

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO**

**FACULTAD DE CIENCIA NATURALES**



**LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR POR PCR DE UNA CEPA DE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EN PLACAS DE PEYER EN  
CORDEROS DE ENGORDA

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
**LICENCIADA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

PRESENTA

**ESPERANSA MORALES RUIZ**

DIRIGIDO POR

**DRA. ANDREA MARGARITA OLVERA RAMÍREZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. MARZO DEL 2013



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencia Naturales  
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia



**Identificación molecular por PCR de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en placas de peyer en corderos de engorda**

**Tesis individual**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**Licenciada en Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Presenta  
**Esperansa Morales Ruiz**

Dirigido por  
**Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez**

**SINODALES**

**Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez**  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

**Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú**  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

**Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito**  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

**Dra. Tercia Cesárea Reis de Souza**  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

**Dr. Jorge Germinal Cantó**  
Director de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Enero del 2013  
México

## RESUMEN

Las bacterias patógenas entéricas, capaces de causar intoxicación alimentaria en humanos, están incrementando su importancia en la salud pública. El rumiante juega un papel muy importante en la transmisión de estos patógenos, por ser hospedador natural. Probióticos basados en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) se utilizan ampliamente en las dietas de los rumiantes para mejorar su producción y su sistema inmune. Además, se ha reportado que son capaces de reducir cargas de bacterias patógenas en el rumen. El presente trabajo examinó el efecto de la suplementación de dos dosis de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (SC) en corderos de engorda sobre los parámetros productivos, así como su presencia en el tracto digestivo y tejido linfoide. Se emplearon 12 corderos Blackbelly de 29 kg, mediante un diseño completamente al azar se formaron tres grupos y se les asignó uno de los tres tratamientos durante 8 semanas: 1) Dieta comercial + Levadura 2.5 g/cordero/día; 2) Dieta comercial + Levadura, 5 g/cordero/día; 3) Dieta comercial (tratamiento testigo). Las variables de respuesta analizadas fueron consumo diario y total de MS, ganancia diaria de peso, peso final eficiencia alimenticia, peso al sacrificio, peso y rendimiento de la canal. Al momento del sacrificio se obtuvieron muestras de líquido luminal del rumen, yeyuno e íleon y placas de peyer, para la extracción de ADN e identificación de la levadura suplementada por medio de PCR. La inclusión de dos dosis de levadura viva SC no tuvo efecto significativo ( $P>0.05$ ) sobre los parámetros productivos y el rendimiento en canal en ovinos de engorda. La levadura suplementada no fue identificada en la muestras del tracto digestivo y tejido linfoide. Se concluye que la inclusión de cultivos de levaduras vivas de SC no mejoró los parámetros productivos de ovinos de engorda.

(Palabras clave: Levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, ovinos, Blackbelly, PCR)

## SUMMARY

Enteric pathogenic bacteria capable of causing food poisoning in humans, are increasing their public health importance. The ruminant plays an important role in the transmission of these pathogens, being natural host. Based probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) are widely used in ruminant diets to improve their production and immune system. Furthermore, it has been reported that are capable of reducing pathogenic bacteria loads in the rumen. This study showed the effect of supplementation of two doses of yeast *Saccharomyces cerevisiae* (SC) on fattening lambs on performance, as well as its presence in the digestive tract and lymphoid tissue. 12 lambs were used Blackbelly of 29 kg, using a completely randomized design formed three groups and assigned one of three treatments for 8 weeks: 1) commercial diet + yeast 2.5 g / lamb / day, 2) commercial diet + yeast, 5 g / lamb / day, 3) commercial diet (control treatment). Response variables analyzed were total daily consumption and MS, daily gain, feed efficiency final weight, weight at slaughter weight and carcass yield. At the time of sacrifice luminal fluid samples obtained rumen, jejunum and ileum and Peyer's patches, for DNA extraction and identification of yeast supplemented by PCR. The inclusion of two doses of live yeast (SC) had no significant effect ( $P > 0.05$ ) on performance and carcass yield in sheep fattening. Supplemented yeast was not identified in the samples of the digestive tract and lymphoid tissue. It is concluded that the inclusion of live yeast cultures of SC did not improve growth performance of fattening sheep.

(Keywords: yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, sheep, Blackbelly, PCR)

## DEDICATORIAS

A mis padres, María y Francisco

Porque simplemente por ellos estoy aquí, y aunque duro el camino todo se lo debo a su cariño, a los valores que me inculcaron, la confianza depositada en mi, y por el sustento durante mi formación profesional. Los amo.

A mi esposo, Ángel

Por el tiempo robado que merecíamos estar juntos, que sin su amor, paciencia y apoyo, no hubiera sido posible culminar éste mi gran sueño con quien lo comparto al igual que mi vida y formamos lo más sagrado, un hogar, una familia.

A mi hijo (y a los que vendrán), Ángel Yael

Con todo mi amor porque desde antes de que supiera que llegarían, ya sabía que gran parte de este esfuerzo era por ese pedacito de mi que lo es todo y lo más importante en mi vida, simplemente, mi razón de luchar y mi vida entera.

A mis hermanos: Mauricio, Norma, Fernando, Teresa y Ramiro

Por su apoyo, su tiempo, y sobre todo por la paciencia que me han mostrado en momentos que los he necesitado y cuando solo han estado conmigo sin nada a cambio.

A todos mis profesores y compañeros de generación,

Día a día aprendí a aprender con su enseñanza, experiencia, compañerismo y paciencia.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez, por la oportunidad de conocer su capacidad y experiencia científica, y permitirme formar parte su proyecto, por la paciencia para lograr éste trabajo que mucho contribuyó a mi formación como Médico Veterinario Zootecnista.

A la M. en C. Susana por la paciencia, el apoyo y la amabilidad que me brindó en cada una de mis dudas.

A la Dra. Tercia Cesária Reis de Souza, por el apoyo que como profesora y amiga obtuve de ella y por cada momento que me regaló con ese entusiasmo y alegría que contagiaba.

## ABREVIACIONES UTILIZADAS

µl: microlitros

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AF: Aflatoxinas

AGL: Ácidos grasos libres

AGV: Ácidos grasos volátiles

APC: Antibióticos promotores del crecimiento

BS: Base seca

d: Día

de TNF- $\alpha$ ,

EA: Eficiencia alimenticia

EE.UU: Estados Unidos de America

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

Fc: Crystalizable fragment

FDA: Fibra detergente ácido

FDN: Fibra detergente neutro

FOS: Fructo-oligosacáridos

g: Gramo

GDP: Ganancia diaria de peso

IgA: Inmuno-globulina A

IgE: Inmuno-globulina E

IgM: Inmuno-globulina M

IL-1: Interleucina 1

Kg: Kilogramo

L: Litro

L1-1: Levadura 1 tratamiento 1

L1-2: Levadura 1 tratamiento 1

ml: mililitros

mm: milímetro

MOS: Manano-oligosacáridos

MS: Materia seca

NI: No inclusión

NNP: Nitrógeno no proteico

OA: Ocratoxinas

OMS: Organización Mundial de la Salud

P7: Procreatin 7

PBS: Buffer Salino Fosfato

PCL: Paredes celulares de levadura

PCR: Polymerase Chain Reaction

PY1a-20: Placa de peyer primera sección de yeyuno del animal 20

SDS: Dodecilsulfato sódico

s-IgA: Inmuno-globulina A secretoria

Spp: Especie

T-2: Toxinas T-2

TAE: Buffer Tris-Acetate-EDTA

TIF: Tipo inspección federal

T LAI: Tejido linfoide asociado al intestino

UE: Unión Europea

UFC: Unidades formadoras de colonias

USA: United States of America

VRE: Vénulas revestidas por endotelio alto

Y-20: Yeyuno del animal 20

YPD: Yeast Peptone Dextrose Agar

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	<b>i</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>iv</b>
<b>Abreviaturas utilizadas</b>	<b>v</b>
<b>Capítulo 1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2 REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1 Situación de la Ovinocultura en México y en el mundo	5
2.2 Anatomía y fisiología del tracto digestivo de los Ovinos	6
2.2.1 Sistema inmunitario de la mucosa del intestino	10
2.3 Prebióticos y probióticos	13
2.3.1 Definición de prebióticos	13
2.3.2 Definición de probióticos	14
2.3.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.3.2.1.1 Uso de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en alimentación animal	18
2.3.2.1.1.1 Comportamiento de monogástricos con suplementación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.3.2.1.1.2 Comportamiento de rumiantes con suplementación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.3.2.2 Mecanismo de acción de las levaduras y paredes celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> adicionadas en el alimento	25
2.3.2.2.1 Exclusión de patógenos y micotoxinas	25
2.3.2.2.1.1 Propiedades farmacodinámicas de la levadura	25
2.3.2.2.1.2 Exclusión de bacterias fimbria-1 específicas	26
2.3.2.2.1.3 Exclusión de micotoxinas	27
2.3.2.2.2 Efecto trófico sobre la mucosa digestiva	27
2.3.2.2.3 Estimulación del sistema inmune	28
<b>Capítulo 3 OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo general	31
3.2 Objetivos específicos	31

## **Capítulo 4 EFECTO DE LA LEVADURA SUPLEMENTADA SOBRE LOS PARÁMETROS**

### **PRODUCTIVOS EN OVINOS DE ENGORDA 32**

4.1 Introducción 32

4.2 Material y métodos 34

4.2.1 Lugar experimental 34

4.2.2 Animales experimentales 34

4.2.3 Dieta 34

4.2.4 Tratamientos 35

4.2.5 Diseño experimental 36

4.2.6 Procedimiento de muestreo de tracto digestivo y placas de peyer 36

4.2.7 Análisis estadístico 36

4.3 Resultados 37

4.4 Discusión 39

## **Capítulo 5 CONTROL DE LA LEVADURA (SC) SUPLEMENTADA 40**

5.1 Introducción 42

5.2 Experimento 1 42

5.2.1 Material y métodos 42

5.2.1.1 Enumeración de levadura suplementada (Conteo de levaduras) 42

5.2.1.2 Obtención de la UFC patrón de *Saccharomyces cerevisiae* para la extracción de ADN 42

5.2.1.3 Obtención de la colonia de la levadura SC 43

5.2.1.4 Obtención del pellet de la levadura de SC 45

5.2.1.5 Técnicas moleculares 46

5.2.1.5.1 Extracción de ADN de la levadura SC para el control positivo 46

5.2.1.5.2 Amplificación del ADN de la levadura SC en el control positivo mediante PCR 47

5.2.1.5.3 Visualización de la extracción del ADN y PCR de la levadura SC en el control positivo 48

5.2.2 Resultados 49

5.3 Experimento 2 50

5.3.1 Material y métodos 50

5.3.2 Resultados 50

5.3.3 Discusión 52

<b>Capítulo 6 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE <i>S. cerevisiae</i> SUPLEMENTADA EN DIFERENTES SECCIONES DEL TRACTO DIGESTIVO DEL RUMIANTE Y EN PLACAS DE PEYER MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR</b>	<b>54</b>
6.1 Introducción	55
6.2 Material y métodos	55
6.2.1 Extracción de ADN de las muestras líquidas (líquido ruminal y contenido luminal de yeyuno e íleon)	55
6.2.2 Extracción de ADN de las muestras sólidas (Placas de Peyer de Yeyuno e Íleon)	56
6.2.3 Amplificación del ADN de la levadura SC en líquido luminal y placas de peyer mediante PCR	56
6.2.4 Visualización de la extracción del ADN y PCR de la levadura SC, (como control positivo, en líquido luminal y placas de peyer)	57
6.3 Resultados	57
6.4 Discusión	59
<b>Capítulo 7 DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo 8 CONCLUSIÓN GENERAL</b>	<b>66</b>
<b>Capítulo 9 ANEXOS</b>	<b>68</b>
<b>Capítulo 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>73</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 2.1</b> Proporción de los compartimentos gástricos de los Ovinos	7
<b>Cuadro 2.2</b> Tipo y Cantidad de Microorganismos ruminales	8
<b>Cuadro 2.3</b> Clasificación funcional de las Bacterias Ruminales	8
<b>Cuadro 2.4</b> Productos comerciales con SC en el mercado	17
<b>Cuadro 4.1</b> Ingredientes y composición química de una dieta en engorda usada en ovinos Blackbelly	35
<b>Cuadro 4.2</b> Tratamientos suplementados a corderos por 8 semanas	36
<b>Cuadro 4.3</b> Comportamiento productivo de corderos Blackbelly suplementados con cultivos de levaduras de SC durante la etapa de engorda	37
<b>Cuadro 4.4</b> Consumo de alimento (MS) por tratamiento por periodo	37
<b>Cuadro 4.5</b> Pesos de los corderos en kilogramos por periodos	38
<b>Cuadro 4.6</b> Rendimiento de la canal de ovinos suplementados con dos niveles de levadura viva	38
<b>Cuadro 5.1</b> Componentes para la preparación del Medio de Cultivo YPD	43
<b>Cuadro 5.2</b> Componentes del Buffer Salino Fosfato con $\text{pH} = 7.3 \pm 0.2$ (PBS) utilizado en las diluciones de la levadura	44
<b>Cuadro 5.3</b> Componentes para la preparación del Diluyente Peptona	44
<b>Cuadro 5.4</b> Muestras de colonias de la levadura SC para extracción de ADN	46
<b>Cuadro 5.5</b> Protocolo de amplificación del ADN para identificar la levadura suplementada	47
<b>Cuadro 5.6</b> Componentes para la mezcla de reacción para la amplificación por PCR	48
<b>Cuadro 5.7</b> Oligonucleótidos utilizados para ampliar el ADN de la levadura SC y las muestras en la mezcla de reacción	48
<b>Cuadro 5.8</b> Componentes para geles de acrilamida al 10%.	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> ADN de levadura una cepa de levadura control (Biosaf) y la levadura suplementada (P7)	49
<b>Figura 2.</b> Amplificación de ADN de levadura control (Biosaf) y la levadura suplementada (P7)	50
<b>Figura 3.</b> Visualización de la existencia de ADN del control positivo del experimento por electroforesis vertical mediante geles de Poliacrilamina al 10%	51
<b>Figura 4.</b> Visualización de la amplificación del ADN del control positivo del experimento mediante PCR por electroforesis vertical con geles de Poliacrilamina al 10%	52
<b>Figura 5.</b> Amplificación de ADN de levadura en contenido luminal de yeyuno mediante PCR utilizando geles de Poliacrilamida al 10%	57
<b>Fig. 6</b> Amplificación de ADN de levadura en contenido luminal de íleon mediante PCR utilizando geles de Poliacrilamida al 10%	58
<b>Fig.7</b> Amplificación de ADN de levadura en contenido luminal del rumen mediante PCR utilizando geles de Poliacrilamida 10%	58
<b>Fig. 8</b> Amplificación de ADN de contenido luminal del rumen mediante PCR utilizando geles de Poliacrilamida al 10%	59

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página</b>
<b>Anexo 9.1</b> Consumo total de alimento en kilogramos (BS) durante el experimento por tratamiento	69
<b>Anexo 9.2</b> Consumo de alimento en kilogramos por tratamiento por periodos	69
<b>Anexo 9.3</b> Consumo de alimento por animal por periodos del Tratamiento L1-1 (2,5g/d de levadura)	70
<b>Anexo 9.4</b> Consumo de alimento por animal por periodos del Tratamiento L1-2 (5g/d de levadura)	70
<b>Anexo 9.5</b> Consumo de alimento por animal por periodos del Tratamiento NI (Grupo control sin inclusión de levadura)	71
<b>Anexo 9.6</b> Ganancia diaria de peso (Kg) por periodos	71
<b>Anexo 9.7</b> Medidas de Placas de peyer del intestino delgado de corderos suplementados con SC	72

## CAPÍTULO 1

### **INTRODUCCIÓN**

## I. 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 (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 por los productos de origen animal de forma natural, y de mayor calidad. La prohibición al uso de antibióticos como promotores del crecimiento (APC) en dietas para animales, ocurrida dentro de la Unión Europea (UE) el pasado 1 de Enero del 2006 (Regulación No. 1831, 2003), dio origen a la oportunidad de investigar y desarrollar nuevas sustancias naturales que puedan ser empleadas para mejorar la salud intestinal y la productividad animales en la ausencia de APC (Brufau, 2000; Halfhide, 2003). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (SC), se ha empleado en la alimentación animal y humana desde hace varias décadas (Lesson y Summers, 2001), pueden ser utilizadas como aditivos alimenticios ya que por sí mismas podrían ejercer efectos similares a bacterias probióticas (Buts, 2005). En la 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 microambiente del trata digestivo (Newbold y Wallace, 1996). En el caso de sus componentes, las paredes celulares de levaduras (PCL) están constituidas por polisacáridos de tipo (1,3/1,6)  $\beta$ -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 (Castro y Rodríguez, 2005); los extractos de levadura 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 animal. 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 su 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 realizó un experimento con corderos de engorda de raza Black Belly empleando levaduras activas en dos niveles de inclusión (2.5 y 5 g/d) y un tratamiento control (no inclusión de levadura).

## CAPÍTULO 2

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Situación de la ovinocultura en México y en el mundo

Los nuevos sistemas de producción ovina, al igual que de otras especies, tienen que ir adaptándose a las crecientes demandas de una población cada vez más crítica hacia los productos de origen animal. La prohibición de antibióticos promotores de crecimiento (APC) en la Unión Europea (UE) impactó indirectamente en los sistemas de producción animal de países que pretenden exportar productos a la UE, como es el caso de México. Bajo este eSCenario, los sistemas de producción ovina deben adaptar esquemas de alimentación sin empleo de APC (Russell y Rychlik, 2001; Morales, 2007).

Los sistemas de producción ovina son clasificados de acuerdo al objetivo de producción y pueden ser de lana, carne, leche, o mixtos. La producción mundial de carne de cordero están decreciendo y el sector se enfrenta a una grave crisis. El comercio en México está dominado por las importaciones de Nueva Zelanda (Pierre, 2010), puesto que se sigue sin satisfacer la cada vez más grande demanda de carne de esa especie (SAGARPA, 2012).

Esta situación puede corroborarse con los inventarios nacionales, en los cuales se informan aumentos que van de 6.0 millones de cabezas en 1999, 6.8 para el 2003 (Arteaga, 2005) y 7.8 millones en el 2010 (Arteaga, 2010). De esta población, el 55% se encuentra en el centro del país, el 23% en la zona norte y el 16% en la zona sur. El dato más importante es el consumo promedio anual de carne en México donde Soto *et al.* (2006), reporta es de 99,000 toneladas y la producción de carne ovina tan solo de 38,000 toneladas, lo cual hace referencia al déficit de 61,000 toneladas. Para el 2009 se señala un consumo promedio de carne ovina de 76,300 toneladas, de las cuales se produjeron 53,462 toneladas, reportando un déficit de 23,838 toneladas (Arteaga, 2010), a pesar de lograr una producción de 56 mil toneladas de carne de ovino para el 2011.

Estos antecedentes representan una gran área de investigación, debido a que la oportunidad de buSCar alternativas tecnológicas para lograr una mayor eficiencia en la producción, especialmente en el rubro alimenticio, donde se incluye hasta un 70%

los costos de producción (Meléndez y Alonso, 2001) puesto que con dichos avances en el país existe la posibilidad de buSCar mercado en China, India y Medio Oriente (Arteaga, 2012), por lo que la preocupación en la búsqueda de dichas alternativas va en aumento. Una alternativa es la implementación de sustancias que nos brinden las mismas y mejores ventajas que con la utilización de APC, que sean naturales y permisibles. Las sustancias alternativas que se destacan como principales opciones son los acidificantes, las enzimas, los extractos vegetales, los probióticos y los prebióticos (Turner *et al.*, 2002; Doyle, 2001). No obstante, la eSCasa asistencia técnica proporcionada a los productores, el ovinocultor carece de información actualizada que le permita crecer con adecuados sistemas de manejo, sanitarios, reproductivos y sobre todo alimenticios (Acero, 2002), esto se debe a que la tecnología para una producción de ovinos más eficiente se ve limitado por la eSCasez de literatura internacional ocasionada principalmente por el número reducido de trabajos de investigación (Torres, 1997).

## **2.2 Anatomía y fisiología del tracto digestivo de los Ovinos**

El ovino (*ovis aries*) es un animal mamífero, artiodáctilo, biungulado y herbívoro rumiante de la familia de los bóvidos, de tamaño mediano, cuerpo cubierto de un pelo espeso o rizado y suave (lana) (SChaller, 1977). Su clasificación taxonómica de los ovinos es la siguiente:

Reino	<i>Animalia</i>
Filo	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	<i>Artiodactyla</i>
Suborden	<i>Ruminantia</i>
Familia	<i>Bovidae</i>
Subfamilia	<i>Caprinae</i>
Tribu	<i>Caprimi</i>
Género	<i>Ovis</i>
Especie	<i>Aries</i>

(SChaller, 1977)

Se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pasto o forraje (Russell, 2002). Esta característica se basa en la posibilidad de poder degradar los hidratos de carbonos estructurales del forraje, como celulosa, hemicelulosa y pectina, muy poco digestibles para las especies de estómago simple, por lo que la fisiología digestiva del rumiante adquiere características particulares (Relling y Mattioli, 2003).

Una de las características del aparato digestivo de los rumiantes es que el estomago se compone de cuatro compartimentos – el retículo (red o redecilla), el rumen (panza), el omaso (librillo) y el abomaso (cuajar)- por lo que el contenido alimenticio pasa sucesivamente (Dyce, 2002). Las proporciones de los compartimentos gástricos de los ovinos se describen en el Cuadro 2.1.

**Cuadro 2.1 Proporción de los compartimentos gástricos de los Ovinos**

<b>Compartimento</b>	<b>Proporción (%)</b>
Rumen	75
Retículo	8
Omaso	4
Abomaso	13

(Dyce, 2002)

En el rumen y el retículo los hidratos de carbono estructurales del forraje son reducidos y convertidos en aprovechable por medio de procesos de fermentación microbiana. Por esta razón Hungate (1966) menciona que los rumiantes ofrecen a los microorganismos un hábitat apto para su crecimiento, mientras estos le proveen ácidos, proteína microbiana y vitaminas, existiendo una simbiosis entre ambos.

Los microorganismos actúan en sistemas cooperativos dentro de un complejo ecosistema, cuya acción de cada especie depende de las condiciones que establecen en conjunto toda la biomasa, como es el pH, donde algunas bacterias productoras de ácido láctico provocan declives y por lo tanto inestabilidad e incluso la muerte del animal (Owens *et al.*, 1998). Existe una amplia variedad de éstos y en diferentes cantidades Cuadro 2.2.

**Cuadro 2.2 Tipo y Cantidad de Microorganismos ruminales.**

<i>Microorganismos</i>	<i>Cantidad</i>
Bacterias	$10^{10}$ y $10^{11}$ /g de líquido ruminal
Protozoarios	$10^4$ a $10^6$ /ml de líquido ruminal
Hongos	8% de la biomasa ruminal

(Relling y Mattioli, 2003).

Las bacterias ruminales se pueden agrupar en base a los sustratos que emplean y a los productos finales de su fermentación (Cuadro 2.3), cuyos productos finales son utilizados posteriormente para diversos procesos (Russell, 2002).

**Cuadro 2.3 Clasificación funcional de las Bacterias Ruminales.**

<i>Grupo de Bacterias</i>	<i>Característica funcional</i>	<i>Principales Productos finales de su metabolismo</i>
Celulolíticas	Fermentan hidratos de Carbono estructurales de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectinas)	AGV (especialmente acetato)
Amilolíticas	Fermentan hidrato de reserva de granos (almidón)	AGV (especialmente propionato)
Sacarolíticas	Fermentan hidratos de carbono simples (azúcares vegetales)	AGV (especialmente butirato)
Lactolíticas	Metabolizan El lactato	AGV(especialmente propionato)
Lipolíticas	Metabolizan las grasas	Ácidos Grasos Libres y AGV (especialmente propionato)
Proteolíticas	Degradan las proteínas	AGV y Amoniac (NH <sub>3</sub> )
Metanógenas	Producen Metano	Metano (CH <sub>4</sub> )
Ureolíticas	Hidrolizan La Urea	CO <sub>2</sub> y NH <sub>3</sub>

(Russell, 2002).

Las bacterias pasan con el quimo hacia el intestino y allí son digeridas, representando una importante fuente de proteínas para el rumiante. Las bacterias

poseen entre 30 y 50 % de proteína verdadera, con 70 a 75 % de digestibilidad y un valor biológico (indicador de calidad) aceptable (70 %), aportando los 10 aminoácidos considerados esenciales para los tejidos de mamíferos (Church, 1988).

Los protozoarios representan la microfauna ruminal, tienen mayor tamaño por lo tanto la masa es semejante a la bacteriana. Los protozoarios se diferencian de las bacterias por poseer una menor capacidad celulolítica (5 al 20 % del total) y son incapaces de sintetizar proteínas a partir de NNP (Church, 1988). Son beneficiosos al moderar la fermentación amilolítica, debido en parte a que consumen preferentemente bacterias amilolíticas, engloban trozos de almidón que pasan al intestino dentro del protozoario y evitan la fermentación ruminal, proveyendo de esa forma una fuente directa de glucosa para el animal (Cunningham, 1994; Church, 1988)

Los hongos poseen una importante actividad celulolítica, en especial cuando el rumiante consume forrajes demasiado maduros o encañados. No predominan en el rumen debido a su baja tasa de multiplicación en comparación con las bacterias, algunas de las cuales a su vez reprimen su crecimiento, como el *Ruminococcus spp.* (Cunningham, 1994).

El omaso está ocupado por unas 100 láminas, con forma de media luna. Su función es exprimir el contenido digestivo para extraer los líquidos del bolo alimenticio y éste siga moviéndose de manera continua hacia el abomaso (Dyce, 2002).

El abomaso de los ovinos es relativamente más grande y tiene contacto directo con el hígado a diferencia de los bovinos. Está revestido por una mucosa glandular de color rosáceo, cubierta de una mucosa fluida (Dyce, 2002), que tienen una función muy similar al estómago de un monogástrico, contiene glándulas peptídicas verdaderas que segregan moco y otras enzimas digestivas (Relling y Mattioli, 2003).

El intestino se divide en delgado y grueso, la primer parte a su vez tiene tres secciones, el duodeno, el íleon y el yeyuno. Una de las funciones del intestino es la adsorción de nutrientes, principalmente en el intestino delgado, la cual disminuye en el intestino grueso, por lo que velocidad del contenido intraluminal del intestino

delgado disminuye en la medida que se avanza desde el duodeno hasta el íleon (Savage, 2005).

En cuanto a la microflora intestinal, se sabe que los dos tercios superiores del intestino delgado, el duodeno y yeyuno, tienen baja concentración de microorganismos, mientras que la del íleon se asemeja en su gran mayoría a la del colon, debido al paso de microorganismos del ciego a través de la válvula ileocecal causando un aumento en la carga bacteriana (Cebra *et al.*, 2005). Múltiples estudios han mostrado que las bacterias predominantes aisladas del intestino delgado fueron estreptococos facultativos, gran positivos y un aislado en forma de bacilo parecido a *Propionibacterium* (Blanco, 1999). Especies gran positivos como *Streptococcus* son predominantes en la microflora, mientras que en zonas más distales los anaerobios y gran negativos son los predominantes (Ouwehand, 2006).

La zona terminal del intestino delgado ocurre una disminución en la velocidad del tránsito intestinal y de la acidez, lo cual hace de la flora ileal un ecosistema más diverso que el del resto de porciones del intestino delgado (Aziz, 2005). Más del 99% de esta microflora está compuesta por bacterias que mantienen una relación de simbiosis con el animal (Pai *et al.*, 2008). Las bacterias pueden deSCubrirse asociadas con partículas de alimentos, libres en la luz intestinal, o fijadas a la capa intestinal y a la capa mucosa. Sin embargo, el uso de herramientas de biología molecular, está demostrando que la cantidad de proteína protozoaria que pasa al intestino es mayor, (Relling y Mattioli, 2003), es por eso que se sabe del gran porcentaje de proteína microbiana pasa al intestino.

El intestino grueso se divide en ciego y colon (Dyce, 2002), sirve para el proceso de absorción de agua y electrolitos, lugar de formación y acumulación de las heces. El ciego cumple la función de realizar una digestión adicional de algunos alimentos. A este nivel ocurre una gran absorción de lignina y en rumiantes se produce la metanogénesis. En ovejas se comprobó que el 12% de la producción total de CH<sub>4</sub> lugar en el intestino grueso (Blanco, 1999). En corderos hasta los 28 días de edad es el intestino el principal órgano donde se realiza la fermentación. A partir de esta edad el retículo – rumen es el principal lugar de producción de ácidos grasos volátiles (Blanco, 1999).

### 2.2.1 Sistema inmunitario de la mucosa del intestino

El sistema inmune de mucosa del intestino presenta propiedades únicas como estar expuesto a una gran variedad y cantidad de antígenos, desarrollar una actividad inmunológica permanente y mantener un microambiente fisiológicamente desviado hacia respuestas antiinflamatorias (Porporatto *et al.*, 2007). El intestino es el órgano linfóide más grande del cuerpo por el número de linfocitos y la cantidad de inmunoglobulina que produce (Zaldívar, 2002).

La superficie mucosa en el intestino está cubierta por una capa única de células, entre las que se encuentran las células absorbivas (enterocitos), que son muy numerosas y cubiertas por mucos y glicocólix, las *Globet cells* que sintetizan el mucus, las *Paneth cells* localizadas en el intestino delgado, y que presentan en su citoplasma gránulos secretorios que contienen lisozimas, IgA, IgE, así como también células entero endocrinas, situadas a todo lo largo del tracto gastrointestinal, cuya función principal es liberar hormonas al tejido conectivo en respuesta a cambios en el ambiente exterior (Hathaway y Kraehenbuhl, 2000).

El Tejido linfóide asociado al intestino (TLAI) está compuesto por folículos linfoides que se disponen en toda la longitud del tubo digestivo. La mayor parte se encuentran aislados, sin embargo en el íleon forman agregados linfoides que se conocen como placas de Peyer (Alzola, 2002).

Los folículos linfoides de las placas de Peyer están compuestos por células B rodeadas por una región más laxa de células T y numerosas células presentadoras de antígenos. Aunque el íleon está revestido por epitelio cilíndrico simple, las zonas inmediatamente adyacentes a los folículos linfoides están revestidas por células de tipo eSCamoso, conocidas como *células M* (células de los micropliegues), que se encuentran esparcidas por todo el epitelio mucoso (Hathaway y Kraehenbuhl, 2000). La función principal de esta célula M es la absorción de partículas desde la luz gastrointestinal transportándola hacia la región vasolateral rica en linfocitos y otras células inmunes. Además, debido a su bajo contenido en lisosima, pueden transportar antígenos con una casi nula degradación enzimática. Su superficie contiene receptores específicos para la región Fc (Fragmento cristalizante) de la IgA, por lo que puede fijar y transportar complejos antígeno anticuerpo. Las

células M pueden transportar partículas y macromoléculas, tales como la ferritina, la peroxidasa, las toxinas del cólera y partículas del látex, así como bacterias, parásitos y virus, presentando epítomos a los linfocitos de las placas de Peyer (Mayer, 2000).

Las placas de Peyer no poseen vasos linfáticos aferentes pero si cuentan con drenaje linfático eferente. Reciben pequeñas arteriolas que forman un lecho capilar drenado por vénulas revestidas por endotelio alto (VRE). Los linfocitos destinados a entrar en las placas tienen receptores locales dirigidos que son específicos de las VRE del tejido linfoide asociado al intestino (Alzola, 2002).

Cuando existe una infección en las mucosas producida por patógenos intracelulares, se induce la inmunidad mediada por células (Van Ginkel *et al.*, 2000), como la que se pone de manifiesto en las células T tipo 1 (CD4 +, CD8+) y en los linfocitos citotóxicos con funciones regulatorias y de memoria (Porporatto *et al.*, 2007). Estas respuestas a la estimulación antigénica local son acompañadas por la síntesis de IgA secretoria (s-IgA) por células plasmáticas que se encuentran ubicadas en la submucosa. La síntesis de IgA secretoria (s-IgA), provee una primera línea de defensa muy importante contra la invasión de agentes patógenos hacia los tejidos (Corthés y Spertini, 1999).

La IgA es una inmunoglobulina predominante en las secreciones externas, que brinda una protección inmunológica específica para todas las superficies mucosas, al producir un bloqueo ante la penetración al organismo de agentes patógenos (Corthés y Spertini, 1999; Zaldívar, 2002; Braathen *et al.*, 2007).

El modo de acción más importante de la IgA, consiste en evitar la adherencia de las bacterias y de los agentes virales a las superficies epiteliales (Tizard, 2002). Inhibe la adherencia bacteriana y la neutralización de enzimas, virus y toxinas. Puede unirse de forma específica a moléculas presentes en la superficie bacteriana mediadora de la unión de esta célula epitelial, aumentando la afinidad de este complejo a la mucina, facilitando la inmovilización del microorganismo a la capa mucosa y la consiguiente eliminación (Salvi y Holgate, 1999).

En el organismo la s-IgA constituye más del 80 % de todos los anticuerpos producidos por el MALT, predomina en la saliva y secreciones intestinales en forma de s-IgA. Además, los anticuerpos de s-IgA no solo están presentes en las secreciones externas, sino también ejercen propiedades antimicrobianas a las células epiteliales durante su transporte a través del epitelio (Corthés y Spertini, 1999).

### **2.3 Prebióticos y probióticos.**

La alimentación, es un rubro dentro de la producción animal que tiene un importante impacto para las empresas pecuarias. Una de las alternativas de manejo más importante para reducir costos de alimentación y obtener mejores resultados en el aprovechamiento de nutrientes, es la utilización de aditivos. En la nutrición actual y moderna, la investigación sobre el empleo de nuevos aditivos naturales que pueden ejercer efectos de mejorar la salud y productividad animal genera muchas expectativas ante la ausencia de APC, o por la simple razón de los problemas de estrés y la exposición a patógenos que desencadenen problemas de inmunodepresión, enfermedad y pobre productividad. Algunos ejemplos de dichos aditivos son los probióticos y los prebióticos.

#### **2.3.1 Definición de Prebióticos**

Se denominan alimentos prebióticos aquellos que estimulan el desarrollo de las poblaciones bacterianas intestinales beneficiosas. Normalmente estos alimentos contienen azúcares complejos que no son digeridos en la parte superior del intestino y llegan a la región del colon donde alimentan estos tipos de bacterias. Son sustancias no digeribles que brindan un efecto fisiológico beneficioso al huésped, estimulando selectivamente el crecimiento favorable o la actividad de un número limitado de bacterias autóctonas (Guarner *et al.*, 2008).

Los prebióticos afectan benéficamente al huésped mediante una estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de una o un limitado grupo de bacterias en el colon (Gibson y Roberfroid, 1995) y potencializan el efecto de los probióticos. Los carbohidratos de cadena corta como los mananooligosacáridos (MOS) y los fructo oligosacáridos (FOS) son componentes de cultivos de levaduras y de plantas,

respectivamente. Los prebióticos sirven como alimento (substrato) para que los organismos probióticos estimulen su crecimiento, proliferación y exclusión competitiva de patógenos. Los prebióticos se encuentran en diferentes presentaciones y marcas comerciales, conocidas en la Comunidad Económica Europea, como Elix'or® (galato-oligosacáridos en polvo), Frutafit® HD (inulina en polvo), los cuales estimulan el metabolismo y la producción de *Bifidobacterium* (Park et al., 2007; Rioux et al., 2005; Walker, 2001), Lactulosa (lactulosa en polvo), Raftilosa® P95 (fructo-oligosacáridos en polvo), Solufiber® (goma guar hidrolizada en polvo), entre otras (Mitterdorfer *et al.*, 2001). En general los prebióticos deben cumplir tres condiciones para que tengan una acción efectiva (Collins y Gibson, 1999):

1. Deben permanecer estables bajo las condiciones ácidas del estómago y las secreciones del intestino delgado.
2. Deben transferirse intactos al colón.
3. Deben tener un metabolismo selectivo.

Aunque no es el tema de esta revisión, vale la pena nombrarlos, ya que son motivo de múltiples estudios en la actualidad y pueden ser el futuro en la prevención y tratamiento de patologías gastrointestinales de alta prevalencia y con un porcentaje importante de morbimortalidad en la población (Gómez y Acero, 2011).

### **2.3.2 Definición de Probióticos**

El término probiótico fue utilizado por primera vez por Lilly y Stillwell (1965) para describir sustancias secretadas por un microorganismo el cual estimula el crecimiento de otros. Parker (1974) fue el primero en utilizar el término probiótico en el contexto para describir organismos y sustancias las cuales contribuyen al equilibrio microbiano intestinal, sin embargo, al emplear la palabra sustancias, también se hace referencia a los antibióticos. Fuller (1989) mejoró la idea de Parker, planteó la siguiente definición: Un suplemento alimenticio de microorganismos vivos, el cual afecta benéficamente al hospedero animal al mejorar su balance microbiano intestinal, por lo que se introduce el aspecto de un efecto benéfico sobre el

hospedero y se enfatiza el requerimiento de viabilidad para los probióticos (Schrezenmeir y de Vrese, 2001). Samudio y De León (2002) denominaron probióticos a aquellos alimentos que contienen bacterias cuya presencia en el intestino es beneficiosa porque favorecen la digestión de alimentos y eliminan competidores, propusieron ingesta de ciertas bacterias como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* tiene efectos particularmente favorables para la salud. Sanders *et al.* (2003) llevaron a cabo una revisión, donde la definición más reciente fue publicada en un encuentro de Expertos Consultores de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), los cuales definieron a los probióticos como microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio saludable al hospedero.

Finalmente la FAO (2006) define que los probióticos son aquellos que contienen microorganismos vivos principalmente bacterias y levaduras que son utilizados como suplementos alimenticios que regulan el proceso digestivo alterando o modificando la microbiota gastrointestinal y que pueden ejercer efectos beneficiosos para la salud.

Estudios científicos recientes sobre las propiedades y la funcionalidad de microorganismos vivos en los alimentos sugieren que los probióticos desempeñan un importante papel en las funciones inmunitaria, digestiva y respiratoria, y que podrían tener un efecto significativo en el alivio de las enfermedades infecciosas (FAO, 2006).

Un probiótico debe sobrevivir a la acción de ácidos gástricos y jugos gástricos en el estomago, colonizar el tracto intestinal además de agruparse y formar colonias que se adhieren a las células del intestino (tejido epitelial) gracias a mecanismos bioquímicos basados en la producción de ácidos lácticos y bacteriocinas, promover la buena digestión mejorando la función intestinal, mejorar las defensas naturales del organismo. Se dice que en monogástricos alivia infección de úlcera y gastritis provocadas por infección de la bacteria *Helicobacter pylori* (Chenoll *et al.*, 2010).

El comportamiento animal en respuesta a la adición de probióticos está influenciado por múltiples factores, entre los cuales se encuentran la dosis utilizada, edad, raza,

tipo de explotación, uso de antibióticos, estrés y el ambiente de la crianza. Por esta razón es muy común encontrar respuestas variables al uso de probióticos, por lo que considerar estos factores es un punto crítico antes de utilizar estos productos (Fox, 1994).

Dentro de los grupos de los probióticos se encuentra los cultivos de levaduras, la sean deshidratados que retienen la capacidad de fermentación o de levaduras inactivas que se considera una fuente de células viables (Miles, 1994). Los cultivos de levaduras utilizados ya de manera comercial y en la alimentación animal pertenecen principalmente a las especies de *Aspegillus oryzae* (AO) y *Saccharomyces cerevisiae* (SC). Éstos han sido utilizados en rumiantes para proveer la utilización de nutrientes, características de fermentación ruminal, producción de leche y ganancia de peso (Patra, 2012). AO, es un hongo que se caracteriza por la producción de hifas especializadas denominadas conidióforos El color es la principal característica macroSCópica para la identificación de los grupos de aspergilos (Kozakiewicz 1989). Se emplea en la fermentación de alimentos, de manera que resulten más asimilables y nutritivos y se conserven mucho tiempo. En cuanto a su empleo en nutrición animal, Beharka *et al.* (1991), fueron capaces de adelantar con todas las garantías una semana la edad al destete de jóvenes terneros consumiendo extractos de AO a través del alimento, viendo que tanto la población de bacterias ruminales como la concentración de ácidos grasos volátiles en el rumen aumentaron en comparación con animales control. Jouany *et al.* (1998) en un estudio con SC y AO en ovejas defaunadas y refaunadas encontraron que la digestibilidad aparente de las paredes celulares de las plantas fue similar en ovejas defaunadas, pero se incrementó con la adición de SC (más 16%) en ovejas refaunadas. Simultáneamente, el efecto de SC o AO en la digestión *in situ* de FDA no fue significativo y negativo en animales defaunadas, mientras que fue positivo en el rumen de ovejas refaunadas después de un tiempo de 12 h.

En el caso concreto del empleo de levaduras, son sustancias que tienen grandes posibilidades para ser empleados como aditivos naturales por sus efectos de poder mejorar la salud y productividad animal. Los resultados reportados en la literatura especializada son limitados para las levaduras aunque se podrían plantear para estas sustancias que serían: eficaces como promotores de crecimiento de los

distintos productos generados en la industria fermentadora (Castro y Rodríguez, 2005).

### 2.3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son microorganismos eucariotas y sus propiedades son completamente diferentes a las de las bacterias. Por ejemplo, las levaduras son resistentes a los antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacteriales. Esta resistencia es genéticamente natural y no es susceptible a ser modificada o transmitida a otros microorganismos. El tamaño de las levaduras varía alrededor de  $5 \times 10 \mu\text{m}$  y es también significativamente mayor al de la bacteria ( $0.5 \times 5 \mu\text{m}$ ) (Auclair, 2001; Lázaro *et al.*, 2005).

Los SC son cultivos de levaduras vivas, son unicelulares ovoides u elípticos, no móviles, que crecen a temperaturas de 25 a 40 °C. Pueden tolerar un pH de 3.5 (Flores, 2000). Esta habilidad parece estar relacionada con su destreza para disminuir las concentraciones potencialmente inhibitorias de oxígeno (Folch-Mallol *et al.* 2004).

La SC es importante para la industria debido a su habilidad de convertir azúcar (glucosa, maltosa) en etanol y dióxido de carbono (cervecaría, destilería). Posee el estatus GRAS (reconocimiento de total seguridad) dado por la FDA de los EE.UU (Auclair, 2001). Algunos de los productos comerciales que contienen cultivos de levaduras de SC que se encuentran en el mercado se describen en el cuadro 2.4.

**Cuadro 2. 4 Productos comerciales con *Saccharomyces cerevisiae* en el mercado.**

<b>Nombre del producto</b>	<b>Estado físico</b>	<b>Cepa</b>	<b>Laboratorio</b>
Biosaf	Levadura viva	SC47	Saf Agri
Diamond V XP	Deshidratada		Diamond V
Levucell SC	Levadura viva	I – 1007	Lallemand
Nutri Bio	Deshidratada		Saf Agri
Selenio Source AF 2000	Deshidratada		Diamond V
Procreatin 7	Levadura viva	Pura	Saf Agri

Yea Sac	Levadura viva	Alltech
---------	---------------	---------

(Gómez *et al.*, 1990; García, 2004)

La levadura de SC ha sido considerada como probiótico en especies domesticas. En algunos trabajos de investigación se ha demostrado que puede actuar como un inmunoestimulador e inmunoregulador y puede además incrementar la resistencia inespecífica para un gran número de bacterias que afectan el tracto respiratorio y digestivo (Martínez, 2000).

Las paredes celulares de levadura (PCL) son fuentes ricas de polisacáridos naturales de 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 SC y que frecuentemente son definidos como fuentes de polisacáridos naturales de tipo MOS (Hooge, 2004). De 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 antibióticos promotores del crecimiento; esta situación podría sugerir que este tipo de aditivos puede representar una buena herramienta para incrementar la eficiencia reproductiva cuando los antibióticos promotores del crecimiento no estén presentes (Ferket *et al.*, 2002).

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 peletizado 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 MOS cuando esta fracción representa la segunda en importancia dentro de la pared celular, después de la fracción de  $\beta$ -glucanos (Aguilar-USCanda *et al.*, 2003).

#### **2.3.2.1.1 Uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en alimentación animal.**

La preocupación por la intoxicación alimentaria causada por bacterias patógenas entéricas tanto en humanos como en animales es cada vez mayor en salud pública, es por eso que el empleo de probióticos puede ser una opción para limitar la sobrevivencia de microorganismos infecciosos que pueden tener reservorio en el tracto digestivo principalmente (Olvera-Ramírez *et al.*, 2002).

Actualmente en el mundo existe una tendencia hacia el consumo de animales sin residuos de antibióticos y de preferencia de animales que no hayan recibido tratamientos con sustancias químicas, por lo tanto el uso de levaduras para el tratamiento de ciertas enfermedades incluidas algunas no entéricas es de gran beneficio para la población (Castro y Rodríguez, 2005; Morales, 2007).

#### **2.3.2.1.1 Comportamiento de monogástricos con suplementación de *Saccharomyces cerevisiae***

En cuanto al uso de la levadura en la alimentación de monogástricos, en particular (SC) aumenta la inmunidad y de alguna manera se adhiere a las bacterias para evitar que estas proliferen, y con esto se disminuye el número de bacterias viables en el intestino y sobretodo se disminuye el número de bacterias que se eliminan con las heces (Castro y Rodríguez, 2005).

Ducluzeau y Bensaada (1982) demostraron que SC solamente era capaz de multiplicarse en el tracto digestivo de ratones gnotobióticos. La levadura es drásticamente eliminada del tracto digestivo de ratones normales por efecto antagonista de la flora intestinal, pues su complejo ecosistema microbiano hace a la levadura incapaz de competir.

Buts *et al.* (1986) mostraron que la ingestión oral de SC por humanos y ratas destetadas produjo marcados incrementos en las actividades específicas y totales de las disacaridasa, sucrasa, lactasa y maltasa, en las membranas de las microvellosidades. Esta propiedad puede ser interesante ya que algunas diarreas se asocian con la disminución de la actividad de las disacaridasas intestinales. Es posible que dicha actividad esté mediada por la liberación endoluminal de poliaminas producidas por las levaduras vivas (Buts *et al.*, 1994).

Gedek (1989) observó que cuando los patógenos se ligan a la pared celular de la levadura se induce un efecto protector ya que el complejo SC patógeno es rápidamente eliminado del tracto digestivo. La frecuencia de colonización de *Salmonella typhimurium* por ejemplo, se vio significativamente reducida en pollos de engorde debido al tratamiento con manosa (Oyoyo *et al.*, 1989) y levaduras (Line *et al.*, 1998), aunque la colonización de *Campylobacter spp.* no se afectó por esta suplementación.

Otro de los efectos observados por la suplementación SC en monogástricos son la inhibición de la producción de toxinas, la modificación de las poblaciones bacteriana, ácidos grasos volátiles y menor colonización de bacterias patógenas como *Vibrio cholerae* (Vidon *et al.*, 1986), *Clostridium difficile* y *E. coli* (Massot *et al.*, 1982; Corthier *et al.*, 1986; Fairchild *et al.*, 2001; Fritts y Waldroup, 2003; Zdunczyk *et al.*, 2005), además de efectos favorables en el índice de conversión alimenticia y peso vivo. Efectos inhibitorios de las levaduras sobre la adhesión de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* (Rigothier *et al.*, 1994) y de *Staphylococcus aureus* (Elliot *et al.*, 1991) en células humanas también han sido demostrados.

Hasta 1994 no se había reportado que las levaduras indujeran alteraciones morfológicas en la mucosa intestinal, ni tampoco que influenciaran la deconjugación de los ácidos biliares o la emulsión y la digestibilidad de las grasas (Buts *et al.*, 1986; El Hennawy *et al.*, 1994). La capacidad de protección ejercida por SC contra *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* fue demostrada en ratones (Rodríguez *et al.*, 1996). Las cantidades de estos microorganismos se reducen cuando la levadura ha sido suministrada. Algunas cepas de SC pueden excretar una serina proteasa que hidroliza la toxina A de *Clostridium difficile*, la cual es resistente a la tripsina; además, inhibe la adhesión de esta toxina a su receptor de glicoproteína en la superficie de la microvellosidad (Castagliuolo *et al.*, 1996).

En los cerdos se ha visto que el uso de las levaduras como probiótico ha tenido un efecto positivo en diversos aspectos del desarrollo del animal, participando en numerosas funciones metabólicas (Castro y Rodríguez, 2005):

- Reducen las diarreas o la severidad de éstas cuando han aparecido (Bekaert *et al.*, 1996).

- Fomentan el equilibrio natural de la flora intestinal en los cerdos y proporcionan mejores procesos digestivos (Kornegay *et al.*, 1995; Van Heugten *et al.*, 2003).
- Estimulan el sistema inmunológico de los cerdos mejorando su resistencia a las enfermedades más comunes (O'Quinn *et al.*, 2001).

Todos estos factores permiten, mejorar la ganancia de peso corporal, el consumo y la conversión alimenticia. En lechones neonatos se recomienda la administración de levaduras a lechones débiles, luego de la deSColmillada y castración, cuando hay problemas gastrointestinales y, especialmente, al destete (Jonsson y Conway, 1992). Jurgens *et al.* (1997) midieron el desempeño de cerdas y cerdos que recibieron un suplemento de levadura en dietas de maíz y torta de soya. La suplementación de la levadura seca activa a la cerda y a sus lechones produjo una mejora en la ganancia de peso y eficiencia alimenticia, pero no afectó el consumo de alimento. Por otro lado, Cuaron *et al.* (1998) reportaron que la levadura viva de SC suplementada de manera permanente a lechones, aumenta la resistencia al estrés y protegen parcialmente contra algunas de las enfermedades infectocontagiosas respiratorias y digestivas más comunes. Además, en cerdos en finalización se utiliza para mejorar el estado inmunológico, pues cuando los cerdos son transportados de un lugar limpio (condiciones de laboratorio con bajos niveles de patógenos) a un área sucia (condiciones de campo con altos niveles de patógenos) se vio notablemente mejorado en animales tratados con la adición de levadura viva, en comparación con las bajas respuestas obtenidas en animales control, probablemente por el estrés digestivo inducido por la presencia de altas cantidades de patógenos. De igual manera en producciones de cerdos en Sonora debido a la exportación de carne hacia Japón no es posible la utilización de antibióticos como tratamiento por lo que se recurre a otros productos como SC (2 kilos por tonelada) (Trujano *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha comprobado que los probióticos reducen el mal olor de las excretas porcinas (Russell *et al.*, 1998; Chang y Cheng, 2003).

En cuanto a la suplementación de manano-oligosacáridos (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).

Los efectos observados en pollos de engorde que consumieron MOS en la dieta fueron: mejoras en los índices productivos, mayor resistencia ante infecciones bacterianas y coccidias, menores mortalidades y modificaciones de la disposición de grasa abdominal en los pollos (Waldroup *et al.*, 2003). 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 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.

#### **2.3.2.1.1.2 Comportamiento de rumiantes con suplementación de *Saccharomyces cerevisiae***

Los efectos beneficiosos y el modo de acción de la levadura como aditivo en la microbiota del rumen, han sido ampliamente estudiados, principalmente en estudios *in vitro* o con modelos animales utilizando ovejas con el rumen canulado o cordero criado en aisladores estériles y microflora acogida simple (Tripathi y Karim, 2011) Sin embargo, el rumen albergan un ecosistema microbiano complejo donde el modo de acción de la levadura y por lo tanto los efectos pueden cambiar por la interacción con la microbiota normal del rumen.

La suplementación de la levadura SC en dietas para la alimentación de rumiantes, ha sido para mejorar su producción mediante la estimulación del crecimiento y actividad de ciertos grupos de microorganismos ruminales, (Olvera-Ramírez *et al.*, 2002) surgiendo diversos resultados, los principales relacionados al impacto en la microflora ruminal e intestinal, observando que la fermentación ruminal podía ser manipulada para controlar el paso de patógenos como *Listeria* y *EScherichia coli* al intestino de los rumiantes, que por lo general ingresan por el alimento o al momento del sacrificio, existiendo la preocupación por posible transmisión a través de la cadena alimenticia humana (Wolin, 1969; Wallace *et al.*, 1989), es por eso que emerge la búsqueda de diferentes estrategias para disminuir la prevalencia de bacterias patógenas en rumiantes antes del sacrificio (Callaway *et al.*, 2003; Olvera-

Ramírez, 2007). Sin embargo, 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 los 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). En ovejas que recibieron levaduras, el número de células viables de estos microorganismos declinó 30 horas después de finalizado el tratamiento (Fiems *et al.*, 1993). En otros experimentos realizados con corderos, entre 17 y 34% de las células de las levaduras permanecieron vivas durante su tránsito a través del tracto digestivo (Durand-Chaucheyras *et al.*, 1998).

La levadura SC está adaptada al ambiente con alto contenido de azúcar, tiene una habilidad limitada para multiplicarse en el líquido ruminal, en el cual estimulan el crecimiento de bacterias celulolíticas y bacteria utilizadoras de ácido láctico. Sin embargo, no todas las cepas de SC son capaces de estimular el crecimiento de las bacterias ruminales (Newbold *et al.*, 1996). Dawson y Girard (1997) sugirieron que la estimulación del crecimiento bacteriano puede estar asociada 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. Rossi *et al.* (2004), aislaron a partir de SC 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 bacteria ruminales (*Megasphaera elsdenii*). Por lo tanto, 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; Chademana y Offer, 1990; Wallace y Newbold, 1992; Dawson y Girard, 1997). Este efecto ha sido atribuido a tres posibles mecanismos, por un lado las levaduras pueden servir como fuente de vitaminas sobre todo de tiamina, vitamina capaz de estimular el crecimiento de ciertos hongos presentes en el rumen (Chaucheyras *et al.*, 1995), por otro favorecen 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), y por último crea un proceso de fermentación, que proporciona una

mezcla de micro-nutrientes para estimular bacteriana el crecimiento en el rumen facilitando de este modo la fermentación aumentado de fibra y / o utilización de productos finales de la fermentación de la fibra para evitar su acumulación en el rumen (Robbinson, 2010).

Con respecto a las respuestas del rendimiento de los rumiantes, incluyendo corderos, alimentados con cultivos de levaduras y hongos, han sido variables. En cuanto a la tasa de crecimiento, eficiencia alimenticia y ganancia de peso fueron similares o reducidas (Agarwal *et al.*, 2002; Erasmus *et al.*, 2005; Mahender *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Kawas *et al.*, 2007), mientras que otros estudios han sugerido mejoría en la ganancia de peso , el consumo de alimento y la eficiencia alimenticia con la suplementación con levadura (Williams y Newbold, 1990; Wallace y Newbold, 1992; Lesmeister *et al.*, 2004; Stella *et al.*, 2007). Kawas *et al.* (2007) y Chaucheyras-Durand *et al.* (2008) sugirieron que la suplementación y respuesta variable de levadura dependen de la cepa de levadura, la naturaleza de la dieta, y el estado fisiológico de animal. El crecimiento y desarrollo de los animales es la base para la producción de carne, mientras que la cantidad y el sitio de grasa en la influye en la calidad de la canal (Karim *et al.*, 2007; Sen *et al.*, 2004).

Algunas cepas de levadura SC son más potentes por vía sanguínea y con ello se podía reducir el consumo a base de ionóforos (monensina) (Castillo *et al.*, 2006) y mantener una mayor pH ruminal (Bach *et al.*, 2007). También ejercen actividad inhibidora sobre la patogenicidad diferente cepas bacterianas es debido a la producción de cualquiera de los dos actividad bacteriostática o bactericida (Comitini *et al.*, 2005) debido a ciertos compuestos metabólicos producido por las levaduras. Estudios han revelado que la inclusión de levaduras basadas en cepas de SC puede reducir la sobrevivencia de patógenos en el fluido ruminal de corderos (Haddad y Goussous, 2005). Se ha reportado en experimentos *in vitro* que diferentes cepas de levaduras vivas basadas en SC, son capaces de prevenir la proliferación de patógenos como *E. coli* y *L. monocytogenens* en fermentadores con líquido ruminal de ovejas. Con la suplementación de 5 g/d de una cepa de levadura viva de SC en borregos canulados alimentados en condiciones controladas e inoculados con bacterias patógenas, tendió a disminuir el número en rumen pero no en heces, lo cual puede estar relacionado con el hecho de que dichas bacterias pueden

sobrevivir y proliferar en el intestino del rumiante (Olvera-Ramírez, 2007). Se sabe que enterobacterias como: *Salmonella entérica serovar typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella spp.*, *E. coli O157* y *Yersinia spp.*, tienen tropismo por placas de peyer (tejido linfoide ampliamente distribuido en intestino) las cuales juegan un papel muy importante en el sistema inmune del animal (Jensen *et al.*, 1998; Philips *et al.*, 2000; Vazquez-Torres y Fang, 2000) donde los manano-oligosacáridos de la pared de la levadura pueden tener un buen papel en rumiantes, ya que se ha especulado que tienen un efecto en el sistema inmune, principalmente en placas de peyer (Swanson *et al.*, 2002; White *et al.*, 2002).

### **2.3.2.2 Mecanismo de acción de las levaduras y paredes celulares de SC adicionadas en el alimento.**

De acuerdo a Cuarón (2000), los efectos de promoción del crecimiento de la levadura en animales monogástricos, sus efectos 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 animal (Klasing *et al.*, 1987). Respecto a los mecanismos de acción de la levadura SC 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 del sistema inmune.

#### **2.3.2.2.1 Exclusión de patógenos y micotoxinas**

##### **2.3.2.2.1.1 Propiedades farmacodinámicas de la levadura**

De acuerdo a Butts (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 demostrado 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*,

el efecto protector que podría justificar la mayor supervivencia de los animales que consumieron células de levadura, 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.* (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 epiteliales (Tasteyre *et al.*, 2002). La administración de *Saccharomyces* en monogástricos 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* (Rodríguez *et al.*, 1996)

#### **2.3.2.2.1.2 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 “lecitinas”. Las lecitinas 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 lecitinas 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).

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-manósido para unirse a las lecitinas afines a receptores presentes en cierto tipo de bacterias que presentan fimbria tipo-1. En estos estudios, se ha reportado que las fracciones D-manosa y metil- $\alpha$ -D-manósido pueden ejercer un efecto de inhibición, mayor a 90%, de las adherencias de *Salmonella typhimurium* a las células digestivas epiteliales. 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).

#### **2.3.2.2.1.3 Exclusión de micotoxinas**

La estructura química de las PCL de SC no solo exhibe un alto grado de antigenicidad debida a sus fracciones de  $\beta$ -glucanos 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; 2004; Jouany, 2003; 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*, *Penicilium*, *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-Leszkiwicz, 2000). Algunos ejemplos de micotoxinas identificadas en materias primas y alimentos contaminados de forma natural son: Aflatoxinas (AF), ocratoxinas (OA), zearalenonas, toxinas T-2, vomitotoxinas y fumonisinas (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 hepatotóxicos, nefrotóxicos, hepatocarcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos (Veldman, 2004). Las levaduras basadas en SC y las PCL son también capaces de contrarrestar los efectos tóxicos de piensos contaminados con aflatoxinas suministrados a animales (Santin *et al.*, 2003).

#### **2.3.2.2.2 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 suministradas oralmente, sugieren que la levadura podría ejercer un efecto trófico a escala de la mucosa digestiva (Buts *et al.*, 1994). En estos experimentos 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).

Zhang *et al.* (2005), observaron que el empleo de levadura de SC a una dosis elevada, 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. Con esto se podría sugerir que las levaduras podrían ejercer un efecto trófico en la mucosa digestiva además de incrementar la actividad enzimática de la membrana en borde de cepillo de las células del epitelio y el transporte de aminoácidos a nivel de la mucosa del yeyuno.

### **2.3.2.2.3 Estimulación del sistema inmune**

Von Dungern (1900) observó que levaduras de SC utilizadas en la industria de panadería, interactuaban con las proteínas del complemento del sistema inmunitario. Pillemer y Ecker (1941) encontraron que el componente activo en la levadura involucrada 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 regresiones 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 (Taylor, 2001; 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 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, neutrófilos y componentes del sistema de proteínas del complemento (C3, C5, C3d) (Macchado-Caetano *et al.*, 1986). En ratas que consumieron *Saccharomyces*, se observó un incremento significativo (+57%) en las concentraciones de IgA secretada en el líquido intestinal y en las concentraciones de la porción secretora (+63%) de las células crípticas de la mucosa intestinal (Rodrigues *et al.*, 2000).

## CAPÍTULO 3

### **OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este proyecto fue identificar la levadura suplementada basada en *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes partes del tracto digestivo y placas de peyer, y evaluar su comportamiento productivo en ovinos de engorda.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para lograr el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Efecto de la levadura suplementada sobre los parámetros productivos en ovinos de engorda.
2. Obtener el control positivo de la levadura (*S. cerevisiae*) suplementada.
3. Identificar la cepa de levadura suplementada en diferentes secciones del tracto digestivo del rumiante y en las placas de peyer mediante la técnica molecular de PCR.

## CAPÍTULO 4

### **EFFECTO DE LA LEVADURA SUPLEMENTADA SOBRE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN OVINOS DE ENGORDA**

## 4. EFECTO DE LA LEVADURA SUPLEMENTADA SOBRE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN OVINOS DE ENGORDA

### 4.1 INTRODUCCIÓN

Las levaduras basadas en SC son productos microbianos conocidos por promover el metabolismo ruminal, desarrollo por modulación de la función del rumen y la fermentación, actividad de su microflora, mejorando el rendimiento de la producción de los rumiantes. (Tripathi y Karim, 2011). Previos experimentos han demostrado efectos positivos sobre los parámetros productivos en animales en producción suplementados con levadura SC (Wiedmeier *et al.*, 1987; Newbold *et al.*, 1990; Newbold y Wallace, 1992; El-Ghani, 2004; Kamel *et al.*, 2004; Lesmeister *et al.*, 2004; Ando *et al.*, 2004; Erasmus *et al.*, 2005; Kritas *et al.*, 2006). Kamel *et al.*, (2004) emplearon 11.25 y 22.5 gramos de SC y un grupo control en ovinos canulados, reportando un incremento de la degradación de materia orgánica del heno. Lesmeister *et al.*, (2004) observaron que la inclusión de SC en una proporción del 2% contribuyó favorablemente al desarrollo del rumen en becerros de engorda, impulsando un aumento en el consumo de alimento, de las ganancias diarias de peso y del desarrollo corporal. Además, otros autores han reportado un incremento en la la ganancia de peso , el consumo de alimento y la eficiencia alimenticia con la suplementación con levadura (Williams y Newbold, 1990; Wallace y Newbold, 1992; Lesmeister *et al.*, 2004;. Stella *et al.*, 2007). Sin embargo, otros autores no han encontrado tales efectos (Chademana y Offer, 1990; Wohlt *et al.*, 1991; Giger-Reverdin *et al.*, 1996; Kamra *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Mahender *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006 y Kawas *et al.*, 2007), incluso algunos más observaron que los resultados en cuanto a la tasa de crecimiento, eficiencia alimenticia y ganancia de peso fueron similares o reducidas respecto a los animales sin inclusión de levadura en la dieta (Agarwal *et al.*, 2002; Erasmus *et al.*, 2005; Mahender *et al.*, 2005. Kim *et al.*, 2006; Kawas *et al.*, 2007). Por lo tanto, en este estudio se investigó el efecto que tiene la suplementación de una cepa de levadura viva en los parámetros productivos

tales como consumo diario, ganancia diaria de peso, eficiencia alimenticia y rendimiento en canal.

## **4.2 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.2.1 Lugar experimental**

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Amazcala, ubicado en el municipio de El Marqués, Querétaro, específicamente en la Posta Ovina de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Ciencias Naturales. Las instalaciones se ubican a los 20° 42' 40.8" N y 100° 15' 24.7" O, a una altura de 1,930 metros sobre el nivel medio del mar. Predomina el clima templado semiseco con una precipitación anual de 400 a 500 mm<sup>3</sup> (Gobierno del municipio de El Marqués, 2011).

### **4.2.2 Animales experimentales**

Se estabularon 12 ovinos de engorda de raza Black Belly con un peso promedio inicial de 29 kg. Se formaron tres grupos al azar, teniendo 4 animales por tratamiento. De manera individual los animales fueron pesados y desparasitados con Closantil® al 5% una semana antes de comenzar el experimento. Posteriormente los animales se estabularon en corraletas individuales para monitorear el consumo voluntario individual durante el experimento. Cada corraleta tenía piso de tierra y estaba acondicionada con bebedero y comedero individual señalado con un recuadro el número de animal y su tratamiento respectivo. Cada dos semanas se monitorearon sus pesos hasta llevarlos al sacrificio, de esta manera se pudo obtener la ganancia diaria de peso.

### **4.2.3 Dieta**

Los animales fueron alimentados con una dieta de engorda (Cuadro 4.1). La dieta fue dada una vez al día *ad libitum*, retirando el sobrante para pesarlo y determinar el consumo diario. A la ración se le determinó su contenido de materia seca (MS), proteína cruda (PC), energía bruta (AOAC, 1990), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Robertson y Van Soest, 1981).

**Cuadro 4.1 Ingredientes y composición química de una dieta en engorda usada en ovinos Black Belly.**

<b>Ingredientes</b>	<b>%</b>
Heno de alfalfa	20
Maíz rolado	30
Sorgo molido	23
Pasta de soya	14.5
Salvado de Trigo	5
Melaza de caña	5
PMX Ovino Engorda E.	2.5
Total	100
<b>Composición Química</b>	
Materia Seca (%)	95.2
Cenizas (%)	10.65
Proteína Cruda (%)	17.398
Energía Bruta (Mcal/Kg)	3.84
Grasa (%)	2.09
Fibra Detergente Neutro (%)	22
Fibra Detergente Ácido (%)	8

#### **4.2.4 Tratamientos**

Tres tratamientos fueron suplementados durante 8 semanas (Cuadro 4.2), dos niveles de inclusión de levadura (2.5 y 5 g/d) y un tratamiento control (no inclusión de levadura). Los tratamientos de inclusión de levadura fueron administrados en *top dressing*, después de la semana de acondicionamiento de la dieta, dicho método consistió en poner la levadura dispersa encima del alimento de tal manera que fuera lo primero que el animal consumía.

**Cuadro 4.2 Tratamientos suplementados a corderos por 8 semanas**

<i>Tratamiento</i>	<i>Dosis de Levadura (g/animal)</i>
1	2.5
2	5
Control	No inclusión

#### **4.2.5 Diseño experimental**

En este experimento se utilizó un diseño totalmente al azar donde las variables a analizar fueron: consumo diario y total de MS, ganancia diaria de peso, peso final, eficiencia alimenticia, peso al sacrificio, peso de la canal, rendimiento de la canal,

#### **4.2.6 Procedimiento de muestreo de tracto digestivo y placas de peyer**

Al terminar el periodo de administración de tratamientos, los animales fueron sacrificados en el Rastro TIF 412, 5320, ubicado sobre la carretera a Chichimequillas Km. 8.5 San José El Alto, Querétaro, México. Los animales fueron pesados y llevados al rastro un día anterior al sacrificio para lo cual se hicieron dos grupos iguales. Al momento del sacrificio, se separó el tracto digestivo, se midió la longitud tanto de intestino delgado como del intestino grueso y se contó la cantidad total de placas de peyer identificando el yeyuno e íleon para recolectar 2 placas de peyer. Posteriormente, se tomaron muestras de contenido luminal y muestras de líquido ruminal, yeyuno e íleon en tubos de 1.5 ml libres de ARNasas y ADNasas. Para la recolección de muestras, se desinfectó la mesa de trabajo entre cada animal con la finalidad de evitar contaminación. Se tomaron muestras de placas de peyer y se guardaron en Nitrógeno líquido para su conservación y transporte. Se mantuvieron congeladas a -20 °C para la extracción de ADN. Después se recolectaron muestras de contenido ruminal y luminal en tubos eppendorf de 2 ml las cuales se iban colocando en termos con Nitrógeno líquido para conservarlas. Al final se guardaron en un Revco a -70 °C (Thermo Fisher Scientific, Asheville, USA).

#### **4.2.7 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en relación a los parámetros productivos fueron analizados mediante el software SPSS versión 16. Las variables fueron analizadas por un análisis de varianza utilizando peso inicial como covarianza. Los resultados fueron considerados significativamente diferentes cuando el valor de *P* fue menor o igual a 0.05.

### 4.3 RESULTADOS

La evaluación de los resultados de los parámetros productivos obtenidos durante la engorda y la suplementación de cultivos de la levadura SC se muestran en el cuadro 4.3. No se encontró efecto alguno en relación con la suplementación de la levadura, con el consumo diario y total de materia seca, ganancia diaria de peso, peso inicial, peso final y eficiencia alimenticia ( $P > 0.05$ ).

**Cuadro 4.3 Comportamiento productivo de corderos *Blackbelly* suplementados con cultivos de levaduras de SC durante la etapa de engorda.**

<i>Parámetro</i>	<i>Levaduras (g/d)</i>					
	<i>Control</i>	<i>2.5</i>	<i>5</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. Est.</i>	<i>P</i>
Consumo Diario de MS (kg)	1.41	1.44	1.33	1.39	0.248	0.585
Consumo Total de MS (kg)	91.5	93.63	86.26	90.46	16.164	0.585
Ganancia Diaria de Peso (kg)	0.24	0.25	0.23	0.23	0.038	0.888
Peso final (kg)	41	42	40	41.05	4.764	0.487
Eficiencia alimenticia	0.34	0.36	0.31	0.33	0.100	0.678

Los consumos de alimento en kilogramos divididos por periodos y por cada grupo de animales de acuerdo al tratamiento se muestran en el cuadro 4.4. No hubo diferencia significativa entre el consumo de alimento y los periodos, de la misma manera no se observó un efecto de la suplementación de la levadura en la dieta sobre el consumo de alimento ( $P > 0.05$ ).

**Cuadro 4.4 Consumo de alimento (MS) por tratamiento por periodo**

	<i>Levaduras (g/d)</i>				

<i>Periodo</i>	<i>Control</i>	<i>2.5 5</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. Est.</i>	<i>P</i>	
Día 1-15	1.46	1.45	1.46	1.45	0.194	0.056
Día 16-29	1.46	1.58	1.39	1.48	0.212	0.061
Día 30-43	1.51	1.60	1.38	1.50	0.215	0.062
Día 44-58	1.84	1.85	1.67	1.78	0.200	0.057

En cuanto a la ganancia diaria de peso de SCrita en el cuadro 4.5, no se observó ninguna diferencia estadística entre los tratamientos control y los tratamientos con suplementados con levadura ( $P>0.05$ ). Sin embargo, numéricamente en el penúltimo periodo se reflejó la mayor ganancia de peso para los tres grupos de animales con una media de 215 gramos al día, siendo el grupo suplementado con 2,5 gramos de levadura el que obtuvo 257 gramos por día de peso, 242 gramos para el grupo suplementado con 5 gramos de levadura al día y 145 gramos para el grupo control, cuyos resultados no arrojan impacto alguno respecto al tratamiento que es nuestro campo de estudio, pero si a los diferentes periodos durante la alimentación ( $P<0.05$ ).

#### **Cuadro 4.5 Pesos de los corderos en kilogramos por periodos**

<i>Periodo</i>	<i>Levaduras (g/d)</i>					
	<i>Control</i>	<i>2.5 5</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. Est.</i>	<i>P</i>	
Día 1-15	34.06	34.65	34.37	34.36	3.83	0.222
Día 16-29	37.57	36.72	36.23	36.84	4.28	0.545
Día 30-43	39.60	40.31	39.61	39.84	3.68	0.609
Día 44-58	43.95	44.06	40.50	42.84	3.58	0.153

Los resultados en cuanto a rendimiento de la canal de los corderos suplementados con levadura SC se presentan en el cuadro 4.6, los cuales no se presentaron sobresalientes, ni tampoco se vieron afectados de acuerdo a los diferentes tratamientos ( $P>0.05$ ).

#### **Cuadro 4.6 Rendimiento de la canal de ovinos suplementados con dos niveles de levadura viva**

	<i>Levaduras (g/d)</i>				

<i>Parámetro</i>	<i>Control</i>	<i>2.5 5</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. Est.</i>	<i>P</i>	
Peso al sacrificio (kg)	43.95	44.06	40.50	42.83	3.57	0.153
Peso canal (kg)	22.1	22.1	20.75	21.65	2.490	0.321
Rendimiento de canal (%)	50.03	50.13	51.28	50.48	3.22	0.914

#### 4.4 DISCUSIÓN

La suplementación de levadura en dietas de corderos de engorda no tuvo ningún efecto significativo en los diferentes parámetros productivos y en el rendimiento de la canal. Simultáneamente, Giger-Reverdin *et al.* (1996), Kamra *et al.* (2002), Yang *et al.* (2004), Mahender *et al.* (2005) y Kawas *et al.* (2007) tampoco observaron ningún efecto de la alimentación con levadura adicionada en el consumo de MS, la digestibilidad de los nutrientes y el crecimiento. De igual manera otros autores no han encontrado ningún efecto de la suplementación de levaduras sobre el consumo voluntario (Chademana y Offer, 1990; Wohlt *et al.*, 1991; Erasmus *et al.*, 1992; Mruthunjaya *et al.*, 2003), ganancia de peso (Haddad y Goussous, 2005) eficiencia alimenticia (Mahender *et al.*, 2005. Kim *et al.*, 2006) y rendimiento de canal (Kawas *et al.*, 2007).

Contrariamente a esto, varios autores (Wiedmeier *et al.*, 1987; Newbold *et al.*, 1990; Newbold y Wallace, 1992; El-Ghani, 2004; Kamel *et al.*, 2004; Lesmeister *et al.*, 2004; Ando *et al.*, 2004; Erasmus *et al.*, 2005; Kritas *et al.*, 2006) han reportado un aumento en la ingesta de MS y los resultados de crecimiento. La respuesta respecto al consumo de MS con levadura suplementada es causada principalmente por la naturaleza de la dieta, particularmente sus diferentes contenidos de carbohidratos fácilmente fermentables (Chademana y Oferta, 1990). Beauchemin *et al.* (2003), reportaron que el efecto del cultivo de levadura en la alimentación depende de la cepa. Los autores mencionan que la falta de respuesta esperada a la suplementación con la levadura podría atribuirse al contenido de proteína cruda alta de la ración, característica común de las utilizadas en la producción comercial de animales de engorda. Además, los efectos del cultivo de levadura sobre la alimentación de los rumiantes son muy variables, ya que dependen de la cepa de levadura, la dosis, la naturaleza de la dieta y el estado fisiológico del animal (Newbold y Wallace, 1992; Wallace, 1994; Kawas *et al.*, 2007; Durand-Chaucheyras *et al.*, 2008), factores que pudieron influir en nuestros resultados, no obstante se

tendría que hacer una evaluación de dichos factores para encontrar las condiciones óptimas para obtener resultados positivos.

## CAPÍTULO 5

### **CONTROL POSITIVO DE LA LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*) SUPLEMENTADA**

## **5. CONTROL POSITIVO DE LA LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*) SUPLEMENTADA**

### **5.1 INTRODUCCIÓN**

Para poder visualizar la amplificación de los diferentes marcadores genéticos de la levadura SC, se debe de tener un control positivo que proporciona el patrón de la levadura y así poder identificar la levadura suplementada en lumen de tracto digestivo y tejido linfoide (placas de peyer). El método de basado en PCR has sido desarrollado para permitir ya sea la diferenciación intra especies y la identificación de aislados de levaduras (De Barros-Lopes *et al.*, 1998). Además se ha utilizado  $\delta$ -PCR para diferenciar probióticos y cepas ambientales de SC en alimentos animales (Büchl *et al.*, 2010). Por este motivo se realizaron dos experimentos, el primero para obtener el control positivo y el segundo para observar el patrón comparativo con levadura inoculada en contenido luminal y tejido linfoide del trato digestivo del grupo control (animales no suplementados con levadura).

### **5.2 Experimento 1**

Con el fin de obtener un control positivo para obtener un patrón de la levadura y así poder amplificar y visualizar los marcadores genéticos de la levadura.

#### **5.2.1 MATERIAL Y MÉTODOS**

##### **5.2.1.1 Enumeración de levadura suplementada (Conteo de levaduras)**

La enumeración de unidades formadoras de colonias (UFC) de la levadura suplementada se realizó para saber cuántas de ellas se suplementaron en cada tratamiento. Para esto, se utilizó una modificación del método oficial EU SMT-CT98-2235 (método oficial para el control de probióticos, comunicación personal, 2000), el cual se deSCribe a continuación.

### 5.2.1.2 Obtención de la UFC patrón de SC para la extracción de ADN

Para obtener la UFC patrón de SC para la extracción de ADN, se pesaron 0.5 g de levadura disolviéndola en 1000 µl de diluyente peptona (Cuadro 3), haciendo diluciones de  $10^{10}$ . Se sembraron las diluciones  $10^4$  y  $10^5$  en cajas de petri con medio de cultivo sólido YPD previamente preparado (Cuadro 5.1), las cuales se dejaron 48 horas en incubación a 37°C. Una vez crecidas las colonias se hizo el cálculo en la dilución  $10^5$ , la cual tuvo un número total de 146 colonias. El cálculo fue el siguiente:

$$146 \text{ colonias} \left[ \frac{1000 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l}} \right] \left[ 10 \right] \left[ \frac{1 \text{ g Levadura}}{0.5 \text{ g Levadura}} \right] = 146 \times 10^6 \text{ UFC/g}$$

Por lo tanto, se obtuvo como resultado que cada gramo de levadura tiene  $146 \times 10^6$  UFC.

Para la preparación del medio de cultivo YPD sólido para el crecimiento de SC se utilizó un fraSCo Duran con 200 ml de agua destilada, para el cual se utilizaron los componentes de SCritos en el Cuadro 5.1. Una vez preparada, se calentó la solución hasta el punto de ebullición para lograr una solución completa. De igual manera en otro fraSCo Duran se prepararon 100 ml obteniendo un medio de cultivo líquido. Una vez listos, se esterilizaron a 121°C por 15 minutos.

**Cuadro 5.1 Componentes para la preparación del Medio de Cultivo YPD**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para 200 ml</b>
Bacto-estrato de levadura <sup>1</sup> (g)	4
Peptona <sup>2</sup> (g)	8
Dextrosa <sup>3</sup> (g)	8
Agar <sup>4</sup> (g)	8
L-Triptófano <sup>5</sup> (g)	0.12
Agua destilada (ml)	200

<sup>1,2,4</sup> Bioxon, México

<sup>3</sup> J.T.Baker, México

<sup>5</sup> Sigma-Aldrich, Japón.

### 5.2.1.3 Obtención de la colonia de la levadura SC

Para el cultivo de levaduras se colocó el medio de cultivo antes preparado en un plato caliente para volverlo líquido sin que éste ebuliera. Se utilizaron 8 cajas de Petri desechables de 100 x 15 mm y un asa de vidrio de bastón los cuales fueron expuestos 30 minutos a rayos ultravioleta para asegurar su esterilidad. Se sembraron por duplicado 200 µl de levadura en cada caja de petri con 20 ml de medio de cultivo YPD. Se incubaron a una temperatura de 30°C durante 24 horas. Se tomaron para la dilución 100 mg de la levadura suplementada que fue diluida en 9.9 ml de buffer salino fosfato (PBS) (Cuadro 5.2).

**Cuadro 5.2 Componentes del Buffer Salino Fosfato con pH = 7.3 ± 0.2 (PBS) utilizado en las diluciones de la levadura**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Cloruro de Sodio <sup>1</sup> (g)	8
Cloruro de Potasio <sup>2</sup> (g)	0.2
Fosfato disodico hidrogenado <sup>3</sup> (g)	1.15
Fosfato de potasio dihidrogenado <sup>4</sup> (g)	0.2
Agua destilada (l)	1

<sup>1,2</sup> J.T.Baker, USA

<sup>3,4</sup> J.T.Baker, México

Diluciones de serie de diez fueron hechas con diluyente peptona cuyos (Cuadro 5.3) y se cultivaron en cajas de petri con agar YPD por duplicado.

**Cuadro 5.3 Componentes para la preparación del Diluyente Peptona**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para 20 ml</b>
Peptona <sup>1</sup> (g)	0.02
NaCl <sup>2</sup> (g)	0.17
Agua Destilada (ml)	20

<sup>1</sup>Bioxon, México

<sup>2</sup>J.T.Baker, USA

Hubo crecimiento en la caja 10<sup>3</sup> equivalente a 107 colonias y en la caja 10<sup>4</sup> con 3 colonias.

### **Cálculos**

Los cálculos para conocer el número de levaduras se describe a continuación:

Dilución  $10^3 = 1000$

Número de colonias en la caja  $10^3 = 107$

Número de levaduras en la caja  $10^3 = 107 \text{ UFC} \times 1000 = 107\,000 \text{ UFC}$  en  $10 \mu\text{l}$

#### 5.2.1.4 Obtención del pellet de la levadura de SC

Para obtener un pellet de la levadura SC, se empleó una modificación del método oficial (De Barros *et al.*, 1998) descrito a continuación:

Se aisló una colonia en un medio de cultivo aerobio, suspendiendo 1 g de levadura seca (Pellet) en 4 ml de agua destilada tomando después  $200 \mu\text{l}$  de la suspensión dispersándolos en los platos de cultivo con el medio YPD utilizando un asa de bastón. Éstas se crecieron a  $30^\circ\text{C}$  por 24 horas. Una vez que las colonias crecieron, se transfirieron a un nuevo plato con YPD, dejándolas crecer a  $30^\circ\text{C}$  por 24 horas. De éste último pase se transfirió una colonia inoculándola en un tubo Falcon con 15 ml de YPD dejándola incubar a  $30^\circ\text{C}$  por 48 horas en incubadora estática. Cada cultivo se hizo por duplicado.

#### Cálculos

En los tubos Falcon el pellet era de  $100 \mu\text{l}$

Cantidad de pellet =  $91.6 \mu\text{l}$

Número de células en Pellet =

$$91.6 \mu\text{l} \left( \frac{107,000 \text{ UFC}}{10 \mu\text{l}} \right) \left( \frac{8.9 \times 10 \text{ levaduras}}{1 \text{ UFC}} \right) = 87230,68 \times 10^2 \text{ levaduras}$$

Además se contaron las levaduras que hay en una colonia mediante una cámara de New Bauer:

Formula: 3,568 levaduras  $\times 1 \times 10^4 \times 1 \text{ ml} = 8,920,000$  levaduras en 1 UFC/ml

4 campos

#### 5.2.1.5 Técnicas moleculares

##### 5.2.1.5.1 Extracción de ADN de la levadura SC para control positivo

Para la extracción de ADN de la levadura obtenida de los pases que previamente se hicieron, puesto que ésta fungió como el control positivo, se empleó la técnica de extracción de ADN de levaduras de un protocolo modificado del Kit de extracción QIAGEN sin enzima Liasa ni Sorbitol. Se extrajo el ADN de 3 muestras por separado explícitas en el Cuadro 5.4.

**Cuadro 5.4 Muestras de colonias de la levadura *Saccharomyces cerevisie* para extracción de ADN.**

<i>Muestra</i>	<i>No. De Colonias</i>	<i>Característica física de la colonia</i>
a.	1	Intacta
b.	4	Intactas
c.	1	Congelada por 15 min y ebulida por 10 min (con choque térmico).

Cada una de las muestras fue suspendida en 180 µl de Buffer ATL (Tissue Lyser) y 20 µl de Proteinasa K, incubándolas 30 min a 56 °C en Termoblot. Al momento de sacarlas de colocaron en el vortex para homogeneizar y después se les puso 200 µl de AL (hidrocloruro de guanidina, Etanol), se colocaron en el vortex y 200 µl de Etanol absoluto (Etoh) colocándose en el vortex nuevamente para después tomar la mezcla con una pipeta y colocarla en una columna DN Easy Minipintube 2 ml. Se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm para después decantar el sobrenadante, desechar el tubo y transferir la columna a un tubo nuevo de 2 ml en donde se le adicionaron 200 µl de buffer AW1 (hidrocloruro de guanidina, Etanol) centrifugando 1 minuto a 8000 rpm (revoluciones por minuto) posteriormente. Se transfirió la columna a otro tubo nuevo de 2 ml adicionando 500 µl de buffer AW2 (ácido sódico, Etanol) para volverse a centrifugar 3 minutos a 14000 rpm. Por última vez se transfirió columna a un tubo nuevo de 2 ml y se le pusieron 200 µl de buffer AE (Tris-Cl, EDTA). Se incubó 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm y se colectó el ADN. Una vez obtenido el ADN, se analizó la pureza en un nanodrop (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA).

#### **5.2.1.5.2 Amplificación del ADN de la levadura SC en el control positivo mediante PCR**

Para la amplificación del ADN mediante PCR de la levadura se trabajó en un Termociclador Punto Final (Bio Rad C1000, Singapore), utilizando una modificación del protocolo de ciclado de Büchl *et al.*, (2010) deSCrito en el Cuadro 5.5.

**Cuadro 5.5 Protocolo de amplificación del ADN para identificar la levadura suplementada**

<b>Proceso</b>	<b>Número de Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización del ADN	1	95°C	2 minutos
Amplificación	4		
Desnaturalización		95°C	30 seg
Alineación de los primers		32°C	30 seg
Extensión		72°C	2 minutos
Amplificación	30		
Desnaturalización		95°C	30 seg
Alineación de los primers		35°C	30 seg
Extensión		72°C	2 minutos
Extensión final		72°C	10 minutos
		4°C	Hasta recoger

La mezcla de reacción se realizó con los componentes deSCritos en el cuadro 5.6 siguiendo el protocolo de reacción para un volumen total de PCR de 50 µl.

**Cuadro 5.6 Componentes para la mezcla de reacción para la amplificación por PCR**

<b>a)Componentes para el PCR mix: 46 µl</b>	<b>Volumen( µl)</b>
Master Mix	25
Oligo s (sentido)	2
Oligo as (antisentido)	2
H <sub>2</sub> O estéril	17
<b>b)cDNA</b>	4

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el PCR se describen en el cuadro 5.7.

**Cuadro 5.7 Oligonucleótidos utilizados para ampliar el ADN de la levadura SC y las muestras en la mezcla de reacción**

<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia de los Oligonucleótidos</b>	<b>Orientación</b>
Oligos, Forward: 7166	5'CAA AT CAC CTA CTA TTT CTC A3'	Sentido
Oligos, Reverse: 7167	5'GTG GAT TTT TAT TCC AAC A3'	Antisentido

(Ness *et al.*, 1993)

### **5.2.1.5.3 Visualización de la extracción del ADN y PCR del control positivo de la levadura SC en el control positivo**

Para visualizar el ADN y PCR se preparó un gel de Poliacrilamida al 10% diluyendo todos los reactivos (Cuadro 5.8), en búfer TAE (1X). Una vez lista la mezcla, ésta fue colocada en platos de cristal para geles de Poliacrilamida (BioRad, Germany) con su respectivo peine para formar los pocillos. Se dejó polimerizando de 30 a 40 minutos hasta que solidificara. El gel de Poliacrilamida al 10% listo se colocó en la cámara de electroforesis y se vertió TAE (1X) hasta cubrirlo completamente. Para cargar el ADN en el gel se prepararon 7 µl de muestra con 3 µl de búfer de carga, utilizando también 5 µl de marcador molecular (ESCalera) con 3 µl de búfer de carga en viales de 0.2 ml. Se depositó en cada pocillo el marcador molecular, una levadura comercial como control (BIOSAF), la levadura SC (Procreatin 7, P7), siguiendo con las muestras a evaluar. Se corrió en la cámara de electroforesis a 75 V por una hora. Posteriormente los geles fueron teñidos con Bromuro de etidio y se visualizó la presencia de bandas de amplificación en el fotodocumentador (Gel Doc XRSsystem, BioRad, Singapore) para su posterior evaluación.

**Cuadro 5.8 Componentes para geles de acrilamida al 10%**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para 10 ml (ml)</b>
TAE 1X <sup>1</sup>	3.8
30% Acrilamida mix <sup>2</sup>	3.4
1.5 M Tris pH 8.8 <sup>3</sup>	2.6
10% SDS <sup>4</sup>	0.1
10% Persulfato Amonio <sup>5</sup>	0.1
TEMED <sup>5</sup>	0.004

<sup>1</sup> 25 ml de TAE 40X y 975 ml de agua destilada = 1 L de TAE 1X

<sup>2</sup> 29.2 g de Acrilamida 100% pura y 0.8 g de Bisacrilamida pura en 100 ml de agua destilada.

<sup>3</sup> g (PM=121.14 g/mol) = MPML = (1.5 M)(121.14 g/mol)(0.1L) = 18.17 g en 100 ml de agua destilada

<sup>4</sup> 5 g de SDS en 50 ml de agua destilada

<sup>5</sup> 5 g de APS en 50 ml de agua destilada

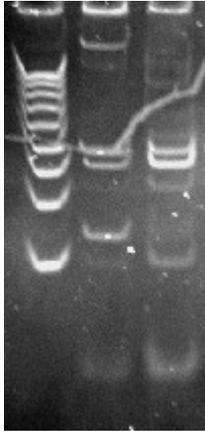
<sup>6</sup> Alicuotar 5 ml

## 5.2.2 RESULTADOS

En la figura 1 se muestra la eSCalera y el ADN de dos levaduras (Biosaf y P7), en la figura 2 se muestra la eSCalera y el patrón de la levadura (Biosaf y P7).



**Fig.1 ADN de levadura una cepa de levadura control (Biosaf) y la levadura suplementada (P7)**



**Fig.2 Amplificación de ADN de levadura control (Biosaf) y la levadura suplementada (P7)**

### **5.3 Experimento 2**

Con la finalidad de obtener un patrón comparativo utilizando contenido luminal y tejido linfoide (placas de peyer) de yeyuno e íleon del grupo control (animales no suplementados con levadura) inoculado con levadura *Saccharomyces cerevisiae* obtenida del control positivo para poder visualizar y comparar la existencia de la levadura en tracto digestivo y tejido linfoide de los animales suplementados.

#### **5.3.1 MATERIAL Y METODOS**

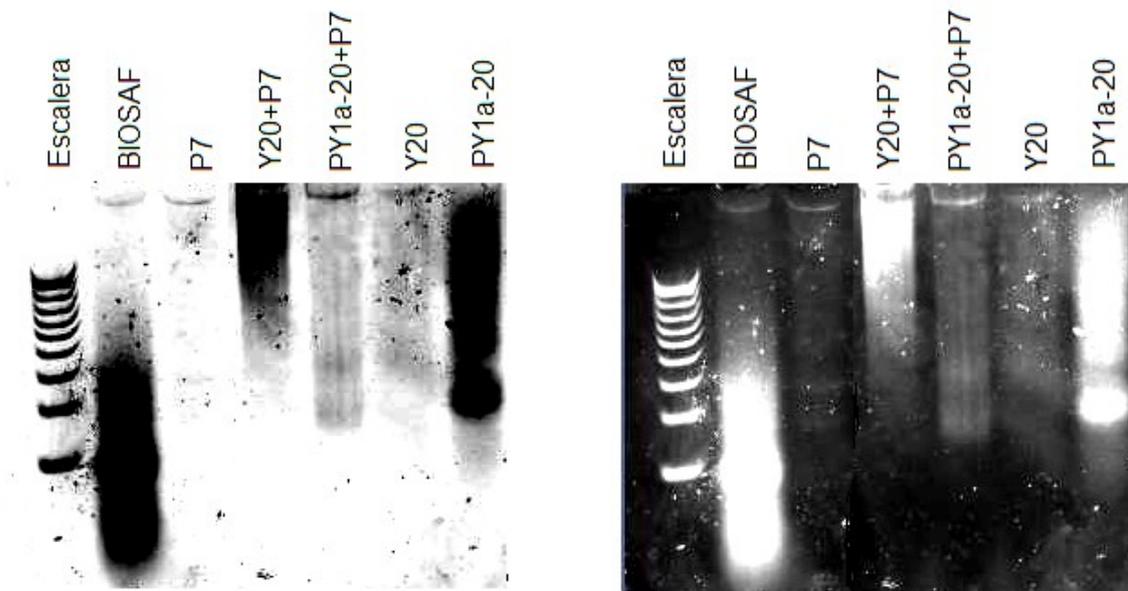
El control positivo de la levadura alicuotada fue adicionada a muestras líquidas de Yeyuno (muestra Y20) y sólidas de Placas de peyer de íleon (PY1a-20) de animales que no fueron suplementados con levadura (Grupo control). Se extrajo ADN utilizando el protocolo de SCrito en 5.2.1.2.1 en y se realizó una visualización por electroforesis vertical mediante geles de poliacrilamina al 10% con la finalidad de verificar la existencia de ADN en las muestras y poder seguir con los PCR.

#### **5.3.2 RESULTADOS**

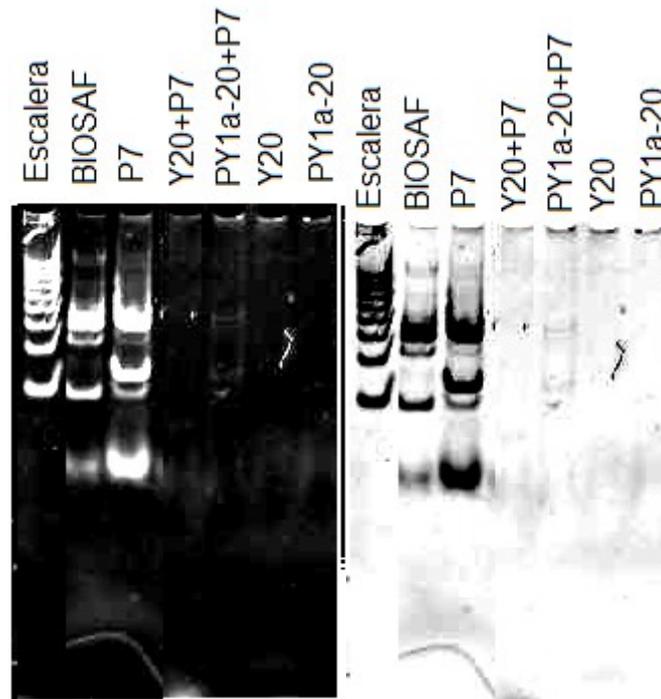
Como resultado de esto, en la Figura 3 se muestra la amplificación del ADN tanto sin y con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (P7) inoculada en líquido luminal de

yeyuno de un animal del grupo control (Y20+P7) así como de la Placa de Peyer (PY1a-20+P7), con la finalidad de corroborar la existencia de ADN en las muestras y continuar con el PCR. Se observó que el ADN no se había degradado durante el proceso de extracción para lo cual se continuó con el PCR.

En la Figura 4 se muestra la amplificación a partir de ADN de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* hecha por medio de la técnica de PCR deSCrita en las técnicas moleculares de material y métodos del experimento 1. Se visualizó un amplicón en la muestra de líquido luminal de yeyuno (Y20) y de la Placa de peyer del íleon (PY1a-20) inoculadas con la levadura (P7) de un animal del grupo control, mientras que para las muestras sin inoculación de la levadura no se observó ninguna señal de amplificación.



**Figura 3. Visualización de la existencia de ADN del control positivo del experimento por electroforesis vertical mediante geles de Poliacrilamina al 10%. P7) Procreatin 7, levadura *Saccharomyces cerevisiae*; Y20+P7) Contenido luminal de yeyuno de cordero control adicionado con levadura; PY1a-20+P7) Placa de peyer de íleon de cordero control adicionada con levadura; Y20) Contenido luminal de yeyuno de cordero control; PY1a-20) Placa de peyer de íleon de cordero control.**



**Figura 4. Visualización de la amplificación del ADN del control positivo del experimento mediante PCR por electroforesis vertical con geles de Poliacrilamina al 10%. P7) Procreatin 7, levadura *Saccharomyces cerevisiae*; Y20+P7) Contenido luminal de yeyuno de cordero control adicionado con levadura; PY1a-20+P7) Placa de peyer de íleon de cordero control adicionada con levadura; Y20) Contenido luminal de yeyuno de cordero control; PY1a-20) Placa de peyer de íleon de cordero control.**

### **5.3.3 DISCUSIÓN**

En base a nuestros resultados obtenidos, se puede establecer un sistema de identificación de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en el experimento basándonos en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con lo que se obtuvo el fragmento de ADN tanto de las levaduras control así como del control positivo sola y adicionada a las muestras de los corderos utilizados como grupo control. En estos experimentos se descartó la sensibilidad para evitarnos falsos negativos. En cuanto a los oligos utilizados se pudo apreciar la especificidad con la que se une al ADN, teniendo en cuenta que si los oligos tuvieran más de un sitio de unión se pueden amplificar más de un producto. De acuerdo a Büchl *et al.*, (2010), es posible que la cepa de SC utilizada en este experimento pueda diferenciarse con éxito aun

en el alimento, siendo el PCR y el PCR los métodos de referencia para llegar a las técnicas más rápidas y de bajo costo para la identificación de levaduras.

## CAPÍTULO 6

**IDENTIFICACIÓN LA CEPA DE *S. cerevisiae* SUPLEMENTADA EN  
DIFERENTES SECCIONES DEL TRACTO DIGESTIVO DEL RUMIANTE Y EN  
LAS PLACAS DE PEYER MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR.**

## **6. IDENTIFICACIÓN LA CEPA DE *S. cerevisiae* SUPLEMENTADA EN DIFERENTES SECCIONES DEL TRACTO DIGESTIVO DEL RUMIANTE Y EN LAS PLACAS DE PEYER MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR.**

### **6.1 INTRODUCCIÓN**

Después de obtener el control positivo y saber cómo debió de apreciarse la presencia de la levadura en las muestras de tracto digestivo, se prosiguió con la amplificación por PCR de muestras del rumen, yeyuno, ileon y placas de peyer de los tratamientos suplementados y testigo.

### **6.2 MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **6.2.1 Extracción de ADN de las muestras líquidas (líquido ruminal y contenido luminal de yeyuno e íleon).**

Se llevo a cabo la extracción de ADN de contenido luminal utilizando un QIAmp mini kit (QIAGEN Ltd., Crawley, West Sussex, RU). Se tomaron 0.5 ml de fluido ruminal o contenido luminal de yeyuno e íleon en un eppendorf de 1.5 ml, después se agregó 1ml de PBS (Anexo 1), se agitó y se dejó sedimentar. Se tomó 0.5 ml del sobrenadante sin detritos. Se agrego 0.5 ml de buffer ATL y se dejó calentando 10 min a 95 °C, se colocó en el vortex por 15 segundos para centrifugarse 1 minuto a 8000 rpm después. Se tomaron 200 µl de sobrenadante con una pipeta y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo en donde se le agregaron 15 µl de Proteinasa K., se colocó de nueva cuenta en el vortex por 15 segundos y se le agregaron 200 µl de buffer AL, se lleva al Vortex por 15 segundos y se incubó a 70 °C por 20 minutos. Al momento de sacarlo de la estufa donde se incubó, se le agregaron 200 µl de etanol y se colocó nuevamente en el Vortex. Se transfirió toda la mezcla a una columna DN Easy Minipintube 2 ml y se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de 2 ml y se le adicionaron 500 µl de buffer AW1 centrifugando 1 minuto a 8000 rpm posteriormente. Se transfirió la columna a otro tubo nuevo de 2 ml adicionando 500 µl de buffer AW2 para volverse a centrifugar 3 minutos a 14000 rpm. Por última vez se transfirió columna a un tubo nuevo de 2 ml y se le pusieron 100 µl de buffer AE. Se incubó 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm y se colectó el ADN. Una

vez obtenido el ADN, se analizó la pureza en un nanodrop (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA).

### **6.2.2 Extracción de ADN de las muestras sólidas (Placas de Peyer de Yeyuno e Íleon).**

Para la extracción de ADN de las placas de peyer, se lavó la muestra con PBS para macerarla después con un mortero y pistilo previamente esterilizados. Una vez bien macerado, se vertió el contenido en tubos eppendorf y se colocó en la centrifuga por un minuto a 2500 rpm para obtener un pellet. Se desechó el sobrenadante y se le agregó 180 µl de ATL y 20 µl de Proteinasa K, incubando la mezcla previamente homogeneizada con vortex por una hora a 56 °C en Termoblot agitando de manera intermitente cada 15 min. Al momento de sacarla, se colocó en el vortex nuevamente por 15 segundos y después se les puso 200 µl de AL, otra vez al vortex y se le añadió 200 µl de Etanol colocándose en el vortex una vez más para después tomar la mezcla con una pipeta y colocarla en una columna DN Easy Minipintube 2 ml. Se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm para después deSCartar el líquido, desechar el tubo y transferir la columna a un tubo nuevo de 2 ml en donde se le adicionaron µl de buffer AW1 centrifugando 1 minuto a 8000 rpm posteriormente. Se transfirió la columna a otro tubo nuevo de 2 ml adicionando 500 µl de buffer AW2 para volverse a centrifugar 3 minutos a 14000 rpm. Por última vez se transfirió columna a un tubo evo de 2 ml y se le pusieron 50 µl de buffer AE. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm y se colectó el ADN. Una vez obtenido el ADN, se analizó la pureza en un nanodrop (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA).

### **6.2.3 Amplificación del ADN de la levadura SC en líquido luminal y placas de peyer mediante PCR**

Para la amplificación del ADN mediante PCR de la levadura se trabajó en un Termociclador Punto Final (Bio Rad C1000, Singapore), utilizando una modificación del protocolo de ciclado de Büchl *et al* (2010) deSCrito en el cuadro 5.5. La reacción de amplificación fue de 50 µl (Cuadro 5.6), utilizando la secuencia de oligonucleótidos deSCritos en el cuadro 5.7.

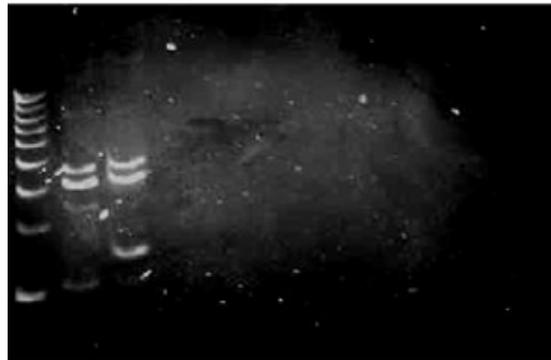
#### **6.2.4 Visualización de la extracción del ADN y PCR de la levadura SC, (como control positivo, en líquido luminal y placas de peyer)**

La visualización del ADN de las muestras se llevo a cabo por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 10% como se describe en el punto 5.2.1.5.3 de material y métodos del experimento 1 del capítulo 5.

### **6.3 RESULTADOS**

El patrón de la levadura suplementada no se observó en las muestras lumbales de yeyuno (fig 5 ) de íleon (fig 6), rumen (fig 7) y placas de peyer (fig 8) en todos los tratamientos.

A continuación se presentan los resultados de la amplificación del ADN mediante la técnica de PCR de cada tratamiento.



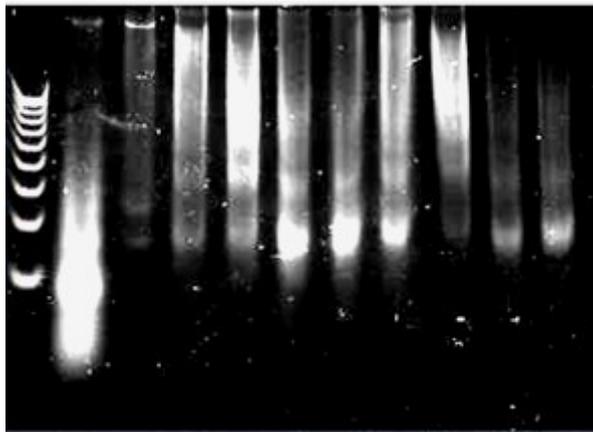
**Fig.5 Amplificación de ADN de levadura en contenido luminal de yeyuno mediante PCR utilizando geles de Poliacrilamida al 10%**



**Fig.6 Amplificación de ADN de levadura en contenido luminal de íleon mediante PCR utilizando geles de Poliacrilamida al 10%**



**Fig.7 Amplificación de ADN de levadura en contenido luminal del rumen mediante PCR utilizando geles de Poliacrilamida al 10%**



**Fig.8 Amplificación de ADN de contenido luminal del rumen mediante PCR utilizando geles de Poliacrilamida al 10%**

#### **6.4 DISCUSIÓN**

En cuanto a los resultados de las amplificaciones para observar el patrón de bandas para la levadura SC, no se observó nada respecto a la existencia de la levadura en líquido o tejido linfoide (Placas de peyer) del tracto digestivo de los corderos de engorda a los que se les suplementó. Es probable que algunas condiciones hayan intervenido en los resultados esperados tales como el uso de los oligonucleótidos empleados y seleccionados basándose en los recomendados en el protocolo de Ness *et al.*, (1993), pudieron no haber sido los correctos para nuestro bandeo, o

bien, la posibilidad de que la dosis de levadura suplementada no haya sido la adecuada o que la cantidad de células viables haya sido baja o en cantidades irregulares (Tripathi y Karim, 2011). Pudo interferir la viabilidad de las células ya que algunos autores (Fiems *et al.*, 1993; Durand-Chaucheyras *et al.*, 1998) dicen que ésta es de tan sólo unas horas o se manifiesta en sólo un porcentaje de la población. Otra posibilidad es que la levadura puede ser degradada en rumen y no pasar a intestino delgado o pasar en forma de proteína (Martin y Nisbet, 1992; Chademana y Offer, 1990; Wallace y Newbold, 1992; Newbold *et al.*, 1996; Dawson y Girad, 1997) y por eso no se pudo amplificar. Estas pueden ser algunos de los factores por lo cual no se pudo encontrar la levadura.

## CAPÍTULO 7

### **DISCUSIÓN GENERAL**

## 7. DISCUSIÓN GENERAL

La presente tesis examinó el efecto de la suplementación de la levadura SC en corderos de engorda sobre los parámetros productivos así como de la presencia de ésta en el líquido luminal y tejido linfóide (placas de peyer) de yeyuno e íleon.

Los resultados respecto a consumo diario y total de MS, ganancia diaria de peso, peso inicial, eficiencia alimenticia, peso final y rendimiento en canal, no registraron efectos estadísticamente significativos que hayan impactado sobre los parámetros productivos ( $P > 0.05$ ). Similarmente otros autores no encontraron diferencias o disminuyeron su efecto en los parámetros productivos con la no inclusión de levadura (Giger-Reverdin *et al.*, 1996; Agarwal *et al.*, 2002; Kamra *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Mahender *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006 y Kawas *et al.*, 2007).

El efecto de la levadura tiene que ver con la dosis de inclusión (Galip, 2006; Tripathi y Karim, 2011). En este experimento se utilizaron  $146 \times 10^6$  UFC/g, (8, 920,000 levaduras en 1 UFC), mientras que Galip (2006), evaluó dos dietas diferentes adicionando a cada una 4 g de levadura ( $20 \cdot 10^9$  UFC/día), para las cuales obtuvo resultados positivos con una cantidad mayor de levadura adicionada. Tripathi y Karim, (2011) utilizaron 60 corderos por un periodo de 91 días, cuyos cultivos de levadura contenían  $1.5-2.0 \times 10^9$  células por ml, alimentando a cada cordero con 1 ml por kilogramo de peso vivo, mejorando significativamente la ganancia diaria de peso, entre otros elementos evaluados, incluyendo efectos en fermentación ruminal. En este experimento en comparación con los otros dos autores ya descritos, solo se utilizó una dieta comercial con 12 corderos por un periodo de tiempo de suplementación de 58 a 64 días, suministrando 2.5 y 5 g de levadura por animal por día ( $365 \times 10^6$  UFC/día y  $730 \times 10^6$  UFC/día, respectivamente), lo cual hace una diferencia tanto en el periodo de administración, la cantidad de levadura o del número de células viables, e incluso la cantidad de animales que se utilizó como muestra de la población, lo cual pudo haber tenido un impacto en nuestro experimento, en donde se podrían hacer cambios para evaluarlos en un futuro análisis. Si bien la cantidad de levadura influye como lo describen algunos autores ya citados, El-Waziry and Ibrahim, (2007) suplementando 22.5 g/día-1 a un grupo de ovejas y 11.25 g/día-1 a otro, tampoco obtuvo efecto alguno respecto MS, FDN y

FDA. Es por eso que Tripathi y Karim, (2011), dejan claro que la cantidad de células viables varían mucho sobre la cantidad de levadura deshidratada suministrada.

Aunque los resultados no tuvieron un efecto positivo, han existido varios experimentos *in vitro* o *in vivo* que han obtenido y demostrado respuestas favorables en la digestión ruminal por alimentación de rumiantes con cultivos de levaduras estimulando el número de bacterias totales y celulolíticas (Newbold *et al.*, 1995), mejorando la degradación de la materia orgánica (Kamel *et al.*, 2004), la regulación del pH ruminal (Bach *et al.*, 2007), lo cual está relacionado con el incremento de la digestibilidad de la materia seca, por un incremento en la degradación ruminal (Paryad y Rashidi, 2009; Fadel, 2007; Tripathi y Karim, 2011; Birick y Yavuz, 2001; Enjalbert *et al.*, 1999; Erasmus *et al.*, 1992; Lynch y Martin, 2002; Miller-Webster *et al.*, 2002). Se sabe además del impacto en la microflora ruminal e intestinal (Haddad y Goussous, 2005), observando que la fermentación ruminal podía ser manipulada para controlar el paso de patógenos como *Listeria* al intestino de los rumiantes (Olvera-Ramirez, 2007).

Como algunos autores lo establecen, no han tenido efectos en los parámetros productivos pero han demostrado que si existe un efecto sobre la microbiota ruminal (Chadema y Offer, 1990; Martin y Nisbet, 1992; Newbold *et al.*, 1995 ; Dawson y Girad, 1997; Durand-Chaucheyras *et al.*, 1998; Agarwal *et al.*, 2002; Lila *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2004; Erasmus *et al.*, 2005; Mahender *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Fadel, 2007; Kawas *et al.*, 2007; Olvera-Ramírez, 2007; Paryad y Rashidi, 2009; Tripathi *et al.*, 2008; Tripathi y Karim, 2011).

Por otro lado, en esta investigación no se encontró la levadura en rumen, yeyuno, íleon y placas de peyer lo cual puede deberse a diferentes factores: 1) que la levadura no llegue a intestino delgado o llegue en forma de proteína (Martin y Nisbet, 1992; Wallace y Newbold, 1992; Jonvel, 1993; Dawson y Girad, 1997; Tripathi y Karim, 2011), o servir como fuente de vitaminas sobre todo de tiamina, vitamina capaz de estimular el crecimiento de ciertos hongos presentes en el rumen (Chaucheyras *et al.*, 1995). 2) que la dosis de la levadura suplementada no haya sido la suficiente por lo que las concentraciones de levadura eran tan pequeñas y no se pudo amplificar. 3) Que las células viables haya declinado rápidamente, así como lo describe Fiems *et al.* (1993), donde reportan que el número de células viables de

estos microorganismos declinó 30 horas después de finalizado el tratamiento en ovejas que recibieron levaduras suplementadas. Otros investigadores (Newbold *et al.*, 1995; Durand-Chaucheyras *et al.*, 1998; Fadel, 2007; Olvera-Ramírez, 2007; Paryad y Rashidi, 2009; Tripathi y Karim, 2011) utilizaron animales canulados con la opción de obtener líquido ruminal y duodenal con levadura viva con un periodo de tiempo más corto, trabajando las muestras inmediatamente. Durand-Chaucheyras *et al.* (1998), observaron que en corderos, entre 17 y 34% de las células de las levaduras permanecieron vivas durante su tránsito a través del tracto digestivo. Dado el caso de que como menciona éste último experimento, y algún porcentaje de la muestra haya logrado mantener la levadura viable por el tracto digestivo, en especial en las placas de peyer. 4) Por último puede existir la posibilidad de que los oligonucleótidos para la cepa empleada y utilizada en el protocolo de Ness *et al.*, (1993), quienes los designaron como adecuados para el bandedo de la levadura SC y en este experimento no fueran los indicados para amplificar la levadura suplementada en tracto digestivo. Por lo tanto sería indicado revisar otros oligonucleótidos para la amplificación de la levadura en tejidos del tracto digestivo tales como los reportados por White *et al.* (1990): NL1 (5'GCATTCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') y NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') para la región 26S y los oligonucleótidos ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') para a región ITS1-5.8S-ITS2.

Presentadas éstas posibles causas, sería factible analizarla y ejecutar el experimento con algunas modificaciones que puedan ayudarnos a saber realmente de que manera actúa la suministración de la levadura SC tanto a nivel producción como el papel que juega dentro del sistema inmune del aparato digestivo. Además, a falta de investigación de cuál es el mecanismo de acción de la levadura o el efecto que ésta tiene sobre el sistema inmune en pequeños rumiantes, termina siendo un amplio campo de investigación y sobre todo importante, ya que se sabe que de alguna manera la suplementación de levadura en la dieta mejora la productividad animal ayudando a la eliminación de antibióticos promotores de crecimiento (APC) (Morales, 2007; Russell y Rychlik, 2001), disminuye el número de bacterias patógenas que se eliminan con las heces (Castro y Rodríguez, 2005), es capaz de prevenir la proliferación de patógenos como *E. coli* y *L.monocytogenens* en fermentadores con líquido ruminal (Olvera-Ramírez, 2007), las cuales son bacterias

que tienen tropismo por placas de peyer las cuales juegan un papel muy importante en el sistema inmune del animal (Jensen *et al.*, 1998; Philips *et al.*, 2000; Vazquez-Torres y Fang, 2000) donde los manano-oligosacáridos (MOS) de la pared de la levadura pueden tener un buen papel en rumiantes, ya que se ha especulado que tienen un efecto en el sistema inmune, principalmente en placas de peyer (Swanson *et al.*, 2002; White *et al.*, 2002). Por lo tanto, mas investigaciones deben de llevarse a cabo para ver el efecto de la levadura SC sobre el sistema inmune de las mucosas intestinales, si se encuentran en placas de peyer, si pasa a intestino delgado o solo algunas partes de ellas como las paredes celulares de levadura (PCL), las cuales son fuentes ricas de polisacáridos naturales de tipo  $\beta$ -glucanos y manano-oligosacáridos (MOS), moléculas que cumplen funciones vitales en los procesos de comunicación a eSCala intestinal y del sistema inmunitario (Osborn y Khan, 2000; Kocher, 2005).

CAPÍTULO 8  
**CONCLUSIONES**

## 8. CONCLUSIONES

1. La inclusión de dos dosis de levadura viva (SC) siendo éstas de 2.5 y 5 g/animal/día, no tuvo efecto estadísticamente significativo sobre los parámetros productivos y rendimiento en canal en ovinos de engorda de raza blackbelly.
2. El control positivo de la levadura suplementada para su identificación por la técnica de PCR fue obtenida.
3. La levadura suplementada no fue identificada en la muestras del tracto digestivo (contenido luminal de yeyuno, íleon y rumen) y tejido linfoide (placas de peyer).

A falta de literatura respecto al mecanismo de acción de la levadura SC sobre el sistema inmune en pequeños rumiantes, seguirá siendo un amplio campo de investigación por lo que debido a los resultados obtenidos en este estudio, algunas recomendaciones para continuar evaluado este experimento serían: 1) Aumentar la dosis suministrada de levadura deshidratada tomando en cuenta que más que eso, se tiene que valorar lo mejor posible la cantidad de células viables en dicha dosis haciendo un experimento previo a la administración. 2) Evaluar diferentes oligonucleótidos utilizados para comparar el bandedo de la levadura SC en la amplificación. 3) Aunque se sabe que de alguna manera la suplementación de levadura en la dieta mejora la productividad animal ayudando a la eliminación de antibióticos promotores de crecimiento (APC), se tiene que demostrar si la levadura llega a intestino delgado, tomando en cuenta que es posible decline la cantidad en pocas horas (Fiems *et al.*, 1993) o la cantidad que logra pasar es solo un mínimo porcentaje (Durand-Chaucheyras *et al.*, 1998) o lleguen sólo algunas fracciones de ésta tales como las PCL u otras, y si éste fuera el caso, continuar investigando si son éstas las que tienen un efecto sobre el sistema inmune específicamente en placas de peyer (Osborn y Khan, 2000; Kocher, 2005).

## CAPÍTULO 9

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel G.,y Czop J.K. 1992.** Stimulation of human monocyte  $\beta$ -glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1. *Int. J. Inmunopharmacol.* 14: 1363-1373
- Acero, Ch. M. 2002.** Posicionamiento de la carne ovina en el mercado mundial. En: Memorial II Taller sobre Sistemas de Producción Ovina del Noroeste Y Golfo de México. Universidad Autónoma de Tamaulipas. 26 al 29 de noviembre de 2002. Cd Victoria, Tamaulipas. México. P 78-100.
- Agarwal, N.; Kamra, D. N.; Chaudhary, L. C.; Agarwal, I.; Sahoo, A.; Pathak, N. N., 2002** Microbial status and rumen microbial enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives. *Letters in Applied Microbiology* 34, 329–336.
- Aguilar-USCanga, B., and Francois, J.M. 2003.** A study of yeast cell wall composition and structure in response to grown conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiology.* 37: 268-274.
- Alzola, R. 2002.** Curso de Histología, Embriología y Teratología. Tejido hemocitopoyetico linfoide (Sistema Inmunitario). Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Ciencias Biológicas. Pp 2,3.
- Ando, S., Khan, R.I. and Takahasi, J. 2004.** Manipulation of rumen fermentation by yeast: The effects of dried beer yeast on the *in vitro* degradability of forages and methane production. *Asian-Australas. J. Anim. SCi.*, 17: 68-72.
- Arteaga, J.D.D. 2005.** Ovinos y Caprinos, ganadería del futuro. Situación de la Ovicultura en México. Asociación Mexicana de Criadores de Ovino. Disponible en: <http://www.cnog.com.mx/.../Juan%20de%20Dios%20Arteaga%20Castelan%20-%20Situacion%20de%20la%20Ovinocultura%20en%20M>. (Revisado el 10 de Septiembre del 2011).
- Arteaga, J.D.D. 2010.** Recursos y necesidades para la producción de carne de ovinos en México. Disponible en <http://spo.uno.org.mx/wp> (Revisado el 10 de Septiembre del 2011)

- Arteaga, J.D.D. 2012.** Situación, retos de la ovinocultura en México 2011. En Unión Nacional de Ovinocultores. Disponible en <http://situaciondelaproducciondelacarneenelsectorovinoenmexico2011.pdf> (Revisado el 4 de Septiembre del 2012)
- Auclair E. 2001.** Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminant species. *Feed Manufacturing in the Mediterranean Region. Reus, Spain: CIHEAM-IAMZ*, p.45–53.
- 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.
- Aziz, RK. 2009.** A hundred-year-old insight into the gut microbiome. *Gut Pathog. 2009 Dec 7; 1(1):21.*
- Bach, A.; Iglesias, C.; Devant, M., 2007.** Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Animal Feed Science and Technology 136*, 146–153.
- Beauchemin, K. A. Yang, W. Z., Morgavi, D. P.; Ghorbani, G. R.; Kautz, W. Leedle, J. A. Z., 2003.** Effects of bacterial direct fed microbial and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry and subclinical acidosis in feedlot cattle. *Journal of Animal Science 81*, 1628–1640.
- Bekaert, H., Moermans, R. y Eeckhout, W. 1996.** Influence d'une culture de levure vivante (Levucell SB2) dans un aliment pour porcelets sevrés sur les performances zootechniques et sur la fréquence des diarrhées. *Annales de Zootechnie. 45*: 369–376.
- Beharka, A.A., Nagaraja, T.G., and Morrill, J.L. 1991.** Performance and ruminal function development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *J. Dairy Sci.*, 74, 4326-36.
- Birick, H. and H.M. Yavuz, 2001.** Effects of SC yeast culture on milk production, milk composition and, some rumen and blood parameters of dairy cows. *J. Fac. Vet. Med.*, 20: 9-17.

- Blanco, M. 1999.** Bacterias Ruminales. Disponible en <http://www.agrarias.unlz.edu.ar/files/anatomia/bacterias%20ruminales.htm>  
(Revisado el 4 de Septiembre del 2012).
- Braathen R, Hohman V, Brandtzaeg P, Johansen F. 2007.** Secretory Antibody formation; Conserved Binding Interaction between J chain and polymeric Ig receptor from humans and amphibians. *J. Immunol* 178: 1589-1597.
- Brown G. D., y Gordon S. 2003.** Fungal  $\beta$ -glucanos and mammalian unmunuity. *Immunity*. 19: 311-315
- Brown G.D., Taylor P.R., Reid D.M., Willment J.A., Williams D.L., Maertinez-Pomares L., Wong S.Y.C., y Gordon S. 2002.** Dectin-1 is a major  $\beta$ -glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 296: 407-412.
- Brufau, J. 2000.** The European unión ban of Antibiotic performance enhancer in animal feeding and consequences: Potential alternatives. Page 93-106 in Selected Topic in Animal Nutrition, Biochemistry and Physiology, Winnipeg, Canada.
- Büchl N R, Hutzler M, Mietke-Hofmann H, Wenning M, and SCheree S. 2010.** Differentiation fo probiotic an environmental SC strain in animal feed. *Journal of applied microbiology* 109 (2010) 783-791. Germany.
- Buts, J.P. 2005.** Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. *Rev. Gastroenterol. Perú.* 25: 176-188
- Buts, J.P., BernaSConi, P., Van Craynest, M.P., Maldague, P. y Meyer, R. 1986.** Response of human and rats small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatr. Res.*, 20(2): 192-196.
- Buts, J.P., Keyser, N., y Reademaeker, L. 1994.** *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatr. Res.*, 36: 522-527.

- Callaway, E.S. and Martin, S.A. 1997.** Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *Journal of Dairy Science.*, 80, 2035.
- Castagliuolo L., Riegler M.F., Valenick L., Lamont J.T. 1999.** *Saccharomyces boulardii* protease mediates *Clostridium difficile* toxin A and B effects in human colonic mucosa. *Infect. Immun.*, 67:302-307
- Castillo, C.; Hernández, J.; Méndez, J.; García-partida, P.; Pereira, V.; Vázquez, P.; López-Alonso, M.; Benedito, J. L., 2006.** Effect of monensin and yeast supplementation on blood acid-base balance in finishing feedlot steers fed a high grain, high protein diet. *Animal Science* 82, 653–659.
- Castro, M. y Rodríguez, F. 2005.** Levaduras: Probióticos y prebióticos que mejoran la nutrición animal. *Revista Corpoica* Vol. 6. No. 1. Enero-Junio.
- Cebra JJ, Jiang HQ, Boiko N, Tlaskalova-Hogenova H. 2005.** The role of mucosal microbiota in the development, maintenance, and pathologies of the mucosal immune system. In: Mestecky J, Lamm ME, Strober W, editors. *Mucosal immunology*. 3rd ed. Burlington, MA : Elsevier; 2005. p. 335-368.
- Chademana, I. and N.W. Offer, 1990.** The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. *J. Anim. Prod.*, 50: 483.
- Chaucheyras F., Devegowda G. y Swamy H.V.L.N, 1995.** Effects of live SC cells on zoospore germination, growth and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MCH3. *Curr. Microbiol.* 31: 201-205
- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N.D., Bach, A., 2008.** Effect of dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 145, 5–26.
- Chang, M.H., Cheng, T.C. 2003.** Reduction of Broiler House Malodor by Direct Feeding of a Lactobacilli Containing Probiotic *International Journal of Poultry Science* 2 (5): 313-317.

- Chenoll E., B. Casinos, E. Bataller, P. Astals, J. Echevarria, J. R. Iglesias, P. Balbarie, D. Ramon, S. Genoves. 2010.** Novel Probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 Strain Active against the Pathogenic Bacterium *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010; 77 (4): 1335 DOI: [10.1128/AEM.01820-10](https://doi.org/10.1128/AEM.01820-10)  
Disponibile en: <http://www.biologia.com/2011/02/deSCubren-bacteria-probiotica-para-tratar-las-ulceras/> (Revisado el 24 de mayo del 2012).
- Church, C.D, 1988.** El Rumiante, Fisiología digestiva y nutrición. Edición en lengua española 1993. Editorial Acribia, S.A..
- Collins, M.D. y Gibson, G.R. 1999.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (suppl): 1052S–1057S.
- Comitini, F.; Ferretti, R.; Clementi, F.; Mannazzu, I.; Ciani, M., 2005.** Interactions between SC and *malonic* bacteria: preliminary characterisation of a yeast proteinaceous compounds active against *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology* 99, 105–111.
- Corthésy, B., y Spertini, F. 1999.** Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem* 380(11):1251-62.
- Corthier, G., Dubos, F. y Ducluzeau, R. 1986.** Prevention of *Clostridium difficile* mortality in gnotobiotic mice by *Saccharomyces boulardii*. *Can. J. Microbiol.*, 32: 894- 896.
- 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.
- Cuaron, I.J.A., Martínez, A.A.M.M., Zapata, L., Pradal, R.P., Velázquez, M.O. y Sierra, J. 1998.** Uso de levadura en la producción de cerdos. Segundo seminario *Microbiología aplicada a la Nutrición Animal.* México, D.F.
- Cunningham J.G. 2002.** *Textbook of Veterinary Physiology.* Third Edition. WB Saunders Company.

- Dawson K.A. y Girard I.D. 1997.** Biochemical and physiological basis stimulatory effects of yeast preparations on ruminal bacteria. In: Bacteriology in the Feed Industry, ed T.P. Lyons and K.A. Jacques, Nottingham University press, Nottingham, UK, Pp 293.
- De Barros M, Soden A, Martens A L, HenSchke P A, and Langridge P. 1998.** Differentiation and species identification of yeast using PCR. International Journal of Systematic Bacteriology 48, 279-286. Australia.
- De Rosen, G.D. 2005.** Halo-analysis of the effects of genetic, managemental, chronological and dietary variables on the efficacy of pronutrient mannanoligosaccharide in broiler. Br. Poult. Sci. Abstracts. 1:27-29.
- Dibner, J.J. y Richards, J.D. 2005.** Antibiotics growth promoters in agriculture: History and mode of action. Poult. Sci. 84:634-643
- Doyle, M.E. 2001.** Alternatives to Antibiotic Use for Growth Promotion in Animal Husbandry. Food Research Institute. Food Research Institute, FRI Briefings. University of Wisconsin. Madison, Wisconsin. April., pp: 1-17.
- Ducluzeau, R. y Bensaada, M. 1982.** Effets comparés de l'administration unique ou en continu de *Saccharomyces boulardii* sur l'établissement de diverses souches de Candida dans le tractus digestif de souris gnotoxéniques. Ann Microbiol., 133B : 491- 501.
- Durand-Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, G., Theveniot, M. y Gouet, P. 1998.** Fate of Levucell S C I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. *Reprod. Nutr. Dev.*, 38: 275-280.
- Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G. 2002.** Anatomía Veterinaria. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, México, Pp 747-754.
- El-Ghani, A. A. 2004.** Influence of diet supplementation with yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of Zaraibi goats. Small Ruminant Research 52, 223–229.

- El Hennawy, A.A., Tse Wong, C. y Kocoshis, S.A. 1994.** Failure of *Saccharomyces boulardii* to hydrolyse bile acid in vitro. *Microbios*, 80: 23-29.
- Elliot, D.A., Katcher, V.B. y Lowy, F.D. 1991.** A 220-kilodalton Glycoprotein in yeast extract inhibits *Staphylococcus aureus* adherence to human endothelial cells. *Infect. Immun.*, 59(6): 2222-2223.
- El-Waziry, A.M. and Ibrahim H.R. 2007.** Effect of SC of yeast on fiber digestion in sheep fed berseem (*Trifolium alexandrinum*) hay and cellulose activity. *Aust. J. Basic Applied Sci.*, 1: 379-385.
- Enjalbert, F., J.E. Garrett, R. Moncoulon, C. Bayourthe and P. Chicoteau, 1999.** Effects of yeast cultura (SC) on ruminal digestion in non-lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 76: 195-206.
- Erasmus, L. J.; Robinson, P. H.; Ahmadi, A.; Hinders, R.; Garrett, J. E. 2005.** Influence of pre-partum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 122, 219–239.
- Fadel, A.M.A. 2007.** Effects of Supplemental Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Culture on NDF Digestibility and Rumen Fermentation of Forage Sorghum Hay in Nubian Goat's Kids. *J. Agric. And Biol. Sci.*, 3: 133-137.
- Fairchild, A. S., Grimes J. L. Jones F.T., Wineland M. J., Edens F. W. y Sefton A. E. 2001.** Effects of hen age, Bio-Mos, and Flavocyn on poult susceptibility to oral *Escherichia coli* challenge. *Poult, Sci.* 80: 562-571.
- Ferket, P.R., C. W. Parks y J.L. Grimes. 2002.** Benefit of dietary antibiotic and mammalogosaccharides supplementation for poultry. 22 Pages. In: *Proc. Multi-State Poultry Feeding and Nutr. Conf.*, Indianapolis, Indiana USA. May 14-16. [http://etd.fda.edu/UF/UFE0004720/spearman k.pdf](http://etd.fda.edu/UF/UFE0004720/spearman%20k.pdf). (Revisado el Junio 14, 2011).
- Fiems, L.O., Cottyn, B.G., Dussert, L. y Vanacker, J.M. 1993.** Effect of a viable yeast culture on digestibility and rumen fermentation in sheep fed different types of diets. *Reprod. Nutr. Dev.*, 33: 43-49.

- Flores, N.M. 2000.** Elaboración de cultivos microbianos a partir de pasta de coco y sus utilización en dietas para borregos en engorda. Tesis de Maestría. Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias. Universidad de Colima, Colima, México. Pp. 40-43
- Folch-Mallol, J.L. Garay-Arroyo, A. Lledías, F. Covarrubias, A. A. 2004.** La respuesta a estrés en la levadura *SC*. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 46. No. 1-2. Morelos, Mexico. Pp 24-46
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006.** Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. ISSN 1014-2916. Roma, Italia. Pp 2-6
- Fox S. 1994.** Probióticos en la nutrición animal. Mundo Porcino- No 17 Ene-Feb 1994. 28-32p.
- Fuller, R. 1989.** Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365–378.
- García, M.E. 2004.** Respuesta productiva de bovinos productores de carne alimentados con raciones conteniendo cultivos de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. Pp. 29
- Gedek, B. 1989. Interaktion zwischen lebenden Hefezellen und darmpathogenen *EScherichia-colikeimen*. In: Okosystem Darm, Morphologie, Mikrobiologie, Immunologie, Müller, J., Ottenjann, R. and Seifert, J. (eds). Springer Verlag, pp: 135-139.
- Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. 1995.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125: 1401-1412.
- Giger-Reverdin, S., Sauvant, D., Tessier, J., Bertin, G., Morand-Fehr, P., 2004.** Effect of live yeast culture supplementation on rumen fermentation in lactating dairy goats. S. Afr. J. Anim. Sci. 34, 59–61.

- Gobierno del Municipio de El Marqués. 2011.** Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal. Enciclopedia de los Municipios de México. Disponible en URL: <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/queretaro/index> (Revisado el 15 de Agosto del 2011)
- Gómez, A.R., Llamas, L.L., y Shimada A. 1990.** Uso de cultivos de levaduras en alimentos para ruminantes. Anabólicos y aditivos en la producción pecuaria. Consultores en Producción animal S.C. México. Pp. 125-129
- Gómez, M. y Acero, F. 2011.** Composición y funciones de la Flora Bacteriana Intestinal. Bogotá D.C., Colombia. *Repert.med.cir.* 2011; 20(2): 74-82.
- Guarner F., Khan A., Garish J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Krabshuis J. y Le Mair T. 2008.** Probióticos y Prebióticos. World Gastroenterology Organization. Pp. 4.
- Haddad, S.G. and S.N. Goussous, 2005.** Effect of yeast culture supplementation on nutrient intake and Rumen Fermentation of Forage Sorghum Hay in Nubian Goat's Kids. *J. Agric. and Biol. Sci.*, 3: 133- 137.
- Halfhide, B. 2003.** Role of European probiotic association (EPA). Pages 3-4 in Roles of probiotics and their link to the demands of European consumers. 11 February 2003, ID-Lelistad report 03/0002713.
- Hathaway LJ, Kraehenbuhl JP. 2000.** The role of M cells in mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci* 2000 Feb; 57(2):323-32.
- Hernández P., Martín O., Rodríguez Y., y Ganem F. 1999.** Aplicaciones de las lecitinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 15: 91-5
- Hofraque, C.L., Bearcorn T., Collett S. y Mathis. 2003.** Using competitive exclusion Mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. *J. Appl. Poult. Res.* 12: 60-64.
- Hooge, D.M. 2004.** Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993-2003. *Int. J. Poult. Sci.* 3:163-174.

- Hungate, R.E. 1966.** The Rumen and Its Microbes. Academic Press, New York. Iverson, W.G., and Mills, N.F. 1976. Bacteriocins of *Streptococcus bovis*. Can. J. Microbiol. 22: 1040–1047.
- Jensen, P.J., Hangarter, R.P., and Estelle, M. 1998.** Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. Plant Physiol. 116, 455–462
- Jonsson, E. y Conway, P.L. 1992.** Probiotics for pigs. In R. Fuller (ed.), Probiotics. Chapman and Hall, London, United Kingdom., pp: 260–316.
- Jonvel, S. 1993.** Use of Yeast in monogastrics. Feed Mix. 1 4
- Jouany D., Yianninkouris A., y Bertin G. 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
- Jurgens, M.H., Rikabi, R.A. y Zimmerman, D.R. 1997.** The effect of dietary active dry yeast supplement on performance of sows during gestation-lactation and their pigs. Journal of Animal Science. 75: 593-597.
- Kamel, H.E.M., Sekine, J., El-Waziry, A.M., Yacout, M.H.M. 2004.** Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the synchronisation of organic matter and nitrogen degradation kinetics and microbial nitrogen synthesis in sheep fed Berseem hay (*Trifolium alexandrinum*). Small Rumin. Res. 52, 211–216.
- Kamra, D.N., Sawal, R.K., Pathak, N.N., Kewalramani, N., Agarwal, N., 1991.** Diurnal variation in ciliate protozoa in the rumen of black-buck (*Antelope cervicapra*) fed green forage. Lett. Appl. Microbiol. 13, 165–167.
- Kawas, J. R., García-Castillo, R., Garza-Cazares, F., Fimbres-Durazo, H., Olivares-Sáenz, E., Hernández-Vidal, G., Lu, C. D. 2007.** Effects of sodium bicarbonate and yeast on productive performance and carcass characteristics of light-weight lambs fed finishing diets. Small Ruminant Research 67, 157–163.

- Kim, H. S.; Ahn, B. S.; Chung, S. G.; Moon, Y. H.; Ha, J. K.; Seo, I. J.; Ahn, B. H.; Lee, S. S. 2006** Effect of yeast culture, fungal fermentation extract and nonionic surfactant on performance of Holstein cows during transition period. *Animal Feed Science and Technology* 126, 23–29.
- Klasing K.C., Laurin D.E., Peng R.K. Fry D.M. 1987.** Immunologically mediated growth depression in chicks: influence of feed intake, corticosterone and interleukin—1. *J. Nutr.* 117: 1629-1637.
- Kocher, A. 2005.** Glycomics-The new frontier in poultry nutrition. 17<sup>th</sup> Annual Australian Poultry Science Symposium. The Poultry Research Foundation U. Sidney, World's Poultry Science Association Australian Branch. 7-9 february, 2005. Pp 53-56.
- Kornegay, E. T., D. Rhein-Welker, M. D. Lindemann y C.M. Wood. 1995.** Performance and nutrient digestibility in weanling pigs as influenced by yeast culture additions to starter diets containing dried whey or one of two fiber sources. *J. Anim. Sci.* 73: 1381– 1389.
- Kozakiewicz Z. 1989.** *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Kritas, S. K., Govaris, A., Christodouloupolos, G., Burriel, A. R., 2006:** Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* supplementation of ewe's feed on sheep milk production and young lamb mortality. *Journal of Veterinary Medicine A* 53, 170–173.
- Lázaro C. 2005.** Efecto de probióticos en el alimento de marranas sobre los parámetros productivos de lechones. *Rev. investig. vet. Perú*, 16(2), pp.97-102. Disponible en:
- Lesmeister K. E, Heinrichs A.J., Gabler, M.T. 2004.** Effects of Supplemental Yeast (SC) Culture on Rumen Development, Growth Characteristics, and Blood Parameters in Neonatal Dairy Calves. *J. Dairy Sci.* 87:1832-1839.
- Lesson, S., y Summers, J.D. 2001.** Scott's Nutrition of the chicken. 4<sup>th</sup> edition. University Books. Guelph-Ontario, Canada.

- Lila, Z.A., Mohammed, N., Yasui, T., Kurokawa, Y., Kanda, S., y Itabashi H. 2004.** Effects of a twin strain of SC live cell on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *J. Anim. Sci* 82:1847-1854.
- Lilly DM., Stillwell H. 1965.** Probiotics. Growth promoting factors produced by micro organisms. *Science* 147:747-8
- Line, J.E., Bailey, J.S., Cox, N.S., Stern, N.J. y Tompkins, T. 1998.** Effect of yeast supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poultry Sci.* 77: 405-410.
- Lynch, H.A. y Martin S.A. 2002.** Effects of SC cultura and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Dairy Sci.*, 85: 2009-2014.
- Machado-Caetano J.A.,Paramés M.T., Babo M.J., Santos A., Bandeira-Ferreira A., Fretas A.A., Clemente-Coelho M.R., y Matthioli-Mateus A. 1986.** Immunopharmacological effects of *Saccharomyces boulardii* in healthy human volunteers. *Int. J. Immunopharmacol*, 8: 245-259.
- Mahender, M. Prasad, V. L. K. Reddy, G. V. N. 2005.** Effect of yeast culture based complete feed diets on the performance of lactating Murrah buffaloes. *Indian Journal of Animal Nutrition* 22, 173–176.
- Martin S.A. y Nisbet D. J. 1992.** Effect of direct-fed microbial on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75, 1736
- Martínez, A. 2000.** Ileitis, intestinal microflora and performance of growing finishing pigs fed *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of animal Science*, 78(1), p.1296.
- Massot, J., DeSCauclois, J. y Astoin, J. 1982.** Protection par *Saccharomyces boulardii* de la diarrhée à *E. coli* du souriceau. *Ann. Pharmaceutiques Françaises*, 40(5): 445-449.
- Mayer, L. 2000.** Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30 Suppl:54-12.

- Meléndez, J.R. y Alonso P.A. 2001.** Costo de producción en tres niveles de producción láctea en establos del altiplano mexicano. Dpto de Economía, administración y desarrollo rural. FMVZ-UNAM. México D.F.
- Miller-Webster, T., W.H. Hoover, M. Holt and J.E. Nocek, 2002.** Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.*, 85: 2009-2014.
- Miles, R. 1994.** Manipulación de la microflora del tracto gastrointestinal: Formas naturales de prevenir la colonización de patógenos. *Biotecnología en la industria de alimentación animal*. Vol. IV. Apligén. Ed. Setic. México. Pp. 80-92
- Mitterdorfer, G., Kneifel, W., y Viernstein, H. 2001.** Utilization of prebiotic carbohydrates by yeast of therapeutic relevance. *Letters in Applied Microbiology*. 33. pp: 251-255.
- Morales, R. 2007.** Las paredes celulares de Levadura *Sacchomyces cerevisiae*: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde. Barcelona, España. Junio 2007. Pp. 84-114.
- Mruthunjaya, H.S., M.M. Kailas and T. Thirumalesh. 2003.** Effect of supplementation of live yeast cultura on nutrient digestion and milk production in crossbred dairy activities in calves fed on SC supplemented Diet. *Ind. J. Anim. Sci.*, 72: 472-475.
- Ness F, Lavallé F, Dubourdiou D, Aigle M, Dulau L. 1993.** Identification of yeast strains using the Polymerase Chain Reaction. *J Sci Food Agric* 1993, 62, 89-94. Great Britain.
- Newbold, C. J., P.E.V. Williams, N. McKain, A. Walker, and R. J. Wallace. 1990.** The effects of yeast culture on yeast numbers and fermentation in the rumen of sheep. *Proc. Nutr. Soc.* 49: 47A (Abstr.)
- Newbold, C. J.; Wallace, R. J.; Chen, X. B.; McIntosh, F. M. 1995.** Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in-vitro and in sheep. *Canadian Journal of Animal Science* 73, 1811–1818.

- Newbold, C.J., R.J. Wallace and F.M. McIntoch. 1996.** Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants, British J. Nutrition. 46: 249-261
- Olvera- Ramírez, A.M., Newbold, C.J. y Hillmanb, K. 2002.** Levaduras en el rumen: nuevas prioridades y nuevas oportunidades. Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen AB21 9SB, UK and SCottish Agricultural College, AB9 1UD, UK . Presentado en el V Seminario Internacional de Microbiología Aplicada a la Nutrición Animal, Guadalajara, 2002
- Olvera-Ramírez, A.M. 2007.** Effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on pathogen survival and fermentation parameters in the rumen. Tesis de Doctorado. Universidad de Aberdeen, Aberdeen, ESCocia, Reino Unido. Pp.
- O'Quinn, P.R., Funderburke, D.W. y Tibetts, G.W. 2001.** Effects of dietary supplementation with mannan oligosaccharides on sow and litter erformance in a commercial production system. J. Anim. SCi. 79(Suppl. 1): 212 (Abstr).
- Oriol, E. 2004.** SAF-Mannan: Origen, Producción y Análisis. CD del VI Seminario Internacional De Microbiología aplicada a Nutricion animal. Lesaffre Feed Additives/Saf Agri. Nov. 4, Veracruz, México.
- Osborn, H.M.I. y Khan, T.H. 2000.** Oligosaccharides: Their Synthesis and Biological Roles, Oxford Chemistry Master, OUP, 2000.
- Ouwehand, A.C., Vaughan, E.E. 2006.** Gastrointestinal microbiology. New York : Informa Healthcare.
- Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J., and Gill, D.R. 1998.** Acidosis in cattle: A review J. Anim SCi. 76: 275–286.
- Oyofu, B.A., Deloach, J.R., Corrier, D.E., Norman, J.O., Ziprin, R.L. y Mollenhauer, H.H. 1989.** Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization with D-mannose. Poultry SCi., 68: 1357-1360.

- Pai, R. y Kang, G. 2008.** Microbes in the gut: A digestible account of host-symbiont interactions. *Indian J Med Res.* 2008 Nov;128(5):587-94
- Paryad, A. y Rashidi, M. 2009.** Effect of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on Apparent Digestibility and Nitrogen Retention of Tomato Pomace in Sheep. *Pakistan Journal of Nutrition* 8 (3): 273-278, 2009
- Park, J. y Floch, M.H. 2007.** Prebiotics, probiotics, and dietary fiber in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007 Mar; 36(1):47-63.
- Parker RB. 1974.** Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health.* 29:4-8.
- Patra, A.K. 2012.** The use of live yeast products as Microbial Feed Additives in Ruminant Nutrition. *Asian Journal of Animal and Veterinarian Advances* 7 (5): 366-375.
- Perry F.G., 1995.** Biotechnology in animal feed and feeding, an overview. Pages 1-15 in *Biothechnology in animal feeds and feeding.* R. J. Wallace and A. Chesson, eds. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim and New York.
- Pettigrew, J.E. 2000.** Mannaoligosaccharides effects on performance reviewed, *Feedstuffs*, 25: 12-14.
- Pfohl-Leszkowicz A. 2000.** Risques mycotoxicologiques pour la santé des animaux et de l'homme. *Cah. Nutr. Diét.* 35: 386-397
- Pier A.C., y Richard J.L. 1992.** Mycoses and mycotoxicoses of animals caused by *aspergilla*. *Biotechnol.* 23: 233-248
- Pierre, J. 2010.** Análisis del Mercado mundial de la carne de ovino. Informe Eurocarne No. 184. Warwickshire, Reino Unido, Marzo 2010. Pp 115-122
- Pillemer L., y Ecker E.E. 1941.** Anticomplementary factor in fresh yeast. *J. Biol. Chem.* 137: 139-142

- Porporatto C, Bianco ID, Correa SG. 2007.** La modulación del sistema inmune de mucosas con polisacáridos, bases para una atractiva alternativa en terapia. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 41(2):203– 211.
- Pothoulakis C., Kelly C.P., Joshi M.A., Gao N., O’Keane C.J., Castagliuolo I. y Lamont J.T. 1993.** *Saccharomyces boulardii* inhibit *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterol.* 104: 1108-1115.
- Qamar A., Aboudola S., Warny M. 2001** *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infect. Immun*, 69: 2762-2765.
- Regulation (EC) No 1831/2003. 2003.** On additives for use in animal nutrition, Official Journal of the European Union, [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). (Revisado en Julio del 2010).
- Relling A.E. y Mattioli G.A. 2003.** Fisiología digestiva y Metabólica de los Rumiantes. Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. Pp. 5-7, 23-25, 44-47.
- Rigothier, M.C., Maeconis, J. y Gapral, P. 1994.** Effets des levures *Saccharomyces boulardii* sur les trophozoites d’entamoeba histolytica in vitro et dans l’amibiase caecale du jeune rat. *Parasitol. Res.*, 80: 10-15.
- Ringot D., Lerzy B., Bonhoure J.P., Auclair E., Oriol E. y Larondelle Y. 2005.** Effects of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochem.* 40: 3008-3016
- Rioux KP, Madsen KL, Fedorak RN. 2005.** The role of enteric microflora in inflammatory bowel disease: human and animal studies with probiotics and prebiotics. *Gastroenterol Clin North Am.* 2005 Sep;34(3):465-82.
- Robbinson, P.H. 2010.** Yeast Products for Growing and Lactating Ruminants: A Literature Summary of Impacts on Rumen Fermentation and Performance. *Cooperative Extension Specialist Department of Animal Science University of California, Davis, CA.*

**Robertson, J.B. and P.J. Van Soest. 1981.** The detergent system of analysis and its application to human foods. The Analysis of dietary fiber in food. W.T. James O. Theander (Ed.) Markel Dekker, Inc. N.Y. United States of America.

**Rodrigues A.C.P., Nardi R.M., Bambira E.A., Viera E.C., y Nicoli J.R. 1996.** Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection whit *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* conventional and gnotobiotic mice. J Appl Bacteriol. 91: 251-256

**Rossi F., Di Luccia A., Vinceti D. y Cocconcelli S 2004.** Effects of peptidic fracions from SC cultura on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. Anim. Res. 53: 177-186.

**Russell, T.J., Kerley, M.S., Allee, G.L. y Howard, M.D. 1998.** Fructooligosaccharides improves nitrogen metabolism And reduces fecal excretion of odor metabolites In the weaned pig. Swine., pp: 79-83.

**Russell, J.B. y Mantovani, H. C. 2002.** The Bacteriocins of Ruminal Bacteria and Their Potential as an Alternative to Antibiotics. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (2002) 4(4): 347–355.

**Russell, J.B., y Rychlik, J.L. 2001.** Factors that alter rumen microbial ecology. Science 292: 1119–1122.

**SAGARPA. 2012.** Crece ovinocultura en México; buSCa incursionar en nuevos mercados. México D.F. 4 de Febrero del 2012. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2012B073.asp> x(Revisado 2 Septiembre del 2012)

**Salvi, S. y Holgate, ST. 1999.** Could the airway epithelium play an important role in mucosal immunoglobulin A production. Cin Exp Allergy 1999 Dec; 29(12):1597-605.

**Samudio y De León, 2002.** Algunos antecedentes ligados a la utilización de probióticos en equino. Disponible en URL:

<http://www.saf.agri.com/spanish/INFORTEC/guadalajara10.htm>. Revisado el 4 de Mayo del 2011.

**Sanders, M.E., Morelli, L. Y Tompkins, T.A. 2003** *CFSSFS* 2: 102-111.

**Santin E., Paulillo A.C., Mojorka A., Okada L.S.N., Macari M., FiScher da-S. A.V., y Alessi A.C. 2003.** Evaluation of the efficacy of SC cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *Int. J. Poult. SCi.* 2:341-344

**Savage, D.C. 2005.** Mucosal microbiota. In: Mestecky J, Lamm ME, Strober W, editors. *Mucosal immunology*. 3rd ed. Burlington, MA : Elsevier; 2005, p. 19-33.

**SChaller, G.B. 1977.** *Mountain Monarchs: wild sheep and goats of the Himalaya*. Univ. of Chicago Press, Chicago.

**SChrezenmeir, J., De Vrese, M. 2001.** Probiotics, prebiotics and symbiotics approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (suppl): 361s-364s..

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

**Soto-Díaz, L del C., Delgado-Estrella, M. y Cuéllar-Ordaz, A. 2007.** DeSCripción de algunos parámetros productivos de los rebaños ovinos empresariales en el occidente de México. En [www.corderosupremo.com/articuloparapublicar](http://www.corderosupremo.com/articuloparapublicar) (Consultado el 2 de Octubre del 2010).

**Spring, P., Wenk, C, Dawson, A.K., y Newman, E.K. 2000.** The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentration of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broilers chicks. *Poult. SCi.* 79: 205-211

**Stella, A. V.; Paratte, R.; Valnegri, L.; Cigalino, G.; Soncini, G.; Chevaux, E.; Dell’Otro, V.; Savoini, G. 2007.** Effect of administration of live SC on milk production, milk composition, blood metabolites and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Ruminant Research* 67, 7–13.

**Sun, X., McElroy A., Webb K.E., Sefton A. E. y Novak C. 2005.** Broiler Performance and intestinal alteration when Fed Drug-Free Diets. *Puolt. SCi.* 84: 1294-1302

- Tasteyre, A., Bare M.C., Karjalainen, T., Bourlioux, P. y Collignon, A. 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): 567-568
- Tizard, I.R. 2002.** *Inmunología Veterinaria*. Editorial McGraw-Hill Interamericana, 6ta. Edición, pp:152 – 153.
- Toothaker, R. D., y G.W. 1984.** Elmer. Prevention of Clindamycin-induced mortality in hamster by *Saccharomyces boulardii*, *Antimicrobial. Ag. Chemother.* 26: 552-556.
- Torres, H.G. 1997.** Estacionalidad reproductiva. Aspectos reproductivos. Producción de ovinos en zonas tropicales. Fundación Produce Tabasco A.C. INIFAP. Pp: 40-45.
- Tripathi, M.K., Karim, S.A., Chaturvedi, O.H., Verma, D.L., 2008.** Effect of different liquid yeast cultures of live yeast strains on performance, rumen fermentation and microbial protein synthesis in lambs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92, 631–639.
- Tripathi, M.K., Karim, S.A. 2011.** Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb. *Livestock Science* 135 (2011) 17–25
- Trujano, M., García, A. 2010.** Efecto de concentrado de levadura sobre desafíos patogénicos en cerdos. *Ceva Salud Animal. Lesaffre Feed Additives*. Disponible en <http://www.finagro.com.co/.../efecto%20de%20concentrado%20de%20levadura.pdf>
- Turner, J.L., Pas, S.S., Dritz y Minton, J.E. 2002.** Review: Alternatives to Antimicrobials in Swine Diets *The Professional Animal Scientist* 17: 217–226.
- Van Ginkel FW, Nguyen HH, McGhee JR. 2000.** Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2000 Mar Apr; 6(2):123-32.

- Van Heugten, E. y Spears, J.W. 1997.** Immune Response and Growth of Stressed Weanling Pigs Fed Diets Supplemented with Organic or Inorganic Forms of Chromium. *J. Anim Sci.* 1997. 75: 409–416
- 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, NI-6700 AE Wageningen, The Netherlands.
- Vidon, N., Huchet, B. y Rambaud, J.G. 1986.** Influence de *Saccharomyces boulardii* su
- Von Dungern, F. 1900.** Beiträge zur Immunitätslehre. *Muench. Med. WochenSchr.* 20: 677-680.
- Waldroup, P.W., Oviedo-Randon E.O. y Fritts C.A. 2003.** Comparison of BioMos® and Antibiotic feeding program in broiler diets containing copper sulphate. *Int. J. Poult. Sci.* 2: 28-31.
- Wallace, R. J. y Newbold, C.J. 1992.** Probiotic for ruminants. In *Probiotics: The Scientific Basis*, ed R. Fuller, Chapman and Hall, London, Pp 317.
- Wallace, R.J., Falconer, M.L. and Bhargava, P.K. 1989.** Toxicity of volatile fatty acids at rumen pH prevents enrichment of *EScherichia coli* by sorbitol in rumen contents. *Current Microbiology*, 19, 277.
- Wiedmeier, R.D., M.J. Arambel and J.L. Walters. 1987.** Effects of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestion. *J. Dairy Sci.*, 70: 2063-2068.
- Williams, P. E. V.; Newbold, C. J., 1990.** Rumen probiosis: the effects of novel micro-organisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In: W. Haresign, D. J. A. Cole (eds), *Recent Advances in Animal Nutrition*. Butter-worth, London, p. 211.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes form phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to*

methods and applications M. A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Eds.), Academic Press, London UK. Pp 315-322.

**White, L.A., Newman, M.C., Cromwell, G.L. y Lindemann, M.D. 2002.** Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *Journal of Animal Science* 80, 2619.

**Witte, W. 1996.** Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in human. Pages 61-70 in proceeding of: Antibiotic reistance: origin, evolution, selection and spread. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 207), July 16-18, London

**Wohlt, J.E., Finkelstein, A.D. y Chung, C.H. 1991.** Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility and performance by dairy cattle during early lactation. *J. Dairy Sci.* 74: 1395-1407.

**Wolin, M.J. 1969.** Volatile fatty acids and the inhibition of *ESCherichia coli* growth by rumen fluid. *Applied Microbiology* 17, 83

**Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., Vedres, D.D., Ghorbani, G.R., Colombatto, D., Morgavi, D.P., 2004.** Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 114, 179–193.

**Yianninkouris, A., Cameleyre, X., Francois, J., Poughon L., Dussap, C.G., Bertin, G., y Jouany, J.P. 2003.** A novel technique to evaluate interactions between SC cell wall and mycotoxins: application to zearatenone. *Biotechnol. Lett.* 25: 783-789

**Yianninkouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap C.G., Bertin, G., Jeminet, G., y Jouany, J.P. 2004.** Adsorption of zearalenone by  $\beta$ -D-glucans in the SC cell wall. *J. Food Prot.* 67: 1195-1200.

**Zaldívar, M. 2002.** El Sistema inmunológico de las mucosas. *Rev Cubana Med Gen Integr* 5: 24-36.

**Zdunczyk, Z., Juskiewicz J. Jankowski J. Biedrzycka E. y Koncicki A. 2005.** Metabolic response of the gastrointestinal tract of turkey to diets with different levels of mannan-oligosaccharides. *Poult. Sci.* 84: 903-909.

**Zhang, A.W., Lee B.D., Lee, S.K., Lee, K.W., An, G.H., Song, K.B., Lee, C.H. 2005.** Effects of yeast SC cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broilers chicks. *Poult. Sci.* 84:1015-1021