

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE IgA SECRETORA
EN LA MUCOSA, A DIFERENTES ESTADIOS Y
REGIONES DE TRACTO GASTROINTESTINAL”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN
MAESTRA EN QUÍMICA CLÍNICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA
QFB. DELIA SOFÍA CAROLINA CUEVAS GONZÁLEZ**

**DIRIGIDO POR:
M. EN C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE**

QUERÉTARO, QRO. A ENERO DEL 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Evaluación de los niveles de IgA secretora en la
mucosa, a diferentes estadios y regiones del tracto
gastrointestinal

por

Delia Sofía Carolina Cuevas González

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQMAC-309164



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

“Evaluación de los niveles de IgA secretora en la mucosa, a diferentes estadios y regiones del tracto gastrointestinal”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Química Clínica

Presenta

QFB Delia Sofía Carolina Cuevas González

Dirigido por:

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote
Presidente

Firma

Dra. Karla Isabel Lira de León
Secretario

Firma

M. en I.M. David Gustavo García Gutiérrez
Vocal

Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Suplente

Firma

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Suplente

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Enero 2024

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) y a los docentes de la Maestría en Química Clínica Diagnóstica por su apoyo durante mi formación académica, siendo excelentes profesores que me permitieron adquirir nuevos conocimientos y reforzar los que ya tengo.

A mi directora de tesis, la M. en C. Alma Delia por estar al pendiente de las cosas que necesitaba, por orientarme dándome la mejor asesoría y sobretodo tener mucha paciencia conmigo. Gracias por hacerme creer que puedo hacer las cosas bien y poner mi salud primero.

De mi comité sinodal, agradezco mucho a la Dra. Karla por otorgarme tanto material, así como sus valiosos consejos para ser una mejor persona y dar lo mejor de mí en la maestría. Al M. en IM. David por su apoyo con material para mi proyecto y por darme sus puntos de vista para enriquecer el trabajo de investigación. A la Dra. Angelina, quien me proporcionó reactivos necesarios para el proyecto dejando en claro que está al pendiente de mí, siendo su retroalimentación muy valiosa y enriquecedora. A la Dra. Iza por sus críticas constructivas en los tutorales para mejorar la calidad de mi trabajo. Agradezco la motivación y paciencia que tuvieron conmigo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por otorgar la beca económica CVU 1143728 permitiéndome continuar con mis estudios de maestría.

DEDICATORA

Dedico la tesis y mis logros a mi familia. A mi mamá Delia Patricia, por su gran amor incondicional, inspirándome a ser una persona que logre lo que se proponga y a terminar las cosas que empecé por muy difíciles que sean. Gracias por apoyarme en todos los aspectos y espero algún día devolverte todo el sacrificio que has realizado por mi bien. A mi papá Mario Alberto, por aconsejarme con base a sus experiencias de vida, dándome un panorama distinto que me ayude a ver más allá de las cosas y demostrando que la distancia no es problema cuando se ama. A mi hermano Mario, que está siempre apoyándome, que me escucha y me protege de todo lo que me hace daño. Eres un ejemplo a seguir y espero un día ser alguien tan exitoso y bueno como tú. A mis abuelitas Delia Rosa y Adela por pedir mi bienestar en sus oraciones y siempre darme mucho cariño cuando más lo necesito. A mis abuelos Pedro Ángel y Mariano, que viven en mi corazón y nunca los voy a olvidar, están cuidándome desde el cielo. A mis medios hermanos, tíos y primos que me quieren y se preocuparon por mí en todo momento durante mi estadía en Querétaro.

A Gabriel, con quien compartí grandes aventuras y me acompañó en muchísimos momentos de la vida, tanto los buenos como los malos. Espero que seas muy feliz y que te realices en todos los aspectos.

A mi amiga Lidia, que desde la distancia seguía viendo por mi bienestar y me daba fuerza para terminar lo que comencé. Eres un ejemplo a seguir.

A mis amigos de maestría Dany, Laura, Rosa, Francisco y Josué por ser personas maravillosas y únicas, brindándome momentos divertidos cuando la maestría se volvía más compleja. Agradezco haber cruzado camino con ellos y espero que sean felices y exitosos en su vida. Fuimos una generación muy unida.

INDICE

INDICE.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUCCIÓN.....	12
2 ANTECEDENTES.....	14
2.1 Sistema gastrointestinal.....	14
2.2 El proceso digestivo.....	14
2.3 Estructura general del tubo digestivo.....	17
2.4 Mucosa del intestino.....	18
2.4.1 Las mucinas.....	19
2.5 Sistema inmunológico del tracto gastrointestinal.....	19
2.6 Inmunidad innata.....	21
2.7 Inmunidad adaptativa.....	22
2.8 Inmunoglobulinas.....	22
2.8.1 IgA.....	24
2.8.1.1 Subclases de IgA.....	25
2.9 IgA en el tracto gastrointestinal.....	26
2.10 IgA en otras secreciones.....	28
2.11 Enfermedades relacionadas a alteraciones de IgA.....	30
2.11.1 Inmunodeficiencia común variable.....	30
2.11.2 Enfermedad de Crohn.....	30

2.11.3	Nefropatía por IgA.....	31
2.12	Modelo biológico aviar.....	32
2.13	Sistema digestivo del modelo aviar <i>Gallus gallus</i>	33
2.14	Similitud en el genoma de humano y aves.....	34
2.15	Sistema inmune del tracto gastrointestinal de las aves.....	35
2.16	Separación de proteínas.....	36
2.17	Inmunoensayos.....	37
2.18	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.....	38
2.18.1	Tipos de ELISA.....	39
2.18.1.1	ELISA directo.....	39
2.18.1.2	ELISA indirecto.....	39
2.18.1.3	ELISA competitivo.....	40
2.18.1.4	ELISA sándwich.....	40
3	OBJETIVOS.....	42
3.1	General.....	42
3.2	Particulares.....	42
3.3	Objetivos profesionales.....	42
4	METODOLOGÍA.....	43
4.1	Diseño.....	43
4.1.1	Definición del Universo.....	43
4.2	Tamaño de muestra.....	43
4.2.1	Definición de las unidades de observación.....	43
4.2.2	Grupo control.....	44
4.2.3	Criterios de inclusión.....	44
4.2.4	Criterios de exclusión.....	44

4.2.5	Criterios de eliminación	44
4.2.6	Definición de variables y unidades de medida	44
4.2.7	Animales	45
4.3	Establecimiento de un método de separación y cuantificación de proteínas totales de la mucosa intestinal de <i>G. gallus</i>	46
4.3.1	Muestras	46
4.3.2	Disposición de residuos	46
4.4	Separación de proteínas.....	47
4.4.1	Cuantificación de proteínas totales	47
4.5	Cuantificación de las concentraciones de IgA secretora en la mucosa intestinal de <i>G. gallus</i> a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	48
4.5.1	Cuantificación de IgA secretora por el método de ELISA	48
4.6	Análisis del comportamiento de los niveles de IgA secretora de la mucosa en diferentes regiones del tracto gastrointestinal y etapas del desarrollo del modelo aviar <i>G. gallus</i>	50
4.6.1	Análisis estadístico.....	51
4.7	Diseño experimental	52
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
5.1	Establecimiento de condiciones de separación y cuantificación de proteínas totales en mucosa del tracto intestinal de <i>G. gallus</i>	53
5.1.1	Evaluación de proteínas totales en la mucosa con base en el uso del inhibidor de proteasas y el tiempo de almacenamiento.....	60
5.1.2	Cuantificación de proteínas totales de las muestras de estudio.....	63
5.2	Cuantificación de las concentraciones de IgA secretora en la mucosa intestinal de <i>G. gallus</i> a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	

(ELISA).....	74
5.2.1 Cuantificación de IgA secretora por prueba de ELISA	74
5.3 Análisis del comportamiento de los niveles de IgA secretora de la mucosa en diferentes regiones del tracto gastrointestinal y etapas del desarrollo del modelo aviar <i>G. gallus</i>	84
6 CONCLUSIONES.....	89
7 REFERENCIAS.....	90
8 ANEXOS	110
8.1 Dictamen de bioética	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras a recolectar por día de estudio	43
Tabla 2. Definición de unidades de observación	44
Tabla 3. Características de la variable.....	45
Tabla 4. Concentraciones de estándar para proteínas totales.....	48
Tabla 5. Concentraciones de estándar de IgA.....	50
Tabla 6. Condiciones de separación encontradas en la bibliografía.....	55
Tabla 7. Concentración de proteínas totales bajo condiciones evaluadas en ensayos preliminares.....	57
Tabla 8. Concentración de proteínas totales de duodeno, yeyuno e íleon en diferentes condiciones evaluadas.....	59
Tabla 9. Cuantificación de proteínas totales en duodeno, yeyuno e íleon a diferentes días de almacenamiento con el uso de inhibidor de proteasas	62
Tabla 10. Cuantificación de proteínas totales en duodeno respecto a la edad	66
Tabla 11. Cuantificación de proteínas totales en yeyuno respecto a la edad.....	67
Tabla 12. Cuantificación de proteínas totales en íleon respecto a la edad.....	68
Tabla 13. Cuantificación de proteínas totales en ciego respecto a la edad.....	69
Tabla 14. Cuantificación de IgA secretora de duodeno respecto a la edad.....	76
Tabla 15. Cuantificación de IgA secretora de yeyuno respecto a la edad.....	77
Tabla 16. Cuantificación de IgA secretora de íleon respecto a la edad.....	78
Tabla 17. Cuantificación de IgA secretora de ciego respecto a la edad.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del sistema digestivo.....	15
Figura 2. Capas de la mucosa del intestino delgado	18
Figura 3. Estructura del GALT.....	21
Figura 4. Forma dimérica y monomérica de IgA.....	25
Figura 5. Subclases de IgA.....	27
Figura 6. Esquema de transcitosis epitelial.....	28
Figura 7. Descripción del tracto gastrointestinal del ave.....	33
Figura 8. Esquema general de los tipos de ELISA	39
Figura 9. Diagrama de separación de proteínas.....	47
Figura 10. Diseño experimental.....	52
Figura 11. Concentración de proteínas totales por sección a diferentes condiciones	60
Figura 12. Proteínas totales de duodeno, yeyuno e íleon usando inhibidor de proteasas y tiempo de almacenamiento	63
Figura 13. Análisis de proteínas totales de duodeno respecto a la edad ...	67
Figura 14. Análisis de proteínas totales de yeyuno respecto a la edad	68
Figura 15. Análisis de proteínas totales de íleon respecto a la edad	69
Figura 16. Análisis de proteínas totales de ciego respecto a la edad	70
Figura 17. Análisis de proteínas totales por sección a los 7 días.....	71
Figura 18. Análisis de proteínas totales por sección a los 14 días	72
Figura 19. Análisis de proteínas totales por sección a los 35 días	73
Figura 20. Niveles de IgA secretora en duodeno con base en la edad.....	77
Figura 21. Niveles de IgA secretora en yeyuno con base en la edad.....	78
Figura 22. Niveles de IgA secretora en íleon con base en la edad.....	79
Figura 23. Niveles de IgA secretora en ciego con base en la edad.....	80
Figura 24. Análisis de los niveles de IgA de cada sección a los 7 días.....	81
Figura 25. Análisis de los niveles de IgA de cada sección a los 14 días.....	82
Figura 26. Análisis de los niveles de IgA de cada sección a los 35 días.....	83

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
ci	Con inhibidor
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FAE	Folículo asociado al epitelio
Fc	Fragmento cristalizable
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
IDCV	Inmunodeficiencia común variable
IEL	Linfocitos del entramado epitelial
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina A
IgA1	Inmunoglobulina A subclase 1
IgA2	Inmunoglobulina A subclase 2
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgG1	Inmunoglobulina G subclase 1
IgG2	Inmunoglobulina G subclase 2

IgG3	Inmunoglobulina G subclase 3
IgG4	Inmunoglobulina G subclase 4
IgM	Inmunoglobulina M
Igs	Inmunoglobulinas
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-7	Interleucina 7
IL-26	Interleucina 23
LPL	Linfocitos de la lámina propia
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
NK	Natural killer
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
pIgR	Receptor de inmunoglobulina polimérica
rpm	Revoluciones por minuto
RRP	Receptores de reconocimiento de patrón
SI	Sistema inmune
si	Sin inhibidor
TMB	3,3',5,5'-tetrametilencidina
VSG	Velocidad de sedimentación globular

RESUMEN

El sistema inmune (SI) intestinal experimenta un continuo desarrollo para adaptarse a medida que el individuo crece y se expone a nuevos retos. Despliega mecanismos complejos que limitan el paso de lo que daña al organismo incluyendo barreras protectoras, estirpes celulares, enzimas y microorganismos comensales que colonizan el tracto intestinal. La IgA juega un rol importante en la protección del huésped, delimitando el contacto de los agentes patógenos y favoreciendo su eliminación. Esta se encuentra en las superficies mucosas y en secreciones como la leche materna y la saliva. La deficiencia de IgA provoca susceptibilidad al desarrollo de afecciones del tracto respiratorio y gastrointestinal, por ello se han intensificado los estudios acerca de IgA en órganos asociados a estos tractos. Sin embargo, debido a que la obtención de biopsias intestinales de pacientes es un proceso invasivo, los modelos biológicos como *Gallus gallus* ofrecen una alternativa en la aproximación de estudiar los mecanismos que desencadenan enfermedades al humano. Estas aves comparten similitudes anatómicas y funcionales en el tracto gastrointestinal con los humanos y al ser expuestas a interacciones con el entorno durante su crecimiento, proporcionan información para comprender la adaptación del SI. Con base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar la evaluación de las concentraciones de IgA secretora en el tracto gastrointestinal de *G. gallus* a diferentes etapas de su desarrollo, para conocer su nivel de secreción de acuerdo a la edad y maduración del SI. Para ello, se establecieron 20 mg de mucosa con inhibidor de proteasas a una centrifugación de 5000 rpm, por 20 min a 4 °C y un homogenizado de 2 min como las condiciones idóneas para separar las proteínas de mucosa de duodeno, yeyuno, íleon y ciegos del estudio. Se cuantificaron las proteínas totales a partir de los sobrenadantes por método de Bradford, mostrando una tendencia en aumento conforme a la edad y destacando mayor concentración en duodeno, seguido yeyuno, íleon y por último los ciegos. Finalmente se observaron diferencias significativas en las concentraciones de IgA en el íleon en comparación con las demás zonas evaluadas en aves de 7 días. Aunque duodeno, yeyuno e íleon de los días 14 y 35 mostraron valores similares no significativos, se observó una tendencia de aumento de la concentración en dirección al ciego, destacando esta zona con mayor concentración de IgA en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína con respecto a las etapas en el desarrollo evaluadas. Estos hallazgos destacan la importancia de la interacción SI - microorganismos, permitiendo evaluaciones futuras de esta respuesta frente a la presencia de patógenos intestinales.

Palabras clave: IgA secretora, tracto gastrointestinal, ELISA.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Delia Sofia Cuevas glz

ABSTRACT

The intestinal immune system (IS) undergoes continuous development to adapt as the individual grows and is exposed to new challenges. It deploys complex mechanisms that limit the passage of what damages the organism, including protective barriers, cell lines, enzymes and commensal microorganisms that colonize the intestinal tract. IgA plays an important role in protecting the host, delimiting the contact of pathogens and promoting their elimination. This is found on mucosal surfaces and in secretions such as breast milk and saliva. IgA deficiency causes susceptibility to the development of respiratory and gastrointestinal tract conditions, which is why studies on IgA in organs associated with these tracts have intensified. However, because obtaining intestinal biopsies from patients is an invasive process, biological models such as *Gallus gallus* offer an alternative approach to studying the mechanisms that trigger diseases in humans. These birds share anatomical and functional similarities in the gastrointestinal tract with humans and when exposed to interactions with the environment during their growth, they provide information to understand SI adaptation. Based on the above, the objective of this project was to evaluate the concentrations of secretory IgA in the gastrointestinal tract of *G. gallus* at different stages of its development, to know its level of secretion according to the age and maturation of the IS. For this, 20 mg of mucosa with protease inhibitor were centrifuged at 5000 rpm, for 20 min at 4 °C and a homogenate for 2 min as the ideal conditions to separate the mucosal proteins of the duodenum, jejunum, ileum and cecum from the study. Total proteins were quantified from the supernatants by the Bradford method, showing an increasing trend according to age and highlighting the highest concentration in the duodenum, followed by the jejunum, ileum and finally the cecum. Finally, significant differences were observed in IgA concentrations in the ileum compared to the other areas evaluated in 7-day-old samples. Although duodenum, jejunum and ileum on days 14 and 35 showed similar non-significant values, a trend of increasing concentration was observed towards the cecum, highlighting this area with a higher concentration of IgA in $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein in comparison to initial development stages evaluated. These findings highlight the importance of the SI - microorganisms interaction, allowing future evaluations of this response in the presence of intestinal pathogens.

Keywords: Secretory IgA, gastrointestinal tract, ELISA.

1 INTRODUCCIÓN

La mucosa constituye un elemento importante en la respuesta inmune y es la primera línea de acción contra agentes extraños, su componente principal es el moco, esta secreción es liberada por las células caliciformes que recubren las superficies epiteliales expuestas al exterior (Pelaseyed et al., 2014). La mucosa tiene la función de evitar la entrada y adhesión de microorganismos, manteniendo el tracto lubricado, hidratando al epitelio y protegiendo del daño mecánico (Bansil & Turner, 2017). El moco está compuesto principalmente de mucinas, las cuales le dan características viscoelásticas; además de electrolitos y agua, contiene péptidos antimicrobianos e inmunoglobulinas (Igs) como la IgA (Hansson, 2020). En la actualidad distintos factores como la nutrición, inmunodepresión, uso de fármacos y hábitos higiénicos pueden modificar las características de la mucosa, haciéndola susceptible a la entrada de microorganismos, desencadenando afecciones y procesos inflamatorios crónicos (Nagai et al., 2019).

Un elemento relevante del sistema inmune (SI) en la mucosa es la IgA, que participa activamente en la inmunidad innata. Predomina en secreciones del aparato genitourinario, respiratorio, gastrointestinal, lágrimas, saliva, leche materna y de forma sérica en menor concentración (Kindt et al., 2007). Juega un papel primordial en la protección de las mucosas, ya que regula a la microbiota, neutraliza a los microorganismos patógenos e impide su adherencia a la barrera epitelial (Andrea & Maria, 2011). La deficiencia de esta inmunoglobulina (Ig) se manifiesta con infecciones del tracto respiratorio e intestinal como alergias, sinusitis, asma, neumonía, diarrea, absorción deficiente y colitis (De Oliveira-Serra et al., 2017). Además, trastornos de la IgA desencadenan cambios en la composición de la microbiota comensal y su interacción, desregulando la tolerancia inmunológica y promoviendo la entrada de oportunistas. Alteraciones estructurales en los patrones de glicosilación de esta glucoproteína alteran su función biológica y facilitan la penetración de microorganismos (Wyatt & Julian, 2013). La determinación de los niveles de IgA permite una aproximación para la evaluación de la mucosa en estadio normal y en enfermedad, mejorando el diagnóstico de afecciones relacionadas con

el tracto gastrointestinal como la enfermedad de Crohn y la deficiencia de producción de Ig. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) permite la cuantificación e identificación de moléculas en distintas muestras y es útil para evaluar la respuesta inmunológica del organismo frente a una infección, proporcionando sensibilidad, especificidad de unión y más seguridad en su realización que otras técnicas (Ochoa Azze, 2012). La concentración de IgA en la mucosa está influenciada por la edad, estado de salud y la interacción con el ambiente (Punt et al., 2018), en la actualidad la implementación de un ELISA capaz de detectar niveles bajos de proteína en la mucosa es importante, debido a que las muestras en patologías intestinales son limitadas y por lo tanto la optimización en su separación favorece la generación de resultados con escasa cantidad de muestra (Martínez Castro & Merino Pérez, 2015). La evaluación de los componentes en la mucosa permite conocer la fisiopatología de enfermedades intestinales y otorga aproximaciones para la generación de biomarcadores que surgen a partir de una actividad metabólica o inmunológica alterada, procesos de muerte celular o inflamatorios (S. & V., 2012). Un ejemplo de ello es la calprotectina, proteína leucocitaria cuya elevación esta correlacionada con procesos inflamatorios (Pathirana et al., 2018). También, la alfa-1-antitripsina y albumina cuya disminución se relaciona con pérdidas proteicas intestinales y se pueden evaluar mediante heces, apoyando a la detección y diagnóstico de patologías, sin recurrir a procesos invasivos para el paciente como las biopsias, colonoscopias, etc. (Craven & Washabau, 2019).

Con base a lo anterior, este estudio se enfoca en evaluar la IgA secretora del tracto gastrointestinal de un modelo aviar a diferentes etapas de su desarrollo para conocer los niveles de secreción asociados a la edad, maduración del SI e interacción con la microbiota comensal (Clavijo & Flórez, 2018), proporcionando una herramienta de apoyo al diagnóstico de enfermedades de la mucosa. La obtención de valores de referencia para cada sección permitirá en aproximaciones futuras evaluar los niveles de secreción de esta Ig frente a la exposición de agentes patógenos en pruebas de retos microbianos, además de sentar bases para el análisis de otros componentes en la mucosa que pueden ser útiles para el diagnóstico de trastornos intestinales.

2 ANTECEDENTES

2.1 Sistema gastrointestinal

El sistema digestivo constituye una serie de órganos que se encuentran conectados entre sí por un conducto largo que da inicio en la boca y finaliza en el ano (Almagiá Flores & Lizana Arce, 2009). Este sistema se encarga de realizar funciones primordiales como: la degradación de los alimentos a moléculas más pequeñas, la absorción y el transporte de nutrientes a donde se requiere y la eliminación de lo no digerible por medio de las heces (Hernandez Rodriguez, 2021). Los órganos involucrados en el proceso de digestión son la boca, el esófago, el estómago, el intestino delgado que se divide en duodeno, yeyuno e íleon; y el intestino grueso que se compone del colon, recto y ano; además del páncreas, el hígado y la vesícula biliar (Roa & Meruane, 2012).

2.2 El proceso digestivo

La cavidad bucal está conformada por diferentes órganos que se encargan de recibir el alimento y que dan inicio al proceso de digestión (Figura 1) (Almagiá Flores & Lizana Arce, 2009). Los dientes se encargan de triturar la comida para formar piezas más pequeñas (Pérez & Fernandez, 2000). Por otra parte, la lengua contiene papilas gustativas y glándulas salivales que producen enzimas como la amilasa para la degradación del almidón y la lipasa que degrada las grasas. El pH de la boca oscila de 6.8-7, por lo tanto, tiene tendencia neutra (Lynge Pedersen & Belstrøm, 2019).

La saliva está compuesta principalmente por agua y contiene además lisozimas, enzimas digestivas, así como IgA que actúa protegiendo contra la entrada de microorganismos a través de la boca (Krahel et al., 2021). Los alimentos se recubren con saliva para generar el bolo alimenticio y este a su vez será deglutido para pasar por la faringe hacia el esófago, esto permite continuar con el proceso digestivo (Gil et al., 2006). El esófago se divide en dos áreas: el esfínter esofágico superior que mantiene la contracción para el aislamiento de la faringe; y el esfínter esofágico inferior que permite el paso del bolo hacia el estómago y evita el reflujo estomacal para que la acidez no dañe otras secciones (Almagiá Flores & Lizana Arce, 2009). A

lo largo de la estructura se destaca la presencia de abundantes células epiteliales secretoras de moco que mantienen lubricadas las paredes y facilitan el paso del bolo alimenticio (Pérez & Fernandez, 2000). Su pH normalmente se mantiene por encima de 6 y al producirse reflujo desciende debido a la presencia del ácido clorhídrico (Casado Caballero, 2010).

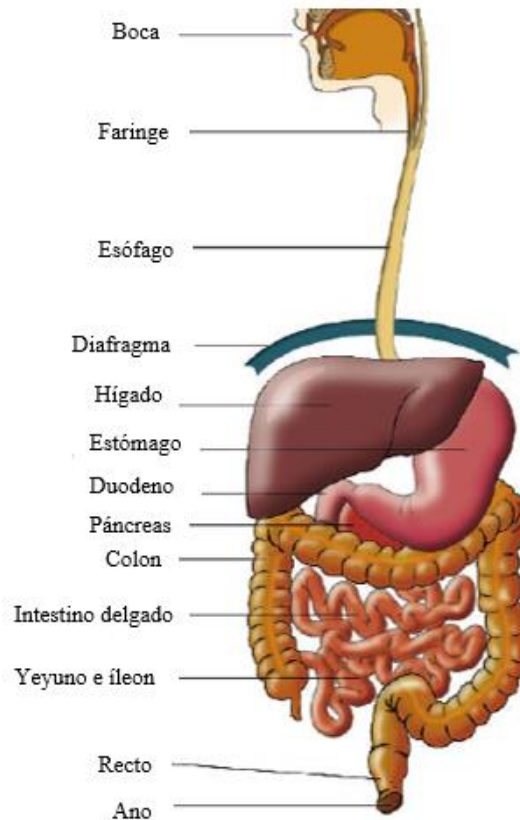


Figura 1. Anatomía del sistema digestivo. Representación de los órganos principales y accesorios que actúan en el proceso de digestión. Imagen extraída y modificada de (Pérez & Fernandez, 2000).

En la parte media del tracto se ubica el estómago, el cual se divide en fundus, cuya parte superior delimita la comunicación con el esófago; la porción media denominada cuerpo y el antro pilórico que separa el estómago del duodeno (Reiriz P., 2016). En el estómago el bolo alimenticio se mezcla con jugos gástricos para ser degradado por medio de enzimas. Debido a que el pH estomacal se mantiene constantemente

entre 1 a 3, las paredes del estómago se encuentran cubiertas con células epiteliales y glándulas secretoras de moco que lo protegen contra daño por el ácido producido (Almagiá Flores & Lizana Arce, 2009). Las células epiteliales también secretan pepsinógenos, que al entrar en contacto con el ácido clorhídrico generan a la pepsina, promoviendo la degradación de proteínas (Rostas et al., 2011). Posteriormente el bolo alimenticio sigue su camino y llega al intestino delgado donde cambia de nombre a quimo. En este punto, el intestino delgado se encarga de la absorción de todos los nutrientes que pueden servir al organismo, pero previamente a ello, existe liberación de secretina que estimula al páncreas a producir jugos pancreáticos con enzimas amilasas, lipasas y proteasas que degradan diferentes compuestos y la secreción de la bilis por el hígado para degradación de lípidos (Chiang & Ferrell, 2018).

El intestino delgado es un tubo estrecho dividido en 3 zonas: duodeno, yeyuno e íleon. Por lo general mantiene su nivel de pH entre 5 a 7 a lo largo del tubo y su calibre va disminuyendo progresivamente en dirección al intestino grueso. El duodeno es el que recibe el quimo del estómago, junto con secreciones del páncreas que tiene un pH mayor a 8 y del hígado con un pH de 7.4 (Brunser et al., 2016), ya que contiene el esfínter de Oddi, que controla el flujo del jugo pancreático al duodeno y el esfínter del colédoco que regula el flujo de la bilis al duodeno (Pérez & Fernandez, 2000). Al yeyuno e íleon se les atribuyen características funcionales similares en la absorción de nutrientes, pero la diferencia radica en que en el yeyuno las vellosidades presentan mayor grosor y por lo tanto mejora su capacidad de absorción. Las células que más abundan en esta región son captadoras de nutrientes y células productoras de moco que lubrican y favorecen el paso del contenido, además de la participación de estirpes celulares con actividad inmunológica (Almagiá Flores & Lizana Arce, 2009). Entre el íleon y el colon está el orificio ileocecal, a través del cual pasa el contenido hacia el intestino grueso y la válvula ileocecal que evita el reflujo de materia fecal del colon al intestino delgado (Hernandez Rodriguez, 2021).

La última parte del tracto gastrointestinal está conformada por el intestino grueso, este comienza desde la válvula ileocecal hasta el recto y tiene un diámetro mayor que el intestino delgado. La función principal de esta sección es la absorción de agua y eliminación de los residuos innecesarios para el organismo. Se divide en ciego, que evita el reflujo del material fecal hacia el intestino delgado; el colon, donde se almacena lo no requerido hasta la evacuación; y el recto, que realiza la motilidad intestinal final para la salida de las heces por el ano (Pérez & Fernandez, 2000). En el colon existe gran diversidad de microorganismos incluidos virus, parásitos y bacterias, esta composición está determinada por la interacción con el medio ambiente, la genética del individuo y su actividad inmunológica (Punt et al., 2018).

2.3 Estructura general del tubo digestivo

De manera interna, el tracto digestivo está cubierto por capas de mucosa que permite el paso del bolo alimenticio y brinda protección, ya sea contra daño mecánico o de característica inmunológica (Brunser et al., 2016). Esta mucosa se encuentra en el epitelio de cada región y estará especializada dependiendo de la función digestiva, produciendo moco en diferentes proporciones. El moco es de las principales líneas de defensa contra agentes extraños al organismo y está compuesto por agua, lípidos, Igs, proteínas antimicrobianas y mucinas (Hansson, 2020).

La siguiente capa se llama submucosa con tejido conectivo laxo, ahí se encuentran vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos que ayudarán a transportar los productos absorbidos hacia el hígado y a la circulación (Figura 2) (Reiriz P., 2016). Después existen dos capas con fibras de músculo liso, una con células dispuestas de forma longitudinal y otra con células en forma circular. Por último, una capa llamada adventicia que, en boca, esófago y recto, es de tejido conectivo laxo y en estómago e intestino es una membrana serosa que evita el roce entre órganos (Brunser et al., 2016).

2.4 Mucosa del intestino

La mucosa y submucosa se encuentran formando pliegues con vellosidades de aspecto variado en las diferentes secciones del intestino (Figura 2). En el intestino delgado las superficies están cubiertas con mayor cantidad de vellosidades, además tienen la característica de ser más largas y delgadas, lo que proporciona una superficie amplia de absorción de los nutrientes (Mowat & Agace, 2014). Con el paso hacia el intestino grueso se vuelven más cortas, ya que en esa área se absorbe agua, vitaminas y se envían los desechos al recto (Punt et al., 2018). Entre cada vellosidad, se encuentran las criptas de Lieberkühn, que producen una secreción que las recubre y proporciona un medio acuoso para la absorción de nutrientes. En el duodeno también están las glándulas de Brunner que secretan mucina como protección contra el quimo ácido proveniente del estómago (Reiriz P., 2016).

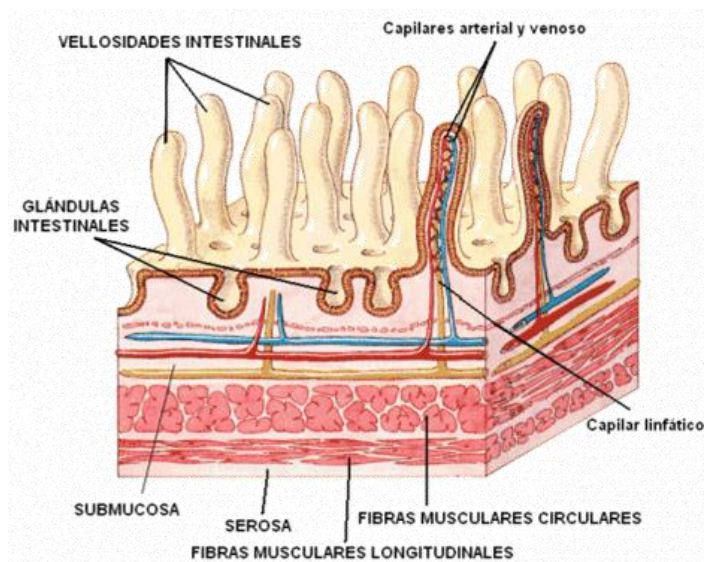


Figura 2. Capas de mucosa del intestino delgado. Contiene vellosidades intestinales y criptas de Lieberkühn, seguido de una capa con células dispuestas longitudinalmente y otra con células circulares. Por último, una membrana serosa (Almagiá Flores & Lizana Arce, 2009).

2.4.1 Las mucinas

La mucosa del tracto gastrointestinal tiene propiedades elásticas y viscosas que le permiten mantener la integridad del epitelio, lubricación, protección contra daño mecánico y de microorganismos (Contreras A. & Cabrera R., 2020). Estas propiedades del moco se deben principalmente a su contenido de mucinas, que son glucoproteínas producidas por células caliciformes y forman un gel que recubre al epitelio (Ciro et al., 2015). Cada mucina está compuesta por dominios ricos en prolina, treonina y serina, que sufrirán O-glicosilaciones en el aparato de Golgi, su contenido de glucanos las hace solubles en agua y capaces de unirse a ella (Hansson, 2020). Las mucinas se clasifican en dos grupos: de membrana y secretadas. Las mucinas de membrana tienen como función la protección de los enterocitos cubriendo su superficie apical, expresándose de manera constante en el tracto, entre las más comunes se encuentra MUC1/3/4/12/15 y 17 (Melhem et al., 2021). Por otra parte, las mucinas secretadas son capaces de polimerizarse formando geles; entre estas se encuentra MUC2/5AC/5B y 6 (McGuckin et al., 2011).

La expresión de mucinas es modulada tanto por la inmunidad innata como adaptativa y varía en grosor, nivel de expresión y distribución en diferentes sitios en el tracto digestivo (Petrou & Crouzier, 2018). En el estómago MUC6 y MUC5AC actúan como capa de moco que forma una barrera de protección de las células epiteliales, protegiéndolas contra el ácido clorhídrico (Pérez & Fernandez, 2000). En el intestino delgado la barrera mucosa está compuesta principalmente por MUC2, la cual se desprende cuando hay presencia de patógenos. Los enterocitos tienen una capa de moco gruesa compuesta por MUC17, MUC12 y MUC3 que crea una barrera contra microorganismos, pero permite el paso de pequeños nutrientes (Hansson, 2020). En el intestino grueso existen dos capas de moco, una externa menos densa que permite la interacción con los microorganismos y una capa interna adherida que promueve una zona de protección al epitelio (Petrou & Crouzier, 2018).

2.5 Sistema inmunológico del tracto gastrointestinal

El SI del tracto gastrointestinal está constantemente expuesto a agentes externos

como bacterias, parásitos, virus o moléculas ajenas al cuerpo que pueden adherirse a las superficies y causar daño (Pietrzak et al., 2020). De manera que, la barrera anatómica mucosa impide el ingreso de estos agentes a través del moco, dificultando el paso de los microorganismos. Si el agente patógeno supera estas barreras, será reconocido por moléculas y células del SI como: células dendríticas, macrófagos, linfocitos, neutrófilos, que promueven su eliminación (Toche P., 2012).

En el yeyuno e íleon se encuentran las placas de Peyer que forman parte del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), elemento importante de interacción inmune. GALT está dividido en dos compartimentos (Figura 3): el primero es GALT organizado que induce la respuesta inmune al contacto con antígenos y está conformado por un epitelio asociado a folículos (FAE) y las placas de Peyer. El otro compartimento es el GALT difuso, efector de la respuesta inmune y está formado por linfocitos dispersos en el entramado epitelial (IEL) y linfocitos en lámina propia intestinal (LPL) que monitorean la superficie luminal en busca de antígenos desconocidos (Y. Li et al., 2020).

El tejido linfoide está separado del lumen intestinal por células epiteliales columnares, IEL, células M y células caliciformes. En las placas de Peyer hay folículos con linfocitos B inmaduros y en la periferia de estos se encuentran estirpes celulares como células dendríticas y macrófagos que pueden presentar antígenos (Ramiro-Puig et al., 2008). Los linfocitos T vírgenes circulantes llegan a los ganglios linfáticos mesentéricos, donde son estimulados por células dendríticas a diferenciarse en linfocitos T cooperadores o citotóxicos. De modo que algunos linfocitos migran hacia diferentes tejidos y otros migran hacia los centros germinales de los folículos ubicados en las placas de Peyer para promover la diferenciación de linfocitos B a linfocitos B de memoria inmunológica o a células plasmáticas productoras de anticuerpos (Punt et al., 2018).

El tracto gastrointestinal constituye el mayor órgano inmune en el cuerpo humano. Debido a que se encuentra constantemente activado por la exposición de agentes extraños, existe mayor respuesta inmune (Correa, 2006). Las células del SI

gastrointestinal tienen funciones de reconocimiento y presentación de antígenos a los linfocitos T; tienen macrófagos, que interiorizan y destruyen a los microorganismos produciendo citocinas que promueven procesos de inflamación; células M especializadas en internalizar antígenos y linfocitos B que promueven la formación de Ig ante el reconocimiento del agente extraño (Huus et al., 2021).

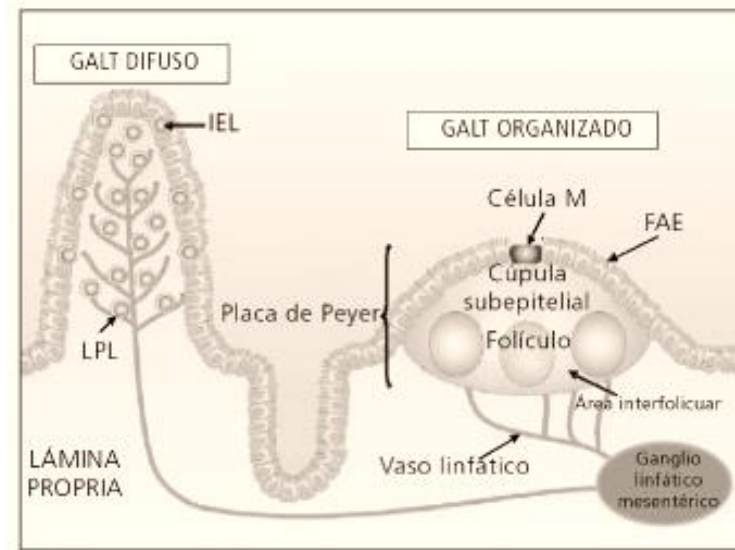


Figura 3. Estructura de GALT. Se divide en dos compartimentos, uno inductor llamado GALT organizado y otro efector de la respuesta inmune, GALT difuso. En las placas de Peyer hay acumulación de linfocitos y células plasmáticas productoras de Igs además de otras células que participan en la captación de antígenos. Imagen extraída y modificada de (Ramiro-Puig et al., 2008).

2.6 Inmunidad innata

La inmunidad innata constituye la primera respuesta del SI frente a la invasión de microorganismos. Posee mecanismos pre existentes que responden con rapidez a la infección, pero con una misma intensidad a todas las exposiciones, ya que esta respuesta no es capaz de distinguir diferencias sutiles entre grupos de microorganismos (Medzhitov, 2007). Los principales componentes que intervienen en la inmunidad innata son las barreras físicas como el epitelio y las mucosas, al igual que existe la participación de células como neutrófilos, monocitos y macrófagos,

encargados de fagocitar y digerir a los microorganismos produciendo citocinas que promueven la inflamación (Taguchi & Mukai, 2019). Están las células dendríticas, que tienen la función de captar antígenos para posteriormente presentarlos a los linfocitos T. También se encuentran los linfocitos NK (Natural Killer), que tienen actividad citotóxica contra virus y células tumorales. Además, la inmunidad innata tiene sistemas sensores de reconocimiento de peligro exógeno y endógeno como es el sistema del complemento, que constituye un nexo entre inmunidad innata y adaptativa. Consta de proteínas plasmáticas capaces de activar cascadas enzimáticas que promueven el proceso de opsonización y culminan con la lisis de los microorganismos (Hajishengallis et al., 2019).

2.7 Inmunidad adaptativa

Este tipo de inmunidad presenta especificidad a moléculas y capacidad de memoria, por lo tanto, mejora su respuesta frente a exposiciones repetidas al mismo agente (Metur & Klionsky, 2021). Existen dos tipos de inmunidad adaptativa. Una de ellas es la inmunidad celular, que tiene como componente principal a los linfocitos T, cuya función es la destrucción de los microorganismos que sobreviven a la fagocitosis y se quedan en el interior de las células y la eliminación de estas para suprimir la infección. Por otra parte, se encuentra la inmunidad humoral que ejerce la función de reconocimiento de antígenos a través de los anticuerpos producidos por los linfocitos B. Después del reconocimiento, los anticuerpos promueven procesos de neutralización, opsonización, eliminación por fagocitosis y la activación del complemento (Medzhitov, 2007). Como parte de la inmunidad adaptativa las Igs realizan el papel de reconocimiento de material extraño y su funcionamiento es esencial para la defensa ante agentes infecciosos (Punt et al., 2018).

2.8 Inmunoglobulinas

Las Igs son proteínas producidas por las células plasmáticas productoras de anticuerpos. Constan de 4 cadenas peptídicas separadas en 2 cadenas ligeras y 2 pesadas, están unidas a través de puentes disulfuro y algunas poseen una región que es flexible llamada bisagra que les permite cambiar de ángulo entre sí para unirse

al antígeno (Lenette et al., 2017). Las Igs son responsables de la respuesta inmune humoral, presentándose en el cuerpo humano 5 clases: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD. Comparten características en su estructura, pero tienen variabilidad de respuesta ante los microorganismos. En las regiones variables de las Igs se produce la unión al antígeno y la región constante interaccionan con proteínas y tejidos que median las funciones efectoras (Kindt et al., 2007). Pueden tener dos tipos de cadenas ligeras, las cuales son κ o λ . También 5 tipos de cadena pesada, la IgG(γ), IgA(α), IgM(μ), IgE(ϵ) y por último la IgD(δ). Las dos primeras Igs se separan en 4 y 2 subclases, mientras que los 3 restantes no presentan ninguna (Toche P., 2012).

La IgG constituye alrededor del 80% de las Igs en sangre. Existen 4 subclases de IgG que diferencian por cambios de aminoácidos en la secuencia de la cadena pesada: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (K. Chen et al., 2020). Entre sus funciones se encuentra la opsonización, que facilita la activación de la fagocitosis mediante el reconocimiento de la región Fc (fracción cristalizante) de la Ig y activación del complemento, enlazándose con antígenos en la membrana del microorganismo para desencadenar reacciones que culminan con su destrucción (Sanabria- Ayala & Landa, 2007). La IgG es el anticuerpo más abundante en la respuesta inmune humoral secundaria y puede atravesar la placenta, proporcionando inmunidad pasiva natural, la cual ofrece protección temporal contra infecciones mientras madura el SI del recién nacido (Scott-Taylor et al., 2018). La IgD representa el 0.25 % de las Igs en suero, se encuentra en la superficie de la membrana de linfocitos B y es marcador de madurez junto con IgM, aunque circula en cantidades pequeñas (Owen et al., 2017). Se ha reportado un conjunto pequeño células plasmáticas productoras de IgD en las vías respiratorias cuya secreción se dirige a circulación, secreciones nasales, saliva, lágrimas y leche. Puede interactuar con la superficie de monocitos y basófilos, desencadenando la liberación de IL-4 y aumento en la producción de IgG, esto promueve inmunidad local en las cavidades nasofaríngeas (Gutzeit et al., 2018). La IgE se encuentra representando el 0.004% de las Igs en suero. Es capaz de unirse a las membranas de los basófilos, propiciando la liberación del contenido de sus gránulos al espacio extracelular, como resultado de esto aparecen manifestaciones

alérgicas (Wade-Vallance & Allen, 2021).

La IgM representa del 5-10 % del total de las Igs. Se localiza en la membrana de linfocitos B de forma monomérica y pentamérica en el torrente sanguíneo (K. Chen et al., 2020). Es la primera Ig que aparece en respuesta a antígenos activando el sistema del complemento y también es la primera que se sintetiza en el recién nacido. Tiene una cadena J, polipéptido que le permite polimerizarse formando una estructura compleja y gracias a ello, puede secretarse en la superficie intestinal por interacción con el receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR) que favorece su transporte al lumen (Kindt et al., 2007). A diferencia de la IgA secretora, el fragmento del componente secretor que se une a la IgM no la protege eficazmente contra la degradación proteolítica, por lo tanto su estabilidad en la mucosa es más baja (K. Chen et al., 2020). A pesar de ello, la IgM puede proporcionar protección en las mucosas compensando parcialmente la deficiencia de IgA en enfermedades como la Inmunodeficiencia común variable (IDCV) disminuyendo la sintomatología de los pacientes (Smith et al., 2019). Además existe mayor cantidad de células plasmáticas productoras de IgA en la lámina propia, lo que representa el predominio de esta Ig en las mucosas en comparación con IgM (Magri et al., 2017). En resumen, tanto IgA e IgM son capaces de realizar transcitosis epitelial pero la concentración de IgM es menor en las mucosas y tiende a degradarse por las enzimas del medio.

2.8.1 IgA

La IgA está formada por 2 cadenas ligeras κ o λ y dos cadenas pesadas α que están unidas por enlaces disulfuro (Owen et al., 2017). En sangre se encuentra de forma monomérica, representando entre el 10-15 % del total de Igs (Figura 4) (Ramiro-Puig et al., 2008). En las superficies mucosas de los tractos respiratorio, genitourinario, gastrointestinal, así como en la saliva, lágrimas y leche materna, la IgA constituye más del 85 % en su forma dimérica, que consta de dos IgA unidas por la cadena J que facilita su polimerización (Huus et al., 2021). Este dímero de IgA se une al pIgR en la superficie de los enterocitos, y a través del proceso de transcitosis, llega al lumen y se libera, llevándose consigo el componente secretor del receptor,

otorgándole protección a la degradación enzimática intestinal (K. Chen et al., 2020). La IgA con el componente secretor se conoce como IgA secretora y predomina en las superficies mucosas, sobretodo del tracto intestinal. Esta Ig presenta dos subclases, cabe mencionar que cualquiera de estas dos puede unirse a otra molécula de la misma clase y formar la IgA dimérica (Floege & Feehally, 2016).

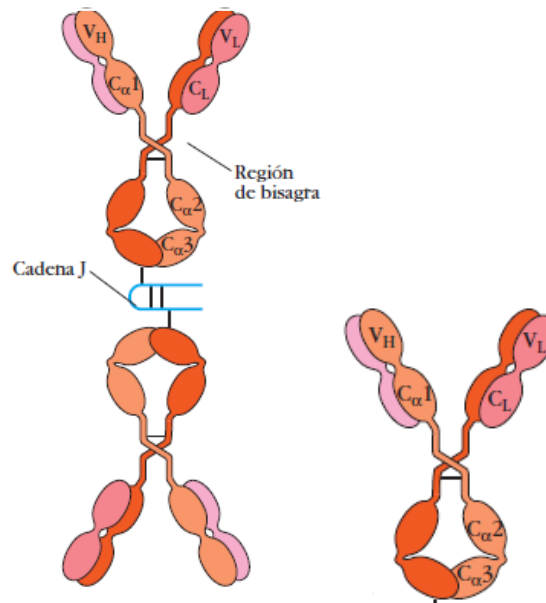


Figura 4. Forma dimérica y monomérica de IgA. La IgA monomérica se encuentra en el torrente sanguíneo, mientras que la forma dimérica contiene la cadena J, que facilita la interacción entre Igs. Imagen extraída y modificada de (Kindt et al., 2007).

2.8.1.1 Subclases de IgA

Existen 2 subclases de IgA en el humano: La IgA1 e IgA2, cuya producción varía entre los tejidos productores de mucosa. La IgA1 predomina en diferentes secreciones, constituyendo el 85 % de IgA en suero humano, del 80 al 90 % en las vías respiratorias y urogenitales y un 60 % en saliva (Y. Li et al., 2020). Por otro lado, IgA2 se produce gradualmente en el intestino, conformando un 25 % en duodeno y yeyuno, mientras que en intestino grueso tiene una concentración mayor al 60 %, debido a la gran cantidad de microorganismos que se encuentra en el colon (Mowat & Agace, 2014). Estructuralmente, la IgA2 tiene N-glicosilaciones en la cadena

pesada y una región bisagra de 16 aminoácidos más reducida, lo que la hace resistente a la degradación por proteasas bacterianas del lumen intestinal (Davis et al., 2020). Por el contrario, IgA1 contiene múltiples O-glicosilaciones en su región bisagra y N-glicosilaciones en la cadena pesada, dándole flexibilidad de unión a antígenos pero susceptibilidad a ser degradada por proteasas bacterianas (Figura 5) (Breedveld & Van Emond, 2019).

La síntesis de IgA1 ocurre en la médula ósea, produciéndose de forma monomérica, mientras que en secreciones mucosas la IgA2 se produce de forma local, en conformación dimérica y formando IgA secretora con ayuda del pIgR (John & Hernán, 2018). Ya que en el cuerpo humano las mucosas de las vías respiratorias, la cavidad oral, el tracto genitourinario y gastrointestinal son vulnerables a la invasión de microorganismos, existen diferentes tejidos que desempeñan funciones de defensa. Este sistema se compone de estructuras de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) donde se da la respuesta inductiva, además de otros tejidos como la lámina propia y glándulas que generan respuestas efectoras (Y. Li et al., 2020).

2.9 IgA en el tracto gastrointestinal

El intestino contiene la mayor cantidad de células inmunes de todos los tejidos del cuerpo ya que diariamente se expone a variedad de antígenos y estímulos inmunitarios. Por ello, las estructuras organizadas de GALT que comprenden: placas de Peyer, folículos linfoides, ganglios linfáticos mesentéricos y linfocitos en la lámina propia intestinal (LPL) son las ubicaciones principales de activación de respuesta inmune donde participa gran variedad de células en protección de la barrera intestinal (Mowat & Agace, 2014). Las placas de Peyer contienen folículos con centros germinales de linfocitos B, que al recibir estímulos antigénicos se diferenciarán en células plasmáticas secretoras de IgA, liberando esta Ig en forma dimérica en la lámina propia (Ramiro-Puig et al., 2008).

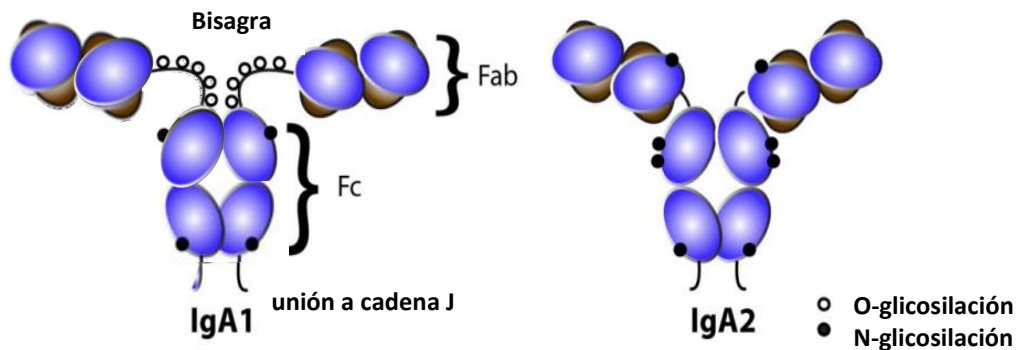


Figura 5. Subclases de IgA. La IgA1 tiene 2 cadenas pesadas N-glicosiladas (azules) y 2 ligeras (café), su región bisagra es más larga y flexible con varias O-glicosilaciones. La IgA2 tiene región bisagra más reducida y con más N-glicosilaciones en ambas cadenas pesadas. Imagen recortada y modificada de (Breedveld & Van Egmond, 2019).

La IgA dimérica será transportada a través de las superficies mucosas por transcitosis epitelial (Figura 6), cuyo proceso está mediado por el pIgR localizado en la membrana basal de las células epiteliales intestinales; este receptor tiene 3 porciones: una extracelular, transmembranal y citoplasmática. La porción extracelular tiene 6 dominios de unión a inmunoglobulina donde participa la cadena J para unir al receptor con la IgA dimérica. Posteriormente por medio de endocitosis el inmunocomplejo es transportado hacia la superficie apical para finalmente ser escindido por proteólisis enzimática y aportar el componente secretor que formará la IgA secretora (Asano & Komiyama, 2011; Punt et al., 2018). Esta Ig se produce en respuesta a antígenos microbianos y de alimentos ingeridos, desempeñando diferentes funciones en la mucosa (Huus et al., 2021). Actúa como defensa contra patógenos, uniéndose a ellos para neutralizarlos y así evitar su penetración a los tejidos, este proceso permite que se atrapen en el moco y se eliminen por movimientos mecánicos del intestino. También regula la composición de la microbiota intestinal y mantiene la homeostasis mediante la tolerancia inmunológica (Pietrzak et al., 2020).

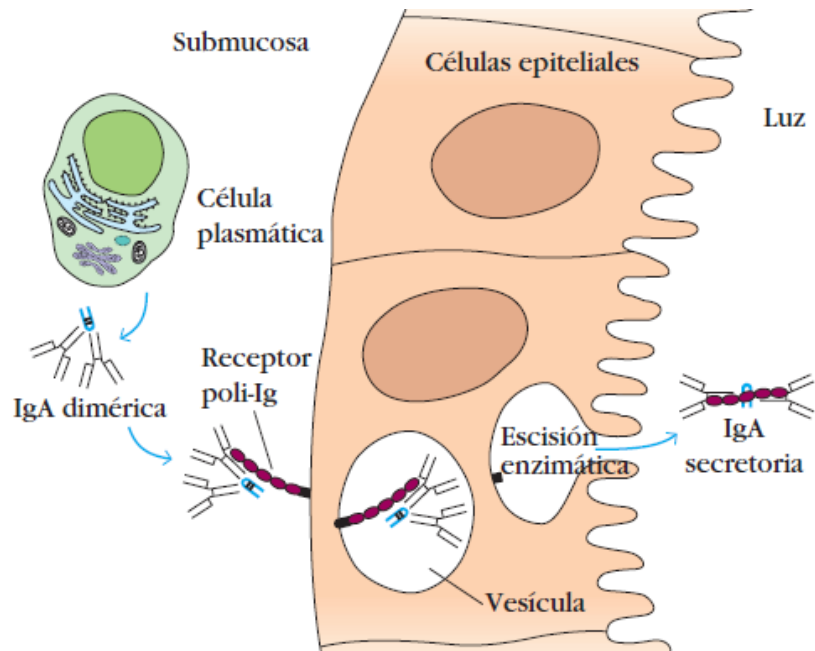


Figura 6. Esquema de transcitosis epitelial. La IgA dimérica se une al pIgR y se internaliza para llegar al lumen, donde se separa llevándose consigo el componente secretor y formando la IgA secretora intestinal (Kindt et al., 2007).

2.10 IgA en otras secreciones

Los patógenos pueden ingresar a los pulmones mediante las superficies mucosas del tracto respiratorio. Las vías respiratorias están cubiertas por tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT), formado por agregados linfáticos en la pared bronquial, este funciona como depósito de células precursoras para la producción de IgA secretora (Veres, 2020). El epitelio que recubre los ganglios linfáticos tiene células M y células dendríticas, que estimulan la internalización y presentación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Taguchi & Mukai, 2019). Las células dendríticas migrarán a los ganglios linfáticos, amígdalas o adenoides y van a interactuar con los linfocitos para promover su diferenciación celular y la producción de anticuerpos, ya que son las encargadas de procesar los antígenos para estimular la respuesta inmune adaptativa (Fleisher et al., 2019). La IgA secretora es liberada por las células plasmáticas y ejerce su acción uniéndose a agentes patógenos para facilitar su eliminación a través de movimientos ciliares. Si llegan a atravesar esta

línea de defensa se enfrentarán a varios estirpes celulares como los IEL, macrófagos, y linfocitos NK que reconocen lo extraño al organismo y proporcionan respuestas ante la invasión (Smith et al., 2019).

La IgA secretora también es importante en la protección del recién nacido porque puede transferirse en la leche materna a través de la lactancia (Aguilar Cordero et al., 2016). El calostro es un líquido que se secreta 5-7 días a partir del nacimiento del bebé que brinda protección contra infecciones, ya que transfiere inmunidad pasiva de la madre al recién nacido. Se han encontrados varios tipos de Igs en la leche y el calostro, pero la IgA constituye el 90 % de todas esas Igs y puede reconocer y neutralizar enzimas, bacterias y toxinas (Kirsi M. Järvinen et al., 2019).

En cuanto a la defensa contra la invasión microbiana, el sistema genitourinario se apoya del epitelio escamoso estratificado, el cual está lubricado con moco producido por glándulas cervicales en la zona, seguido de la lámina propia que contiene células inmunes como los neutrófilos, células dendríticas, macrófagos y linfocitos (Abbas et al., 2012). A diferencia de todas las secreciones mucosas, el anticuerpo que más se expresa en el área es IgG, seguido de IgA. Este sistema se ve constantemente influenciado por hormonas y los cambios de pH, por lo que la concentración de estas Igs se verá modificada según el ciclo menstrual, disminuyendo significativamente durante la ovulación (Lorenzen et al., 2016).

Además, la IgA ejerce función protectora en la saliva uniéndose a la película salival y limitando la adhesión de las bacterias, previniendo así la penetración de microorganismos por la cavidad oral (Martínez et al., 2013). La saliva contiene proteínas que son secretadas por las células plasmáticas secretoras en las glándulas salivales, principalmente son α -amilasa, mucinas, IgA, péptidos, cistatinas, proteínas ricas en prolina, lisozimas, defensinas, entre otros, que destruyen componentes de la superficie en la membrana de microorganismos (Krahel et al., 2021).

2.11 Enfermedades relacionadas a alteraciones de IgA

2.11.1 Inmunodeficiencia común variable

La IDCV es una enfermedad caracterizada por niveles bajos de anticuerpos y defectos en la producción de linfocitos, que condiciona a una disminución de secreción de Igs. El grado y el tipo de deficiencia varía entre cada persona y puede presentarse una reducción en los niveles de anticuerpos IgG, IgM e IgA en conjunto o por separado (Díez et al., 2010). Tanto hombres como mujeres pueden presentar esta afección por igual durante cualquier etapa de la vida, teniendo un pico entre 6 a 10 años y otro entre los 18 y 25 (O´Farril Romanillos et al., 2017). Entre las IDCV, la deficiencia selectiva de IgA es la más frecuente, con una prevalencia de 1 en 600 en recién nacidos. Este tipo de deficiencia puede ser asintomática y cuando se manifiesta suele relacionarse con afecciones en el tracto respiratorio y gastrointestinal, alergias y enfermedades autoinmunes (Agarwal & Cunningham-Rundles, 2019). Los padecimientos más comunes son amigdalitis, asma, rinosinusitis, neumonías, diarrea, giardiasis, mala absorción, vómitos, pérdida de peso e inflamación de los ganglios linfáticos que disminuyen la calidad de vida de los pacientes (Yazdani et al., 2020). Para su diagnóstico se sospecha esta afección al presentarse infecciones recurrentes tanto respiratorias como intestinales. El diagnóstico de IDCV se confirma con la detección de niveles bajos de Igs y linfocitos, observación del historial familiar e inicio de las manifestaciones clínicas (Rojas Torres et al., 2014).

2.11.2 Enfermedad de Crohn

Es una enfermedad caracterizada por inflamación crónica en diferentes partes del tracto gastrointestinal, las áreas que suelen ser más afectadas son a partir del íleon terminal hasta el ano. Como síntomas presenta diarrea, dolor abdominal, permeabilidad intestinal y sangre en las heces (Veauthier & Hornecker, 2018). Se han reportado mutaciones asociadas al receptor NOD2 perteneciente a la inmunidad innata como factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad, ya que la alteración de este receptor de reconocimiento de patrón (RRP) da como resultado

aumento en la carga microbiana y con el tiempo procesos inflamatorios crónicos (Rochereau et al., 2021). En un estudio realizado por Nicolas Rochereau y cols. en el 2021 se determinó que la ausencia de NOD2 puede incrementar el transporte de complejos de IgA-bacterias por medio de las células M hacia la lámina propia del intestino, provocando inflamación de la mucosa. Hedl y cols. en el 2011 demostraron que NOD2 activa la vía de señalización mTOR, la cual induce la regulación positiva de factores antiinflamatorios y regulación negativa de factores proinflamatorios, por lo tanto, la ausencia de este receptor desencadena la susceptibilidad a enfermedades inflamatorias (Hedl & Abraham, 2011). Como diagnóstico de esta patología se analizan marcadores de inflamación como proteína C, VSG y fibrinógeno. De manera adicional, se realiza un coprocultivo para descartar alguna otra causa de la diarrea. Mediante colonoscopia y biopsias intestinal se pueden observar alteraciones del tracto intestinal (López et al., 2005).

2.11.3 Nefropatía por IgA

Esta patología está caracterizada por inflamación del glomérulo debido a una acumulación de IgA en las células mesangiales. Es de las glomerulonefritis más frecuentes y causantes de insuficiencia renal crónica. Presenta síntomas como hematuria en diferentes grados, proteinuria y deterioro de la función renal. Estructuralmente la IgA1, tiene alto contenido de serina y treonina en su región bisagra, estos residuos le permiten adquirir cadenas de O-glicanos conformadas por N-acetilgalactosamina, galactosa y ácido siálico para realizar su función biológica (Floege & Feehally, 2016). En esta patología la alteración genera depósitos de IgA1 polimérica deficiente de galactosa tanto en circulación como en las células mesangiales. Al unirse esta IgA deficiente de galactosa con anticuerpos anti-IgA1 en su mayoría de clase IgG forman un complejo que estimula la secreción de citoquinas proinflamatorias y posteriormente el reclutamiento de macrófagos que conducen al daño renal (Sallustio et al., 2020). El diagnóstico requiere de una biopsia renal para identificar características histológicas, lesiones glomerulares, microhematuria con o sin proteinuria y en casos graves macrohematuria (Khasnobish et al., 2021).

2.12 Modelo biológico aviar

Desde la antigüedad la experimentación con animales ha sido una herramienta útil para realizar aproximaciones de mecanismos en el desarrollo de enfermedades, incluso para contribuir en el tratamiento de patologías en humanos (Vasconcelos et al., 2016). Diversas especies como ratones, conejos, perros, gatos, aves, etc., han servido como modelos biológicos de investigación, abarcando su desarrollo embriológico hasta el organismo adulto, desempeñando un papel crucial en múltiples áreas como virología, inmunología e industria alimenticia (Furlong, 2005). En particular, el ave denominada *Gallus gallus*, ha sido utilizada en estudios como (Gomez-Verduzco et al., 2009) y (Campozano-Marcillo et al., 2021) cuyas investigaciones están dirigidas a la implementación de métodos naturales para mejorar la producción avícola y fortalecer su SI sin necesidad del uso de antibióticos. *G. gallus* se encuentra ampliamente distribuida a nivel global y es utilizada como fuente de alimentación. Su capacidad para crecer en ambientes controlados y temperaturas templadas, además de su rápido desarrollo, lo convierte en un modelo de estudio rentable por su menor costo de producción y mantenimiento en comparación con otras especies (Vargas Ruiz, 2009). La línea genética Cobb 500 es un pollo de engorde eficiente, con buena tasa de crecimiento. El huevo del ave ofrece un panorama de estudio del desarrollo embrionario y tiene la ventaja de ser de fácil acceso y no requerir grandes instalaciones para mantener sus condiciones, por lo que los costos se ven reducidos (Rodríguez et al., 2014). El modelo de experimentación aviar es valioso para reproducir infecciones cercanas a las observadas en humanos, facilitando la comprensión de la fisiopatología de enfermedades y la aplicación terapéutica en ensayos clínicos (Miró & Gatell, 2000). La estructura del tracto intestinal, que incluye duodeno, yeyuno, íleon e intestino grueso, es funcionalmente similar en aves y humanos. Del mismo modo, órganos como el hígado y páncreas en las aves secretan sales y jugos pancreáticos para la digestión de nutrientes, siendo diferentes partes anatómicas como el pico, ausencia de dientes, presencia de dos ciegos por parte de las aves y la presencia de dos estómagos, el muscular y el glandular (Scanes, 2020).

2.13 Sistema digestivo del modelo aviar *Gallus gallus*

El tracto gastrointestinal de las aves constituye un sitio susceptible a la invasión de múltiples microorganismos al llevar a cabo procesos de digestión y absorción de nutrientes provenientes de la ingesta de alimento (Lv et al., 2021). El tracto gastrointestinal se compone por el pico, esófago, buche, proventrículo, molleja, duodeno, yeyuno, íleon, ciegos, colon y cloaca (Figura 7). En primer lugar, el pico se encarga de obtener y manipular los alimentos, además de la defensa, vocalización, cortejo y la producción de saliva para facilitar la ingestión (Clavijo & Flórez, 2018). El alimento sigue su camino hacia el esófago, que está compuesto por epitelio escamoso estratificado con producción de moco a través de glándulas mucosas, algunas aves presentan una sección que permite el almacenamiento del alimento cuando el ave está en movimiento denominado buche. Posteriormente el alimento pasa al estómago, que se divide en dos: proventrículo y molleja (Rodríguez Fernández et al., 2017). El primero tiene pH que varía según el alimento que ingiere el ave, aquí secreta sustancias que permiten la degradación de los alimentos; en la molleja procede a triturarlo utilizando partículas sólidas como piedras pequeñas o arena. Posee una cutícula de colina, que es una capa delgada y resistente que protege a este órgano de dañarse durante el proceso digestivo (Moran, 2018).

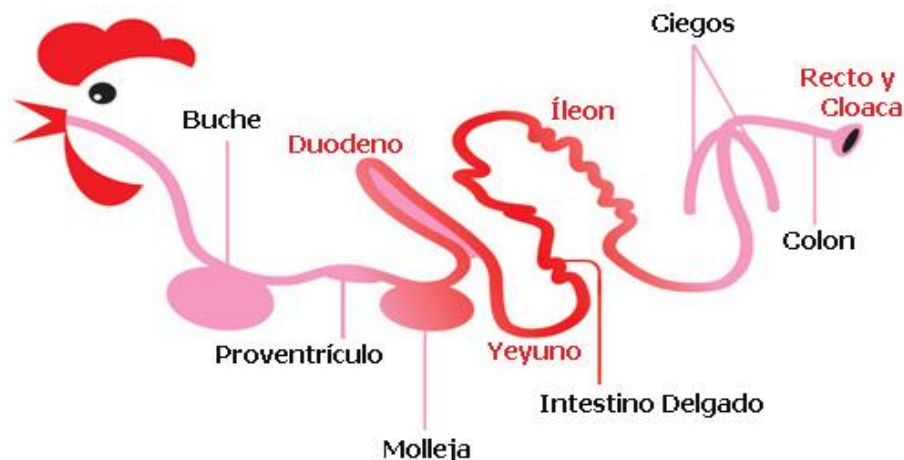


Figura 7. Descripción del tracto gastrointestinal del modelo *Gallus gallus*. El tracto gastrointestinal se compone por el pico, esófago, buche, proventrículo, molleja, duodeno, yeyuno, íleon, ciegos, colon y cloaca (Christofoli et al., 2020).

El intestino delgado está conformado por el duodeno, yeyuno e íleon, en esta parte ocurren los procesos de absorción de nutrientes ingeridos y por otro lado está el intestino grueso que se encarga de la absorción de agua y electrolitos. Es importante mencionar que entre el yeyuno e íleon se puede encontrar un vestigio del saco vitelino que permite diferenciar entre las dos zonas. También tiene 2 ciegos, que participan en la digestión post-gástrica del alimento fibroso, absorción de agua y retención del contenido de desecho. Pasando el intestino se llega a la cloaca que es para la salida de las heces del ave (Rodríguez Fernández et al., 2017). Al ser tan extenso, el tracto gastrointestinal constituye un punto de entrada para la invasión de virus, bacterias y parásitos, por lo que el SI digestivo contiene células inmunológicas que ejercen la función de protección al organismo (Brisbin et al., 2008). Estructuras como las placas de Peyer, tonsilas cecales, divertículo de Meckel, tonsila esofágica, MALT y bolsa de Fabricio llevan a cabo procesos inmunológicos para la diferenciación y maduración de linfocitos B y T en las aves (Gómez et al., 2010).

2.14 Similitud en el genoma de humano y aves

La comparación de secuencias genómicas de especies diferentes sirve de modelo para conocer aspectos biológicos de ambas, este análisis permite encontrar elementos de secuencia conservados entre especies e identificar cambios evolutivos (Furlong, 2005). El pollo es el primer animal agrícola en tener su genoma secuenciado, esto permite conocer a fondo la información del organismo y aplicarla en ámbitos tanto de investigación como en el área de alimentos. En cuanto a similitudes entre especies, aproximadamente el 60 % de los genes codificantes de proteínas de pollo tienen similitud con el humano, las secuencias más conservadas están implicadas en funciones citoplasmáticas y nucleares; encontrándose 218 genes de ave que son similares a genes del receptor olfativo *OR5U1* y *OR5BF1* en humanos (Hillier et al., 2004). En cuanto a expresión de genes, se observó que mientras un gen se encuentre mayormente distribuido por todos los tejidos, existe mayor probabilidad que lo compartan entre especies, a que un gen que se exprese en pocos tejidos (Furlong, 2005). Se encontraron también similitudes de varios genes relacionados con el SI de los mamíferos, como la catelicidina, factor estimulante de

colonias, IL-3, IL-4, IL-7 e IL-26 que se conocía solamente en humanos, por lo que esta ave representa un modelo disponible para investigar la función de IL-26 como una aproximación al humano (Hillier et al., 2004).

2.15 Sistema inmune del tracto gastrointestinal de las aves

Las células epiteliales intestinales proporcionan una barrera física contra los microorganismos, estas interactúan a través de uniones estrechas y la secreción de mucinas que protegen y lubrican las superficies epiteliales (Suzuki, 2020). Las proteínas antimicrobianas como las defensinas sirven como mecanismo de defensa innato, las gallinacinas son defensinas descritas en las aves y tienen actividad contra patógenos intestinales (Stanley et al., 2014). El SI tanto del ave como de otros mamíferos es capaz de diferenciar entre microorganismos comensales de los que pueden causar daño (Kogut et al., 2020). Como parte de la SI del ave se encuentra un órgano linfoide primario llamado bolsa de Fabricio, localizado en la parte dorsal de la cloaca y con una estructura de pliegues que le permiten la comunicación con el lumen intestinal. En esta estructura se llevan a cabo procesos de diferenciación y maduración de linfocitos B, mientras que los linfocitos T se desarrollan en el timo. En el yeyuno se encuentra el divertículo de Meckel, sitio donde ocurren procesos de mielopoyesis extramedular entre la semana 2 y 7 de edad del ave (Gómez et al., 2010). Las placas de Peyer se sitúan en la parte media del intestino, sirven como un órgano linfoide secundario que también se encuentra en mamíferos. Tiene una estructura que le permite comunicarse con células especializadas para el reconocimiento de antígenos como los macrófagos, células M y células dendríticas (Kogut et al., 2020). Estas reconocen PAMPs a través de RRP en su membrana, permitiendo su transporte de la luz intestinal hacia las placas de Peyer y así desarrollar una respuesta inmune. Dentro de las placas de Peyer existen centros germinales con linfocitos B, que son precursoras de células plasmáticas productoras de Igs o células de memoria (Broom & Kogut, 2018).

Por otra parte, las tonsilas cecales que están localizadas en el íleon cecal, constan de tejido linfoide distribuido en dos zonas: una subepitelial con linfocitos B y una zona

más profunda con linfocitos T, en esas dos zonas se localizan centros germinales con función similar a las placas de Peyer. Otro tejido linfoide que se localiza en la mucosa y submucosa del intestino de las aves es GALT. Aquí se encuentran 70-80 % de todas las células inmunitarias. En él existen linfocitos B y T, células M, macrófagos y granulocitos (Clavijo & Flórez, 2018). La tonsila esofágica se localiza cerca del proventrículo y consta de 6-8 unidades rodeadas de tejido fibroso. Estas unidades forman epitelio escamoso que contiene linfocitos T, células plasmáticas y células dendríticas, sin linfocitos B (Rodríguez Lecompte, 2016). Se han descrito 3 isotipos de Igs en las aves: IgY, IgM e IgA, siendo en el tracto gastrointestinal la IgA una pieza clave para la respuesta inmune humoral en las superficies mucosas (Itzá Ortiz et al., 2008). La IgA en aves tiene la función de neutralización de microorganismos, manteniendo la homeostasis intestinal. De igual manera que los mamíferos, la forma polimérica también puede transportarse de manera selectiva del epitelio hacia la luz intestinal por medio de su cadena J y el componente secretor, pero la gran diferencia radica que la IgA en aves normalmente se encuentra en forma de trímero o tetrámero (Gómez et al., 2010). Para determinar la concentración de Igs se debe considerar que el fluido contendrá, además de la proteína de interés, otras biomoléculas y contenido celular que puede interferir en el análisis, por lo que se opta por realizar procesos de separación y purificación de proteínas a la muestra (Ramirez C & Miranda Z, 2021).

2.16 Separación de proteínas

Actualmente el uso de métodos de separación y purificación de proteínas juega un papel importante para conocer los procesos celulares en los que se ve implicada la molécula. Por lo general, al lisar una célula se obtiene una mezcla de biomoléculas y metabolitos que pueden centrifugarse para separar la muestra en fracciones de interés. Durante la separación y purificación de una proteína debe considerarse mantener una temperatura adecuada, ya que la muestra corre el riesgo de degradarse por actividad de proteasas; además, se deben estandarizar los tiempos y pasos que permitan obtener una mayor cantidad de proteína sin perder su estabilidad y conservación de su función (S. Liu et al., 2020).

Existen varios métodos de separación de proteínas como es la electroforesis, que consiste en la separación por peso molecular y carga de la proteína problema. Se basa en el movimiento de las proteínas por estimulación eléctrica en una matriz porosa en gel de poliacrilamida, esta técnica es utilizada ampliamente pero es un método cualitativo, por lo tanto, solo te permite observar la presencia de proteínas en la muestra, además de que el uso de acrilamida para formar el gel es neurotóxico (Fierro, 2014). Otro tipo de métodos de separación de proteínas son los cromatográficos que se basa en una fase móvil que interactuará con una fase estacionaria contenida en una columna y pueden variar en su técnica dependiendo del tamaño, la carga de la proteína y especificidad de unión para separar la proteína de interés. Como desventajas presenta el uso de equipos de costo elevado y capacitación de personal requerida (Pliego-Arreaga et al., 2013). Después de llevar a cabo el proceso de separación, la realización de métodos de cuantificación permite conocer la concentración total de proteínas de una muestra problema.

2.17 Inmunoensayos

El uso de técnicas de laboratorio que proporcionen especificidad y sensibilidad para detección de enfermedades son de gran importancia para mejorar la calidad de vida del paciente. En estos ensayos influyen factores como la disponibilidad de la muestra, el método utilizado, la especificidad de interacción y habilidad técnica del personal (Auriostigue Bautista, 2014). Los métodos que utilizan enzimas como marcador ofrecen ventajas de obtención de resultados eficientes en cuanto a sensibilidad y especificidad, mayor rendimiento en tiempo y tienen procedimientos más sencillos. Las técnicas inmunoenzimáticas sustituyeron el uso de radioisótopos cuya vida media es más corta y de manipulación cuidadosa. En los métodos para evaluar la interacción antígeno-anticuerpo se pueden emplear diferentes marcadores como los radiactivos, fluorescentes, partículas de látex, colorantes, enzimas, etc. Siendo los marcadores enzimáticos muy populares por ser más estables, más económicos, no tóxicos, con actividad catalítica elevada y porque permiten la formación de productos estables (Ochoa Azze, 2012).

Los ensayos inmunoenzimáticos homogéneos tienen como principio la medición del complejo antígeno-anticuerpo y la comparación con los reactivos que quedaron libres, por lo que no se requiere pasos de lavado. Este tipo de ensayos se divide en competitivos y no competitivos. En los primeros la concentración del antígeno será inversamente proporcional a la concentración de la señal porque existe una competencia entre el antígeno de la muestra y un antígeno marcado con enzima. En los no competitivos, en cambio, la concentración de antígeno será directamente proporcional a la concentración de la señal (Punt et al., 2018). Existen también ensayos inmunoenzimáticos heterogéneos, en los cuales ocurre la separación de los complejos formados de las moléculas libres mediante aspiración o lavados, esto permite la eliminación de componentes que pueden interferir en el estudio (López Riquelme et al., 2009).

2.18 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

El ELISA es una técnica muy utilizada en área clínica, es un ensayo heterogéneo donde se utiliza una matriz sólida con antígenos o anticuerpos fijados, estos formarán complejos con el analito de interés si se encuentra presente en la muestra problema y por medio de unión enzimática, al añadir el sustrato afín, se producirá una señal colorimétrica detectable a una longitud de onda específica (Waritani et al., 2017). La fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y β -galactosidasa son las enzimas más utilizadas para realizar estas cuantificaciones y vienen conjugadas normalmente con biotina-estreptavidina. Representa una prueba sensible con ventajas de ser más segura en cuanto a manipulación por el uso de enzimas como marcaje, la posibilidad de evaluar gran cantidad de muestras en un solo ensayo, además su lectura se realiza por medio de espectrofotometría sin la necesidad de recurrir a equipos más especializados y complejos de utilizar (Ochoa Azze, 2012). Algunas desventajas de la técnica incluyen que el procedimiento consume tiempo y requiere mucha manipulación, por lo tanto, debe existir capacitación previa para poder realizar el ensayo. Existen diferentes tipos de ELISA que permiten la medición de complejos antígeno-anticuerpo (Hernández Ramírez & Cabiedes, 2010).

2.18.1 Tipos de ELISA

Existen 4 tipos de ELISA: el directo, indirecto, sándwich y competitivo (Figura 8); dependiendo de las características del analito que se esté buscando se elegirá el método que se acople más al estudio. Existen variaciones de la técnica, pero se llega al resultado de obtener la concentración desconocida de la muestra problema (Ochoa Azze, 2012).

2.18.1.1 ELISA directo

Es el más simple de todos, consiste en la unión de un anticuerpo primario marcado con una enzima con el antígeno de interés, se realizan posteriormente lavados para eliminar lo que no se unió y con la adición de un sustrato que reaccione con la enzima se permite la detección de una señal colorimétrica que es medible con espectrofotometría. Por lo tanto, la cantidad de color será proporcional a la concentración del analito. Mediante esta técnica se puede eliminar la posibilidad de reactividad cruzada porque solo se añade un anticuerpo (Abbas et al., 2012).

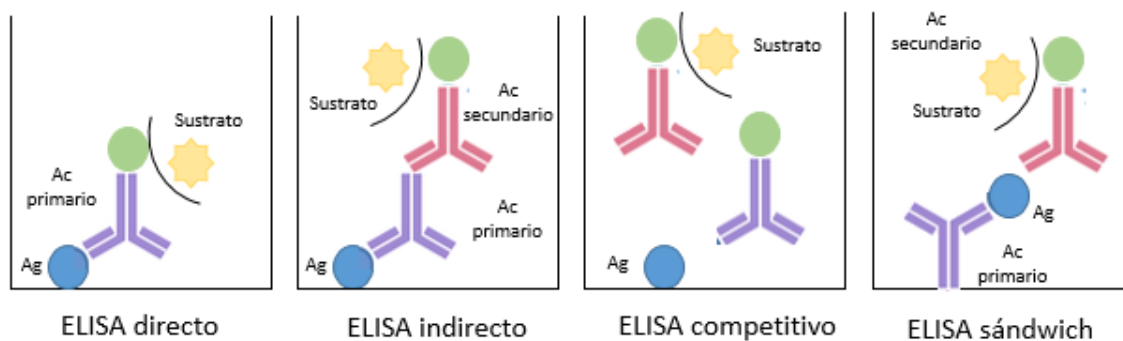


Figura 8. Esquema general de los tipos de ELISA. Requieren 3 elementos importantes: la muestra problema, un anticuerpo específico para el antígeno problema y un conjugado de enzima. Imagen realizada para este trabajo de tesis.

2.18.1.2 ELISA indirecto

Se utiliza un antígeno unido a la placa, al cual se le añade la muestra de interés que contenga el anticuerpo primario y se permite la formación del complejo en la placa. Se procede a realizar lavados para eliminar cualquier sustancia que haya quedado

libre. Después se agrega un anticuerpo secundario marcado con una enzima que reconocerá al anticuerpo primario. Se procede a realizar lavado para eliminar cualquier sustancia que haya quedado libre del paso anterior y se añade un sustrato para la enzima. La cantidad de complejo que se forme se mide por espectrofotometría. Dado que existen dos anticuerpos en este estudio, se considera más sensible que el método de ELISA directo, pero existe la posibilidad de reactividad cruzada (Kindt et al., 2007).

2.18.1.3 ELISA competitivo

En este ensayo los antígenos o anticuerpos serán inmovilizados en la placa y la unión con el conjugado-enzima, estará interrumpida por la unión con analito no marcado en la muestra. Por lo tanto, participa un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra problema para unirse al anticuerpo o antígeno que esta inmovilizado en la placa. Entonces, la concentración de la muestra problema es inversamente proporcional a la coloración (Kindt et al., 2007).

2.18.1.4 ELISA sándwich

En esta técnica el anticuerpo es el que se encuentra inmovilizado en la placa. Se añade la muestra problema y se deja reaccionar para formar inmunocomplejos que estarán inmovilizados en la placa. Se procede a realizar lavados y después se agrega un segundo anticuerpo marcado con enzima que sea específico para continuar con la reacción (Figura 7) (Ochoa Azze, 2012). Se procede a lavar y al final se añade el sustrato para producir la reacción colorimétrica medible en el espectrofotómetro. Son muy específicos gracias al uso de dos anticuerpos que capturan la muestra dando la forma de emparedado (Owen et al., 2017).

El propósito de implementar un ELISA específico, capaz de detectar niveles bajos de IgA secretora en diferentes etapas del desarrollo, permite la evaluación de metabolitos que en afecciones de la mucosa se alteran, esto proporciona métodos de apoyo para su diagnóstico y establece de los niveles de secreción fisiológico del modelo biológico de estudio (S. & V., 2012). La optimización en los procesos de

obtención y separación de proteínas totales previos a la cuantificación de la molécula de interés da la posibilidad de aprovechar al máximo muestras asociadas a patologías intestinales que son limitadas (Martínez Castro & Merino Pérez, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar los niveles de IgA secretora en la mucosa del tracto gastrointestinal del modelo aviar *G. gallus* respecto a las diferentes etapas en su desarrollo.

3.2 Particulares

- 1) Establecer un método de separación de proteínas totales de la mucosa intestinal de *G. gallus*.
- 2) Cuantificar las concentraciones de IgA secretora de la mucosa intestinal de *G. gallus* a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
- 3) Analizar el comportamiento de los niveles de IgA secretora de la mucosa en diferentes regiones del tracto gastrointestinal y etapas del desarrollo del modelo aviar *G. gallus*.

3.3 Objetivos profesionales

- 1) Desarrollar habilidades de comunicación oral y escrita en documentos de índole científica.
- 2) Adquirir capacidades técnicas en la realización y análisis de inmunoensayos con aplicación en el diagnóstico clínico.
- 3) Obtener una formación integral a través del trabajo interdisciplinario durante el proyecto de investigación.

4 METODOLOGÍA

4.1 Diseño

El diseño de este proyecto de investigación es de tipo observacional y transversal.

4.1.1 Definición del Universo

Se utilizó en el estudio el modelo aviar *G. gallus* estirpe Cobb 500, a los que se les extirpó del tracto gastrointestinal a los días 7, 14 y 35 de edad para su seccionamiento.

4.2 Tamaño de muestra

Se proporcionaron 5 aves por grupo donadas de la granja avícola de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), campus Amazcala, de los días 7, 14 y 35 de su nacimiento. Se recolectó el tracto gastrointestinal de cada uno de los animales, de manera que se obtuvieron 60 muestras para el estudio.

El tamaño de muestra se definió a partir de las secciones que conforman el tracto gastrointestinal, seleccionando el duodeno, yeyuno, íleon y ciegos (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras a recolectar por día de estudio.

Sección	Día 7	Día 14	Día 35
Duodeno	5	5	5
Yeyuno	5	5	5
Íleon	5	5	5
Ciegos	5	5	5

4.2.1 Definición de las unidades de observación

Las unidades de observación están conformadas por las regiones de los tractos gastrointestinales obtenidos y seccionados. Se definen los grupos a evaluar (Tabla 2).

Tabla 2. Definición de unidades de observación.

Unidades de observación	Definición	Unidad de medida
Día 7, 14 y 35 de nacimiento	Duodeno	Concentración de IgA secretora de la mucosa intestinal
	Yeyuno	
	Ileon	
	Ciego	

4.2.2 Grupo control

Se utilizó el estándar del kit de ELISA tipo sándwich de IgA de pollo (E33-103) de Bethyl Laboratories, Inc., cuya preparación se indica en el instructivo del kit.

4.2.3 Criterios de inclusión

Se consideró como criterio de inclusión las secciones del tracto gastrointestinal que se encuentren completas y en buen estado, correspondientes a los 7, 14 y 35 días posterior a la eclosión.

4.2.4 Criterios de exclusión

Tejido que no haya sido conservado adecuadamente a la temperatura establecida en el protocolo, que estén incompletos o dañados.

Cualquier tejido que se encuentre en estado de descomposición o que se haya contaminado por agentes externos durante su extracción.

4.2.5 Criterios de eliminación

Se consideró como criterio de eliminación cualquier tejido proveniente de aves a los cuales se les haya modificado las condiciones de crecimiento y cambios en la dieta.

4.2.6 Definición de variables y unidades de medida

Se menciona la definición, las unidades de medida y el tipo de variable (Tabla 3).

Tabla 3. Características de la variable.

Variable	Definición	Unidad de medida	Tipo de variable
Proteínas totales de mucosa intestinal	Concentración de proteína total de cada sección	µg/mL	Cuantitativa continua
IgA secretora	Concentración de IgA secretora	ng/mL	Cuantitativa continua

4.2.7 Animales

Las aves fueron donadas de la Granja Avícola de la UAQ, campus Amazcala de 7, 14 y 35 días de edad, su alimentación se basó en una dieta de sorgo-soya. Fueron trasladadas en grupos de 5 aves por contenedor hacia la Facultad de Veterinaria de la UAQ, en cajas de polietileno de alta densidad especializadas para el transporte de aves con las siguientes dimensiones: 96 cm de largo, 57 cm de ancho y 23-26 cm de altura de acuerdo a la NOM-051-ZOO-1995, trato humanitario en la movilización de animales. Las aves recibieron alimento y agua *ad libitum* durante el traslado. El alimento comercial se rigió bajo los lineamientos del Nutrient Requirements of Poultry: 10th Revised Edition, National Research Council. Posteriormente el MVZ responsable de la unidad de necropsia procedió a sacrificarlas por el método de dislocación cervical en un periodo máximo a 1 hora de llegada de su traslado a la Facultad de Veterinaria, realizó cortes con el fin de exponer el tracto gastrointestinal y lo removió con cuidado para no dañar el tejido.

El manejo y eutanasia de las aves se realizó solo por el MVZ responsable capacitado para llevar a cabo el proceso con el mayor cuidado posible de acuerdo a la NOM-033-SAG/ZOO-2014, métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres y a la NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

4.3 Establecimiento de un método de separación y cuantificación de proteínas totales de la mucosa intestinal de *G. gallus*.

4.3.1 Muestras

Con la finalidad de aumentar la cantidad de proteínas totales de las muestras de mucosa intestinal, se estandarizó un método de separación de proteínas que permitiera la detección y cuantificación de IgA secretora. Para ello, se obtuvieron los tractos gastrointestinales completos y se realizó la disección del duodeno, yeyuno, íleon y ciegos, identificados con base a sus características morfológicas (Figura 10). De cada región se obtuvo una sección aproximada de 10 cm, se les limpió con solución salina para remover el contenido intestinal y se les abrió por la mitad de forma longitudinal raspando la mucosa intestinal con una espátula estéril, depositándose en microtubos etiquetados (Gomez-Verduzco et al., 2009). La obtención de las muestras correspondió a los días 7, 14 y 35 posterior al nacimiento de las aves y se mantuvieron en hielo seco durante todo el proceso de recolección, siendo finalmente almacenados a -20 °C para su procesamiento. El tamaño de muestra fue seleccionado con base en estudios previos donde se han reportado valores y variaciones fisiológicas de este analito (Husáková et al., 2015).

4.3.2 Disposición de residuos

Al finalizar la extracción los residuos patológicos fueron envasados en bolsa de polietileno de color amarillo con la leyenda correspondiente de "residuos peligrosos" como lo indica la NOM-087-SEMARNAT-2002 en el apartado 6.2 identificación y envasado. Los residuos se almacenaron a -20 °C evitando su degradación para su disposición final. Los tejidos no utilizados en este trabajo se donarán a otras investigaciones con el fin de aprovechar al máximo el ave.

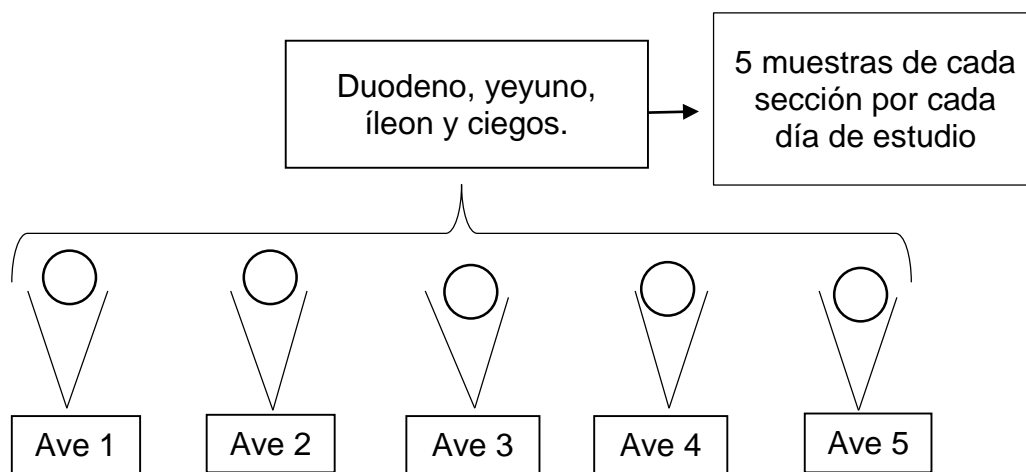


Figura 9. Diagrama de separación de proteínas. Se obtuvo la mucosa de duodeno, yeyuno, íleon y ciegos de 5 aves por cada día de estudio, teniendo un total de 60 muestras.

4.4 Separación de proteínas

La separación de proteínas se optimizó tomando como base a lo reportado por Gómez-Verduzco y cols. (2009), Bi y cols. (2020) y lo señalado en el manual del kit de ELISA de IgA de pollo (ECH0083) de Wuhan Fine Biotech Co., Ltd. Se modificaron los parámetros de cantidad de muestra a utilizar, tiempo de homogenizado, tiempo y velocidad de centrifugación, manteniendo una temperatura de 4 °C con el fin de obtener la mayor cantidad de proteínas totales de la mucosa intestinal. Se obtuvo el sobrenadante, el cual se recolectó para utilizarse al momento o en caso de no realizar la cuantificación de proteínas de inmediato se almacenó a -20° C para su posterior procesamiento evitando la degradación de la muestra.

4.4.1 Cuantificación de proteínas totales

Para conocer la concentración de proteínas totales de la mucosa de las muestras, se utilizó el método de Bradford. Los reactivos, así como la cuantificación se realizaron de acuerdo al manual de usuario de "Ensayo de proteínas" de la casa comercial Bio-rad. Se utilizó como estándar suero de albúmina bovina de 2 mg/mL del cual se generaron en 7 tubos, rotulados del 2 al 8 incluyendo el blanco. Cada tubo tendrá

una concentración final de proteína diferente en $\mu\text{g}/\text{mL}$ como se observa en la Tabla 4. Las mediciones se tomaron como base para realizar una curva estándar. Se pipetearon 5 μL de cada muestra de estándar y las soluciones problema de proteína provenientes de las secciones del tracto gastrointestinal (duodeno, yeyuno, íleon y ciegos) en diferentes pocillos de una microplaca.

Tabla 4. Concentraciones de estándar para proteínas totales.

No. de tubo	Estándar volumen (μL)	Fuente de estándar	Volumen diluyente (μL)	[Proteína] final ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	20	2 mg / mL de stock	0	2000
2	30	2 mg / mL de stock	10	1500
3	20	2 mg / mL de stock	20	1000
4	20	Tubo 2	20	750
5	20	Tubo 4	20	500
6	20	Tubo 5	20	250
7	20	Tubo 6	20	125
8 (blanco)	-	-	20	0

Se añadieron 250 μL reactivo de Bradford 1X en cada pocillo y se agitó la placa con un mezclador durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la absorbancia del complejo formado a 595 nm en un lector de microplacas Multiscan GO. Se realizó la curva estándar trazando las concentraciones conocidas de proteína en el eje (X) versus las absorbancias promedio en el eje (Y), y con la ecuación de la curva se interpolaron los datos de las muestras problema para conocer su concentración real. Todas las mediciones se realizaron por triplicado (Bio-Rad, 2017).

4.5 Cuantificación de las concentraciones de IgA secretora en la mucosa intestinal de *G. gallus* a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

4.5.1 Cuantificación de IgA secretora por el método de ELISA

Con el fin de evaluar los niveles de IgA secretora, a partir de los extractos de proteína obtenidos, se cuantificó por medio del kit de ELISA de tipo sándwich de IgA de pollo (E33-103) de Bethyl Laboratories, Inc. El método se realizó con base a las especificaciones del instructivo por duplicado. Se etiquetaron 8 tubos Eppendorf con la leyenda 1000, 333, 111, 37, 12.3, 4.1, 1.37 y 0 para la curva de calibración (Tabla 5). Se colocaron 300 μ L de solución estándar patrón (1000 ng/mL) en el primer tubo. Se añadieron 300 μ L de tampón de dilución B 1X del tubo 2 en adelante. Posteriormente se tomaron 150 μ L de la solución estándar patrón al segundo tubo (333) y se mezclaron bien. Se continuó la dilución transfiriendo 150 μ L del tubo rotulado con 333 al tubo (111), se mezcló bien y así sucesivamente hasta el tubo correspondiente a 1.37, el tubo rotulado con 0 contenía solamente 300 μ L del tampón de dilución B 1X y sirvió como blanco del ensayo.

Se tomaron alícuotas de 100 μ L de todos los tubos para la curva, el blanco y las muestras problema y se depositaron cada una en un pocillo, anotando sus posiciones para llevar orden. Se cubrió la placa con una hoja adhesiva y se incubó a temperatura ambiente (20-25 °C) por 1 hora. Se desechó el contenido de la placa retirando la cubierta adhesiva y se hicieron 4 lavados con tampón de lavado 1X. Se agregaron 100 μ L de anticuerpo de detección de IgA de pollo sin tocar los laterales de los pocillos y mezclando suavemente la placa, se colocó una placa adhesiva y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora.

Se procedió a retirar la cubierta adhesiva y se lavó 4 veces con tampón de lavado 1X procurando que la placa no se seque. Se añadieron 100 μ L de solución A de HRP (conjugado de HRP-estreptavidina) en cada pocillo, se cubrió la placa e incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se retiró la cubierta adhesiva para desechar el contenido y se lavó 4 veces con tampón de lavado 1X. Se agregaron 100 μ L de sustrato TMB a cada pocillo evitando utilizar pipetas de vidrio y sin cubrir la placa, se incubó en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente.

Tabla 5. Concentraciones de estándar de IgA.

Tubo	Estándar volumen (μL)	Fuente de estándar	Tampón de dilución B 1X (μL)	Concentración de IgA (ng/mL)
1	300	estándar (1000 ng/mL)	-	1000
2	150	estándar (1000 ng/mL)	300	333
3	150	Tubo 2	300	111
4	150	Tubo 3	300	37
5	150	Tubo 4	300	12.3
6	150	Tubo 5	300	4.1
7	150	Tubo 6	300	1.37
8	-	-	300	0

Se añadieron 100 μL de solución de parada en cada pocillo. El color cambió a amarillo. Se leyó la absorbancia a 450 nm en el lector de microplacas Multiscan GO antes de 30 min. Se preparó la curva estándar trazando la absorbancia promedio de cada concentración de estándar en el eje (Y) y las concentraciones conocidas de IgA en el eje (X) y se interpolaron los datos del método para conocer la concentración de IgA secretora de las muestras problema de cada sección del tracto gastrointestinal. La muestra se multiplicó por el factor de dilución. Los valores de IgA se normalizaron con base a mg de proteínas totales (Bethyl Laboratories, n.d.).

4.6 Análisis del comportamiento de los niveles de IgA secretora de la mucosa en diferentes regiones del tracto gastrointestinal y etapas del desarrollo del modelo aviar *G. gallus*.

Para conocer el comportamiento de los niveles de IgA secretora con respecto a la edad y región intestinal del modelo aviar *G. gallus*. se utilizó la metodología descrita en el apartado 4.5.1.

4.6.1 Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos por medio de ANOVA con intervalos de confianza del 95% ($P < 0.05$), donde se compararon los niveles de IgA secretora en las secciones del tracto gastrointestinal de las aves, en los diferentes días de nacimiento y su posterior análisis por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

4.7 Diseño experimental

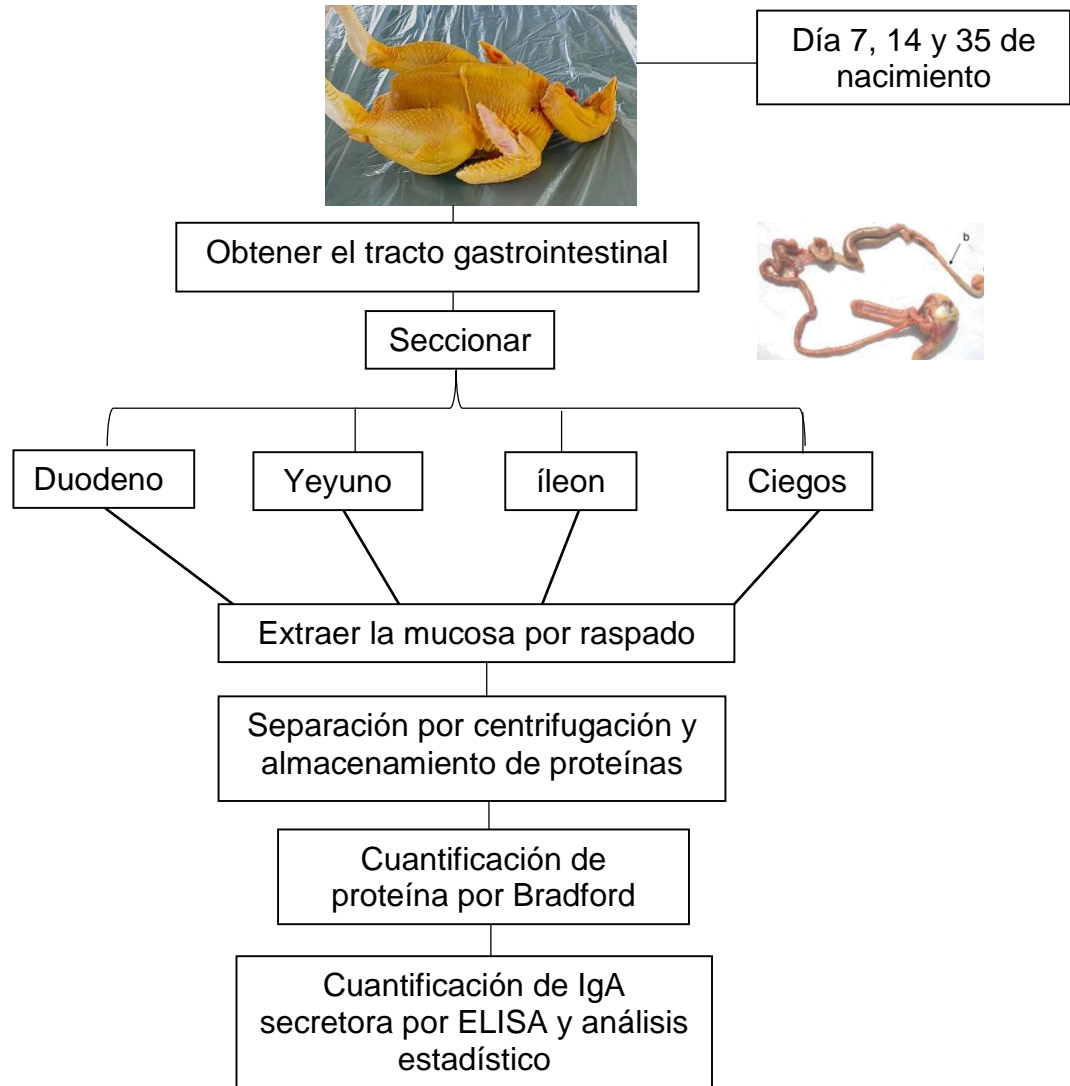


Figura 10. Diseño experimental. Se muestran los pasos a seguir en la metodología del trabajo de investigación desde la obtención de la muestra, su seccionamiento y cuantificación por Bradford, además de la medición de IgA secretora por ELISA.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Establecimiento de condiciones de separación y cuantificación de proteínas totales en mucosa del tracto intestinal de *G. gallus*

El intestino delgado y grueso del tracto gastrointestinal en *G. gallus* constituye una de las zonas más importantes donde se llevan a cabo los procesos de digestión y absorción de nutrientes (J. Li et al., 2017). Después de la eclosión, el ave se enfrenta a diversos agentes externos que influyen en la formación de su microbiota, incluyendo la interacción con microorganismos patógenos. Es aquí donde el tracto intestinal adquiere mayor interés al brindar mecanismos innatos y adaptativos de protección contra la entrada de agentes extraños, a través de elementos como los RRP's, células inmunológicas, citocinas, péptidos antimicrobianos e Igs. Esta barrera puede alterarse por la exposición de patógenos, aglomeración, privación de alimento, cambios en el entorno y transportación, generando periodos de estrés y la susceptibilidad a adquirir infecciones (Fu et al., 2022). En este contexto, el desarrollo de un SI eficaz es vital para la supervivencia, crecimiento y mantenimiento de la actividad productora del ave (Zhang et al., 2019), por lo tanto, en este trabajo de tesis se propuso evaluar la IgA secretora, que desempeña un papel activo en el reconocimiento de microorganismos en las mucosas y que es predominante en este tejido.

Investigaciones previas como la llevada a cabo por Lv y cols., (2021) con aves machos amarillos, Fu y cols., (2022) con gallinas ponedoras Dekalb White, Rahman y cols., (2015) en gallinas ponedoras White Leghorn y H. Chen & Schifferli, (2000) en aves machos White Leghorn, han explorado la acción de esta Ig empleando muestras de mucosa de duodeno, yeyuno e íleon, así como mediante lavados intestinales. Otros como Merino-Guzmán y cols., en el 2017 y Bi y cols., en el 2020 evaluaron hisopados cloacales, centrándose en áreas específicas en pollos machos White Leghorn y pollos machos White Roman respectivamente (Bi et al., 2020; Merino-Guzmán et al., 2017). Basándose en estos antecedentes y con el objetivo de llevar a cabo un estudio que abarcara tanto intestino delgado como grueso, se realizó la extracción del duodeno, yeyuno, íleon y ciegos de *G. gallus* a los días 7, 14 y 35

posterior a su eclosión, tomando como referencia el proceso de separación de proteínas reportado por Gómez-Verduzco y cols., (2009), permitiendo la medición de esta Ig conforme al crecimiento del ave y su exposición natural con antígenos.

Primeramente, se identificaron las secciones de intestino anteriormente mencionadas con base a sus características morfológicas distintivas. El duodeno, que marca el inicio del tracto intestinal es un segmento corto colindante con el páncreas, órgano que sirvió para identificar la zona (S. Kong et al., 2018). El yeyuno, situado en la sección media del intestino, se distingue por la presencia de una estructura en forma de saco llamada divertículo de Meckel que sirvió como referencia para identificar el final del yeyuno y el inicio del íleon (Gómez et al., 2010). Conforme el ave crece este saco disminuye su tamaño, sin embargo, en todos los animales de estudio se mantuvo presente esta estructura, facilitando su identificación. Por último, los ciegos son dos proyecciones que sobresalen del tracto principal y pueden ser fácilmente localizados, esta zona cuenta con una gran colonización bacteriana (J. Liu et al., 2021). Una vez identificadas, se procedió al seccionamiento de fragmentos de aproximadamente 10 cm por zona, se cortaron de forma longitudinal y se lavaron con solución salina con la finalidad de retirar el contenido intestinal que podía causar interferencia en el estudio, debido a que esta contiene enzimas tanto digestivas como de microorganismos que aceleran la degradación hacia moléculas más pequeñas (Fu et al., 2022; Merino-Guzmán et al., 2017). Durante el proceso de recolección, a las muestras se les dio un código único de identificación y se depositaron en hielo seco para mantener la integridad de las proteínas y desacelerar el proceso de degradación proteica por parte de las proteasas bajo efectos del aumento de temperatura (Jannet Iwasa, 2019). Al término se almacenaron a -20 °C minimizando en la medida de lo posible la degradación de las proteínas para su posterior separación y cuantificación. La determinación de la concentración de proteínas se emplea en diversas aplicaciones, como la evaluación de su actividad durante procesos fisiológicos, el diagnóstico de enfermedades cuando sufren alteraciones, para conocer sus características fisicoquímicas, entre otras (Tan & Yiap, 2009). La centrifugación es el procedimiento que permite la separación efectiva de los

componentes que conforman una muestra, utilizando la fuerza de gravedad para aislar las partículas con base a su peso y solubilidad (Lippi et al., 2007). Siendo posible la separación de proteínas de un homogenizado como la mucosa a través del proceso de centrifugación, en este trabajo se planteó la optimización de las condiciones que nos permitieran obtener una apropiada cantidad de proteínas totales. Para cumplir con el primer objetivo del trabajo de tesis, se realizó una búsqueda bibliográfica con la finalidad de obtener un método que permitiera la adecuada separación y cuantificación de proteínas totales como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de separación encontradas en bibliografía

Autores	Muestras	Procesamiento	Condición de separación
(Gomez-Verduzco et al., 2009)	Muestras de duodeno y tráquea	Lavados con PBS y recolección con hisopos.	Centrifugación a 1,200 g, resguardo a -20 °C.
(Husáková et al., 2015)	Muestras de íleon y yeyuno	Se mezcló con buffer de lavado.	Centrifugación de las muestras a 12,000 g por 5 min.
(Merino-Guzmán et al., 2017)	Hisopados traqueales, salivales y de cloaca	Se guardaron en viales con solución salina.	Centrifugación de las muestras a 3000 rpm por 10 min a 4 °C.
(Bi et al., 2020)	Hisopados fecales	Se mezcló con buffer de lavado.	Centrifugación de las muestras a 2,000 rpm por 10 min.
(Yang et al., 2021)	Muestras de yeyuno	Se lavaron con de PBS por tres veces.	Se centrifugó a 10,950 g a 4 °C durante 10 min.
(Guerrini et al.)	Hisopos	Se les agregó PBS y	Se centrifugó a 1,500 g

al., 2022)	cloacales	Tween 20.	durante 10 min a 4 °C
(Y. Liu et al., 2022)	Muestras de mucosa yeyunal e íleal	Se les lavó con PBS frío.	Centrifugación a 2,000 g por 10 min a 4 °C

Al observar gran variabilidad de condiciones de separación, se propuso tomar de referencia lo reportado en: 1) Gómez-Verduzco y cols., (2009), quienes evaluaron IgA secretora aclarando sus muestras con PBS frío y estéril a 1200 g, 2) Bi y cols., (2020), que centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min y finalmente 3) lo señalado en el manual del kit de ELISA de IgA de pollo (ECH0083) de Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., cuyo procedimiento indica centrifugar la muestra por 20 min a 1000 g, entre 2-8 °C (Yang et al., 2021).

Con lo anterior, se planteó la realización de un ensayo preliminar utilizando aves obtenidas del mercado para conocer la anatomía, familiarizarse con la obtención de la mucosa y en cómo hacer la disección. En esta evaluación se tomaron 100 mg de mucosa de duodeno, yeyuno, íleon y ciegos. Se les agregó 500 µL de PBS estéril frío para simular el medio fisiológico, evitando cambios de pH y de osmolaridad que afecten la muestra (Laboratorio de Genómica Viral y Humana, 2008). Además, se homogenizó por 1.5 min mezclando en vórtex para formar una sola fase en el tubo, permitiendo la suspensión completa de la muestra. Luego se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4 °C, para separar las proteínas totales en función del tamaño de las partículas, empujando los componentes más densos como células hacia abajo en el precipitado y los componentes solubles en medio acuoso como las proteínas se quedan en el sobrenadante (Tan & Yiap, 2009). Se hicieron diluciones 1:10 de los sobrenadantes para su cuantificación, obteniendo como resultado concentraciones proteicas de 9493 µg/mL en duodeno, 4076 µg/mL en yeyuno, 4443.3 µg/mL en íleon y 5193.3 µg/mL en ciego respectivamente. Es importante destacar que en estos ensayos preliminares se utilizaron aves comerciales de las que se desconocían condiciones de crecimiento, esquema de vacunación y que dieta recibían, por lo que podrían generar variaciones en el análisis.

Además, por la escasa cantidad de muestra con la que se contaba en el momento, solo se realizó una única medición. Esto podría generar errores por falta de precisión en el pipeteo, errores del usuario y el justificar si el resultado es representativo en la población. Debido a la dificultad en el homogenizado de las muestras por su diferente viscosidad, se realizaron pruebas hasta obtener sobrenadantes más clarificados, demostrando que el ajuste de estas condiciones generó un incremento en la cantidad de proteínas cuantificadas mediante el método de Bradford como se observa en la Tabla 7, destacando que para la condición 3, se había realizado otra recolección de muestras de un ave comercial y para ese momento ya no se contaba con suficiente muestra de ciego.

Tabla 7. Concentración de proteínas totales bajo condiciones evaluadas en ensayos preliminares

Parámetros	Condiciones		
	1	2	3
miligramos	100 mg	100 mg	100 mg
Velocidad	2000 rpm	3500 rpm	5000 rpm
Tiempo	20 min	20 min	20 min
T	4 °C	4 °C	4 °C
Vórtex	2 min	2 min	2 min
Concentración de proteínas totales			
Duodeno	9440.6 µg/mL	12426 µg/mL	12911.11 µg/mL
Yeyuno	9114 µg/mL	10886 µg/mL	9388.89 µg/mL
Íleon	5380.6 µg/mL	11812.66 µg/mL	5700 µg/mL
Ciego	1154 µg/mL	2372.66 µg/mL	*

Evaluaciones realizadas en una única medición. * No se contó con muestra de esta área.

Posteriormente se tuvo acceso a tractos gastrointestinales cortados de 20 aves provenientes de una granja de explotación comercial ubicada en Querétaro, cuyas condiciones de crecimiento son más controladas por las normativas industriales, permitiendo la posibilidad de repetir ensayos y de realizar análisis por triplicado para mejor precisión de los datos. Los intestinos donados no contaban con ciegos, por lo que no se realizó su cuantificación. A partir de aquí, se generaron pools de mucosa tomando todas las muestras de una sección identificada. Se hicieron pruebas por triplicado, recolectando 20 mg de mucosa con la finalidad de tener muestra de reserva para realizar más estudios y observar si la disminución en la cantidad usada afectaba la concentración proteica. Algunos autores como Guerrini y cols., (2022); Merino-Guzmán y cols., (2017) mezclaron en vórtex durante 5 s y 10 s sus muestras de mucosa, previo al proceso de separación, de igual manera H. Chen & Schifferli, (2000) mezclaron el contenido intestinal durante 5 min para evaluarla. En este contexto, al observar la viscosidad de cada sección se optó por aumentar el tiempo a 2 min para cada tubo, así se aseguraba un contenido más uniforme sin visualización de las fases. Se realizaron modificaciones en la velocidad y tiempo de centrifugado, con el objetivo de acercarse a las señaladas en Tabla 6 para determinar cuáles condiciones proporcionaban una mayor cantidad de proteínas totales en la mucosa intestinal de *G. gallus*. Los resultados de estas evaluaciones se muestran en la Tabla 8.

El duodeno destacó como la zona con mayor cantidad de proteínas totales durante los ensayos, seguido del yeyuno y por último el íleon. Con lo anterior, se observó que las condiciones 4, 5 y 6 generaban sobrenadantes más clarificados y resultados de proteínas totales similares entre ellas (Figura 11). Por lo tanto, se llevó a cabo un análisis estadístico que las evaluara, ya que estas se acercaban más a las condiciones revisadas en Gomez-Verduzco y cols., (2009) y Guerrini y cols., (2022) que trabajaron a 2000 y 1500 g respectivamente. Para ello, se realizó una prueba de ANOVA con 95% de confiabilidad ($P < 0.05$) en el programa GraphPad Prism 8.0.2. Los resultados de la prueba revelaron que no existen diferencias significativas entre los valores contenidos de las condiciones de 3500, 5000 y 7500 rpm ($P = 0.2952$).

Con base en los resultados del análisis estadístico, se identificó la condición 5 como la más idónea para trabajar con las muestras para el ensayo final, véase Tabla 8.

Tabla 8. Concentración de proteínas totales de duodeno, yeyuno e íleon en diferentes condiciones evaluadas

Parámetros	Condiciones		
	4	5	6
miligramos	20 mg	20 mg	20 mg
Velocidad	3500 rpm	5000 rpm	7500 rpm
Tiempo	20 min	20 min	20 min
T	4 °C	4 °C	4 °C
Vórtex	2 min	2 min	2 min
Concentración de proteínas totales			
Duodeno	12581.11 µg/mL ± 1627.19	14267.77 µg/mL ± 3064.08	12034.44 µg/mL ± 862.02
Yeyuno	11429.25 µg/mL ± 1077.39	12982.59 µg/mL ± 1789.45	11333.67 µg/mL ± 767.63
Íleon	11347.77 µg/mL ± 2490.74	11867.77 µg/mL ± 878.34	12918.15 µg/mL ± 901.46

Muestras analizadas por triplicado

Todas las pruebas se hacían de manera inmediata, llevando a cabo tanto la separación como la cuantificación de proteínas totales en el mismo día. No obstante, como los animales de estudio abarcaban distintos rangos de edad, había que almacenar la mucosa a -20 °C para la posterior cuantificación de proteínas. Por ello, como prevención, se optó por emplear inhibidores de proteasas con el fin de preservar la muestra por más tiempo.

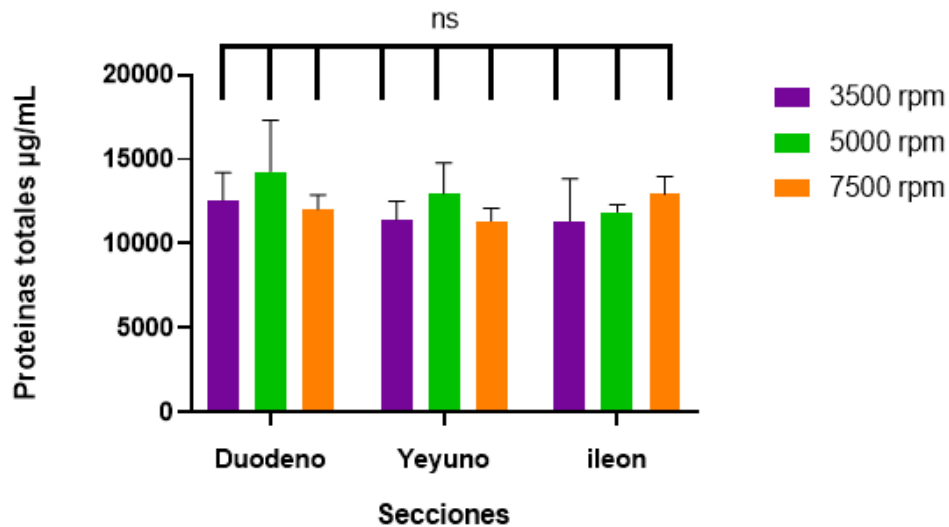


Figura 11. Concentración de proteínas totales por sección a diferentes condiciones. Las barras moradas reflejan los resultados de duodeno, yeyuno e íleon en la condición 4; las barras verdes los resultados de duodeno, yeyuno e íleon en la condición 5 y las barras naranjas resultados de cada sección en la condición 6, todas las muestras analizadas por triplicado. Los resultados de la prueba de ANOVA revelaron que no existían diferencias significativas (ns) en ninguna de las condiciones representadas ($P= 0.2952$).

5.1.1 Evaluación de proteínas totales en la mucosa con base en el uso del inhibidor de proteasas y el tiempo de almacenamiento

En el tracto gastrointestinal abundan las proteasas, cuya función es hidrolizar a las proteínas que llegan al intestino para ser absorbidas como nutrientes (Peña Montes & Quirasco Baruth, 2014). Las enzimas pancreáticas desempeñan un papel crucial en la hidrólisis de los enlaces peptídicos en el intestino, siendo las proteasas de serina y cisteína muy relevantes durante los procesos de absorción en el intestino delgado. Entre ellas se encuentra la tripsina, quimotripsina, elastasa, papaína, etc. Como ejemplo, la tripsina actúa escindiendo enlaces peptídicos en el grupo carboxilo de lisina o arginina, mientras que la quimotripsina se encarga de hidrolizar enlaces

de aminoácidos aromáticos. También están las cisteinproteasas, que catalizan la hidrólisis de enlaces presentes en residuos de histidina de las proteínas (Ordoñez et al., 2018; Sastre & Sabater, 2005).

Un elemento que caracteriza a la IgA secretora es el componente secretor adquirido a través de la transcitosis epitelial, lo cual le confiere protección contra la degradación de las proteasas en el medio intestinal y resistencia a los cambios de pH, esto le permite cruzar al lumen donde tendrá contacto con los agentes extraños (K. Chen et al., 2020). No obstante, durante la revisión bibliográfica realizada Wyszyńska y cols., 2004, extrajo anticuerpos de muestras intestinales utilizando una solución de PBS con Tween 20, inhibidor de tripsina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF. También Rahman y cols. en el 2015 trató sus muestras mucosa duodenal con BSA/PBS frío añadiendo inhibidor de tripsina de soja. Como se observó discrepancias entre el uso de inhibidores de proteasas para conservar su muestra, se optó por evaluar un cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA de Roche, cuya función está en inhibir la acción de las serinproteasas y cisteinproteasas. La finalidad de estos ensayos fue observar si el cóctel podría proteger las proteínas totales y disminuir su degradación en las muestras, incluyéndolo en el estudio.

Se propuso realizar el ensayo con muestras identificadas de duodeno, yeyuno e íleon de aves provenientes de la granja de explotación comercial. Estas se dividieron en dos grupos sometidos a la condición 5 (Tabla 8), el primero utilizando muestras con inhibidor y el segundo sin inhibidor de proteasas. Luego de la centrifugación, se recolectó el sobrenadante de cada una y se realizaron diluciones 1:10 para cuantificarlas mediante el método de Bradford (ver apartado 4.4.1). Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C, evaluándose posteriormente a 45 días para determinar si el inhibidor de proteasas proporcionaba protección contra los efectos de la descongelación repetida, las muestras se evaluaron por triplicado. Se calcularon los promedios de los datos con desviación estándar como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Cuantificación de proteínas totales en duodeno, yeyuno e íleon a diferentes días de almacenamiento con el uso de inhibidor de proteasas.

Parámetros		Tiempo			
Condición	Sección	Día 0		Día 45	
		ci	si	ci	si
20 mg 5000 rpm 20 min 4 °C 2 min	D	13049.26 µg/mL ± 2961.11	14267.78 µg/mL ± 3064.08	13637.78 µg/mL ± 5705.63	4941.48 µg/mL ± 1284.20
	Y	12049.26 µg/mL ± 756.21	12982.59 µg/mL ± 1789.45	10582.22 µg/mL ± 898.63	5600.74 µg/mL ± 1235.0
	I	11390.00 µg/mL ± 878.34	11867.78 µg/mL ± 443.19	11060.00 µg/mL ± 901.46	6378.52 µg/mL ± 1303.38

D: duodeno, Y: yeyuno, I: íleon; ci: con inhibidor, si: sin inhibidor; muestras analizadas por triplicado

Se realizó un ANOVA como prueba estadística utilizando el programa GraphPad Prism 8.0.2 y considerando un valor de confianza al 95% ($P < 0.05$). En la Figura 12 se observa que, al evaluar las secciones intestinales en una primera vez, en el día 0 (con inhibidor y sin inhibidor) no se registra diferencias significativas, presentando valores similares entre ellos. No obstante, al paso de 45 días y con el repetido descongelamiento de las muestras, se observa una notable diferencia significativa con más del 50% de reducción de proteína total ($P < 0.0001$), sugiriendo que el inhibidor de proteasas desempeña de manera efectiva la función de retardar el proceso de degradación de las muestras y genera resultados más confiables al contrarrestar la actividad enzimática. En el intestino principalmente se encuentran las proteasas como tripsina, quimotripsina y elastasa, las cuales son liberadas por el páncreas para acelerar el proceso de descomposición de proteínas a unidades más pequeñas como péptidos y aminoácidos, esto en términos fisiológicos aseguran la adecuada digestión y absorción de los nutrientes (Brunser et al., 2016; Reiriz P.,

2016), pero para fines de este trabajo, el uso de inhibidor de proteasas proporcionó un enfoque más cuidadoso al mantener la integridad de los sobrenadantes durante un tiempo de almacenamiento a largo plazo. Por esto, se agregó inhibidor de proteasas a todas las muestras de estudio.

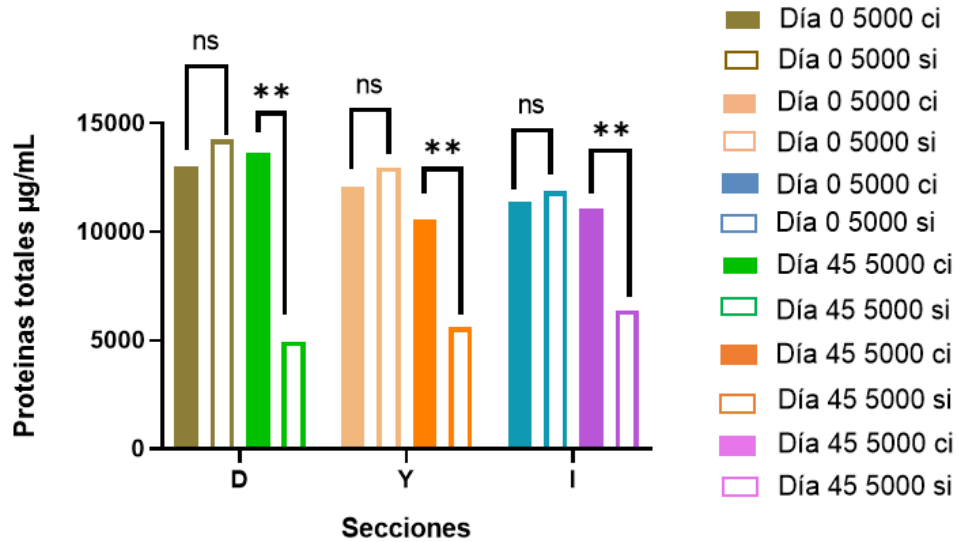


Figura 12. Proteínas totales de duodeno, yeyuno e íleon usando inhibidor y tiempo de almacenamiento. El color marrón corresponde al duodeno, el beige al yeyuno y el color azul al íleon medidos al día 0 con inhibidor, mientras que las barras delineadas indican la ausencia de inhibidor. Del mismo modo el color verde corresponde al duodeno, el naranja al yeyuno y lila al íleon al día 45 con inhibidor y su respectivo delineado sin inhibidor de proteasas. Puede observarse una disminución significativa de proteínas al día 45 en las muestras sin inhibidor ($P < 0.0001$). No se presentó diferencia significativa (ns) en las muestras evaluadas con y sin inhibidor de proteasas al día 0.

5.1.2 Cuantificación de proteínas totales de las muestras de estudio

Una vez obtenidas las condiciones idóneas de ensayo, se procedió a recolectar las muestras de estudio tomando tractos gastrointestinales de 15 aves en total, 5 de cada día (7, 14 y 35). A estas se les aplicó la eutanasia por medio de dislocación cervical realizado por un MVZ. Siguiendo el procedimiento de los apartados (4.3-

4.4), se realizó la disección y recolección de muestras de duodeno, yeyuno, íleon y ciegos, utilizando hielo seco para preservarlas y obteniendo un total de 60 secciones. Conforme se entregaban las aves, se les aplicaban las condiciones elegidas para obtener el sobrenadante: se pesaron 20 mg de mucosa de cada sección, se agregaron 100 μ L del cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA de Roche en cada tubo, se les aplicó un homogenizado de 2 min y se procedió a centrifugar a 5000 rpm, durante 20 min a 4 °C, procurando tener las muestras en hielo durante los ensayos. Una vez obtenidos los sobrenadantes se realizaron las cuantificaciones de proteínas totales por triplicado, utilizando el método de Bradford descrito en la metodología (4.4.1).

Se calcularon promedio y desviación estándar. Se realizaron pruebas estadísticas con ANOVA, utilizando el programa GraphPad Prism 8.0.2 y con un nivel de confianza al 95 % ($P < 0.05$). Los resultados de duodeno se observan en la Tabla 10. Se encontró diferencia significativa entre las proteínas totales de las aves de 7 y 14 días ($P = 0.0064$), mientras que los valores del día 14 y 35 no mostraron diferencias entre sí ($P = 0.2175$). Los datos se ven representados en la Figura 13. Para los valores de proteínas totales en yeyuno (Tabla 11) se encontró diferencia significativa en todos los días, 7 y 14 ($P = 0.0029$), 14 y 35 ($P = 0.0020$), resaltando un mayor aumento de proteínas totales entre el día 7 y 35 ($P < 0.0001$), esto se puede ver representado en la Figura 14 respecto a la edad. Para la cuantificación de las proteínas en íleon se encontró una diferencia significativa marcada entre el día 7 y 35 posterior al nacimiento de las aves ($P = 0.0407$) y entre el día 14 y 35 ($P = 0.0011$) (Tabla 12) (Figura 15). Cabe resaltar que, para el ciego, la diferencia se presentó también entre los días 7 y 14 ($P = 0.0365$) y días 7 y 35 ($P = 0.0019$), mientras que, entre el día 14 y 35 no se observó (Tabla 13), esto se aprecia en la Figura 16. Del mismo modo se realizaron en las Figuras 17, 18 y 19 con el fin de representar los valores de proteínas totales entra cada sección por cada día de estudio individual.

Durante las primeras semanas de vida, el tracto gastrointestinal del ave es inmaduro y obtiene los nutrientes a través del saco vitelino antes de la eclosión. Con el paso

del tiempo, se producen cambios morfológicos significativos en el tracto, esto le permite adaptarse a la transición del alimento y al contacto con el medio ambiente, lo que favorece el desarrollo del SI (Sklan & Noy, 2000). Inicialmente, las vellosidades intestinales son más cortas y se encuentran en menor cantidad, lo que limita el acceso de los nutrientes. Aunado a eso, a pesar de que ya cuentan con enzimas digestivas, estas tienen actividad limitada y se vuelven más activas con el paso del tiempo al adaptarse a los cambios de la dieta (Bassi et al., 2023). La secreción de enzimas va en aumento durante las primeras 3 semanas después de la eclosión del ave (Noy & Sklan, 1994). Es por eso que los intestinos muestreados en el día 7 tienen una cantidad de proteína total menor. Con el paso de los días, su adaptación al cambio de entorno y de alimento, propician el desarrollo intestinal y a la mejora en absorción de nutrientes, siendo las aves de 35 días las que cuentan con una cantidad de proteínas totales mayor. El tracto gastrointestinal de un ave madura es por completo funcional y tiene mayor superficie de absorción. Sus vellosidades son más largas en comparación con los primeros días, esta superficie se extiende por todo el intestino delgado y va disminuyendo el número de vellosidades, hasta llegar a los ciegos que carecen de estas (Cervantes, 2019). Según Menocal & López (2020), las microvellosidades en el duodeno alcanzan un mayor volumen a los 4 días de edad, mientras que el yeyuno e íleon llegan a punto a los 10 días y funcionan de manera más eficiente para satisfacer las necesidades nutricionales (Lamot et al., 2019; Sanz et al., 2016). En el estudio, el duodeno destacó con mayor cantidad de proteínas totales, mostrando diferencias significativas elevadas hacia las demás secciones a los 7 días (Figura 17) y cuya tendencia va disminuyendo conforme el ave crece (Figura 18), siendo menos significativo a los 35 días (Figura 19), donde los valores de proteínas totales siguen patrones similares en todas las secciones. Esto puede deberse a la gran carga microbiana que contiene un ave madura, esta le proporciona la digestión de moléculas que no puede digerir y la liberación de metabolitos que ya pueden ser asimilables por el ave (Kogut et al., 2020).

El intestino delgado constituye el sitio principal para la absorción de péptidos y aminoácidos, mientras que en el intestino grueso esto puede ser insignificante,

viéndose reflejado en que el ciego de las aves de estudio contiene menor cantidad de proteínas totales en comparación con las otras secciones, siendo predominante en el duodeno las proteínas provenientes del bolo alimenticio (C. Kong et al., 2014). Podría sugerirse que las proteínas encontradas en las otras zonas, más allá del proceso de absorción, son las que forman parte de la barrera de protección como mucina, péptidos antimicrobianos y enzimas (Adeola et al., 2016). Dado que muchos factores como las condiciones de crianza, la calidad de la dieta, el contacto con otras aves en el galpón y la propia genética, pueden afectar el desarrollo de las aves, el esquema de alimentación es primordial. Este se centra en el crecimiento rápido en los primeros días, a la ganancia muscular y desarrollo óseo durante los días 11 a 24 y a alcanzar el objetivo de peso y acumulación de carne en las últimas semanas de vida previas a su cosecha (Potosí Mite, 2023).

Tabla 10. Cuantificación de proteínas totales en duodeno respecto a la edad

Días	7	14	35	Significancia
Muestra	promedio µg/mL	promedio µg/mL	promedio µg/mL	Valor de P
P1	8686.30 ± 666.33	10107.78 ± 619.54	9917.41 ± 1702.37	7 vs 14 (P= 0.0064)
P2	7682.22 ± 2156.47	9605.56 ± 1020.53	10332.22 ± 989.01	
P3	8318.89 ± 596.60	10655.93 ± 959.06	8325.56 ± 661.932	7 vs 35 (P= 0.1450)
P4	9156.67 ± 542.40	11311.48 ± 1283.05	9843.33 ± 1612.91	
P5	9201.11 ± 767.63	12681.85 ± 710.62	10670.0 ± 458.26	14 vs 35 (P= 0.2175)
Prom global	8609.04 ± 632.375	10872.52 ± 1194.080	9817.70 ± 898.365	

P: pollo 1...5; muestras por triplicado

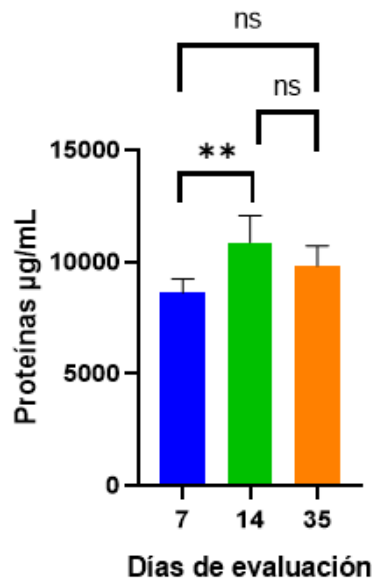


Figura 13. Análisis de proteínas totales de duodeno respecto a la edad. El color azul corresponde al día 7, el verde al día 14 y el naranja al 35 posterior a la eclosión. No se presentó diferencia significativa (ns) entre día 14 y 35, así como 7 y 35. Se observa diferencia significativa entre los días 7 y 14 ($P= 0.0064$) en el análisis de comparación múltiple de Tukey.

Tabla 11. Cuantificación de proteínas totales de yeyuno respecto a la edad

Día	7	14	35	Significancia
Muestra	promedio µg/mL	promedio µg/mL	promedio µg/mL	Valor de P
P1	6894.44 ± 340.48	7315.19 ± 1104.00	7770.37 ± 959.06	7 vs 14 ($P= 0.0029$)
P2	7041.11 ± 512.44	7272.22 ± 283.50	8077.78 ± 815.21	
P3	6574.44 ± 490.78	7511.48 ± 802.95	8029.63 ± 648.30	7 vs 35 ($P< 0.0001$)
P4	7263.33 ± 1159.66	7472.22 ± 931.15	8192.59 ± 1152.42	
P5	6607.78 ± 307.92	7611.48 ± 1732.56	8062.96 ± 201.64	14 vs 35 ($P= 0.0020$)
Prom global	6876.22 ± 291.765	7436.22 ± 140.731	8026.67 ± 155.851	

P: pollo 1...5; muestras por triplicado

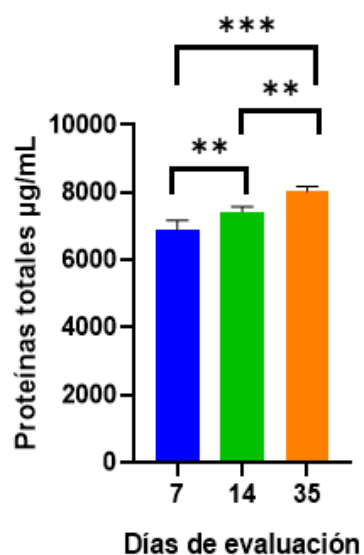


Figura 14. Análisis de proteínas totales de yeyuno respecto a la edad. El color azul corresponde al día 7, el verde al día 14 y el naranja al 35 posterior a la eclosión. Se encontró diferencia significativa entre todos los días, para 7 y 14 ($P=0.0029$), para 14 y 35 ($P= 0.0020$), destacando el día 35 con el día 7 ($P< 0.0001$) durante el análisis de comparación múltiple de Tukey.

Tabla 12. Cuantificación de proteínas totales de íleon respecto a la edad

Día	7	14	35	Significancia
Muestra	Promedio µg/mL	promedio µg/mL	promedio µg/mL	Valor de P
P1	6253.70 ± 237.36	5015.56 ± 195.32	8692.22 ± 745.60	7 vs 14 ($P= 0.1377$)
P2	7760.00 ± 503.32	5793.33 ± 333.33	8350.74 ± 1354.30	
P3	5648.89 ± 386.34	5882.22 ± 761.82	6395.19 ± 1452.51	7 vs 35 ($P= 0.0407$)
P4	6287.04 ± 679.54	5716.30 ± 1126.69	8776.67 ± 1828.21	
P5	6748.89 ± 704.22	5194.07 ± 911.00	7332.22 ± 645.88	14 vs 35 ($P= 0.0011$)
Prom global	6539.70 ± 786.141	5520.30 ± 388.954	7909.41 ± 1022.952	

P: pollo 1...5; muestras por triplicado

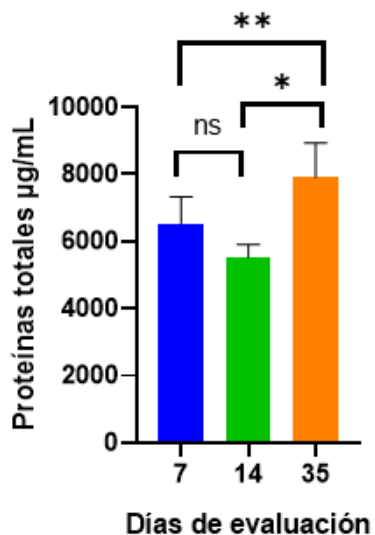


Figura 15. Análisis de proteínas totales de íleon respecto a la edad. El color azul corresponde al día 7, el verde al día 14 y el naranja al 35 posterior a la eclosión. No se encontró diferencia significativa (ns) entre los días 7 y 14 ($P=0.1377$), sin embargo, se marcó diferencia entre 7 y 35 ($P=0.0407$) y también entre 14 y 35 ($P=0.0011$) en el análisis de comparación múltiple de Tukey.

Tabla 13. Cuantificación de proteínas totales de ciego respecto a la edad

Día	7	14	35	Significancia
Muestra	Promedio µg/mL	Promedio µg/mL	Promedio µg/mL	Valor de P
P1	5160.00 ± 3202.83	7451.11 ± 1847.55	8701.11 ± 163.68	7 vs 14 ($P=0.0365$)
P2	6008.15 ± 1132.59	6238.15 ± 723.72	5719.63 ± 285.09	
P3	4104.44 ± 2220.30	7077.04 ± 949.88	8486.30 ± 494.70	7 vs 35 ($P=0.0019$)
P4	4089.63 ± 1872.03	5414.07 ± 535.68	7212.22 ± 1558.89	
P5	3083.33 ± 240.37	5837.78 ± 684.21	7508.52 ± 1290.53	14 vs 35 ($P=0.2570$)
Prom global	4489.11 ± 1122.645	6403.63 ± 848.158	7525.56 ± 1190.041	

P: pollo 1...5; muestras por triplicado

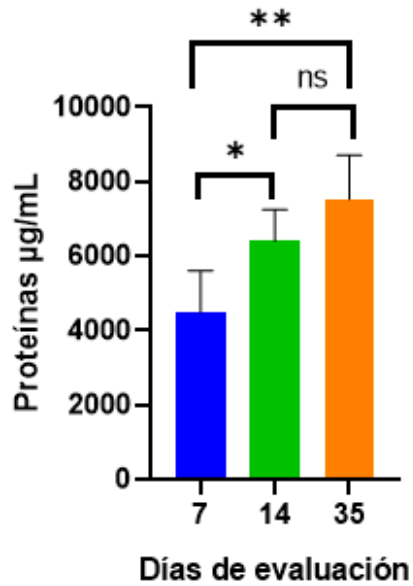


Figura 16. Análisis de proteínas totales de ciego respecto a la edad. El color azul corresponde al día 7, el verde al día 14 y el naranja al 35 posterior a la eclosión. Se encontró diferencia significativa entre los días 7 y 14 ($P=0.0365$), también en 7 y 35 ($P=0.0019$), sin embargo, el día 14 comparado con el día 35 presentaron valores dentro de su desviación estándar ($P= 0.2570$) siendo no significativo (ns) en el análisis de comparación múltiple de Tukey.

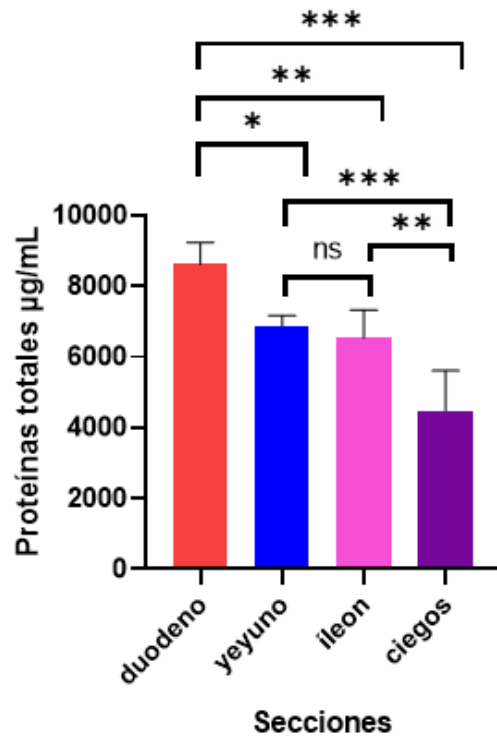


Figura 17. Análisis de proteínas totales por sección a los 7 días. El duodeno destacó sobre todas las áreas con mayor cantidad de proteínas totales, obteniendo diferencias significativas entre yeyuno ($P=0.0124$), íleon ($P=0.0030$) y ciegos ($P<0.0001$). Por otro lado, el yeyuno presentó diferencia significativa sobre el ciego ($P=0.0008$) y el íleon también presentó diferencia sobre el ciego ($P=0.0033$). Sin embargo, el yeyuno e íleon presentaron valores dentro de su desviación estándar ($P= 0.8986$) siendo no significativos (ns).

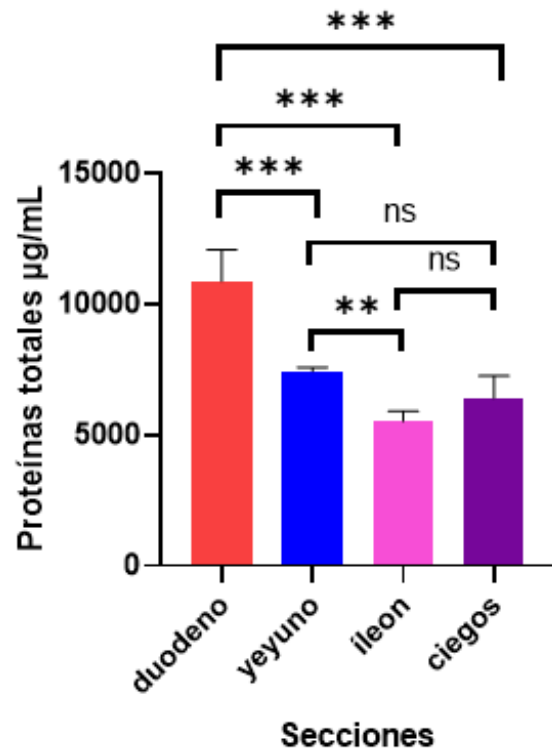


Figura 18. Análisis de proteínas totales por sección a los 14 días. Se observa que el duodeno presenta diferencias significativas entre yeyuno ($P < 0.0001$), íleon ($P < 0.0001$) y ciegos ($P < 0.0001$). Por otro lado, el yeyuno presentó diferencia significativa sobre el íleon ($P = 0.0053$) pero no sobre el ciego ($P = 0.1809$). Sin embargo, el íleon y ciegos no presentan diferencia significativa (ns) ($P = 0.2937$).

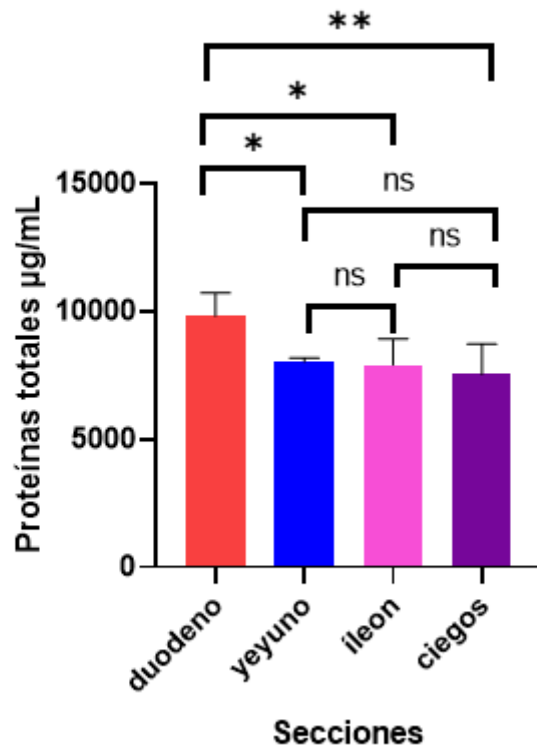


Figura 19. Análisis de proteínas totales por sección a los 35 días. Las diferencias entre el duodeno y el yeyuno ($P=0.0302$), íleon ($P=0.0201$) y ciegos ($P=0.0052$) son estadísticamente significativas. Por otro lado, ni el yeyuno, íleon ($P=0.9969$) y ciegos ($P=0.8185$) presentaron diferencia entre sí (ns), con valores por encima de ($P<0.05$).

5.2 Cuantificación de las concentraciones de IgA secretora en la mucosa intestinal de *G. gallus* a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

5.2.1 Cuantificación de IgA secretora por prueba de ELISA

El tracto intestinal es una zona con gran actividad inmunológica, ya que está continuamente expuesto a una amplia variedad de antígenos y microorganismos que desencadenan el desarrollo del SI (Contreras A. & Cabrera R., 2020). La mucosa, compuesta por el epitelio y la lámina propia, es el sitio principal donde ocurren los procesos inmunológicos. Aquí, existen diversas células innatas y adaptativas, células epiteliales con características distintivas como las de Paneth, liberadoras de péptidos antimicrobianos, células caliciformes productoras de mucinas y los enterocitos que absorben nutrientes y también contribuyen en la defensa con sus PRR (Mowat & Agace, 2014).

La respuesta inmunológica en la barrera mucosa está respaldada por las Igs, destacando a la IgA secretora como un componente esencial de aves y mamíferos. Esta Ig es producida por células plasmáticas productoras de anticuerpos en la lámina propia del intestino y con ayuda del pIgR llega a la superficie luminal en forma de IgA secretora, que desempeña un papel clave mediante la neutralización, mantenimiento de homeostasis y la modulación del SI (Turula & Wobus, 2018). La IgA secretora ayuda a la formación y mantenimiento de la microbiota intestinal y al monitoreo constante de antígenos para contribuir al inicio de respuestas inmunes locales (Macpherson et al., 2011). Dado que la respuesta de la IgA secretora es fundamental en la defensa contra patógenos, en este estudio se propuso evaluarla en las diferentes zonas del intestino, considerando que cada una desempeña funciones específicas de absorción de nutrientes, interacción con microorganismos, exposición a diferentes cantidades de antígenos y esto puede reflejar la variabilidad en la concentración de IgA de cada sección (Sterlin et al., 2020).

Durante la realización del ensayo los sobrenadantes con inhibidor de proteasas obtenidos de duodeno, yeyuno, íleon y ciego de las diferentes edades fueron

almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para poder llevar a cabo el ensayo de ELISA sándwich, ya que las aves eran entregadas en cada día de estudio, siendo necesario el resguardo de las muestras para su posterior procesamiento. Considerando las variaciones en las cantidades de proteínas totales de cada zona del intestino, se llevó a cabo una prueba preliminar con la finalidad de conocer la dilución más apropiada para trabajar. En la literatura se han reportado diluciones desde 1:100 de muestras de hisopo cloacal y 1:2000 en lágrimas de aves por parte de Merino-Guzmán y cols. en 2017 , hasta Hofmann y cols. en 2021 con diluciones 1:2000 muestras de plasma y 1:1,000,000 a la bilis. Al observar tal variación se optó por realizar la dilución inicial de 1:1000 (dilución recomendada en el kit de ELISA para IgA de ave, Cat. No. EE33-103) y 1:5000 para poder determinar la concentración con la curva de calibración. De esta manera, se encontró que los datos que entraban en la curva eran los de la dilución 1:1000, por ello se decidió trabajar con ella para el ensayo final.

Debido a la limitante de realizar una sola la prueba de ELISA con cierta cantidad de pocillos para la prueba, de las 5 aves analizadas por Bradford, se tomaron las 3 que más se acercaran al promedio de proteínas totales obtenido de cada zona intestinal para realizar la cuantificación de IgA secretora. Se realizaron las diluciones de las muestras de trabajo, tomando 3 de cada zona por cada día de estudio, teniendo un total de 36 muestras a evaluar por duplicado en el ELISA. Se tomó la metodología en el apartado 4.5.1 para realizar las cuantificaciones de IgA secretora. De los promedios obtenidos en la cuantificación, se realizó un análisis estadístico por medio de ANOVA utilizando el programa GraphPad Prism 8.0.2, con un nivel de confianza al 95 % ($P < 0.05$) del cual se obtuvo tanto las medias como la desviación estándar.

En duodeno se encontraron diferencias significativas de la concentración de IgA secretora, en aves del día 35 comparados con el día 7 ($P = 0.0027$) y 14 ($P = 0.0042$) respectivamente (Figura 20), datos obtenidos en Tabla 14. En cuanto al yeyuno, se observaron diferencias significativas entre los días 14 y 35 ($P = 0.0001$), así como entre 7 y 35 ($P = 0.0001$), los resultados se esquematizan en la Figura 21 y Tabla 15. En el íleon, la cantidad de IgA destacó en las aves de 35 días comparándolas con el

día 7 ($P < 0.0001$) y 14 ($P < 0.0001$) posterior a la eclosión (Figura 22), (Tabla 16). Se destacó diferencia significativa de IgA en ciegos entre los días 14 y 35 ($P = 0.0155$), también en 7 y 35 ($P = 0.0140$) como se muestra en la Figura 23, datos presentados en Tabla 17. De manera interesante, en el día 7 y 14 de todas las secciones evaluadas no se presentó diferencia significativa, con valores mayores a ($P < 0.05$) Los valores de IgA se normalizaron con base a mg de proteínas totales. La Figura 24 resalta al íleon como la zona con mayor concentración de IgA, mostrando diferencias significativas con duodeno ($P = 0.0020$) y ciegos ($P = 0.0020$) en aves de 7 días. En las Figuras 25 y 26, que corresponde a las aves de 14 y 35 días, el ciego presenta la mayor concentración de IgA secretora, mientras que las demás secciones no presentan diferencias entre sí.

Tabla 14. Cuantificación de IgA secretora de duodeno respecto a la edad

Día	7	14	35	Significancia
Muestra	Promedio µg/mg	promedio µg/mg	promedio µg/mg	Valor de P
P1	1.702 ± 0.143	2.254 ± 3.372	5.338 ± 0.9354	7 vs 14 ($P = 0.8835$)
P2	1.397 ± 1.283	2.006 ± 0.4372	4.1207 ± 5.468	7 vs 35 ($P = 0.0027$)
P3	2.343 ± 0.145	1.827 ± 1.451	3.846 ± 1.6610	
Prom global	1.814 ± 0.483	2.0294 ± 0.215	4.4349 ± 0.794	14 vs 35 ($P = 0.0042$)

P: pollo 1...3; muestras por duplicado

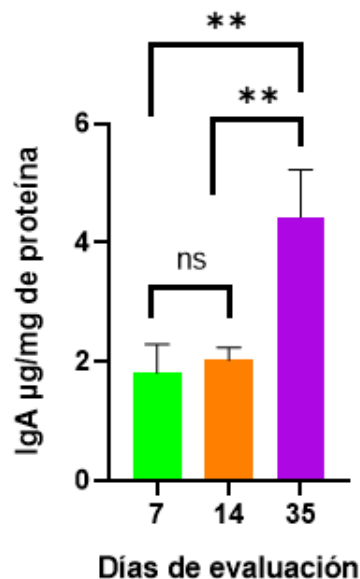


Figura 20. Niveles de IgA secretora en duodeno con base en la edad. El color verde corresponde al día 7, el naranja al día 14 y el morado al día 35. Se encontró diferencia significativa entre los días 14 y 35 ($P=0.0042$), también en 7 y 35 ($P=0.0027$), sin embargo, el día 7 comparado con el día 14 no presentaron diferencia (ns) ($P=0.8835$).

Tabla 15. Cuantificación de IgA secretora de yeyuno respecto a la edad

Día	7	14	35	Significancia
Muestra	Promedio µg/mg	Promedio µg/mg	promedio µg/mg	Valor de P
P1	2.852± 0.2901	2.643 ± 0.5801	9.937 ± 1.8181	7 vs 14 ($P= 0.9874$)
P2	2.9058 ± 5.0801	4.322 ± 2.0879	11.726 ± 1.3626	7 vs 35 ($P= 0.0001$)
P3	3.639 ± 0.5871	2.0806 ± 0.1436	11.821 ± 17.568	
Prom global	3.1323 ± 0.440	3.0154 ± 1.166	11.162 ± 1.061	14 vs 35 ($P= 0.0001$)

P: pollo 1...3; muestras por duplicado

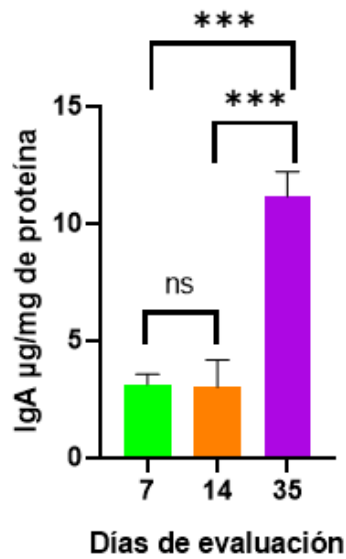


Figura 21. Niveles de IgA secretora en yeyuno con base en la edad. El color verde corresponde al día 7, el naranja al día 14 y el morado al 35 posterior a la eclosión. Se encontró diferencia significativa entre los días 14 y 35 ($P=0.0001$), también en 7 y 35 ($P=0.0001$). En el día 7 y 14 no presentaron diferencia significativa (ns) ($P=0.9874$).

Tabla 16. Cuantificación de IgA secretora de íleon respecto a la edad

Día	7	14	35	Significancia
Muestra	promedio µg/mg	promedio µg/mg	promedio µg/mg	Valor de P
P1	4.385 ± 4.587	4.853 ± 0.2946	25.547 ± 2.948	7 vs 14 ($P=0.6771$)
P2	1.7321* ± 0.854	4.834 ± 0.5954	28.454 ± 8.1289	7 vs 35 ($P<0.0001$)
P3	4.096 ± 0.7369	5.669 ± 0.1428	3.721 ± 7.7086	
Prom global	4.241 ± 1.455	5.1187 ± 0.476	19.2407 ± 13.519	14 vs 35 ($P<0.0001$)

P: pollo 1...3; muestras por duplicado; *se eliminó el valor atípico porque generaban desviación muy alta

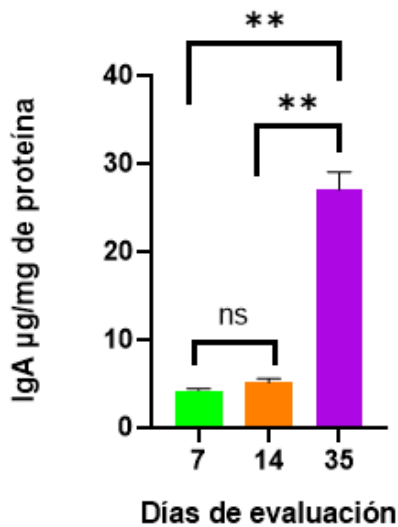


Figura 22. Niveles de IgA secretora en íleon con base en la edad. El color verde corresponde al día 7, el naranja al día 14 y el morado al 35 posterior a la eclosión. Se encontró diferencia significativa entre los días 14 y 35 ($P < 0.0001$), también en 7 y 35 ($P < 0.0001$). En el día 7 y 14 no presentaron diferencia significativa (ns) ($P = 0.6771$).

Tabla 17. Cuantificación de IgA secretora de ciego respecto a la edad

Día	7	14	35	Significancia
Muestra	promedio µg/mg	promedio µg/mg	promedio µg/mg	Valor de P
P1	1.519 ± 1.5497	12.0016 ± 0.6571	98.649 ± 9.9996	7 vs 14 ($P = 0.8353$)
P2	1.674 ± 0.2822	14.285 ± 0.6777	127.827 ± 9.2204	7 vs 35 ($P = 0.0140$)
P3	8.1036* ± 1.505	14.229 ± 0.8463	57.409 ± 21.4263	
Prom global	1.597 ± 3.757	13.5057 ± 1.302	94.629 ± 35.380	14 vs 35 ($P = 0.0155$)

P: pollo 1...3; muestras por duplicado; *se eliminó el valor atípico porque generaban desviación muy alta

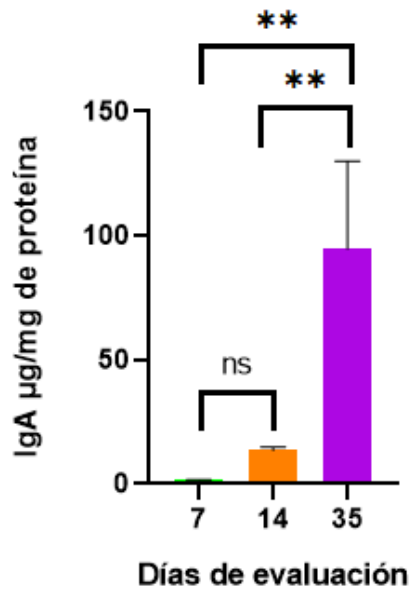


Figura 23. Niveles de IgA secretora en ciego con base en la edad. El color verde corresponde al día 7, el naranja al día 14 y el morado al 35 posterior a la eclosión. Se encontró diferencia significativa entre los días 14 y 35 ($P=0.0155$), también en 7 y 35 ($P=0.0140$). En el día 7 y 14 no presentaron diferencia significativa (ns) ($P=0.8350$).

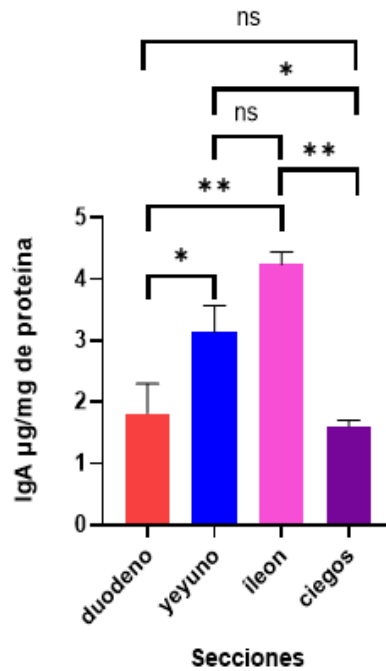


Figura 24. Análisis de los niveles de IgA de cada sección a los 7 días. Se observa el íleon con la mayor cantidad de IgA secretora en comparación con las otras áreas. Se presentan diferencias significativas entre el duodeno y yeyuno ($P=0.0231$) e íleon ($P=0.0020$), entre íleon y ciegos ($P=0.0020$) y entre yeyuno y ciegos ($P=0.0193$). Los valores de duodeno y ciego, además de yeyuno e íleon no mostraron diferencias marcadas entre sí (ns), siendo más altos al valor de ($P<0.05$) en la comparación de múltiples de Tukey.

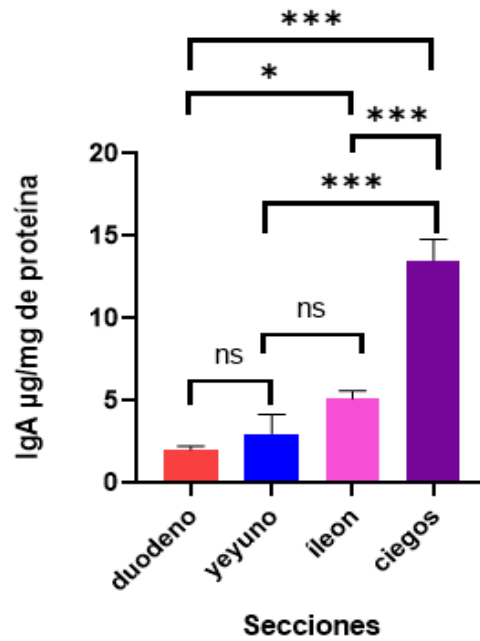


Figura 25. Análisis de los niveles de IgA de cada sección a los 14 días. Se observa que el ciego destaca con la mayor cantidad de IgA secretora en comparación con las otras áreas. Las diferencias entre el ciego y el duodeno ($P < 0.0001$), yeyuno ($P < 0.0001$) e íleon ($P < 0.0001$) son estadísticamente significativas. Los valores de duodeno, yeyuno e íleon no mostraron diferencias significativas (ns), siendo más altos al valor de ($P < 0.05$) en la comparación de múltiples de Tukey.

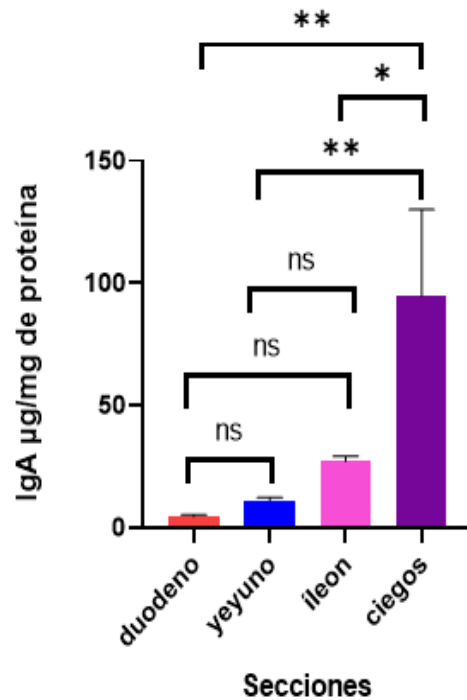


Figura 26. Análisis de los niveles de IgA de cada sección a los 35 días. El ciego exhibe la mayor cantidad de IgA secretora en comparación con las otras áreas. Las diferencias entre el ciego y el duodeno ($P=0.0028$), yeyuno ($P=0.0043$) e íleon ($P=0.0234$) son estadísticamente significativas. Por otro lado, los valores en las secciones correspondientes al intestino delgado, no mostraron diferencias significativas entre sí (ns), presentando valores por encima de ($P<0.05$).

5.3 Análisis del comportamiento de los niveles de IgA secretora de la mucosa en diferentes regiones del tracto gastrointestinal y etapas del desarrollo del modelo aviar *G. gallus*.

En este trabajo de tesis, se buscó conocer los niveles de IgA secretora en las secciones de duodeno, yeyuno, íleon y ciegos a lo largo del desarrollo en aves de engorde. Las evaluaciones de los sobrenadantes revelaron variación en los niveles de IgA en relación con su edad y la ubicación en el tracto intestinal. De manera interesante, a pesar de presentar una mayor cantidad de proteínas totales (Figuras 17,18 y 19), el duodeno mostró la concentración más pequeña de IgA secretora en todos los días de estudio, registrando un promedio de 1.814 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en el día 7, 2.029 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en el día 14 y 4.439 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína en el día 35. Estudios previos como Gomez-Verduzco y cols., (2009) reportaron un aumento de los niveles de IgA secretora en el duodeno en aves de 21 días, siendo de 622 ng/mL en los controles y aumentar a 1281 ng/mL al suplementar una dieta con pared celular de levadura. Mientras que Perozo y cols., (2007) reportó un aumento hasta 45 días después de la inoculación *in ovo* contra el virus de la enfermedad de Newcastle, comparado con sus controles no vacunados que permanecieron con títulos bajos de este anticuerpo durante su experimento. Cabe destacar que el duodeno, siendo la primera sección del intestino delgado, recibe las secreciones digestivas para el proceso de descomposición y absorción de los alimentos que consume el ave. En esta área, la presencia de enzimas como tripsina y quimotripsina, realizan la hidrólisis proteica a moléculas más pequeñas como péptidos y aminoácidos que serán absorbidos por los enterocitos (Punt et al., 2018). El tiempo del tránsito intestinal de las aves por el intestino delgado es de 2.5 horas en promedio, esta retención corta genera la selección de limitada cantidad de microorganismos en esta área (Sergeant et al., 2014). La comunidad bacteriana de esta zona está formada por clostridios, estreptococos, enterobacterias y lactobacilos, estas bacterias podrían competir por la adquisición de nutrientes e influir en el crecimiento y desarrollo del ave (Gong et al., 2002). Cabe resaltar que la mayor cantidad de proteínas totales encontradas en el duodeno podrían ser asociadas a los componentes de la digestión, más que a los

componentes proteicos que forman parte de la respuesta inmunológica y estos requerimientos alimenticios del ave están en constante cambio para cubrir las necesidades en cada etapa de su desarrollo (Adeola et al., 2016).

La composición microbiana puede variar entre secciones, generalmente es similar en duodeno, yeyuno e íleon, mientras que en ciego se da la mayor carga, es por esto que la respuesta inmunológica debe adaptarse a las necesidades específicas de cada región (Kollarikova et al., 2018). En cuanto a los valores presentados de IgA secretora en yeyuno e íleon, se obtuvieron valores similares entre los días 7 y 14, sin mostrar una diferencia significativa resaltando un aumento para el día 35, registrando 11.162 µg/mg en yeyuno y 19.240 µg/mg de proteína en íleon. El yeyuno desempeña un papel en la absorción significativa de productos finales de digestión en sus formas más simples, como monosacáridos, aminoácidos, ácidos grasos, algunas vitaminas y minerales (Pérez & Fernandez, 2000). Por otro lado, el íleon es responsable de la absorción de ácidos y sales biliares, así como vitaminas, agua y electrolitos, aunque la mayor parte de esa absorción ocurre en ciegos (S. Kong et al., 2018). Husáková y cols., (2015) encontraron niveles de 68.65 ng/mL de IgA en controles y títulos más elevados en aves expuestas de manera temprana a *E. faecium* y posteriormente a *S. enteritidis* de hasta 77.08 ng/mL en muestras de lavado intestinal de íleon. Yang y cols., (2021) reportaron aumento de niveles de IgA secretora yeyunal a los días 7 y 21, con la administración de una concentración de 4 mg/mL de astrágalo y una tendencia de aumento al añadir concentraciones de 8 mg/mL de esta hierba medicinal conocida por sus propiedades inmunomoduladoras al compararlo con los controles. La microbiota del intestino delgado contribuye con el proceso de digestión de nutrientes, mientras que la del ciego podría estar relacionada con la protección inmunológica (Awad et al., 2016). Las placas de Peyer son sitios de inducción de respuesta inmune local en aves y mamíferos, estos están situados en la submucosa. Ahí se llevan a cabo procesos de presentación antigénica y diferenciación de células plasmáticas productoras de IgA en el ambiente intestinal, una respuesta más específica (Punt et al., 2018). La función de estas placas va decreciendo a medida que pasa el tiempo, presentándose de 5 a 6 placas de Peyer en aves de hasta 12

semanas de edad, mientras que, en aves adultas, se conoce la presencia de una sola placa, localizada entre la unión del Íleon y los ciegos (Gómez et al., 2010). Esto podría ser consistente a los resultados presentados (Figura 25 y 26), donde a medida que se recorre el tracto intestinal, aunque no sean significativos los niveles de IgA secretora en yeyuno e íleon, van en una tendencia al aumento hasta llegar al ciego.

En este trabajo de tesis se puede observar que, en las regiones más distantes del tracto, la producción de IgA secretora va en aumento, siendo en el ciego y a los 35 días de edad el que presenta mayor contenido de IgA (Figura 26). En las aves, el ciego es un órgano donde ocurre principalmente la fermentación bacteriana, pero también se absorbe en esta zona agua y electrolitos. En comparación con el intestino delgado, el quimo permanece en el ciego durante 12 a 20 horas, lo que permite un tiempo más largo para el proceso de digestión y propicia la colonización por parte de los microorganismos (Sergeant et al., 2014). Estos absorberán los nutrientes de sustratos indigeribles, liberando productos como ácidos grasos de cadena que son absorbidos por el ave como fuente de energía (Kogut et al., 2020). Aquí se informa un gran aumento de los niveles de IgA secretora el día 35 con 94.629 µg /mg de proteína. Merino-Guzmán y cols., (2017) reportó que al paso de los días existía una tendencia en aumento de los niveles de IgA tanto en muestras de lágrimas, como de hisopos cloacales, asegurando que este último método de recolección es representativo y más sencillo para el análisis. Bi y cols., (2020) registraron aumento significativo de anticuerpos IgA en las heces de aves suplementadas con pared celular de levadura, a las 2 y 3 semanas después de la inmunización contra virus de Newcastle en comparación con sus controles, los cuales fueron vacunados con solución salina y presentaron valores constantes durante el ensayo. La presencia de mayores cantidades de IgA secretora en los ciegos puede deberse al ambiente interno, siendo un sitio propicio para la colonización principalmente de bacterias *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Proteobacteria* y *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Tenericutes* (Awad et al., 2016). Al albergar una gran cantidad de microorganismos, es clave la interacción de la microbiota y la participación de la IgA como regulador para evitar la generación de enfermedades intestinales (Siegerstetter

et al., 2017). El desarrollo de la microbiota intestinal comienza al momento de la eclosión y está directamente influenciado por la genética del huésped, la dieta y la interacción con el medio ambiente, esta microbiota madura alrededor de las 3 semanas de edad y actúa como barrera de defensa física para evitar la colonización de patógenos, ocupando sitios de unión o compitiendo también por el consumo de los nutrientes, influyendo de manera indirecta en la respuesta inmunológica (Ranjitkar et al., 2016). Esto puede observarse en la Figura 24 donde los valores de IgA secretora van en tendencia al aumento en las zonas del intestino delgado al día 7, representando que el ave se encuentra en un proceso de adaptación al cambio de dieta y se encuentra estableciendo su microbiota. Todo esto influye directamente en la generación de su propia respuesta inmunológica, además de adaptarse al medio ambiente al cual es sometido y modificado conforme los requerimientos de su desarrollo (Aviagen, 2018). Al inicio de los ciegos se encuentran las tonsilas cecales, otro tejido con actividad linfoide que contiene centros germinales con linfocitos B, T y una zona con presencia de macrófagos, aquí también se llevan a cabo funciones similares como las placas de Peyer, por lo tanto se promueve la distribución de IgA secretora en esta zona (Gómez et al., 2010).

La IgA secretora actúa en la barrera mucosa impidiendo la adherencia de los microorganismos, modula la composición de la microbiota al limitar la colonización de los patógenos y regulando las poblaciones de las ya asentadas a lo largo del intestino. Participa en la respuesta inmunológica local, apoyando la liberación de IL-10 y TGF- β conocidas por ser citocinas antiinflamatorias, esto permite la regulación de respuestas inflamatorias excesivas (Seikrit et al., 2021). La IgA secretora tiene resistencia a las enzimas proteolíticas presentes en el tracto intestinal, gracias al componente secretor que adquiere a través de la transcitosis epitelial, esto le confiere estabilidad y prolonga su acción protectora (Macpherson et al., 2011). A pesar de ello, existen algunos microorganismos capaces de burlar la defensa de esta Ig, por ejemplo, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* que son capaces de liberar enzimas proteolíticas para escindir los enlaces prolina-serina y prolina-treonina de la región

bisagra de la IgA1 (Mistry & Stockley, 2005). Videnska y cols., (2013) reportó que la infección de *Salmonella entérica* en aves con 1 día de eclosión influyó en la composición de una microbiota cecal menor. La interacción temprana con patógenos intestinales también es capaz de modificar la microbiota y por lo tanto impactar el desarrollo del SI.

El estudio de la IgA secretora en distintas secciones del intestino de aves, proporciona información sobre las respuestas inmunes locales y su evolución a medida que las aves se desarrollan. Es esencial reconocer la importancia de llevar a cabo múltiples pruebas de ELISA, ya que realizar una sola prueba puede tener errores aleatorios individuales entre las aves de estudio, el número de muestras para analizar y la variabilidad entre individuos que realizan el ensayo (García, 2022). El SI del ave está en constante desarrollo y las diferencias en los niveles de IgA pueden asociarse a la maduración fisiológica gradual a medida que las aves se exponen a una gran variedad de antígenos tanto en el alimento, el medio ambiente y durante el contacto con otras aves en su crecimiento en la granja (Broom & Kogut, 2018).

6 CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas para el proceso de extracción de proteínas totales en la realización del trabajo de investigación fueron tomar 20 mg de mucosa de cada sección, agregar cóctel de inhibidores de proteasas, aplicar un homogenizado por 2 min y centrifugar a 5000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se normalizaron los resultados de IgA con base a mg de la proteína total cuantificada en la prueba de ELISA.

La cuantificación de proteínas totales de los sobrenadantes de mucosa obtenidos, mostraron mayor concentración de proteínas totales en duodeno, seguido de yeyuno e íleon y por último, los ciegos con la menor concentración, teniendo un patrón de aumento conforme a la edad.

La concentración de IgA secretora de duodeno, yeyuno e íleon en *G. gallus* a los días 14 y 35 posterior al nacimiento obtuvieron valores similares, sin ser estadísticamente significativos. En el día 7 el íleon obtuvo diferencias significativas en comparación con las demás zonas evaluadas. El ciego destacó con la mayor concentración de IgA secretora en aves de 35 días, presentando diferencias significativas en comparación con duodeno, yeyuno e íleon, mostrando una tendencia de aumento conforme a la edad de las aves de estudio.

Es crucial destacar la necesidad de tener más evaluaciones en la prueba de ELISA para no disminuir el número de muestras como se realizó en este trabajo, esto favorece la obtención de resultados más precisos en estudios futuros eliminando errores aleatorios que pueden presentarse durante la ejecución del ensayo. Finalmente, las concentraciones de IgA secretora obtenidas de este trabajo de tesis establecerán las bases para la evaluación de los niveles de esta Ig ante la presencia de microorganismos patógenos en pruebas de retos microbianos. Además, resalta la posibilidad identificar otros componentes dentro de la mucosa que podrían funcionar como marcadores para el apoyo al diagnóstico de enfermedades intestinales.

7 REFERENCIAS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H., & Pillai, S. (2012). *Inmunología celular y molecular* (p. 570). <https://books.google.com/books?id=iQCupVehIXQC&pgis=1>

Adeola, O., Xue, P. C., Cowieson, A. J., & Ajuwon, K. M. (2016). Basal endogenous losses of amino acids in protein nutrition research for swine and poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 221, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.004>

Agarwal, S., & Cunningham-Rundles, C. (2019). Autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 123(5), 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.07.014>

Aguilar Cordero, M. J., Baena García, L., Sánchez López, A. M., Guisado Barrilao, R., Hermoso Rodríguez, E., & Mur Villar, N. (2016). Beneficios inmunológicos de la leche humana para la madre y el niño. Revisión sistemática. *Nutricion Hospitalaria*, 33(2), 482–493. <https://doi.org/10.20960/nh.526>

Almagiá Flores, A. A., & Lizana Arce, P. (2009). Anatomía del aparato digestivo. *Pontificia Universidad Católica de Valparaíso*, 27. <http://www.untumbes.edu.pe/vcs/biblioteca/document/varioslibros/0265>. Anatomía del aparato digestivo.pdf

Andrea, C., & Maria, R. (2011). The Biology of Intestinal Immunoglobulin A Responses. *Immunity*, 28(6), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.001>.The

Asano, M., & Komiyama, K. (2011). Polymeric immunoglobulin receptor. *Journal of Oral Science*, 53(2), 147–156. <https://doi.org/10.2334/josnusd.53.147>

Auriostigue Bautista, J. C. (2014). *Desarrollo y validación de un inmunoensayo enzimático para la cuantificación de productos finales de glicación avanzada*.

Aviagen, B. (2018). *Manual de manejo del pollo de engorde Arbor Acres Prefacio*.

1–162.

Awad, W. A., Mann, E., Dzieciol, M., & Hess, C. (2016). *Age-Related Differences in the Luminal and Mucosa-Associated Gut Microbiome of Broiler Chickens and Shifts Associated with Campylobacter jejuni Infection*. 6(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00154>

Bansil, R., & Turner, B. S. (2017). The biology of mucus: composition, synthesis and organization. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.023>

Bassi, L. S., Hejdysz, M., Pruszyńska-Oszmalek, E., Wolc, A., Cowieson, A. J., Sorbara, J. O. B., Svihus, B., & Kaczmarek, S. A. (2023). The effect of amylase supplementation on individual variation, growth performance, and starch digestibility in broiler chickens. *Poultry Science*, 102(4). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102563>

Bethyl Laboratories, I. (n.d.). *Chicken IgA ELISA kit*. 1–12.

Bi, S., Zhang, J., Qu, Y., Zhou, B., He, X., & Ni, J. (2020). Yeast cell wall product enhanced intestinal IgA response and changed cecum microflora species after oral vaccination in chickens. *Poultry Science*, 99(12), 6576–6585. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.075>

Bio-Rad. (2017). *Quick Strat Bradford Protein Assay*. <https://doi.org/10.1097/00000441-192806000-00007>

Breedveld, A., & Van Egmond, M. (2019). IgA and FcαRI: Pathological roles and therapeutic opportunities. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00553>

Brisbin, J. T., Gong, J., & Sharif, S. (2008). Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 9(1),

101–110. <https://doi.org/10.1017/S146625230800145X>

Broom, L. J., & Kogut, M. H. (2018a). The role of the gut microbiome in shaping the immune system of chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 204, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.10.002>

Broom, L. J., & Kogut, M. H. (2018b). The role of the gut microbiome in shaping the immune system of chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 204, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.10.002>

Brunser, O., Cruchet, S., & Gotteland, M. (2016). Fisiología Gastrointestinal y Nutrición. In *Fisiología Gastrointestinal y Nutrición*.

Campozano-Marcillo, G. A., Antonio-Hurtado, E., Bravo-Loor, J. D., Bulnes-Goicochea, C. A., Bazurto-Vera, V. L., & Solórzano-Macías, C. K. (2021). Duodenal morphometry in COBB 500 chickens supplemented with essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 32(6), 1–9. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I6.19924>

Casado Caballero, F. J. (2010). Indicaciones de la pH-metría. Selección de candidatos para tratamiento quirúrgico. *Revisiones Temáticas*, 33, 282–288.

Cervantes, H. (2019). *Integridad intestinal en aves*. BM Editores. <https://www.bmeditores.mx/avicultura/integridad-intestinal-en-aves/>

Chen, H., & Schifferli, D. M. (2000). Mucosal and systemic immune responses to chimeric fimbriae expressed by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains. *Infection and Immunity*, 68(6), 3129–3139. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3129-3139.2000>

Chen, K., Magri, G., Grasset, E. K., & Cerutti, A. (2020). Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nature Reviews Immunology*, 20(7), 427–441. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0261-1>

Chiang, J. Y. L., & Ferrell, J. M. (2018). Bile acid metabolism in liver pathobiology.

Gene Expression, 18(2), 71–87.
<https://doi.org/10.3727/105221618X15156018385515>

Christofoli, M., Souza, C. S., Costa, T. F., Alexandrino, S. L. de S. A., Faria, P. P. de, Minafra-Rezende, C. S., Santos, F. R. dos, Minafra, C. S., & Pereira, P. S. (2020). Beneficial and harmful intestinal microbiota in poultry farming: Review. *Research, Society and Development*, 9(7), 5–7.
<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/3667>

Ciro, J. A., López, A., & Parra, J. (2015). La adición de cepas probióticas modula la secreción de mucinas intestinales en león de cerdos en crecimiento. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), 150–159.
<http://www.scielo.org.co/pdf/cmzv/v10n2/v10n2a07.pdf>
<http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/3648/2456>

Clavijo, V., & Flórez, M. J. V. (2018). The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science*, 97(3), 1006–1021. <https://doi.org/10.3382/ps/pex359>

Contreras A., R., & Cabrera R., I. (2020). Microbiota intestinal y envejecimiento. *Gerontología y Geriatría*, 15(3), 1–18.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/geroinfo/ger-2019/ger191a.pdf>

Correa, I. (2006). Inmunidad innata gastrointestinal y enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y Hepatología Continuada*, 5(5), 222–227.
[https://doi.org/10.1016/S1578-1550\(06\)74315-7](https://doi.org/10.1016/S1578-1550(06)74315-7)

Craven, M. D., & Washabau, R. J. (2019). Comparative pathophysiology and management of protein-losing enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(2), 383–402. <https://doi.org/10.1111/jvim.15406>

Davis, S. K., Selva, K. J., Kent, S. J., & Chung, A. W. (2020). Serum IgA Fc effector functions in infectious disease and cancer. *Immunology and Cell Biology*, 98(4), 276–286. <https://doi.org/10.1111/imcb.12306>

De Oliveira-Serra, F. A., Mosca, T., Da Conceição Santos De Menezes, M., & Forte, W. C. N. (2017). Clinical symptoms in IgA deficiency. *Revista Alergia Mexico*, 64(1), 34–39. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i1.216>

Díez, R., García, M. J., Vivas, S., Arias, L., Rascarachi, G., Pozo, E. del, Vaquero, L. M., Miguel, A., Sierra, M., Calleja, S., & Ruiz De Morales, J. M. (2010). Manifestaciones gastrointestinales en pacientes con inmunodeficiencias primarias que cursan con déficit de anticuerpos. *Gastroenterología y Hepatología*, 33(5), 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.12.012>

Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*, 27–52.

Fleisher, T. A., Shearer, W. T., Schroeder Jr, H. W., Frew, A. J., & Weyand, C. M. (2019). *Inmunología Clínica Principios y práctica* (R. R. Rich (ed.); 5ta Edición). Elsevier.

Floege, J., & Feehally, J. (2016). The mucosa-kidney axis in IgA nephropathy. *Nature Reviews Nephrology*, 12(3), 147–156. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.208>

Fu, Y., Hu, J., Erasmus, M. A., Johnson, T. A., & Cheng, H. wei. (2022). Effects of early-life cecal microbiota transplantation from divergently selected inbred chicken lines on growth, gut serotonin, and immune parameters in recipient chickens. *Poultry Science*, 101(7), 101925. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101925>

Furlong, R. F. (2005). Insights into vertebrate evolution from the chicken genome sequence. *Genome Biology*, 6(2), 2–4. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-207>

García, F. S. (2022). *Bases de la nutrición del pollo en la fase de preinicio*. https://www.engormix.com/avicultura/iniciadores-aves/bases-nutricion-pollo-fase_a50431/

Gil, O., Corzo, G., & Marrero, M. (2006). Anatomía y fisiología del esofago. In *sociedad española de Otorrinolaringología* (pp. 1–4). <http://seorl.net/PDF/cabeza>

cuello y plastica/135 - ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL ESÓFAGO.pdf%0Ahttp://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/02-anatomia_fisiologia_digestivo.pdf

Gomez-Verduzco, G., Cortes-Cuevas, A., Lpez-Coello, C., Vila-González, E., & Nava, G. M. (2009). Dietary supplementation of mannan-oligosaccharide enhances neonatal immune responses in chickens during natural exposure to *Eimeria* spp. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-11>

Gómez, G., López Coello, C., Maldonado Bernal, C., & Ávila González, E. (2010). El sistema inmune digestivo en las aves. *Investigación y Ciencia: De La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 48, 9–16.

Gong, J., Forster, R. J., Yu, H., Chambers, J. R., Wheatcroft, R., Sabour, P. M., & Chen, S. (2002). *Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum*. 41, 171–179.

Guerrini, A., Dalmonde, T., Lupini, C., Andreani, G., Salaroli, R., Quaglia, G., Zannoni, A., Scozzoli, M., Forni, M., & Isani, G. (2022). *Influence of Dietary Supplementation with *Boswellia serrata* and *Salix alba* on Performance and Blood Biochemistry in Free-Range Leghorn Laying Hens*.

Gutzeit, C., Chen, K., & Cerutti, A. (2018). The enigmatic function of IgD: some answers at last. *Eur J Immunol*, 48(10), 1–28. <https://doi.org/10.1002/eji.201646547>.The

Hajishengallis, G., Li, X., Mitroulis, I., & Chavakis, T. (2019). Trained innate immunity and its implications for mucosal immunity and inflammation. *Adv Exp Med Biol*, 11–26. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-28524-1>

Hansson, G. C. (2020). Mucins and the Microbiome. *Annual Review of Biochemistry*, 89, 769–793. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-105053>

Hedl, M., & Abraham, C. (2011). Secretary Mediators Regulate NOD2- Induced Tolerance in Human Macrophages. *National Institutes of Health*, 23(1), 1–17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.09.009.Secretory>

Hernández Ramírez, D. F., & Cabiedes, J. (2010). Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatología Clínica*, 6(3), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2009.10.003>

Hernandez Rodriguez, P. (2021). *El Aparato Digestivo Y La Importancia De La Nutrición Y La Alimentación Para La Salud*. http://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/14093/1/HERNNDEZ_RODRGUEZPATRICIA_BIOLOGAYGEOLOGA_TFM.pdf

Hillier, L. W., Miller, W., Birney, E., Warren, W., Hardison, R. C., Ponting, C. P., Bork, P., Burt, D. W., Groenen, M. A. M., Delany, M. E., Dodgson, J. B., Chinwalla, A. T., Cliften, P. F., Clifton, S. W., Delehaunty, K. D., Fronick, C., Fulton, R. S., Graves, T. A., Kremitzki, C., ... Wilson, R. K. (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432(7018), 695–716. <https://doi.org/10.1038/nature03154>

Hofmann, T., Schmucker, S., & Sommerfeld, V. (2021). *Immunomodulatory Effects of Dietary Phosphorus and Calcium in Two Strains of Laying Hens*. 1–15.

Husáková, E., Bobíková, K., & Stašová, D. (2015). Total IgA in spleen, bursa and intestine of chickens pretreated with *E. faecium* AL41 and challenged with *Salmonella* Enteritidis PT4. *Food and Agricultural Immunology*, 26(3), 366–370. <https://doi.org/10.1080/09540105.2014.918587>

Huus, K. E., Petersen, C., & Finlay, B. B. (2021). Diversity and dynamism of IgA–microbiota interactions. *Nature Reviews Immunology*, 21(8), 514–525. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00506-1>

Itzá Ortiz, M., Avila Gonzalez, E., López Coello, C., Arce Menocal, J., Gómez Rosales, S., & Velasquez Madrazo, P. A. (2008). Efecto de la fuente energética y el

nivel de energía sobre la longitud de vellosidades intestinales, la respuesta inmune y el rendimiento productivo en pollos de engorda. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México*, 39(4), 357–376.

Jannet Iwasa. (2019). Enzimas. Modificación de la actividad del sustrato. In *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*. (pp. 89–90).

John, F., & Hernán, T. (2018). Nefropatía por inmunoglobulina A. *Manual MSD - Versión Para Profesionales*, 1–4. [https://www.msmanuals.com/es-co/professional/trastornos-urogenitales/glomerulopatías/nefropatía-por-inmunoglobulina-a?query=nefropatia por iga](https://www.msmanuals.com/es-co/professional/trastornos-urogenitales/glomerulopatías/nefropatía-por-inmunoglobulina-a?query=nefropatia+por+iga)

Khasnobish, A., Takayasu, L., Watanabe, K. I., Nguyen, T. T. T., Arakawa, K., Hotta, O., Joh, K., Nakano, A., Hosomi, S., Hattori, M., Suda, W., & Morita, H. (2021). Dysbiosis in the salivary microbiome associated with iga nephropathy —a japanese cohort study. *Microbes and Environments*, 36(2), 1–13. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME21006>

Kindt, T., Goldsby, R., & Osborne, B. (2007). Inmunología de los trasplantes. In *INMUNOLOGIA de Kuby*.

Kirsi M. Järvinen, Martin, H., & Oyoshi, M. K. (2019). Immunomodulatory Effects of Breast Milk on Food Allergy Kirsi. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 176, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.04.022>. Immunomodulatory

Kogut, M. H., Lee, A., & Santin, E. (2020). Microbiome and pathogen interaction with the immune system. *Poultry Science*, 99(4), 1906–1913. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.011>

Kollarcikova, M., Kubasova, T., Karasova, D., Crhanova, M., Cejkova, D., Sisak, F., & Rychlik, I. (2018). Use of 16S rRNA gene sequencing for prediction of new opportunistic pathogens in chicken ileal and cecal microbiota Sequence Processing and Classification of the V3 / V4 Region of 16S rRNA Genes. *Poultry Science*, 98(6), 2347–2353. <https://doi.org/10.3382/ps/pey594>

Kong, C., Ragland, D., & Adeola, O. (2014). *Ileal Endogenous Amino Acid Flow Response to Nitrogen-free Diets with Differing Ratios of Corn Starch to Dextrose in Pigs*. 27(8), 1124–1130.

Kong, S., Zhang, Y. H., & Zhang, W. (2018). Regulation of intestinal epithelial cells properties and functions by amino acids. *BioMed Research International*, 2018(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2018/2819154>

Krahel, A., Paszynska, E., Otulakowska-Skrzynska, J., Rzatowski, S., Hernik, A., Slopian, A., Hanć, T., Szczesniewska, P., Bryl, E., Boucher, Y., Tyszkiewicz-Nwafor, M., Gawriolek, M., & Dmitrzak-Weglarz, M. (2021). Salivary Biomarkers (Opiorphin, Cortisol, Amylase, and IgA) Related to Age, Sex, and Stress Perception in a Prospective Cohort of Healthy Schoolchildren. *Mediators of Inflammation*, 14. <https://doi.org/10.1155/2021/3639441>

Laboratorio de Genomica Viral y Humana. (2008). Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). *Facultad de Medicina UASLP*, 9–10. http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf

Lamot, D. M., Sapkota, D., Wijtten, P. J. A., Van Den Anker, I., Heetkamp, M. J. W., Kemp, B., & Van Den Brand, H. (2019). Diet density during the first week of life: Effects on growth performance, digestive organ weight, and nutrient digestion of broiler chickens. *Poultry Science*, 98(2), 789–795. <https://doi.org/10.3382/ps/pey002>

Lenette, L., Tood, S., Sarah, F., & Galit, A. (2017). Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol*, 17(12), 1–35. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.106.Beyond>

Li, J., Li, R. X., Liu, G., Lv, C. F., Mi, Y. L., & Zhang, C. Q. (2017). Effect of melatonin on renewal of chicken small intestinal mucosa. *Poultry Science*, 96(8), 2942–2949. <https://doi.org/10.3382/ps/pex085>

Li, Y., Jin, L., Chen, T., & Pirozzi, C. J. (2020). The Effects of Secretory IgA in the

Mucosal Immune System. *BioMed Research International*, 2020.
<https://doi.org/10.1155/2020/2032057>

Lippi, G., Salvagno, G. L., Montagnana, M., Manzato, F., & Guidi, G. C. (2007). Influence of the centrifuge time of primary plasma tubes on routine coagulation testing. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 18(5), 525–528.
<https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e3281eec945>

Liu, J., Stewart, S. N., Robinson, K., Yang, Q., Lyu, W., Whitmore, M. A., & Zhang, G. (2021). Linkage between the intestinal microbiota and residual feed intake in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s40104-020-00542-2>

Liu, S., Li, Z., Yu, B., Wang, S., Shen, Y., & Cong, H. (2020). Recent advances on protein separation and purification methods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284, 102254. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102254>

Liu, Y., Azad, A. K., Zhao, X., Zhu, Q., & Kong, X. (2022). *Dietary Crude Protein Levels Alter Diarrhea Incidence , Immunity , and Intestinal Barrier Function of Huanjiang Mini-Pigs During Different Growth Stages*. 13(July), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.908753>

López, A., Román, S., & Moreira, V. F. (2005). Enfermedad de Crohn Sección. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 97, 2005.

López Riquelme, N., Dosda González, M. D., Antonio Ramírez Garrido, F., Noguera Moya, O., Espasa Sempere, A., & Cañas Bello, D. (2009). Análisis comparativo de tres métodos de ELISA frente a Inmunodot para la determinación de antígenos extraíbles del núcleo (ENAs). *Inmunología*, 28(1), 7–11.
[https://doi.org/10.1016/s0213-9626\(09\)70022-8](https://doi.org/10.1016/s0213-9626(09)70022-8)

Lorenzen, E., Agerholm, J. S., Grossi, A. B., Bojesen, A. M., Skytte, C., Erneholm, K., Follmann, F., & Jungersen, G. (2016). Characterization of cytological changes, IgA, IgG and IL-8 levels and pH value in the vagina of prepubertal and sexually

mature Ellegaard Göttingen minipigs during an estrous cycle. *Developmental and Comparative Immunology*, 59, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.006>

Lv, H., Huang, Y., Wang, T., Zhai, S., Hou, Z., & Chen, S. (2021). Microbial Composition in the Duodenum and Ileum of Yellow Broilers With High and Low Feed Efficiency. *Frontiers in Microbiology*, 12(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.689653>

Lynge Pedersen, A. M., & Belstrøm, D. (2019). The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal of Dentistry*, 80(July 2018), S3–S12. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.08.010>

Macpherson, A. J., Geuking, M. B., & McCoy, K. D. (2011). Immunoglobulin A: A bridge between innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Gastroenterology*, 27(6), 529–533. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834bb805>

Magri, G., Comerma, L., Pybus, M., Sintes, J., Lligé, D., Segura-Garzón, D., Bascones, S., Yeste, A., Grasset, E. K., Gutzeit, C., Uzzan, M., Ramanujam, M., van Zelm, M. C., Albero-González, R., Vazquez, I., Iglesias, M., Serrano, S., Márquez, L., Mercade, E., ... Cerutti, A. (2017). Human Secretory IgM Emerges from Plasma Cells Clonally Related to Gut Memory B Cells and Targets Highly Diverse Commensals. *Immunity*, 47(1), 118-134.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.013>

Martínez Castro, S., & Merino Pérez, R. (2015). *Relationship Between Mucosal Immunity and Microbiota With Inflammatory Diseases*.

Martínez, S. E., Juárez, R. P., Vila, V. G., & Hormaechea, M. I. (2013). Relación entre la salud bucal y la concentración de inmunoglobulina a salival en adolescentes. *Odontoestomatología*, 15(21), 38–44.

McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 265–278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>

Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, *449*(7164), 819–826. <https://doi.org/10.1038/nature06246>

Melhem, H., Regan-Komito, D., & Niess, J. H. (2021). Mucins dynamics in physiological and pathological conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms222413642>

Merino-Guzmán, R., Latorre, J. D., Delgado, R., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, A. D., Teague, K. D., Graham, L. E., Mahaffey, B. D., Baxter, M. F. A., Hargis, B. M., & Tellez, G. (2017). Comparison of total immunoglobulin A levels in different samples in Leghorn and broiler chickens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *7*(2), 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.021>

Metur, S. P., & Klionsky, D. J. (2021). Adaptive immunity at the crossroads of autophagy and metabolism. *Cellular and Molecular Immunology*, *18*(5), 1096–1105. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00662-3>

Miró, J. M., & Gatell, J. M. (2000). *Modelos Experimentales De Patología Infecciosa*. <http://www.esteve.org>

Mistry, D., & Stockley, R. A. (2005). *IgA1 protease*. *January*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.10.005>

Moran, E. (2018). Anatomofisiología del tracto digestivo de aves y cerdos y la influencia de los alimentos. *AviNews*, 69–71. <https://lpncongress.com/wp-content/uploads/2018/10/anatomofisiologia-del-tracto-digestivo-de-aves-y-cerdos-y-la-influencia-de-los-alimentos-edwin-moran.pdf>

Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, *14*(10), 667–685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>

Nagai, M., Noguchi, R., Takahashi, D., Morikawa, T., Koshida, K., Komiyama, S., Ishihara, N., Yamada, T., Kawamura, Y. I., Muroi, K., Hattori, K., Kobayashi, N.,

Fujimura, Y., Hirota, M., Matsumoto, R., Aoki, R., Tamura-Nakano, M., Sugiyama, M., Katakai, T., ... Hase, K. (2019). Fasting-Refeeding Impacts Immune Cell Dynamics and Mucosal Immune Responses. *Cell*, 178(5), 1072-1087.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.047>

Noy, Y., & Sklan, D. (1994). Digestion and Absorption in the Young Chick. *Poultry Science*, 74(2), 366–373. <https://doi.org/10.3382/ps.0740366>

O’Farril Romanillos, P., Herrera Sánchez, D., Hernández Fernández, C., & López Rocha, G. (2017). Inmunodeficiencia Común Variable en adultos. *Rev Alerg Mex*, 64(4), 452–462.

Ochoa Azze, R. F. (2012). *Técnicas Inmunoenzimáticas Para Ensayos Clínicos De Vacunas Y Estudios Inmunoepidemiológicos*. http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/investigaciones/Tecnicas_inmunoenzimaticas_para_ensayos_clinicos_de_vacunas_y_estudios_inmunoepidemiologicos.pdf

Ordoñez, M. J., Bravo, M. X. R., & Saldaña., D. F. R. (2018). Rol de las enzimas en la alimentación de mono-gastricos, con énfasis en pollos de engorde. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 2(3), 25–42.

Owen, J., Punt, J., Stranford, S., & Jones, P. (2017). Kuby.Immunology. In *Mc Graw Hill Education* (Vol. 7).

Pathirana, W. P. N. G. W., Paul Chubb, S. A., Gillett, M. J., & Vasikaran, S. D. (2018). Faecal calprotectin. *Clinical Biochemist Reviews*, 39(3), 77–90. <https://doi.org/10.1097/mcg.0b013e318250e34e>

Pelaseyed, T., Bergström, J., Gustafsson, J., Ermund, A., & Birchenough, G. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunology Review*, 260(August), 87–107. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>.The

Peña Montes, C., & Quirasco Baruth, M. (2014). ¿Enzimas En Los Alimentos?

Bioquímica Comestible. *Revista Digital Universitaria*, 15(12), 1–6.
<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art94/art94.pdf>

Pérez, E., & Fernández, A. M. (2000). Aparato digestivo. Procedimientos relacionados. In *Técnicas básicas de enfermería* (p. 767).
<https://www.mheducation.es/bcv/guide/capitulo/8448169158.pdf>

Perozo, F., Finol, G., & Mavárez, Y. (2007). Levels of immunoglobulin-A in trachea, gut and bile samples of chickens vaccinated against newcastle disease. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 17(3), 226–230.

Petrou, G., & Cruzier, T. (2018). Mucins as multifunctional building blocks of biomaterials. *Biomaterials Science*, 6(9), 2282–2297.
<https://doi.org/10.1039/c8bm00471d>

Pietrzak, B., Tomela, K., Olejnik-Schmidt, A., Mackiewicz, A., & Schmidt, M. (2020). Secretory iga in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/ijms21239254>

Pliego-Arreaga, R., Regalado, C., Amaro-Reyes, A., & García-Almendárez, B. E. (2013). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3), 505–511.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966013>

Potosí Mite, C. J. (2023). *Aplicación del inoculante biológico en la cama base del galpón de pollos para reducir mortalidad por enfermedades respiratorias*.
<https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/4666/1/UPSE-TAE-2019-0016.pdf>

Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P. y, & Owen, J. A. (2018). Kuby Immunology. In *Mc Graw Hill* (Vol. 8, Issue 1, pp. 400–432).

Rahman, M. M., Uyangaa, E., Han, Y. W., Hur, J., Park, S. Y., Lee, J. H., Kim, K., & Eo, S. K. (2015). Modulation of systemic and mucosal immunity against an inactivated vaccine of newcastle disease virus by oral co-administration of live attenuated salmonella enterica serovar typhimurium expressing chicken interleukin-18 and interferon- α . *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(4), 395–403. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0495>

Ramirez C, S., & Miranda Z, B. (2021). Purificación de proteínas. *Grasas y Aceites (Sevilla)*, 41(4), 377–382.

Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F. J., Castellote, C., Franch, A., & Castell, M. (2008). El intestino: Pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 100(1), 29–34. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082008000100006>

Ranjitkar, S., Lawley, B., Tannock, G., & Engberg, M. (2016). *Bacterial Succession in the Broiler Gastrointestinal Tract*. 82(8), 2399–2410. <https://doi.org/10.1128/AEM.02549-15.Editor>

Reiriz P., J. (2016). Sistema digestivo: anatomía. *Collegi Oficial Infermeres i Infermers Barcelona*, 1–34.

Roa, I., & Meruane, M. (2012). Desarrollo del Aparato Digestivo Digestive System Development. *Int. J. Morphol*, 30(4), 1285–1294.

Rochereau, N., Roblin, X., Michaud, E., Gayet, R., Chanut, B., Jospin, F., Corthésy, B., & Paul, S. (2021). NOD2 deficiency increases retrograde transport of secretory IgA complexes in Crohn's disease. *Nature Communications*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20348-0>

Rodríguez Fernández, C., Waxman, S., & Lucas Burneo, J. J. (2017). Particularidades anatómicas, fisiológicas y etológicas con repercusión terapéutica, en medicina aviar/(II): aparato digestivo, aparato cardiovascular, sistema músculo-esquelético, tegumento y otras características. *Portalfarma*, 11, 18.

<https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2017/3/10/113722.pdf>

Rodríguez, J. C., Sainz, P. M., Rodríguez, I. S., & Salvador, C. R. (2014). El embrión de pollo como modelo de experimentación: Ven y descubre la embriología. *Lcsanpablo*, 1–18. <http://www.lcsanpablo.es/mangel/pollo.pdf>

Rodríguez Lecompte, J. C. (2016). Mecanismos De La Respuesta Inmune De Los Sistemas Respiratorio Y Digestivo De Las Aves. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1, 1–7. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/enfermedades_aves/97-Respuesta_Inmune.pdf

Rojas Torres, D. S., Bastidas Yaguana, D. K., Sierra Santos, L., & Aguilar Shea, A. L. (2014). Importancia del déficit selectivo de inmunoglobulina A. *Semergen*, 40(3), e65–e68. <https://doi.org/10.1016/j.semereg.2013.01.013>

Rostas, J. W., Mai, T. T., & Richards, W. O. (2011). Gastric motility physiology and surgical intervention. *Surgical Clinics of North America*, 91(5), 983–999. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2011.06.012>

S., S., & V., A. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 30, 75–82. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0986-5_19

Sallustio, F., Curci, C., Di Leo, V., Gallone, A., Pesce, F., & Gesualdo, L. (2020). A new vision of iga nephropathy: The missing link. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21010189>

Sanabria- Ayala, V., & Landa, A. (2007). Anticuerpos: sus propiedades, aplicaciones y perspectivas. *Revista Médicas Uis*, 20(1), 15–30.

Sanz, P., Revidatti, F., Fernández, R., Sindik, M., & Laffont, G. (2016). Desarrollo del aparato digestivo en pollos Campero INTA alimentados con poroto mucuna (*Stizolobium deeringianum*). *Revista Veterinaria*, 27(2), 107. <https://doi.org/10.30972/vet.2721089>

Sastre, J., & Sabater, L. (2005). *Fisiología de la secreción pancreática*. 28(Supl 2), 3–9.

Scanes, C. G. (2020). Avian Physiology: Are Birds Simply Feathered Mammals? *Frontiers in Physiology*, 11(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.542466>

Scott-Taylor, T. H., Axinia, S. C., Amin, S., & Pettengell, R. (2018). Immunoglobulin G; Structure and functional implications of different subclass modifications in initiation and resolution of allergy: *Immunity Inflammation and Disease*, 6(1), 13–33. <https://doi.org/10.1002/iid3.192>

Seikrit, C., Pabst, O., Barratt, J., & Pabst, O. (2021). *The immune landscape of IgA induction in the gut*. 627–637.

Sergeant, M. J., Constantinidou, C., Cogan, T. A., Bedford, M. R., Penn, C. W., & Pallen, M. J. (2014). *Extensive Microbial and Functional Diversity within the Chicken Cecal Microbiome*. 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091941>

Siegerstetter, S., Petri, R. M., Magowan, E., Lawlor, P. G., & Zebeli, Q. (2017). *Fecal Microbiota Transplant from Highly Feed-Efficient Donors Shows Little Effect on Age-Related Changes in Feed-Efficiency- Associated Fecal Microbiota from Chickens*.

Sklan, D., & Noy, Y. (2000). Hydrolysis and absorption in the small intestines of posthatch chicks. *Poultry Science*, 79(9), 1306–1310. <https://doi.org/10.1093/ps/79.9.1306>

Smith, K. G., Kamdar, A. A., & Stark, J. M. (2019). Lung Defenses: Intrinsic, Innate, and Adaptive. In *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children* (Ninth Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44887-1.00008-0>

Stanley, D., Hughes, R. J., & Moore, R. J. (2014). Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: Influence on health, productivity and disease. *Applied*

Microbiology and Biotechnology, 98(10), 4301–4310.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5646-2>

Sterlin, D., Fadlallah, J., Slack, E., & Gorochoy, G. (2020). *The antibody / microbiota interface in health and disease*. April 2019. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0192-y>

Suzuki, T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal*, 91(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/asj.13357>

Taguchi, T., & Mukai, K. (2019). Innate immunity signalling and membrane trafficking. *Current Opinion in Cell Biology*, 59, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.02.002>

Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>

Toche P., P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70335-8)

Turula, H., & Wobus, C. E. (2018). *The Role of the Polymeric Immunoglobulin Receptor Infection and Immunity*. 1–15. <https://doi.org/10.3390/v10050237>

Vargas Ruiz, J. E. (2009). Evaluación de pollo (*Gallus gallus*) de engorde Ross 308 y Cobb 500 en la operación de Cargill en Nicaragua. *Tesis de Ingeniero En Administración de Agronegocios*. San Antonio de Oriente-Honduras. Universidad Zamorano, 75.

Vasconcelos, M., Ednesio da Cruz, J., & Bezerra, L. (2016). Utilización de animales en la investigación : breve revisión de la legislación en Brasil. *Revista Bioética*, 24(2), 217–224. <https://www.scielo.br/j/bioet/a/DZgFdNFHRnCT8ydr5Ym7Ccp/?lang=es&format=pdf>

Veauthier, B., & Hornecker, J. R. (2018). Crohn's disease: Diagnosis and management. *American Family Physician*, 98(11), 661–669.

Veres, T. Z. (2020). Visualizing immune responses of the airway mucosa. *Cellular Immunology*, 350(January), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.10.001>

Wade-Vallance, A. K., & Allen, C. D. C. (2021). Intrinsic and extrinsic regulation of IgE B cell responses. *Current Opinion in Immunology*, 72, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.06.005>

Waritani, T., Chang, J., McKinney, B., & Terato, K. (2017). An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays. *MethodsX*, 4, 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.03.002>

Wyatt, R. J., & Julian, B. A. (2013). IgA nephropathy. *The New England Journal of Medicine*, 368(25), 2402–2404. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1206793>

Wyszyńska, A., Raczko, A., Lis, M., & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2004). Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 *cjaA* gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine*, 22(11–12), 1379–1389. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.11.001>

Yang, S. B., Qin, Y. J., Ma, X., Luan, W. M., Sun, P., Ju, A. Q., Duan, A. Y., Zhang, Y. N., & Zhao, D. H. (2021). Effects of in ovo Injection of Astragalus Polysaccharide on the Intestinal Development and Mucosal Immunity in Broiler Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.738816>

Yazdani, R., Habibi, S., Sharifi, L., Azizi, G., Abolhassani, H., Olbrich, P., & Aghamohammadi, A. (2020). Common variable immunodeficiency: Epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, classification, and management. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 30, 14–34. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0388>

Zhang, H., Li, D., Liu, L., Liu, Y., Xu, L., Zhu, M., & He, X. (2019). Cellular composition and differentiation signaling in chicken small intestinal epithelium. *Animals*, 9(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ani9110870>

8 ANEXOS

8.1 Dictamen de bioética

C.U., Querétaro, abril 25, 2022

No. de oficio. CBQ22/016b

9 MC. Alma Delia Bertadillo

JiloteFacultad de Química

Presente

10 At'n. Delia Sofía Carolina Cuevas González

El protocolo de investigación titulado “**Evaluación de los niveles de IgA secretora a diferentes estadios y regiones de la mucosa del tracto gastrointestinal**” sometido a evaluación por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Química **involucra el uso de animales de experimentación**. Las características del diseño del protocolo de investigación son resumidas a continuación:

Tipo de estudio	<i>In vivo</i>
Modelo experimental	Aves estirpe Cobb 500 (7, 15 y 30 días posnatales) obtenidas de una granja de explotación comercial del estado de Querétaro
Tamaño de muestra	36 aves (12 ratas por grupo experimental)
Alojamiento	Jaulas de polietileno de alta densidad de 96 x 57 x 23-26 cm.
Alimentación	No aplica
Inducción de enfermedad	No aplica
Administración de tratamiento	No aplica
Monitoreo de animales	No aplica
Método de eutanasia	Dislocación cervical
Recolección de muestras biológicas	Tracto gastrointestinal (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y cloaca)
Manejo de RPBI	Se contratará un servicio para la recolección de los RBPI generados durante el estudio
Variables de medición	Cuantificación de IgA secretora en las muestras del tracto gastrointestinal

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado “**Evaluación de los niveles de IgA secretora a diferentes estadios y regiones de la mucosa del tracto gastrointestinal**”, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **aprobado en lo referente a los aspectos bioéticos del proyecto**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.



11 Dra. Minerva Ramos Gómez
Secretaria



12 Dr. Mamadou Moustapha Bah
Representante investigador



13 M.C. Eduardo Balderas Martínez
Representante docente

Ccp archivo

Carta compromiso

Como investigador responsable del protocolo de investigación “**Evaluación de los niveles de IgA secretora a diferentes estadios y regiones de la mucosa del tracto gastrointestinal**”, el cual fue evaluado por el **Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro** en la sesión del día **06 de abril de 2022** con una resolución de **aprobado en lo referente a los aspectos bioéticos del proyecto (CBQ22/016)**, me comprometo a:

- Notificar al Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro cualquier enmienda (excluyendo aspectos logísticos o administrativos del estudio) realizada al protocolo de investigación aprobado antes de ser implementada.
- Reportar al Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro de manera oportuna cualquier evento adverso presentado durante el desarrollo de la investigación. Dependiendo del riesgo y relación del evento adverso suscitado, se podrá decidir la suspensión o la culminación del estudio.
- Notificar al Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en caso de la cancelación del protocolo de investigación.

Como investigador responsable del proyecto entiendo que cualquier incumplimiento de los compromisos anteriormente descritos o la falta de seguimiento de las normas éticas durante el desarrollo del proyecto de investigación aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro será reportado ante las instancias correspondientes.

Atentamente,

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote

14 Nombre del investigador responsable



Firma

25/04/2022

Fecha