. Wageningen Academic Publisher, Wageningen, The Netherlands.
- Van der Klis, J. D., and A. Van Voorst. 1993.** The effect of carboxymethylcellulose (a soluble polysaccharide) on the rate of marker excretion from the gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Sci.* 72, 503-512.
- Van der Klis, J. G., M. W. A. Verstegen, and W. De wit. 1990.** Absorption of minerals and retention time of dry matter in the gastrointestinal tract of broilers. *Poult. Sci.* 69:2185-2194.
- Van der Wielen, P. W. J. J., S. Biesterveld, L. J. A. Lipman, and F. van Knapen. 2001.** Inhibition of a glucose-limited sequencing fed-batch culture of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by volatile fatty acids representative of the ceca of broiler

- chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1979–1982.
- Van der Zijpp, A. J. 1983.** Breeding for immune responsiveness and disease resistance. *World's Poult. Sci. J.* 39: 118-131.
- Van Dijk, J. E., J. Huisman, and J. F. G. Koninkx. 2002.** Structural and functional aspects of a healthy gastrointestinal tract. Pages 71-98 in Nutrition and Health of the Gastrointestinal Tract. M. C. Block, H. A. Vahl, L. de Lange, A. E. van de Braak, G. Hemke, and M. Hessing, ed. *Wageningen Academic Publisher, Wageningen, The Netherlands.*
- van Heugten, E., D. W. Funderburke, and K. L. Dorton. 2003.** Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *J. Anim. Sci.* 81: 1004-1012.
- Van Immerseel F, Cauwerts K, Devriese LA, Haesenbrouck F, Ducatelle R. 2002.** Feed additives to control Salmonella in poultry. *World's Poultry Science Journal.* 58: 501-513.
- Van Leeuwen, P., J. M. V. M. Mouwen, J. D. van Der Klis, and M. W. A. Verstege. 2004.** Morphology of the small intestinal mucosal surface of broilers in relation to age, diet formulation, small intestinal microflora and performance. *Br. Poult. Sci.* 45: 41-48.
- Van Vuuren, A. M. 2003.** Effect of live yeast on the performance of dairy cows. Pages 41-48 in Role of probiotics and their link to the demands of European consumers. 11 February 2003, ID-Lelistad report 03/0002713.
- Velamen, A., and Vahl, H. A. 1994.** Xylanase in broiler diets with differences in characteristic and content of wheat. *British Poultry Science.* 35: 537-550.
- Veldman, B. 2004.** Mycotoxins in the animal production chain. Pages 275-280 in Meeting the mycotoxin menace. D. Barug, H. van Egmond, R. López-García, T. van Osenbruggen, and A. Visconti, eds. *Wageningen Academia Publishers.* P. O. Box 220, NL-6700 AE Wageningen, The Netherlands.
- Veterinary Medicines Directorate. 2002.** Sales of antimicrobial products used as veterinary medicines, growth promoters and coccidiostats in the UK in 2000. [Online.] <http://www.vmd.gov.uk/general/publications/amrrpt2000v51.htm> (27 April 2003, date last accessed).
- Vidon, N., B. Huchet, and J. C. Rambaud. 1986.** Influence de *Saccharomyces boulardii* sur la sécrétion jéjunale induite chez le rat par la toxine cholérique. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 10: 13-16.
- Viveros, A., I. Arija, R. Canales, and A. Brenes. 1994.** Effect of enzyme addition on plasma minerals, cholesterol and caecal volatile fatty acid concentrations in broiler diets based on barley. *Invest. Agraria. Prod. Sanid. Anim.* 9:109–118.



- von Durgern, F. 1900.** Beiträge zur Immunitätslehre. *Muench. Med. Wochenschr.* 20: 677-680.
- Waldroup, P. W., C. A. Fritts, and F. Yan 2003a.** Utilization of Bio-Mos<sup>®</sup> Mannan Oligosaccharide and Bioplex<sup>®</sup> Copper in Broiler diets. *Int. J. Poult. Sci.* 2: 44-52.
- Waldroup, P. W., E. O. Oviedo-Randon and C. A. Fritts. 2003b.** Comparison of Bio-Mos<sup>®</sup> and Antibiotic feeding program in broiler diets containing copper sulphate. *Int. J. Poult. Sci.* 2: 28-31.
- Walker, W. A., and L. C. Duffy. 1998.** Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. *J. Nutr. Biochem.* 9:668-675.
- Wallace, R.J., and C.J. Newbold. 1992.** Probiotics for Ruminants. In Probiotics: The Scientific Basis, ed R. Fuller, Chapman and Hall, London, pp 317.
- Wang, W., R. F. Wideman, Jr., M. E. Chapman, T. K. Bersi, and G. F. Erf. 2003.** Effect of Intravenous Endotoxin on Blood Cell Profiles of Broilers Housed in Cages and Floor Litter Environments. *Poult. Sci.* 82:1886-1897
- Ward, A. T., and R. R. Marquardt. 1987.** Antinutritional activity of a water-soluble pentosan-rich fraction from rye grain. *Poult. Sci.* 66: 1665-1674.
- Ward, N. E. 1995.** Enzyme use in viscous inducing cereal diets examined. *Feedstuffs.* 67(November 27):12-14.
- Warr, G. W., K. E. Magor, and D. A. Higgins. 1995.** IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today.* 16: 392-398.
- Watford, M., P. Lund, and H. A. Krebs. 1979.** Isolation and metabolic characteristics of rat and chicken enterocytes. *Biochem. J.* 178: 589-596.
- Wattel, W., G. A. Van Huis, M. F. Kramer, and J. J. Geuze. 1979.** Glycoprotein synthesis in the mucous cell of the vascularly perfused rat stomach. *Am. J. Anat.* 156:313-320.
- Webel, D. M., R. W. Johnson, and D. H. Baker. 1998.** Lipopolysaccharide-induced reductions in body weight gain and feed intake do not reduce the efficiency of arginine utilization for whole-body protein accretion in the chick. *Poult. Sci.* 77: 1893-1898.
- Webster's Encyclopedic Cambridge Dictionary of the English Language (1989).** Gramercy Books, New York.
- Wegener, H. C. 2005.** Use of antimicrobial growth promoters in food animals: the risks outweigh the benefits. Pages 14-17 in Antimicrobial Growth Promoters: Worldwide Ban on the Horizon?. Bastiaanse Communication, Noordwijk aan Zee, the Netherlands.
- Weindruch, R., and R. L. Walford. 1988.** The retardation of ageing and disease by dietary restriction. *J. Anim. Sci.* 74:1523-1529.
- Weiser, M. M. 1973.** Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator of cellular differentiation. *J. Biol. Chem.* 248: 2536-2541.
-

- Wenk, C. 2006.** Are herbs, botanicals, and other related substances adequate replacement for antimicrobials growth promoters?. Pages 329-340 in Antimicrobial growth promoters. Where do we go from here?. K. Kies, M. W. A. Verstegen, D. Borug, J. de Jong, ed. Wageningen Academic publishers. Wageningen, the Netherlands.
- White, L. A., M. C. Newman, G. L. Cromwell, and M. D. Lindemann. 2002.** Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *J Anim Sci.* 80: 2619-2628.
- White, W. B., H. H. Bird, M. L. Sunde, N. Prentice, W. C. Burger, and J. A. Marlett. 1983.** Viscosity of  $\beta$ -D-glucan as a factor in the enzymatic improvement of barley for chicks. *Poult. Sci.* 62: 853-862
- White, W. B., H. R. Bird, M. L. Sinde, N. Prentice, W. C. Burger, and J. A. Marlett. 1981.** The viscosity interaction of barley b-glucan with *Trichoderma viride* cellulose in the chick intestine. *Poult. Sci.* 60: 1043-1048.
- Whitehill, A. R., J. J. Oleson, and B. L. Hutchings. (1950).** Stimulatory effect of aureomycin on the growth of chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74:11-13.
- Wierup, M. 2005.** The AGP use/non-use situation in poultry production. Page 35 in Antimicrobial Growth Promoters: Worldwide Ban on the Horizon?. Bastiaanse Communication, Noordwijk aan Zee, the Netherlands.
- Witte, W. 1996.** Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in human. Pages 61-70 in proceedings of: Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 207), July 16-18, London.
- Witte, W. 2000.** Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int. J. Antimicrob. Agents.* Suppl. 1: S19-S24.
- Woese, C. R. 1987.** Bacterial evolution. *Microbiological Reviews.* 51: 221-271.
- Wu, G. 1998.** Intestinal mucosa amino acids catabolism. *J. Nutr.* 128: 1249-1252.
- Wu, Y.B., V. Ravindran, D.G. Thomas, M.J. Birtles, W.H. Hendriks. 2004.** Influence of method of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology of broilers. *Br. Poult. Sci.* 45:385-394.
- Xie, H., N. C. Rath, G. R Huff, W. E. Huff, and J. M. Balog. 2000.** Effects of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide on broiler chickens. **Poult. Sci.** 70:33-40.
- Yamamoto, H., H. Watanabe, and T. Mikami. 1977.** Distribution of immunoglobulin and secretory component containing cells in chickens. *Am J Vet Res.* 38: 1227-1230.
- Yason, C. V. and K. A. Schat. 1987.** Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: clinical signs and virology. *Am. J. Vet. Res.* 48: 977.

- Yianninkouris, A., J. Francois, L. Poughon, C. G. Dussap, G. Bertin, G. Jeminet, and J. P. Jouany. 2004.** Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Food Prot.* 67: 1195-1200.
- Yianninkouris, A., L. Poughon, X. Cameleyre, C. G. Dussap, J. Francois, G. Bertin, and J. P. Jouany. 2003.** A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotechnol. Lett.* 25: 783-789.
- Ying, S., S.R. Durham, C.J. Corrigan, Q. Hamid, and A.B. Kay. 1995.** Phenotype of cells expressing mRNA for Th2-type (interleukins 4 and interleukin 5) and Th1-type (interleukin 2 and interferon-g) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12:477-487.
- Yokoyama, H., R. C. Peralta, K. Umeda, T. Hashi, F. C. Icatlo, Jr., M. Kuroki, Y. Ikemori, and Y. Kodama. 1998.** Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 59:416-420.
- Zaghini, A., G. Martelli, M. Roncada, M. Simioli, and L. Rizzi. 2005.** Mannan oligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: Effects on egg quality, aflatoxins B1 and M1 residues on eggs, and aflatoxin B1 in liver. *Poult. Sci.* 84:825-832.
- Zdunczyk, Z., J. Jankowski, J. Juskiwicz, and J. Stanczuk. 2004.** Caecal parameters of turkey fed diets containing mannan oligosaccharides with or without flavomycin. Compact disk in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey.
- Zdunczyk, Z., J. Juskiwicz, J. Jankowski, E. Biedrzycka, and A. Koncicki. 2005.** Metabolic response of the gastrointestinal tract of turkey to diets with different levels of mannan-oligosaccharide. *Poult. Sci.* 84: 903-909.
- Zhang, A. W., B. D. Lee, S. K. Lee, K. W. Lee, G. H. An, K. B. Song, C. H. Lee. 2005.** Effects of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poult. Sci.* 84: 1015-1021.
- Zhu, X. Y., T. Zhong, Y. Pandya, and R. D. Joerger. 2002.** 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 124-137.
- Zoetendal, E. G., C. T. Collier, S. Koike, R. I. Mackie, and H. R. Gaskins. 2004.** Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *J. Nutr.* 134: 465-472.

**Zucker, B. A., and W. Muller. 2000.** Investigations on airborne microorganisms in animal stables. 3: Relationship between inhalable endotoxin, inhalable dust and airborne bacteria in a hen house. Berl. Munch. *Tierarztl. Wochenschr.* 113:279–283.

**Capítulo 11. Apéndice**

### 11.0. Apéndice

**Tabla 11.1.** Peso promedio de pollos de engorde alimentados con dietas trigo-cebada-centeno (TCC) y maíz suplementadas con levaduras, paredes celulares de levaduras (PCL), extractos, manano-proteínas (MP), beta-glucanos (BG) y antibiótico promotor del crecimiento (APC), y efecto en el parámetro expresadas como % de mejora por el uso de los distintos aditivos respecto del empleo de la dieta control = 100% (por experimento y globales).

Experimento	Exp. 1 (TCC)		Exp. 2 (Maíz)		Exp. 3 (TCC y Maíz)		Exp. 4 (TCC)		Exp. 5 (TCC)		Exp. 6 (TCC)		Promedio del % mejora
	Jaulas, 42 días		Jaulas, 39 días		Jaulas, 42 días		Jaulas, 42 días		Suelo, 40 días		Jaulas, 28 días		
Presencia de desafío	no		no		2 vacunas (Newcastle)		1 vacuna (Newcastle)		Estrés cálido		Lipopolisacárido de <i>E. coli</i>		
	Peso, g	%* mejora	Peso, g	%* mejora	Peso, g	%* mejora	Peso, g	%* mejora	Peso, g	%* mejora	Peso, g	%* mejora	
Control	1878	=100%	1950	=100%	2462	=100%	2244	=100%	2404	=100%	1177	=100%	=100%
APC	1959	+4.3	1999	+2.5	-	-	2361	+5.2	-	-	-	-	<b>+4.0</b>
Levadura-1	1915	+2.0	2010	+3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	+2.5
Levadura-2	1881	+0.2	1987	+1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	+1.0
Levadura-3	1964	+4.6	1986	+1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	+3.2
Extracto	1927	+2.6	2003	+2.7	-	-	-	-	-	-	-	-	+2.7
PCL-1	1887	+0.5	2012	+3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	+1.8
PCL-2	1964	+4.6	2014	+3.3	2548	+3.5	2313	+3.1	2431	+1.1	1179	+0.17	<b>+2.6</b>
MP	-	-	-	-	-	-	2284	+1.8	2419	+0.6	-	-	+1.2
BG	-	-	-	-	-	-	2312	+3.0	2430	+1.1	-	-	+2.1
MP+BG	-	-	-	-	-	-	2310	+2.9	-	-	-	-	+2.9

APC = Avilamicina 10ppm.

### 11.0. Apéndice

**Tabla 11.2.** Índice de conversión alimenticia de pollos de engorde alimentados con dietas trigo-cebada-centeno (TCC) y maíz suplementadas con levaduras, paredes celulares de levaduras (PCL), extractos, manano-proteínas (MP), beta-glucanos (BG) y antibiótico promotor del crecimiento (APC), y efecto en el parámetro expresadas como % de mejora por el uso de los distintos aditivos respecto del empleo de la dieta control = 100% (por experimento y globales).

Experimento	Exp. 1 (TCC)		Exp. 2 (Maíz)		Exp. 3 (TCC y Maíz)		Exp. 4 (TCC)		Exp. 5 (TCC)		Exp. 6 (TCC)		Promedio del % mejora
	Jaulas, 42 días		Jaulas, 39 días		Jaulas, 42 días		Jaulas, 42 días		Suelo, 40 días		Jaulas, 28 días		
Presencia de desafío	no		no		2 vacunas (Newcastle)		1 vacuna (Newcastle)		Estrés cálorico		Lipopolisácarido de <i>E. coli</i>		
Tratamientos	Peso, g	%* mejora	Peso, g	%* mejora	Peso, g	%* mejora	Peso, g	%* mejora	Peso, g	%* mejora	Peso, g	%* mejora	
<u>Control</u>	1.844	100	1.678	100	1.602	100	1.675	100	1.660	100	1.417	100	100
<u>APC</u>	1.839	-0.3	1.633	-2.7	-	-	1.634	-2.4	-	-	-	-	<b>-1.8</b>
<u>Levadura-1</u>	1.839	-0.3	1.662	-1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.6
<u>Levadura-2</u>	1.837	-0.4	1.683	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0
<u>Levadura-3</u>	1.827	-0.9	1.666	-0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.8
<u>Extracto</u>	1.787	-3.1	1.637	-2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-2.8
<u>PCL-1</u>	1.819	-1.4	1.666	-0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-1.0
<u>PCL-2</u>	1.838	-0.3	1.635	-2.6	1.582	-1.2	1.654	-1.3	1.615	-2.7	1.393	-1.7	<b>-1.6</b>
<u>MP</u>	-	-	-	-	-	-	1.645	-1.8	1.600	-3.6	-	-	-2.7
<u>BG</u>	-	-	-	-	-	-	1.650	-1.5	1.584	-4.6	-	-	-3.0
<u>MP+BG</u>	-	-	-	-	-	-	1.652	-1.4	-	-	-	-	-1.4

APC = Avilamicina 10ppm.

**Tabla 11.3.** Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 1 (dietas únicas trigo-cebada-centeno 0-42 días).

Dieta	Humedad (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Energía bruta (Kcal/kg)
T-1	88.8	19.67	6.18	4148.8
T-2	89.1	19.82	6.09	4123.3
T-3	89.5	20.22	6.14	4140.6
T-4	90.1	20.32	6.04	4153.8
T-5	90.2	20.28	6.17	4152.8
T-6	90.2	20.22	6.53	4166.0
T-7	89.4	20.22	6.47	4172.7
T-8	89.8	19.97	6.63	4167.6

**Tabla 11.4.** Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 2 (dietas únicas maíz 0-39 días).

Dieta	Humedad (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Energía bruta (Kcal/kg)
T-1	88.2	21.19	4.51	3977.8
T-2	88.2	20.64	4.31	3961.7
T-3	88.4	20.39	4.29	3984.6
T-4	88.3	20.11	4.97	3984.4
T-5	88.3	21.02	4.37	3989.8
T-6	88.4	21.06	4.95	3984.4
T-7	88.3	21.20	4.50	3992.8
T-8	88.5	20.65	4.54	4018.8



**Tabla 11.5.** Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 3 (dietas únicas 0-43 días).

Dieta (Programa)	Materia seca (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Energía bruta (Kcal/kg)
T-1 (1DM)	87.8	19.7	6.3	4167.9
T-2 (1DM)	87.6	20.7	6.1	4240.5

1DM = 1 dieta maíz.

**Tabla 11.6.** Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 3 (programas con dietas de 0-21 y 21-43 días).

Dieta (programa)	Materia seca (%)		Proteína cruda (%)		Grasa cruda (%)		Energía bruta (Kcal/kg)	
	0-21 d	21-43 d	0-21 d	21-43 d	0-21 d	21-43 d	0-21 d	21-43 d
	T-2 (2DM)	88.4	89.13	21.95	19.72	5.85	10.01	4201.4
T-3 (2DM)	88.6	88.75	22.39	20.32	5.92	10.20	4261.3	4499.6
T-4 (2DTCC)	90.2	90.41	22.36	19.64	7.79	10.04	4419.8	4537.2
T-5 (2DTCC)	89.8	89.97	22.32	19.50	8.10	10.41	4566.0	4556.4

2DM = 2 dietas maíz.

2DTCC = 2 dietas trigo-cebada-centeno.

**Tabla 11.7.** Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 4 (dietas únicas trigo-cebada-centeno 0-42 días).

Dieta	Materia seca (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Energía bruta (Kcal/kg)
T-1	89.7	20.32	6.21	4274.4
T-2	89.9	20.11	6.41	4299.2
T-3	89.6	19.99	6.16	4286.4
T-4	89.7	20.20	5.85	4289.0
T-5	89.8	20.37	6.09	4293.2
T-6	89.7	20.30	6.43	4278.8

**Tabla 11.8.** Composición analizada de las distintas dietas experimentales empleadas en el experimento 5 (dietas 0-21 y 21-42 días).

Dieta (programa)	Materia seca (%)		Proteína cruda (%)		Grasa cruda (%)		Energía bruta (Kcal/kg)	
	0-21 d	21-42 d	0-21 d	21-42 d	0-21 d	21-42 d	0-21 d	21-42 d
	T-1 Control	89.4	89.7	22.66	19.29	8.31	9.25	4270
T-2 PCL	86.3	89.7	22.13	19.62	8.48	9.50	4268	4330
T-3 MP	89.3	89.7	22.85	19.31	8.09	9.42	4256	4333
T-4 BG	89.3	89.9	22.59	20.51	7.75	9.19	4272	4291

**Tabla 11.9.** Composición analizada de la dieta basal empleada en el experimento 6 (dietas únicas maíz-trigo-cebada-centeno 0-28 días).

Nutriente	Contenido
MS (%)	90.5
PC (%)	20.1
Grasa cruda (%)	7.57
Lisina (%)	1.10
Metionina (%)	0.61
Treonina (%)	0.75
Arginina (%)	0.87

