

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Lactobacillus casei* ATCC® 334 SOBRE LA
MORFOLOGÍA DE INTESTINO DELGADO DE POLLO ROSS**

GUADALUPE ALEXANDRA MAIGUAL GETIAL

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2022**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Lactobacillus casei* ATCC® 334 SOBRE LA
MORFOLOGÍA DE INTESTINO DELGADO DE POLLO ROSS**

GUADALUPE ALEXANDRA MAIGUAL GETIAL

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
médico veterinaria**

**Director
CARLOS ALBERTO CHAVES VELÁSQUEZ
MV., Esp, Pat Vet, MSc (c)**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2022**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

**“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado son
responsabilidad exclusiva del autor”**

**Artículo 1° del acuerdo N° 324 de octubre de 1966 emanado del honorable
Consejo superior de la Universidad de Nariño**

NOTA DE ACEPTACIÓN

CARLOS ALBERTO CHAVES VELÁSQUEZ
Director

GUILLERMO ARTURO CÁRDENAS CAYCEDO
Jurado delegado

BOLÍVAR LAGOS FIGUEROA
Jurado

San Juan de Pasto, Mayo de 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente:

A Carlos Alberto Chaves Velásquez. MV, Esp, MSc (c), por ser asesor y apoyarme con su colaboración y conocimientos recibidos.

A Bolívar Lagos Figueroa MV MSc y Guillermo Arturo Cárdenas Caycedo MV. MSc por ser apoyo como jurado.

A Carlos Alfredo Bernal Zoot., técnico encargado del laboratorio de fisiología y reproducción animal de la universidad de Nariño, por apoyar el proceso del estudio histopatológico en dichas instalaciones.

A Adriana Orbes Villacorte Zoot., por ser una guía importante en el desarrollo de este trabajo.

A la clínica Carlos Martínez Hoyos de la universidad de Nariño, por permitir el desarrollo del trabajo de campo en sus instalaciones.

Al Grupo de investigación en medicina interna y farmacología veterinaria (MIFARVET)

A todas las personas que contribuyeron con la realización y culminación de este trabajo para obtener el título de médico veterinario.

DEDICATORIA

En el transcurso mi formación profesional, se presentaron varios miedos y obstáculos pero ante todo la satisfacción de aprender y alcanzar este sueño anhelado son la recompensa a todo el esfuerzo, por ello quiero dedicar esta investigación a:

Este trabajo investigativo lo dedico en primer lugar a Dios por darme la fuerza, motivación y salud para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mis padres por guiarme a lo largo de mi existencia, ser el pilar de mi vida y la fortaleza en aquellos momentos de dificultad, por los consejos, valores y principios que me han inculcado, los cuales me han permitido ser una mejor persona.

A mis hermanos por su cariño y apoyo durante todo este proceso, gracias por sus palabras de aliento y de una u otra forma por acompañarme en todos mis sueños y metas.

A mi pareja, pues él, fue un gran apoyo para lograr alcanzar esta dichosa y muy merecida victoria en la vida, el poder haber culminado esta tesis con éxito y poder disfrutar del privilegio de ser agradecida con esa persona que se preocupó por mí en cada momento y que siempre quiso lo mejor para mí, te agradezco por tantas ayudas y tantos aportes, no solo para culminar con el desarrollo de esta hermosa profesión, sino también para mi vida, gracias por ese apoyo incondicional.

También quiero agradecer a mi amigo Luis Daniel por apoyarme cuando más lo necesito, por extender su mano en momentos difíciles y por el cariño brindado cada día, de verdad mil gracias.

Agradezco a mis docentes de la Universidad de Nariño por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi preparación profesional, quienes con sus valiosas enseñanzas hicieron que pueda crecer cada día y en especial a mi director de trabajo de grado MV., Esp, Pat Vet, Carlos Alberto Chaves por guiar esta investigación y formar parte de este objetivo alcanzado.

RESUMEN

El presente estudio es derivado del proyecto de investigación “DETERMINACIÓN *in vivo* DEL EFECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus casei* MICROENCAPSULADO, SOBRE LA MORFOLOGÍA INTESTINAL, RESPUESTA INMUNOLÓGICA, PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y PRODUCTIVOS, EN POLLO DE ENGORDE ROSS”, adelantado por el grupo de investigación FISE PROBIOTEC. La evaluación morfológica fue llevada a cabo por el grupo de investigación MIFARVET, en las instalaciones del laboratorio de fisiología y reproducción animal de la universidad de Nariño, ubicado en el municipio de Pasto, departamento de Nariño.

La finalidad del estudio fue evaluar el efecto de *Lactobacillus casei* ATCC® 334 sobre la morfología de intestino delgado en pollos Ross; para lo cual, previamente se realizó un ensayo experimental con una población de 105 pollos, machos, línea Ross de un día de edad. Posterior al experimento, se realizó el muestreo de los animales, se efectuó la disección y extracción del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), seguidamente, se procesaron mediante la técnica de inclusión en parafina y coloración de Hematoxilina y Eosina, con el fin de evaluar mediante microscopía óptica las características histológicas y posibles alteraciones histopatológicas en la mucosa de intestino delgado. Adicionalmente, se realizó histoquímica a los bloques de parafina con el fin de hacer un conteo de células caliciformes y evaluar la capa de mucina en la superficial apical de la mucosa intestinal. Para el análisis estadístico se utilizó estadística descriptiva mediante tablas de frecuencia y la determinación porcentual de cada una de las alteraciones morfológicas encontradas.

El análisis microscópico de los tejidos evidenció lesiones leves, moderadas y severas, dichos hallazgos morfológicos permiten concluir que *L. casei* ATCC® 334 administrado bajo las condiciones experimentales citadas por Gámez y Zambrano, produce alteraciones microscópicas y lesiones moderadas a severas en la mucosa de intestino delgado, lo cual sugiere reevaluar el protocolo de administración del probiótico en pollos Ross.

Palabras claves: microencapsulación, histopatología, microorganismo, probiótico, morfología, sistema digestivo.

ABSTRACT

This study is derived from the research project "IN VIVO DETERMINATION OF THE PROBIOTIC EFFECT OF MICROENCAPSULATED *Lactobacillus casei*, ON INTESTINAL MORPHOLOGY, IMMUNOLOGICAL RESPONSE, BIOCHEMICAL AND PRODUCTIVE PARAMETERS, IN ROSS BROILER CHICKEN", advanced by the FISE PROBIOTEC research group. The morphological evaluation was carried out by the MIFARVET research group, in the facilities of the animal physiology and reproduction laboratory of the University of Nariño, located in the municipality of Pasto, department of Nariño.

The purpose of the study was to evaluate the effect of *Lactobacillus casei* ATCC® 334 on the morphology of the small intestine in Ross chickens; For which, an experimental trial was previously carried out with a population of 105 one-day-old Ross line male chickens. After the experiment, the sampling of the animals was carried out, the dissection and extraction of the small intestine (duodenum, jejunum and ileum) were carried out, subsequently, they were processed by means of the paraffin inclusion technique and Hematoxylin and Eosin staining in order to evaluate by light microscopy the histological characteristics and possible histopathological alterations in the mucosa of the small intestine. Additionally, histochemistry was performed on the paraffin blocks in order to count goblet cells and evaluate the mucin layer on the apical surface of the intestinal mucosa. For the statistical analysis, descriptive statistics were used through frequency tables and the percentage determination of each of the morphological alterations found.

The microscopic analysis of the tissues showed mild, moderate and severe lesions, these morphological findings allow us to conclude that *L. casei* ATCC® 334 administered under the experimental conditions cited by Gamez and Zambrano, produces microscopic alterations and moderate to severe lesions in the mucosa of the small intestine. Which suggests reevaluating the administration protocol of the probiotic in Ross chickens.

Keywords: microencapsulation, histopathology, microorganism, probiotic, morphology, digestive system.

CONTENIDO

	Pag.
GLOSARIO	15
INTRODUCCIÓN	18
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	20
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GENERAL	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MARCO TEÓRICO	23
4.1. LÍNEA DE LAS AVES UTILIZADA EN LA INVESTIGACIÓN	23
4.2. TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS AVES	23
4.2.1 Pico.	24
4.2.2 Cavidad bucal.	24
4.2.3 Lengua..	24
4.2.4 Lubricante.	24
4.2.5 Esófago y Buche.	25
4.2.5 Región gástrica.	25
4.2.6 Intestino delgado.	25
4.2.7 Intestino grueso.	26
4.2.8 Páncreas.	26
4.2.9 Hígado, vesícula biliar, y conducto biliar.	27
4.3. HISTOLOGÍA DEL INTESTINO DELGADO DEL POLLO	27
4.3.1 Túnica mucosa..	28
4.3.2 Túnica submucosa.	29
4.3.3 Túnica muscular.	29
4.3.4 Túnica serosa.	29
4.4. CARACTERÍSTICAS DE LA PARED INTESTINAL	30
4.5. CONTROL NERVIOSO DE LA FUNCIÓN GASTROINTESTINAL	30
4.5.1. Control autónomo del tubo digestivo.	30
4.6. CONTROL HORMONAL DE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL	31
4.7. INTEGRIDAD INTESTINAL	31
4.7.1. Agentes potencialmente patógenos que comprometen la integridad intestinal en las aves.	32
4.7.2. Factores no infecciosos que comprometen la integridad intestinal.	36
4.8. INFLUENCIA DE LA MICROFLORA SOBRE LA SALUD INTESTINAL DE LAS AVES	37
4.9. SISTEMA INMUNE DIGESTIVO DE LAS AVES	40
4.9.1. Bolsa de Fabricio.	40
4.9.2 Divertículo de Meckel.	40
4.9.3 Placas de Peyer.	41

4.9.4 Tonsilas Cecales.	41
4.9.5 Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT).	41
4.9.6 Tonsila Esofágica (TE).	42
4.10. RESPUESTA INMUNE EN EL TUBO DIGESTIVO DE LAS AVES	42
4.11. PROBIÓTICOS	43
4.11.1. Mecanismos de acción de los probióticos.	46
4.11.2. Efectos benéficos de los probióticos. L	48
4.12. MICROENCAPSULACIÓN	50
4.13. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE TEJIDOS	51
4.13.1. Técnica histológica.	51
4.13.2. Utilidad de colorantes para el diagnóstico histopatológico	51
5. DISEÑO METODOLÓGICO	54
5.1. LOCALIZACIÓN	54
5.2. TAMAÑO DE MUESTRA	54
5.2.1. Plan de suministro de alimento.	57
5.2.2. Técnica de muestreo..	58
5.2.3. Evaluación microscópica de tejidos.	60
5.3. TINCIONES ESPECIALES - HISTOQUÍMICA	65
5.4. VARIABLES DE ESTUDIO	65
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	65
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
6.1. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE TEJIDOS	66
6.1.1. Descripción microscópica de los diagnósticos morfológicos encontrados en las láminas de Hematoxilina y Eosina (H/E).	66
6.1.2. Evaluación de láminas de histoquímica.	87
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	91
7.1 CONCLUSIONES	91
7.2 RECOMENDACIONES	92
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXOS	105

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Colorantes y reacciones histológicas comunes	53
Cuadro 2. Criterios de evaluación microscópicos de los micropreparados histológicos	62

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Distribución de los tratamientos en las unidades de experimentación	55
Tabla 2. Muestras por cada tratamiento y cada repetición	56
Tabla 3. Micropreparados/láminas histológicas para tinción inmunohistoquímica/Alcian Blue y para histología/Hematoxilina y Eosina en los 5 tratamientos	60
Tabla 4. Conteo de células calciformes por tratamiento	88

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Toma de muestra de intestino delgado	63
Figura 2. Bloques referenciados, para la identificación de tejidos en las láminas	63
Figura 3. (A y B). Rotulo de láminas histológicas correspondientes a intestino delgado de pollo Ross utilizando el método de doble ciego	64
Figura 4. Distribución de los hallazgos microscópicos encontrados en los tratamientos 0, 1, 2, 3 y 4 en duodeno, yeyuno e íleon	66
Figura 5. Atrofia y fusión de vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular	73
Figura 6. Hiperplasia de glándulas en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular	76
Figura 7. Cambios asociados a muerte celular: necrosis de coagulación en los segmentos de intestino delgado evaluados en mucosa región glandular	77
Figura 8. Infiltrado inflamatorio en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular	80
Figura 9. Estrato afectado de la vellosidad en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular	84
Figura 10. A–D. Descripción y registro fotográfico (láminas de hematoxilina y eosina)	86
Figura 11. Se presenta el resultado del conteo de células caliciformes en los diferentes tratamientos con tinción Alcian Blue	87
Figura 12. Marcación positiva para la tinción diferencial alcian blue en células caliciformes	90

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo A. Distribución de lesiones microscópicas encontradas en duodeno, yeyuno e íleon de pollo Ross	106
Anexo B. Atrofia y fusión de vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular	107
Anexo C. Hiperplasia de glándulas en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular	109
Anexo D. Cambios asociados a muerte celular: coagulación en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular	110
Anexo E. Cambios inflamatorios en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular	111
Anexo F. Estrato afectado en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular	115

GLOSARIO

ALIMENTO BALANCEADO: alimento que aporta la nutrición adecuada, destinado a animales (no al hombre). Por su fórmula específica, está preparado para ser consumido como única ración y es capaz de mantener con vida y/o promover la producción sin que sea necesario proporcionar ninguna sustancia adicional, excepto agua.

ALIMENTO CONCENTRADO: alimento combinado con otro para mejorar el balance nutritivo del producto y que será posteriormente diluido y mezclado para producir un suplemento o un alimento completo.

ANTIBIÓTICO: es una sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles.

ANTICOCCIDIAL: son sustancias químicas que al administrarse oralmente y junto con el alimento permiten el control de la enfermedad denominada coccidiosis.

CARIORREXIS: fragmentación del núcleo en trozos con cromatina condensada.

CÉLULA DE PANETH: cumplen un importante rol en los mecanismos de defensa y protección del tracto gastrointestinal en varias especies animales a través de sus secreciones como lisozima, fosfolipasa A2 secretoria y defensinas.

CÉLULAS CALICIFORMES: son células glandulares, o glándulas unicelulares secretoras de mucus, presentes en los revestimientos epiteliales de las mucosas de las vías respiratorias y el aparato digestivo.

CORTE HISTOLÓGICO: es una sección o rodaja fina de un tejido biológico adherida sobre un portaobjetos y generalmente coloreada con alguna tinción específica para resaltar una parte de la estructura.

CRIPTAS DE LIEBERKÜHN: invaginaciones de forma tubular del epitelio intestinal, que ocupan desde la luz del tubo digestivo hasta la capa muscular de la mucosa. Poseen un epitelio simple en el cual se sitúan células caliciformes, cilíndricas absortivas, células de Paneth (situadas en la base) y células enterocromafines.

DISBIOSIS: la disbiosis es el desbalance del equilibrio microbiano de la microbiota normal, debido a cambios cuantitativos o cualitativos de su composición, cambios en su funcionamiento o actividades metabólicas, o bien, a cambios en su distribución.

ENTEROCITOS: son células epiteliales del intestino encargadas de realizar: la absorción de diversos nutrientes esenciales, el transporte de agua y electrolitos al interior del organismo y la secreción de proteína en la luz intestinal.

HISTOLOGÍA: parte de la biología que estudia la composición, la estructura y las características de los tejidos orgánicos de los seres vivos.

HISTOPATOLOGÍA: es la rama de la Patología que trata el diagnóstico de enfermedades a través del estudio de los tejidos.

HISTOQUÍMICA: las técnicas histoquímicas son aquellas que supongan una reacción química en la que intervienen moléculas pertenecientes al propio tejido.

LACTOBACILLUS: es un género de bacterias grampositivas, facultativas o microaerófilas, baciliforme, no productora de esporas.

MICRIBIÓTA INTESTINAL: es la comunidad de microorganismos vivos residentes en el tubo digestivo.

MICROENCAPSULACIÓN: La microencapsulación es definida como una tecnología de empaquetamiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos.

MICROSCOPIA ÓPTICA: es el conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visible los objetos de estudio que por su pequeñez están fuera del rango de resolución del ojo normal.

MONONUCLEAR: célula que posee un solo núcleo simple, como el linfocito y el monocito.

MORFOLOGÍA: es la disciplina encargada del estudio de la estructura de un organismo o sistema y sus respectivas características.

MORFOMETRÍA: significa "medición". Se refiere al análisis cuantitativo de la forma, un concepto que abarca el tamaño y la forma.

MUCINA: son una familia de proteínas de alto peso molecular y altamente glicosiladas producidas por las células de los tejidos epiteliales de la mayoría de los animales.

NECROSIS: ocurre después de la muerte resultante de un daño agudo a los tejidos.

PICNÓSIS: es la retracción del núcleo con condensación de cromatina.

PREBIÓTICO: se refiere a los ingredientes de los alimentos no digeribles que producen efectos beneficiosos sobre el huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de un tipo o de un número limitado de bacterias en el colon.

PROBIÓTICO: microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada confieren un efecto beneficioso sobre la salud del huésped.

RESISTENCIA BACTERIANA: es la capacidad que tienen las bacterias de soportar los efectos de los antibióticos o biocidas destinados a eliminarlas o controlarlas.

SIMBIÓTICO: se refiere a aquellos productos que contienen probióticos y prebióticos.

VELLOSIDAD INTESTINAL: proyecciones diminutas con aspecto de pelo que cubren el interior del intestino delgado. Contienen vasos sanguíneos y ayudan a absorber los nutrientes.

INTRODUCCIÓN

La Federación nacional de avicultores de Colombia-FENAVI¹ manifiesta que la industria avícola en Colombia ha ido incrementando su producción a diferencia de otros tipos de carne, el aumento de consumo de carne de pollo en el país ha sido significativo. Durante el 2018 se registró un récord en la producción de huevo y de pollo: 2.500.000 toneladas, lo que significó un crecimiento del 4,5% en relación con el 2017 donde la producción en la industria avícola generó 108.500 toneladas. En 2018, el número de aves que entraron a hacer parte de la población avícola fue de 840 millones, 60 millones más que en el 2017, representando un crecimiento proyectado de 2%; convirtiéndose en una cifra histórica en Colombia y permitiendo asegurar un aumento de la capacidad instalada en granjas.

Tal como señala Díaz, Izasa y Angel², en la actualidad los probióticos se plantean como una opción potencial de sustitución a los antibióticos utilizados en dosis subterapéuticas, como promotores de crecimiento. Estos cuentan con ciertas ventajas como no dejar residuos en el huevo ni en la carne del ave, y no generan riesgo de resistencia antibiótica en la microbiota humana. La utilización de microorganismos probióticos, principalmente bacterias productoras de ácido láctico en la alimentación de las aves, contribuye al mantenimiento de la integridad y estabilidad de la flora intestinal. Esto hace que sea difícil la proliferación de microorganismos perjudiciales, lo cual contribuye a prevenir el desarrollo de enfermedades y a optimizar el rendimiento productivo.

De acuerdo con Diplock³, los probióticos ejercen efectos benéficos mediante su crecimiento y/o actividad a nivel del tubo digestivo. En la actualidad, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura ha modificado el término a “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud del huésped”⁴.

¹ FENAVI. El sector avícola en Colombia creció el 4.5% en 2018 [en línea]. En: FENAVI (Bogotá): 2018 [consultada: 20 feb. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://fenavi.org/comunicados-de-prensa/el-sector-avicola-crecio-45-en-2018/>

² DIAZ, Elvis., IZASA, Jaime., y ANGEL, Daniela. Probióticos en la avicultura: una revisión. [en línea]. En: Rev. Med. Vet. (Bogotá): 2017 [consultada: 16 feb.2020]. Disponible en la dirección electrónica: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n35/0122-9354-rmv-35-00175.pdf>

³ DIPLOK, A. Scientific concepts of functional food in Europe, Citado por CARRILLO, Raúl., y ACEVEDO, Bibiana. Simbióticos, prebióticos y probióticos en la práctica clínica [en línea]. En: Revista Investigación Médica Sur México. (Mexico): 2009 [Consultada: 16 feb. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2009/ms094b.pdf>

⁴ DIAZ, Elvis., IZASA, Jaime., y ANGEL, Daniela. Op cit., p. 177.

Como mencionan Manzano, Estupiñan y Poveda⁵, existen varios microorganismos que se establecen en el tracto digestivo de las aves. La microflora es una mezcla de bacterias, hongos y protozoos, sin embargo, las bacterias son los microorganismos predominantes. La perturbación en la microflora normal de las aves puede conducir a un desequilibrio en la flora microbiana que contribuye a la proliferación descontrolada de enteropatógenos⁶.

Por ello los avances en relación a los efectos benéficos de los probióticos han ido en aumento, ya que se ha descrito que los probióticos pueden modular la respuesta inmune en animales y humanos no sólo en la mucosa intestinal, sino también a nivel sistémico. Dadas sus propiedades inmunomoduladoras, actualmente se evalúa la utilidad de los probióticos en el manejo preventivo o terapéutico de enfermedades inflamatorias.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *L. casei* ATCC 334 sobre la morfología del intestino delgado de pollo Ross, describir los cambios microscópicos, determinar mediante histoquímica el efecto sobre la capa de mucina y hacer un conteo del número de células caliciformes en la mucosa del intestino delgado posterior a la administración de *L. casei* ATCC 334 en el ensayo experimental desarrollado por Gámez y Zambrano⁷.

⁵ MANZANO, Claudia., ESTUPIÑAN, Claudia., y POVEDA, Elpidia. Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia [en línea]. En: revista chilena de nutrición. (Chile): 2012 [Consultada 20 feb. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182012000100010

⁶ MATTE, Fabrizio. Influencia de la microflora sobre la salud intestinal de las aves [en línea]. En: (Brasil): 2019 [Consultada: 10 mar. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.vetanco.com/es/wp-content/uploads/sites/3/2017/10/INFLUENCIA-DE-LA-MICROFLORA-SOBRE-LA-SALUD-INTESTINAL-DE-LAS-AVES-1>

⁷ GAMEZ, Henry., y ZAMBRANO, Johnny. Determinación in vivo del efecto probiótico de *Lactobacillus casei* microencapsulado, sobre morfología intestinal, respuesta inmunológica, parámetros bioquímicos y productivos, en pollo de engorde Ross. Pasto: UDENAR, 2019.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Como menciona Milián⁸, debido a los métodos de manejo intensivos, los animales son susceptibles a los desbalances bacterianos entéricos. Esto conlleva a la insuficiente conversión de alimentos y a la disminución de la respuesta zotécnica. Para atenuar estos problemas, las dietas se suplementan con antibióticos que han mostrado ser efectivos en la disminución de los trastornos diarreicos y en la promoción del crecimiento animal. Desde hace algunos años, a nivel mundial se ha prohibido el uso de ciertos antibióticos en la alimentación animal, ya que se ha comprobado el aumento de la resistencia bacteriana y el efecto residual que tienen en los productos de origen animal.

En los últimos veinte años, se han realizado investigaciones acerca de la utilización de probióticos, como sustitutos de antibióticos en la nutrición animal. Bajo este lineamiento, y dada la importancia enmarcada en la salud animal y humana se ha propuesto como alternativa sanitaria y nutricional el uso de probióticos, ya que se ha reportado que estos podrían mejorar los parámetros productivos y sanitarios en algunas especies animales⁹.

⁸ MILIÁN, Grethel. Empleo de probióticos basado en *Bacillus* spp de sus endosporas en la producción avícola [en línea]. En: Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe (España): 2008, p. 1. [Consultada: 14 mar. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <http://www.redalyc.org/pdf/1930/193015494001.pdf>

⁹ *Ibid.*, p. 2

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Teniendo en cuenta que la resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial y que el uso indebido de estos fármacos en el ser humano y los animales es muy alto en la actualidad, los probióticos se plantean como una opción potencial de sustitución a los antibióticos en la alimentación animal. Por esta razón es importante establecer el efecto de estos microorganismos sobre la mucosa intestinal. A partir de lo mencionado surge la pregunta de investigación ¿Cuál es efecto de *L. casei* ATCC 334 sobre la morfología de intestino delgado en pollo Ross?

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de *Lactobacillus casei* ATCC ® 334 sobre la morfología de intestino delgado en pollo Ross.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Describir las alteraciones microscópicas en la mucosa del intestino delgado en pollo Ross tras la administración de *Lactobacillus casei* ATCC ® 334

Determinar mediante histoquímica el efecto sobre la capa de mucina y el número de células caliciformes en la mucosa del intestino delgado de pollo Ross luego del suministro de *Lactobacillus casei* ATCC 334.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. LÍNEA DE LAS AVES UTILIZADA EN LA INVESTIGACIÓN

El Ross 308 AP es un pollo de engorde desarrollado por Aviagen, una multinacional norteamericana que tiene reconocimiento a nivel mundial en venta de genética aviar. Suministra abuelas y reproductoras de un día de edad a más de 100 países del mundo. En la línea de pollo de engorde cuenta con la Ross 308 AP que se caracteriza por ser un pollo robusto, de rápido crecimiento, conversión alimenticia eficiente y con buen rendimiento de carne¹⁰.

4.2. TRACTO GASTROINTESTINAL DE LAS AVES

Como menciona Rueda¹¹ es importante tener en cuenta cada uno de los órganos digestivos de las aves ya que estos son diferentes en muchos aspectos al de los mamíferos. En las aves están ausentes los dientes, mientras existe un buche bien desarrollado, una molleja, el ciego es doble y la ausencia del colon.

Estrada¹² expone que las aves no tienen dientes, no mastican, y que el esófago continua con el buche, donde el alimento es almacenado y remojado, de aquí el alimento pasa al proventrículo o estomago glandular, de pared gruesa inmediatamente en frente de la molleja, aquí es almacenado temporalmente mientras los jugos digestivos son copiosamente secretados y mezclados con el alimento, en la molleja o estomago muscular, la cual normalmente contiene piedras o grits, así el alimento es triturado, después pasa a través del intestino delgado, ciego el grueso y la cloaca.

¹⁰ AVIAGEN. America latina pollo de engorde. Pollo de engorde Ross 308 AP [en línea]. En: AVIAGEN. 2017. [Consultada: 24 mar. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Ross_308AP-Broiler-PO-2017-ES.pdf

¹¹ RUEDA, Leidy. Acompañamiento técnico al laboratorio de Norgtech en la utilización de estabilizadores de pasaje digestivo en pollos de engorde. Bucaramanga: Universidad Francisco de Paula Santander, 2012.

¹² ESTRADA, Mónica. Anatomía y fisiología aviar [en línea]. En: plataforma académica universidad de Antioquia (Medellín): 2011 [Consultada: 24 mar. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/247268/mod_resource/content/0/ANATOMIA_Y_FISIOLOGIA_AVIAR_documento_2011.pdf

4.2.1 Pico. Es el representante en las aves de las mandíbulas, de los labios y en parte de los carrillos. El pico es el órgano de aprehensión de los alimentos e incluso medio de defensa, formado por parte de los maxilares superior e inferior, recubierto por láminas corneas densas que constituyen la ranfoteca¹³.

4.2.2 Cavidad bucal. No existe separación neta entre la boca y la faringe. En las paredes de la cavidad bucal se hallan numerosas glándulas salivares. El color de la saliva es gris lechoso a claro; el olor, algo pútrido. La reacción es casi siempre ácida, siendo el promedio del pH 6,75. La amilasa salival está siempre presente. También se encuentra una pequeña cantidad de lipasa¹⁴.

4.2.3 Lengua. La lengua de las aves es generalmente mucho menos móvil que la de los mamíferos. Su forma depende en gran medida de la conformación del pico. Así en la gallina es estrecha y puntiaguda. La lengua está suspendida del hioides, formando con él un conjunto móvil. Los músculos linguales propiamente dichos, que constituyen la base del órgano de referencia, son rudimentarios, de ahí que su movilidad sea escasa. Toda la lengua está revestida por una mucosa tegumentaria, recia, muy cornificada sobre todo en la punta y en el dorso en la gallina. En el dorso de la lengua de la gallina existe una fila transversal de papilas filiformes o cónicas dirigidas hacia atrás. En la mucosa lingual hay además corpúsculos nerviosos terminales, que sirven para la percepción táctil. Las yemas gustativas se presentan sólo aisladas. La actividad funcional de la lengua consiste en la aprensión, selección y deglución de los alimentos¹⁵.

4.2.4 Lubricante. Ayudan a la masticación, a la formación del bolo y a la deglución, sin esta mezcla la deglución podría ser muy difícil. Actividad enzimática: la alfa amilasa (ptialina) es encontrada en la saliva de algunos pájaros. Esta sirve para romper enlaces alfa 4 glucosídicos en almidón y glucógeno. Capacidad buffer; una gran cantidad de bicarbonatos es secretada en la saliva, así sirve como un buffer (amortiguador) en la ingesta. Gusto: la saliva solubiliza un número de químicos en el alimento el cual una vez en solución puede ser detectado por las papilas gustativas¹⁶.

¹³ ESTRADA, Mónica. Anatomía y fisiología aviar [en línea]. En: plataforma académica universidad de Antioquia (Medellín): 2011, p. 19 [Consultada: 24 mar. 2020]. Disponible en la dirección electrónica:

http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/247268/mod_resource/content/0/ANA_TOMIA_Y_FISIOLOGIA_AVIAR_documento_2011.pdf

¹⁴ PULGARIN, Diana. Evaluación de parámetros productivos utilizando tres niveles crecientes de glicerol en dietas para pollos de engorde. Bogotá: Universidad de Cundinamarca, 2015, p. 18.

¹⁵ *Ibíd.*, p. 19.

¹⁶ ESTRADA, Op. cit., p. 20.

4.2.5 Esófago y Bucho. El esófago es algo amplio y dilatado, sirviendo así para acomodar los voluminosos alimentos sin masticar. De allí se encuentra una evaginación extraordinariamente dilatado, dirigida hacia delante y a la derecha, que es lo que se llama bucho. El bucho es un ensanchamiento estructural diversificado según las especies que cumplen distintas funciones, pero fundamentalmente dos: almacenamiento de alimento para el remojo, humectación y maceración de éstos y regulación de la repleción gástrica. Además, colabora al reblandecimiento e inhibición del alimento junto a la saliva y secreción esofágica, gracias a la secreción de moco¹⁷. En el bucho no se absorben sustancias tan simples como agua, cloruro sódico y glucosa.

La reacción del contenido del bucho es siempre ácida. La reacción promedio es aproximadamente de un pH 5. En cuanto a la duración promedio del tiempo que tiene el alimento en el bucho es de dos horas. La actividad motora del bucho está controlado por el sistema nervioso autónomo y presenta dos tipos de movimientos: contracciones del hambre con carácter peristáltico y vaciamiento del bucho gobernado reflejamente por impulsos provenientes del estómago fundamentalmente¹⁸.

4.2.5 Región gástrica. La digestión gástrica se lleva a cabo en dos órganos distintos, el proventrículo y la molleja. El proventrículo es un órgano pequeño (estómago glandular o verdadero), a través del cual el alimento pasa rápidamente, su principal función es la secreción de un fluido gástrico. Este fluido es similar al de los mamíferos no rumiantes, su contenido es de pepsina y ácido clorhídrico. La función de la molleja es una acción mecánica de mezclado y molido del alimento. Aquí los fluidos secretados por el proventrículo son mezclados con el bolo durante el molido. Los grits, son pequeños granitos, los cuales con frecuencia son adicionados a las raciones de alimento para incrementar la digestibilidad de los granos enteros o con mínimo proceso. Los grits estimulan motilidad en la molleja y proveen superficie adicional para el molido. Cuando el alimento es provisto en forma de masa, el beneficio de los grits es mínimo¹⁹.

4.2.6 Intestino delgado. Está formado por tres segmentos que son el duodeno, donde desembocan de dos a tres conductos pancreáticos, uno biliar y uno hepático. La reacción del contenido del duodeno es casi siempre ácida, presentando un pH de 6,31, por lo que posiblemente el jugo gástrico ejerce aquí la mayor parte de su acción, esta irrigado por la arteria celiaca. El yeyuno empieza donde una de las ramas de la U del duodeno se aparta de la otra. El yeyuno consta de unas diez asas pequeñas, dispuestas como una guirnalda y suspendidas de una parte del mesenterio. Presenta un pH de 7,04. El yeyuno lo delimita la entrada de la arteria mesentérica craneal a irrigar el tubo intestinal. Su color es pardo-verdoso o verde-grisáceo, ocupa la mitad derecha de la cavidad visceral y lo forman 11 asas externas y 10 internas.

¹⁷ PULGARIN, Op. cit., p. 20.

¹⁸ Ibid., p. 20.

¹⁹ ESTRADA, Op. cit., p. 22.

Termina en el divertículo de Meckel, el cual es el vestigio del tallo del saco vitelino y funciona como órgano linfoide, se localiza en la parte terminal del yeyuno. El Íleon, cuya estructura es estirada, se encuentra en el centro de la cavidad abdominal. El pH fluctúa entre 6,8 y 7,6. En el lugar del íleon, donde desembocan los ciegos, empieza el intestino grueso. El íleon es del mismo color que el duodeno, va desde el divertículo de Meckel al inicio de los ciegos, lateralmente lo acompañan los dos ciegos en la gallina y están unidos por los ligamentos iliocecales²⁰.

4.2.7 Intestino grueso. El intestino grueso, que se subdivide también en tres porciones, las cuales son ciego, recto y cloaca. El ciego de las aves domésticas, como son las gallinas, son dos tubos con extremidades ciegas, que se originan en la unión del intestino delgado y el recto y se extienden oralmente hacia el hígado. El pH del ciego derecho es de 7,08, mientras que el pH del ciego izquierdo es de 7,12. La porción terminal de los ciegos es mucho más ancha que la porción inicial. Los ciegos además tienen como función continuar la desintegración de los principios nutritivos y la absorción de agua. El recto es corto y derecho, se expande para formar la cloaca, su función es la de acumular las heces. En el colon se realiza la absorción de agua. La Cloaca es un órgano común a los tractos urinario, digestivo y reproductivo. Por lo tanto, la orina y las heces se eliminan juntas²¹.

4.2.8 Páncreas. Es un órgano accesorio de la digestión, es una estructura glandular que juega un papel esencial en la fisiología digestiva de las aves. El páncreas siendo glándula endocrina y exocrina, la función endocrina es la secreción de hormonas, insulina y glucagón, la exocrina se encarga de la producción y secreción de fluidos que son necesarios para la digestión dentro del intestino delgado. Muchas de las 16 enzimas pancreáticas son almacenadas y secretadas en forma inactiva y se activan en el sitio de digestión. El tripsinógeno es una enzima proteolítica que es activada en el intestino delgado por la enteroquinasa, una enzima secretada de la mucosa intestinal. Al activarse el tripsinogeno se convierte en tripsina. Las nucleasas, lipasas, y amilasa pancreática son secretadas en forma activa, muchas de las enzimas requieren un ambiente específico antes de su funcionamiento. Por ejemplo, la amilasa requiere de un PH de 6.9 y la presencia de iones inorgánicos antes de que digiera los carbohidratos complejos²².

²⁰ RUEDA, Op. cit., p. 24.

²¹ Ibid., p. 24.

²² ESTRADA, Op. cit., p. 22.

4.2.9 Hígado, vesícula biliar, y conducto biliar. El hígado es un órgano accesorio indispensable en el tracto gastrointestinal. Desde el estómago y el intestino delgado, la mayoría de los nutrientes absorbidos viajan a través de la vena porta al hígado, este no solo juega un papel importante en el metabolismo de los nutrientes y almacenaje también forma la bilis, fluido esencial para la absorción de lípidos en el intestino delgado²³.

4.3. HISTOLOGÍA DEL INTESTINO DELGADO DEL POLLO

La histología es la rama de la anatomía centrada en el análisis de los tejidos del organismo. Se trata de la disciplina que estudia desde el nivel microscópico de los tejidos hasta sus funciones. Partiendo de la estructura microscópica de los tejidos, la histología genera conocimientos sobre la organización, las interrelaciones y el funcionamiento de los diversos componentes individuales del organismo²⁴.

Se han realizado diferentes descripciones histológicas del tracto digestivo de las aves de corral, Si bien existen diferencias puntuales entre los estudios, ya sea por diferencias metodológicas o interpretaciones variables de los resultados, todos concuerdan en la estructura histológica básica de este tracto. El intestino delgado de las aves, al igual que el resto del tracto digestivo, presenta una estructura histológica similar a la de los mamíferos, siendo un tubo multicapa con: túnica mucosa, túnica submucosa, túnica muscular y túnica serosa²⁵.

El duodeno está formado por un epitelio cilíndrico simple con células caliciformes, sale del estómago muscular (molleja) por su parte anterior derecha, se dirige hacia atrás y hacia abajo a lo largo de la pared abdominal derecha y es el sitio principal de digestión y absorción de nutrientes. El yeyuno por su parte está formado por un epitelio estriado cilíndrico simple, una lámina propia de tejido conectivo laxo y células caliciformes, el yeyuno empieza donde una de las ramas de la U del duodeno se aparta de la otra y su función es la absorción de nutrientes. El íleon contiene vellosidades con epitelio cilíndrico simple, glándulas de lieberkuhn y células globulares y su función principal es la absorción de nutrientes digeridos y producción de enzimas²⁶.

²³ ESTRADA, Op. cit., p. 23.

²⁴ PÉREZ, Julián., y GARDEY, Ana. Definición de histología [En línea] en: definicion.de. 2018 [consultada: 10 abri. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://definicion.de/histologia/>

²⁵ HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 9.

²⁶ HERRERA, Op. cit., p. 6.

4.3.1 Túnica mucosa. La túnica mucosa está formada por el epitelio, la lámina propia y la muscular de la mucosa, estando estas últimas dos capas poco desarrolladas en las aves. Las vellosidades son evaginaciones de la túnica mucosa y están presentes a lo largo de todo el intestino delgado y grueso, incluso en ciegos. Estas estructuras tienen forma elipsoidal, a diferencia de los mamíferos donde son digitiformes. Con una disposición en zigzag, y varían en número y dimensiones a lo largo del intestino. Por ejemplo, sus dimensiones varían de 1,5 mm en duodeno a 0,4-0,6 mm en el íleon y colon. La capacidad digestiva y absorbiva está determinada proporcionalmente por la densidad de vellosidades y el tamaño de estas, o sea, la superficie disponible para la absorción. La morfología y densidad de vellosidades y criptas varían con la dieta y los estímulos patógenos²⁷.

El epitelio de revestimiento de las vellosidades duodenales es de tipo simple cilíndrico absorbivo, siendo una barrera permeable para nutrientes y la primera línea de defensa contra patógenos. De su estructura histológica dependerá su adecuada función y la óptima performance productiva. Estas células epiteliales, denominadas enterocitos, presentan una altura de 20-25 μm y un ancho de 7-8 μm , con un núcleo alargado situado en los dos tercios inferiores del citoplasma, y se caracterizan por su borde apical con miles de microvellosidades, también llamado borde en cepillo. Entre los enterocitos se mezclan células caliciformes —o de Goblet— a lo largo de toda la vellosidad, y células enteroendócrinas hacia la base. A su vez, se pueden observar linfocitos intraepiteliales²⁸.

Dispersas entre los enterocitos, se encuentran las células caliciformes, las cuales cumplen funciones de secreción de glicoproteínas protectoras del epitelio intestinal. Presentan una morfología característica similar a un cáliz por la acumulación de vesículas de mucinógenos en la región apical, mientras que el núcleo y el citoplasma son empujados hacia la base angosta. Su secreción forma una capa que cubre las vellosidades, protegiendo a la mucosa de la acción de las enzimas digestivas y los efectos abrasivos de la ingesta, tanto durante el desarrollo in ovo como post-eclosión.

²⁷ BOLELI, I., MAIORKA, A., y MACARI, M. Estructura funcional do trato digestório, Citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 10.

²⁸ TURK, D The Anatomy of the Avian Digestive Tract as Related to Feed Utilization. Citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 12.

La capa de mucus podría colaborar en la absorción a través de proteínas de unión al calcio. Estas células se encuentran en menor número hacia el ápice de las vellosidades y, en cuanto a los órganos, aumenta su cantidad hacia caudal, siendo el colon el de mayor concentración²⁹.

4.3.2 Túnica submucosa. La túnica submucosa es una estructura delgada conformada por tejido conectivo denso, con fibras colágenas y elásticas. En esta túnica se pueden encontrar grandes cantidades de tejido linfóide en forma difusa o en nódulos. También, se encuentran vasos sanguíneos ramificaciones de la arteria celíaca, tanto de su rama derecha como izquierda y el plexo nervioso submucoso, cuyas ramificaciones se extienden en las vellosidades. Una característica del intestino de las aves es no tener glándulas submucosas o de Brünner, a diferencia de lo que se puede observar en mamíferos. Posiblemente, la abundancia de células secretoras de mucus en la superficie del epitelio y porción apical de las glándulas en la zona de transición entre ventrículo e intestino compense la ausencia de las glándulas submucosas y de una estructura de función análoga al píloro de mamíferos³⁰.

4.3.3 Túnica muscular. Al igual que otras especies, la túnica muscular del intestino delgado de las aves consiste de una capa interna de músculo liso circular y una capa externa de músculo liso dispuesto longitudinalmente, siendo esta última más delgada. Entre estas dos capas, se encuentra tejido conjuntivo, donde se alojan los vasos sanguíneos y el plexo nervioso mientérico³¹.

4.3.4 Túnica serosa. El intestino delgado está cubierto en su totalidad por la túnica serosa, la cual está compuesta por una capa de tejido conectivo laxo, de mayor espesor en la zona de origen del mesenterio, y un mesotelio hacia el exterior³².

²⁹ BOLELI, I., MAIORKA, A., y MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório, citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 13.

³⁰ AITKEN, R. A Histochemical Study of the Stomach and Intestine of the Chicken, citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 19.

³¹ FRAPPIER, B. Digestive System, citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 19.

³² ZANUZZI, C., y BARBEITO, C. Sistema Digestivo, citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 20.

4.4. CARACTERÍSTICAS DE LA PARED INTESTINAL

Está compuesta por cinco capas: serosa, capa muscular longitudinal, capa muscular circular, submucosa, mucosa (muscular de la mucosa). El músculo liso gastrointestinal funciona como SINCITIO (dentro de cada haz, las fibras musculares presentan conexiones eléctricas debido a un gran número de uniones de baja resistencia que permiten el paso de iones desde una célula hacia la siguiente)³³.

4.5. CONTROL NERVIOSO DE LA FUNCIÓN GASTROINTESTINAL

El tubo intestinal tiene un sistema nervioso intrínseco (sistema nervioso entérico) que comienza en el esófago y termina en el ano. Se compone de dos plexos: Plexo de Auerbach o plexo externo (entre capas musculares longitudinal y circular). Controla movimientos gastrointestinales. Plexo de Meissner o plexo interno (en la submucosa). Controla la secreción gastrointestinal y flujo sanguíneo local. Hay fibras simpáticas y parasimpáticas que se conectan con los dos plexos (su estimulación puede activar o inhibir funciones gastrointestinales). Las terminaciones nerviosas sensitivas que se originan en el epitelio gastrointestinal envían fibras aferentes hacia los plexos y a los ganglios prevertebrales del sistema nervioso simpático. Desencadenan reflejos locales dentro del intestino y arcos reflejos que regresan al intestino desde los ganglios prevertebrales o sistema nervioso central³⁴.

4.5.1. Control autónomo del tubo digestivo. Inervación parasimpática (sacra y craneal), el parasimpático craneal está representado por los nervios vagos que inervan esófago, estómago, páncreas y primer 1/2 de intestino grueso. El sacro se origina en los segmentos sacros 2, 3 y 4 de la medula espinal y pasa por los nervios pélvicos hacia el 1/2 distal del intestino grueso. Las neuronas pos ganglionares están localizadas en los plexos mioentérico y submucoso. La estimulación de los nervios parasimpáticos produce un aumento general de la actividad del sistema nervioso intestinal (estimula la actividad de la mayor parte de las funciones gastrointestinales)³⁵.

³³ ZANUZZI, C., y BARBEITO, C. Sistema Digestivo, citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 27.

³⁴ Ibid., p. 29.

³⁵ Ibid., p. 30.

Inervación simpática: se originan en la medula entre los segmentos T5 y L2. Las fibras pre ganglionares entran en las cadenas simpáticas y llegan hasta los ganglios periféricos (ganglio celiaco y mesentérico) donde están localizados los cuerpos de las neuronas posganglionares. Las fibras posganglionares se extienden hacia el intestino terminando en las neuronas del sistema nervioso autónomo. Las terminaciones nerviosas simpáticas secretan noradrenalina³⁶.

4.6. CONTROL HORMONAL DE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL

La colecistocinina producida por la mucosa del yeyuno en respuesta a la presencia de sustancias grasas. Aumenta la contractilidad de la vesícula biliar, expulsando bilis que emulsifica las grasas para que puedan digerirse y absorberse. Inhibe la motilidad del estómago, vacía la vesícula biliar. Secretina: formada por la mucosa del duodeno en respuesta al jugo gástrico ácido. Inhibe la motilidad de la mayor parte del tubo digestivo. Péptido inhibidor gástrico: secretado por la mucosa del intestino delgado en respuesta al contenido de lípidos y glúcidos. Disminuye la actividad motora del estómago (retrasa el vaciamiento del contenido hacia el duodeno)³⁷.

4.7. INTEGRIDAD INTESTINAL

La integridad intestinal es la funcionalidad óptima del tubo digestivo y el principal impulsor del rendimiento y rentabilidad de las aves. Está relacionada con el revestimiento del intestino y su capacidad para realizar las funciones metabólicas: digestión, secreción, absorción y transporte de nutrientes. Prevenir la inflamación del aparato digestivo (enteritis) es esencial para proteger la integridad intestinal³⁸.

Las aves cuya integridad intestinal está intacta convierten mejor los nutrientes en energía para el crecimiento y no tan sólo para su mantenimiento o la lucha contra las enfermedades, con lo que disponen de más energía que posibilita un mayor crecimiento de manera más eficiente³⁹.

³⁶ ZANUZZI, C., y BARBEITO, C. Sistema Digestivo, citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 30.

³⁷ Ibid., p. 31.

³⁸ ECKMAN, M., y ELAM, T. Potential effects of the withdrawal of anticoccidials in Japan. Unpublished, citado por DOMINGUEZ, Ignacio. Influencia de la integridad intestinal sobre el rendimiento y rentabilidad aviares [en línea]. En: aviNews (Brasil): 2015, p. 1 [Consultada: 2 may. 2020]. Disponible la dirección electrónica: <https://avicultura.info/influencia-de-la-integridad-intestinal-sobre-el-rendimiento-y-rentabilidad-aviares/> p. 1.

³⁹ Ibid., p.2.

Hay una serie de factores o entes que pueden amenazar la integridad intestinal. Existe un amplio rango de expresión de la pérdida de ésta, que depende de la etiología y de la severidad de la injuria al Tracto gastro intestinal⁴⁰.

4.7.1. Agentes potencialmente patógenos que comprometen la integridad intestinal en las aves.

- **Agentes bacterianos.**

- ***Clostridium***. La toxina α que origina *Clostridium perfringens* tipo A y C y la toxina β producida por *C. perfringens* tipo C, se cree que provocan la necrosis de la mucosa intestinal, lesión característica de la Enteritis Necrótica. Casi todos los informes de Enteritis Necrótica corresponden a pollos de engorda de 2 a 5 semanas de edad criados en cama. Entre los signos clínicos se incluyen depresión marcada a grave, disminución del apetito, rechazo a moverse, diarrea y plumas erizadas⁴¹.

Las lesiones macroscópicas en brotes naturales, por lo general, se confinan al intestino delgado, principalmente yeyuno e íleon; sin embargo, las lesiones cecales también son aparentes. Muchas veces, los intestinos se encuentran friables y distendidos con gas, la mucosa se cubre por una pseudomembrana de laxa a muy adherida, con apariencia amarilla o verde, se informa sobre coágulos de sangre, pero las hemorragias no son una característica predominante⁴².

Los cambios microscópicos se distinguen necrosis grave de la mucosa intestinal con abundancia de fibrina mezclada con restos celulares adheridos a la mucosa necrótica. Las lesiones iniciales se desarrollan en los ápices de las vellosidades y se caracterizan por desprendimiento del epitelio y colonización de la lámina propia expuesta con los bacilos, acompañada de necrosis coagulativa. Las áreas de necrosis se encuentran rodeadas por heterófilos. El progreso de las lesiones se presenta por lo común a partir de los ápices de las vellosidades a las criptas. La necrosis se puede extender hasta la submucosa y la capa muscular del intestino. Muchas veces, se observan numerosos bacilos grandes adheridos a los restos celulares⁴³.

⁴⁰ RODRIGUEZ, Javier. Integridad intestinal del pollo de engorde [en línea]. En: Montana. 2004 [Consultada: 17 may. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <http://bibliotecavirtual.corpmontana.com/bitstream/handle/123456789/2504/M000203.pdf?sequence=7&isAllowed=y>

⁴¹ CALNEK, B. Enfermedades de las aves. 2° ed. España: Manual Moderno, 2000. p. 268.

⁴² Ibid., p. 269.

⁴³ Ibid., p. 269.

La integridad intestinal está equilibrada por la flora microbiana y puede verse influida por varios factores infecciosos y no infecciosos. La enteritis bacteriana, la coccidiosis o los virus pueden causar un desequilibrio del aparato digestivo. Una disfuncionalidad causada por factores no infecciosos se debe principalmente a: una dieta rica en sal, las amilasas biógenas, polisacáridos distintos del almidón, Polisacáridos distintos del almidón, (como los xilanos, los glucanos o los mananos), grasas de mala calidad y micotoxinas⁴⁴.

Un mal manejo y la falta de higiene y medidas de bioseguridad desencadenan una pérdida de integridad intestinal. Todas las enfermedades inmunodepresoras (por ejemplo, la enfermedad Gumboro o Marek) crean un entorno favorable para la pérdida de integridad intestinal⁴⁵.

• **Salmonella.** Las infecciones con bacterias del género *Salmonella* provocan gran variedad de enfermedades agudas y crónicas en la industria avícola; de hecho, las aves afectadas representan uno de los reservorios más importantes de salmonelas que pueden ser transmitidas hacia los hermanos en la cadena alimenticia. Con más frecuencia que de cualquier otra especie, se mencionan aislamientos de *Salmonella* tanto de aves como de productos avícolas⁴⁶.

Con mayor frecuencia, las infecciones en pollos y pavos por *Salmonella* paratifoidea, se caracterizan por la colonización asintomática del aparato intestinal, algunas veces con persistencia hasta el sacrificio, lo cual permite la contaminación de los cadáveres. Algunos serotipos, en especial *S. enteritidis*, puede depositarse en el contenido de huevos limpios e intactos; por lo que el manejo inapropiado de los alimentos antes del consumo, puede permitir la multiplicación de *Salmonella* a concentraciones capaces de originar enfermedades gastrointestinales graves en los consumidores humanos⁴⁷.

Los signos típicos de la infección paratifoidea relacionados con el sistema gastrointestinal incluyen diarreas profusas acuosas, lo que ocasiona deshidratación y pastosidad en el área de la cloaca. Cuando el curso de la enfermedad es más prolongado, es frecuente la enteritis grave acompañada de lesiones necróticas focales en la mucosa del intestino delgado y es común observar núcleos cecales con apariencia de queso⁴⁸.

⁴⁴ DOMINGUEZ, Op. cit., p. 3.

⁴⁵ Ibid, p. 3.

⁴⁶ CALNEK, Op. cit., p. 79.

⁴⁷ Ibid., p. 80.

⁴⁸ Ibid., p. 103.

La invasión de las células epiteliales intestinales por salmonelas, origina una serie de cambios patológicos que afectan al líquido intestinal y a la regulación de electrolitos; este proceso puede originar finalmente muerte celular, y por tanto producir y exacerbar la diarrea. La inoculación oral de gallinas de postura con *S. enteritidis* tal vez ocasione inflamación del epitelio y de la lámina propia del colon y los ciegos relacionados con la infiltración heterofílica; aunque a menudo los ciegos y la unión ileocecal son los sitios de afinidad particular por las salmonelas, pueden ser invadidas las células epiteliales de todo el intestino. Además, la invasión epitelial puede permitir la diseminación de las salmonelas a través de la membrana basal hacia la lámina propia a través de los macrófagos⁴⁹.

• ***Escherichia coli***. La enteritis primaria en aves, originada por *E. coli*, se ha considerado poco frecuente, si se llega a presentar. Sin embargo, de manera reciente, se ha recuperado *E. coli enterotoxígena* (ECET) que produce toxinas capaces de acumular líquido en las asas intestinales ligadas de pollos con diarrea. También se han identificado infecciones experimentales y de desarrollo natural en pollos y un pichón con *E. coli adherente y destructora* (ECAD). Las infecciones con virus de infección de la bolsa en los pollos y la infección por adenovirus en el pichón, se consideraron como factores predisponentes posibles a la infección ECAD⁵⁰.

- **Agentes parasitarios.**

• ***Eimeria***. Los parásitos protozoarios del género *Eimeria* se multiplican en el aparato intestinal y ocasionan daño tisular, con interrupción resultante de la alimentación y de los procesos digestivos o absorción de nutrientes, deshidratación, pérdida de sangre, y aumento en la susceptibilidad a otros patógenos infecciosos⁵¹.

Las lesiones pueden observarse a menudo en la superficie serosa del intestino delgado. La mucosa intestinal puede verse primero adelgazada, y después se cubre con placas blancas que tienden a acomodarse de manera transversa y tienen una apariencia de escalera, por las estriaciones. El intestino puede estar pálido y contiene líquido acuoso. La lesión macroscópica en infecciones ligeras se limita al asa duodenal, con pocas placas por centímetro, pero en infecciones graves las lesiones pueden extenderse en gran parte del intestino delgado, y las placas pueden sobreponerse o coalescer, por lo general, son más pequeñas en las infecciones graves por ser más numerosas. Las lesiones consisten en esquizontes, gametocitos y oocistos en desarrollo⁵².

⁴⁹ CALNEK, Op. cit., p. 104.

⁵⁰ Ibid., p. 136.

⁵¹ Ibid., p. 892

⁵² Ibid., p. 881.

La microscopia de raspados de las lesiones intestinales por lo general muestra numerosos oosistos. La histopatología del intestino delgado revela los gametocitos ovoides que cubren las células de la mucosa sobre las vellosidades. En infecciones de moderadas a graves, se desprenden los extremos de las vellosidades, lo que las trunca y fusiona además del engrosamiento de la mucosa. Algunas células pueden contener más de un parásito. El reactivo de Schiff tiñe los macrogametos y los oocistos en desarrollo de rojo brillante, por el polisacárido utilizado en la formación de la pared del oocisto⁵³.

• ***Cryptosporidium***. Viven en la región de las microvellosidades de las células epiteliales de los aparatos respiratorio y gastrointestinal en vertebrados. La criptosporidiosis intestinal (cloaca y bolsa de Fabricio) en pollos (producida por *C. baileyi*) puede resultar en lesiones histológicas, pero no en lesiones macroscópicas o en signos visibles de la enfermedad. Sin embargo, varios informes sugieren que el rendimiento de las aves puede afectarse de manera adversa. Se relacionó una inusual alta mortalidad con infección por *C. baileyi* en la bolsa de Fabricio, y había poca pigmentación, cuando se comparó a las aves inoculadas con testigos no infectados⁵⁴.

- **Agentes virales.**

Otro factor que pone en riesgo la integridad intestinal son las infecciones víricas con tropismo intestinal y que se replican en el intestino. Los virus pueden amenazar la integridad intestinal porque destruyen las células intestinales maduras que absorben los nutrientes, pero no las células que segregan líquidos, aumentan la multiplicación de las células inmaduras con menos capacidad de absorción, se pueden complicar con bacterias secundarias que aumentan la secreciones digestivas⁵⁵.

⁵³ CALNEK, Op. cit., p. 882.

⁵⁴ Ibid., p. 914.

⁵⁵ DOMINGUEZ, Op. cit., p.4.

4.7.2. Factores no infecciosos que comprometen la integridad intestinal.

Los factores no infecciosos que dañan la integridad intestinal incluyen interrupciones en la alimentación, cambios de dieta, desequilibrios nutricionales, estresores alimentarios como los polisacáridos solubles distintos del almidón (xilanos, glucanos, mananos), dietas ricas en sal, aminas biógenas, grasa de mala calidad, endotoxinas y micotoxinas. Exceso de líquido causado por la irritación o por una respuesta inmunitaria inducida por el alimento (RIIA) desencadenada por los β -mananos de ciertos productos alimentarios. Las dietas ricas en sal pueden causar un transporte excesivo de líquidos en los tejidos intestinales. Como producto secundario de la industria panadera, los carbohidratos complejos son resistentes a las enzimas digestivas y aumentan la viscosidad en el intestino. Alimentos de riesgo típicos son los que contienen cebada, centeno, trigo y otros ingredientes⁵⁶.

Mientras que la mayoría de los factores no infecciosos desencadenan diarrea, un aumento de masa en el intestino causa una ralentización del tránsito, indicado por excrementos húmedos y pegajosos. Un exceso de líquido y moco produce heces húmedas y pegajosas. La calidad de las materias primas es también importante: las micotoxinas, las aminas biógenas, la proporción entre grasa de calidad/ grasa rancia dañan la integridad intestinal⁵⁷.

Alteración en la permeabilidad de la pared intestinal. Los cuadros de enteritis cursan con un proceso inflamatorio de la mucosa intestinal, donde se modifica el tamaño de los poros intercelulares afectando la permeabilidad. Esto se produce en todos los casos de enteritis, ya que por definición siempre hay inflamación. Se caracteriza por falta de la presión intraluminal y puede ser desencadenada por varios mecanismos: a) aumento de la presión hidrostática (por ejemplo hipertensión portal), b) secreción activa de iones por la acción de prostaglandinas, sales biliares y sustancias neuro-humorales que alteran la secreción de electrolitos intestinales; c) lesiones exudativas causadas por agentes patógenos⁵⁸.

⁵⁶ SAKI, A., et al. Effect of Mannanase on Broiler Performance, Ileal and In-vitro Protein Digestibility, citado por DOMINGUEZ, Ignacio. Influencia de la integridad intestinal sobre el rendimiento y rentabilidad aviares [en línea]. En: aviNews (Brasil): 2015, p. 4 [Consultada: 2 may. 2020]. Disponible la dirección electrónica: <https://avicultura.info/influencia-de-la-integridad-intestinal-sobre-el-rendimiento-y-rentabilidad-aviares/>

⁵⁷ Ibid., p. 4.

⁵⁸ RUEDA, Op. cit., p. 33.

4.8. INFLUENCIA DE LA MICROFLORA SOBRE LA SALUD INTESTINAL DE LAS AVES

El sistema digestivo de las aves complejo e implica muchas funciones importantes para el desarrollo, la productividad y la salud de las aves. El tracto digestivo de las aves consiste en un sistema inmunológico, tejido linfóide asociado al intestino (GALT), considerado el principal compartimento inmunológico de las aves, un sistema nervioso entérico, considerado como un segundo cerebro para la producción de varios neurotransmisores, y un microambiente consiste en una microflora única y específico para cada individuo, con capacidad para producir interacciones con el huésped ayudando a mantener la salud intestinal y la integridad física⁵⁹.

El término “microflora” o “microbiota” intestinal hace referencia al ecosistema microbiano que coloniza el tracto gastrointestinal. Las principales funciones de la microflora intestinal incluyen (1) actividades metabólicas que se traducen en recuperación de energía y nutrientes, y (2) protección del huésped frente a invasión por microorganismos extraños⁶⁰.

En las aves la microflora es una mezcla de bacterias, hongos y protozoos, sin embargo, las bacterias son los microorganismos predominantes. La perturbación en la microflora normal de las aves puede conducir a un marco de desequilibrio microbiana que contribuye a la proliferación descontrolada de enteropatógenos⁶¹.

Desde la eclosión del pollito se adquiere y desarrolla la microbiota intestinal, junto con los microbios que se encuentran en la superficie de la cascara del huevo, los cuales corresponden a microorganismos del intestino de la madre, además de fuentes externas presentes en el medio ambiente, el alimento y el personal que manipula los animales, todo esto influye sobre la población intestinal de los pollos⁶².

⁵⁹ MATTE, Fabrizio. Influencia de la microflora sobre la salud intestinal de las aves [en línea]. En: (Brasil): 2019, p. 1 [Consultada: 10 mar. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.vetanco.com/es/wp-content/uploads/sites/3/2017/10/INFLUENCIA-DE-LA-MICROFLORA-SOBRE-LA-SALUD-INTESTINAL-DE-LAS-AVES-1>

⁶⁰ GUARNER, F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad [en línea]. En: NutrHosp. (España): 2007, p. 1. [Consultada: 1 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v22s2/fisiologia2.pdf>

⁶¹ MATTÉ, Op. cit., p. 1.

⁶² APAJALAHTI, J., y KETTUNEN, A. Efecto de la dieta sobre la flora microbiana en el tracto gastrointestinal de aves [en línea]. En: Danisco Innovation. 2003 [Consultada: 15 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/28179835_Efecto_de_la_dieta_sobre_la_flora_microbiana_en_el_tracto_gastrointestinal_de_aves

A los 3 días de vida, la microbiota ileal del pollo contiene una gran proporción de bacterias ambientales, especialmente si las aves se crían en camas profundas, mientras que, a los 7 días de edad los polluelos contienen una microbiota de la mucosa ileal dominada principalmente por *Lactobacillus*, seguida de *Lachnospiraceae* no clasificada y *Enterococcus*. Después de la segunda semana de vida, el intestino delgado y el ciego desarrollan comunidades claramente diferentes. Probablemente se pueda atribuir a la maduración de los entornos espaciales, incluidas las diferencias en el pH, las condiciones de anaerobiosis (O₂, CO₂ y H₂), los surfactantes, la osmolaridad, los sustratos y los metabolitos bacterianos (como los ácidos grasos de cadena corta)⁶³.

Muchos informes ahora revelan la composición de la comunidad microbiana del íleon de pollo durante el engorde, Por ejemplo Nakphichit et al. (2011) observaron que el organismo más abundante en el intestino delgado era *Lactobacillus* cuya diversidad aumentó de 21 a 42 días de edad. *Lactobacillus salivarius*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. oris* y *L. crispatus* se detectaron a los 21 días de edad, semanas después, se observaron en abundancia secuencias relacionadas con *L. gallinarum*, *L. equi*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *L. aviaries*, *L. johnsonii* y *L. reuteri*. Estos estudios revelan que aunque *Lactobacillus* domina el microbioma del intestino delgado, hay una sucesión de especies y cepas que dependen de la edad de las aves⁶⁴.

Estos estudios revelan que aunque *Lactobacillus* domina el microbioma del intestino delgado, hay una sucesión de especies y cepas que dependen de la edad de las aves. En contraste, los estudios que utilizan técnicas de cultivo tradicionales han descrito una comunidad de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* y *Clostridium* que ilustran las limitaciones de los métodos de placa tradicionales⁶⁵.

⁶³ ABAD, Rodrigo., et al. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones práctica [en línea] En: centro de biotecnología (Ecuador): 2017, p. 103 [Consultada: 29 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas

⁶⁴ NAKPHAICHIT, M., et al. The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. Citado por ABAD, Rodrigo. et al. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones práctica [en línea] En: centro de biotecnología (Ecuador): 2017 Consultada: 29 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas

⁶⁵ SALANITRO, J., et al. Bacteria isolated from the duodenum, ileum, and cecum of young chicks. Citado por ABAD, Rodrigo. et al. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones práctica [en línea] En: centro de biotecnología (Ecuador): 2017 Consultada: 29 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas

La microbiota dentro del intestino delgado es escasa en el duodeno y más abundante en el yeyuno y el íleon. El intestino delgado alberga una gran cantidad de especies relacionadas con *Lactobacillus*. Se observó que aproximadamente el 90% de la microbiota del intestino delgado de pollos está compuesta por *Lactobacillus*⁶⁶.

Otros estudios determinaron que el 70% de las secuencias del íleon eran *Lactobacillus*, y el resto estaba relacionado con *Clostridiaceae* (11%), *Streptococcus* (6,5%) y *Enterococcus* (6,5%). El 99% de las secuencias bacterianas 16S rRNA recolectadas del yeyuno se relacionaron con *lactobacilos*⁶⁷.

Como menciona Abad⁶⁸, la composición de la microbiota dentro del tracto intestinal del pollo no es estática, presenta variaciones temporales relacionadas con la edad del ave y la variación espacial observada dentro de los diferentes compartimentos del tracto intestinal. En los inicios de la vida del ave, la composición parece estar influenciada por los factores del huésped, como la edad y la genética, que por factores externos como la dieta. Comprender estas variaciones puede ser importante para diseñar estrategias para reducir el impacto de los patógenos y mejorar la eficiencia de la producción.

⁶⁶ DUMONCEAUX, T., et al. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. Citado por ABAD, Rodrigo. et al. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones práctica [en línea] En: centro de biotecnología (Ecuador): 2017 Consultada: 29 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas

⁶⁷ STANLEY, D., et al. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens, Citado por ABAD, Rodrigo., et al. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones práctica [en línea] En: centro de biotecnología (Ecuador): 2017 Consultada: 29 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas

⁶⁸ ABAD, Op. cit., p.106.

4.9. SISTEMA INMUNE DIGESTIVO DE LAS AVES

Como sugiere Gómez y colaboradores⁶⁹ el concepto del tubo digestivo utilizado anteriormente como un sistema meramente metabólico ha evolucionado ya que, también desempeña otras funciones inmunológicas diferentes a la digestión, absorción y metabolismo de los nutrientes. Además, es el punto de entrada para muchos agentes etiológicos de gran impacto económico en la avicultura tales como: bacterias, virus y parásitos encontrados en la salmonela, reovirus y coccidia. El sistema inmune digestivo contiene un gran número de células inmunológicas organizadas en diferentes estructuras, las cuales comprenden: Placas de Peyer (PP), Tonsilas Cecales (TC), Divertículo de Meckel (DM), Tonsila Esofágica (TE), Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (GALT) y Bolsa de Fabricio (BF).

4.9.1. Bolsa de Fabricio. Ubicada en la zona dorsal de la cloaca, es un órgano linfoide primario en las aves, por lo que en este sitio se realizan procesos de diferenciación y maduración de los linfocitos B. Al nacimiento del pollo, la BF está integrada estructuralmente por pliegues que desembocan en un ducto central o bursal. Éste provee comunicación directa entre el lumen de la BF y el lumen intestinal, lo que permite la captación de antígenos. La aplicación de éstos en la cloaca da como resultado el desarrollo de respuestas de anticuerpos⁷⁰.

4.9.2 Divertículo de Meckel. Macroscópicamente se localiza sobre el yeyuno y sirve como referencia para dividir éste del íleon. El DM se incluye dentro del sistema inmune digestivo de las aves por ser un sitio donde se realiza el proceso de mielopoyesis extramedular en aves, esto ocurre entre las 2 y 7 semanas de edad del pollo. Además, se indica que en aves desde el primer día hasta las 2 semanas de edad hay una comunicación directa entre el lumen del intestino delgado y el Divertículo de Meckel. Sin embargo, en aves de 6 semanas de edad se menciona que esta comunicación ya no se encuentra presente, por lo que se concluye que ésta, se cierra conforme la edad de las aves aumenta. También se ha indicado la presencia de granulocitos, monocitos, células epiteliales y células positivas a IgM de membrana en esta estructura⁷¹.

⁶⁹ GOMEZ, Gabriela., et al. El sistema inmune digestivo en las aves [en línea]. En: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (México): 2010, p. 9 [Consultada: 10 ago. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67413203003.pdf>

⁷⁰ *Ibíd.*, p. 10.

⁷¹ JEURISSEN, J., et al. Meckel's diverticle: a gut associated lymphoid organ in chickens, citado por GOMEZ, Gabriela., et al. El sistema inmune digestivo en las aves [en línea]. En: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (México): 2010 [Consultada: 10 ago. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67413203003.pdf>

4.9.3 Placas de Peyer. Situadas en la parte media del intestino, en la submucosa. Por ser un órgano linfoide secundario, es un sitio donde se desarrolla la respuesta inmune específica. El epitelio que recubre a las PP es diferente al resto del intestino delgado; ya que las vellosidades localizadas sobre las PP son más cortas y anchas para permitir una comunicación más estrecha y directa entre el antígeno con las células M que se encuentran intercaladas con los enterocitos del intestino; su función principal es la de células especializadas en el transporte de los antígenos los cuales son captados en la luz intestinal y transportados hacia las PP, donde se desarrolla una respuesta inmune específica⁷².

4.9.4 Tonsilas Cecales. Localizadas en la unión íleon cecal. Es el tejido más grande en proporción en el ciego. El tejido linfoide presente en las TC, se encuentra distribuido en dos áreas: Una zona subepitelial donde se encuentran células B que consisten en 45-55% y una más profunda donde se localizan los linfocitos T con un 35%. En estas dos zonas se localizan los centros germinales. En la zona cortical se localizan algunos macrófagos y otros; debajo del epitelio. Las TC funcionan como tejido linfoide secundario similar a las PP⁷³.

4.9.5 Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT). Es un tejido difuso que se localiza en la submucosa y mucosa del intestino. Debido al sitio de localización es llamado GALT (Tejido Linfoide Asociado a Intestino). Se ha señalado que en el GALT se encuentra de 70 a 80% de todas las células del sistema inmune por lo que se considera el órgano inmune efector más grande de todo el organismo. Asimismo, se ha reportado la presencia de linfocitos B y T; y de células epiteliales especializadas dispuestas sobre las PP llamadas células M; se ha descrito la presencia de granulocitos y macrófagos. Al contar este tejido con esa diversidad de células inmunes puede inferirse que GALT funciona como un tejido linfoide secundario⁷⁴.

⁷² BEFUS, A., et al. Gut associated lymphoid tissue in the chicken. I Morphology, ontogeny and some functional characteristics of Peyer's patches, citado por GOMEZ, Gabriela., et al. El sistema inmune digestivo en las aves [en línea]. En: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (México): 2010 [Consultada: 10 ago. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67413203003.pdf>

⁷³ GLICK, B., et al. A scanning electron microscope study of Cecal Tonsil: The basic unit of the Cecal Tonsil, citado por GOMEZ, Gabriela., et al. El sistema inmune digestivo en las aves [en línea]. En: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (México): 2010 [Consultada: 10 ago. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67413203003.pdf>

⁷⁴ GOMEZ, Op. cit., p.12.

4.9.6 Tonsila Esofágica (TE). Estas unidades se encuentran en la parte más baja de los pliegues longitudinales del esófago, formando un epitelio escamoso estratificado, infiltrado por células linfoides como linfocitos T, células plasmáticas, dendríticas, macrófagos, pero no se ha indicado la presencia de células B. Todo este conjunto de células se conocen como el linfoepitelio (LE). Un hallazgo de gran importancia es el grado tan alto de circulación sanguínea que se encuentra en esta zona, representado por muchas vénulas, hecho que sugiere una comunicación entre la TE y otros órganos linfoides. Además, se menciona que durante el proceso de la digestión, la TE se expone de manera directa al bolo alimenticio, que contiene alimento, agentes patógenos o vacunas; esto permite el reconocimiento de antígenos con la producción de respuestas inmunes efectoras en este nivel⁷⁵.

4.10. RESPUESTA INMUNE EN EL TUBO DIGESTIVO DE LAS AVES

El objetivo principal de las acciones de defensa en el intestino es evitar la penetración y establecimiento de agentes patógenos. Para hacer eficiente esta función protectora, el tubo digestivo se sustenta en mecanismos de defensa, los cuales se denominan: a) mecanismos de resistencia o innatos y b) mecanismos específicos.

a.) Es la primera línea de defensa natural contra microorganismos invasores cuyo objetivo principal es restringir la entrada y penetración de estos microorganismos. Los mecanismos pueden ser: a) físicos o estructurales como son el epitelio y la mucosa intestinal, cuya integridad evita la entrada o el establecimiento de agentes patógenos y funcionan como una barrera física. Las vellosidades intestinales, los movimientos peristálticos y la producción de moco poseen la capacidad de captar y desplazar partículas extrañas hacia el exterior; b) factores químicos como el grado de acidez o alcalinidad (pH), péptidos antimicrobianos y proteínas; por ejemplo, la lisozima que se sintetiza en la base de las criptas intestinales, es capaz de inactivar algunas bacterias Gram positivas por la degradación de sus paredes celulares; c) El proceso de inflamaciones producido para actuar en contra de la invasión de agentes infecciosos; se caracteriza por un aumento en la permeabilidad capilar en el área afectada y, por consiguiente, la llegada de numerosas estirpes celulares (heterófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos y células dendríticas) que, de manera particular, realizan el proceso de fagocitosis. Debido a este aumento en la permeabilidad capilar, se hace posible el paso del complemento, de anticuerpos y otras moléculas presentes en el plasma⁷⁶.

b.) Desarrollo de la respuesta inmune específica en el intestino: Los antígenos entran por vía oral y, con ello, alcanzan el lumen intestinal. La superficie intestinal está recubierta por un epitelio simple formado, en parte, por unas células especializadas en el transporte de macromoléculas y partículas llamadas células M. Para lograr esta función inmune, las células M poseen gran

⁷⁵ GOMEZ, Op. cit., p.12.

⁷⁶ Ibid., p. 13.

cantidad de vesículas endocíticas capaces de transportar los antígenos de la superficie apical al polo basal, espacio en donde son liberadas e interactúan directamente con las Placas de Peyer, Tonsilas Cecales, MALT o linfocitos intraepiteliales. Al alcanzar estos sitios, los antígenos sufren un proceso de degradación y presentación a través de moléculas clase I y clase II del CPH. Los linfocitos CD8 reconocen péptidos presentados bajo el contexto del CPH clase I, siendo su función efectora la citotoxicidad. Los linfocitos CD4 reconocen péptidos presentados en el contexto de moléculas clase II del CPH y su función efectora es la producción de citocinas. La variabilidad en la intensidad así como en el tipo de respuesta desarrollada en el intestino puede deberse a varios factores como la naturaleza química del antígeno, ausencia o presencia de señales coestimuladoras (por ejemplo CD28-CD80; familia B7) que inducen tolerancia o anergia de células inmunes al patrón de liberación de citocinas que producen las células T inductoras, genética de las estirpes de aves, así como a su relación con otros sistemas como el neuroendocrino⁷⁷.

4.11. PROBIÓTICOS

Los probióticos han sido definidos por OMS/FAO/UNU como microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped⁷⁸.

“El término prebiótico se refiere a los ingredientes de los alimentos no digeribles que producen efectos beneficiosos sobre el huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de un tipo o de un número limitado de bacterias en el colon”⁷⁹.

“El término simbióticos se refiere a aquellos productos que contienen probióticos y prebióticos. En sentido estricto debería ser reservado a productos en los que el componente prebiótico selectivamente favorece al componente probiótico”⁸⁰.

⁷⁷ GOMEZ, Op. cit., p.24.

⁷⁸ FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food.2002 (En línea). En: FAO: 2002 [Consultada: 5 sep. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.sochipe.cl/Revista-Chilena-de-Pediatria-88-4-2017/files/assets/downloads/page0095.pdf>

⁷⁹ SCHREZENMEIR, J., y DE VRESE M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition [en línea]. En: The American Journal of Clinical Nutrition. 2001, p. 361 [consultada: 29 sep. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/361s/4737561>

⁸⁰ *Ibíd.*, p. 361.

Una absorción de nutrientes adecuada con sus componentes básicos permite una conversión eficiente del alimento, lo cual es fundamental para la producción y el bienestar de las aves. Como método de ayuda, durante varias décadas se ha recurrido al suplemento de antibióticos como subterapéuticos, usados como promotores de crecimiento con el propósito de mantener la salud intestinal y mejorar la eficiencia digestiva⁸¹.

Sin embargo, ha incrementado la preocupación por los desagradables efectos que puede ocasionar la administración de antibióticos en los animales sobre la salud humana, debido a que se considera que muchos de ellos transmiten genes inductores de resistencia hacia la microbiota humana, por esta razón se llevó a su prohibición desde 2006 por la Comunidad Europea⁸².

Como un método de sustitución eficiente a los antibióticos, en su función como promotores de crecimiento, sin la generación de riesgos para la salud humana, se viene planteando el uso de cepas de microorganismos seleccionados, que estimulen la eubiosis y la estabilidad de la flora intestinal de las aves, lo cual permite que se mantenga la integridad y funcionalidad de las mucosas digestivas, y garantiza el aprovechamiento oportuno de los nutrientes suministrados en la dieta⁸³.

Los probióticos pueden estar conformados por un solo tipo de microorganismo o por combinaciones de estos, con el fin de lograr mayor eficiencia al colonizar el intestino. Principalmente utilizan bacterias los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Pediococcus*, y emplean levaduras como prebióticos, como la *Saccharomyces cerevisiae*⁸⁴.

Como señalan Vinderola, Medici y Perdígón G⁸⁵, para obtener estos microorganismos, las principales fuentes son el contenido intestinal y las heces fecales de animales. Durante el proceso de colonización, las cepas endógenas presentan mayor capacidad de proliferar, debido a que se encuentran en un ambiente similar al del que fueron aisladas. Por este motivo, bacterias como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus*

⁸¹ GAGGIÀ, F., MATTARELLI, P., y BIAVATI B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production, citado por DIAZ, E., ISAZA, J., y ANGEL, D. Probióticos en la avicultura: una revisión. Bogotá, 2017. N° 35.

⁸² REGULATION (EC) NO. 1831/2003. Oficial Journal of European Union, citado por DIAZ, E., ISAZA, J., y ANGEL, D. Probióticos en la avicultura: una revisión. Bogotá, 2017. N° 35, p. 175.

⁸³ DIAZ, ISAZA y ANGEL, Op, cit., p.175.

⁸⁴ FULLER, R. Probiotics in man and animals, citado por DIAZ, E., ISAZA, J., y ANGEL, D. Probióticos en la avicultura: una revisión. Bogotá, 2017. N° 35.

⁸⁵ VINDEROLA, CG., MEDICI, M., y PERDIGÓN G. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria [en línea]. En: J Appl Microbiol, 2004 [consultada: 12 oct. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2004.02158.x>

faecium, *Enterococcus faecalis* y *Bifidobacterium spp.* Son comúnmente utilizadas en los suplementos probióticos.

Mohamed dice que el género *Lactobacillus* es una unidad taxonómica amplia y heterogénea, que comprende más de 100 especies diferentes, pertenece al grupo de BAL. Muchas de las especies son componentes de la microbiota intestinal normal de los seres humanos y los animales⁸⁶.

Klaenhammer y Kullen afirman que *Lactobacillus casei* son un tipo de bacteria probiótica muy eficaz para equilibrar la microflora intestinal, prevenir los trastornos intestinales, regular el sistema inmune específicamente de la respuesta inmune celular y además posee una potente acción antidiarreica. Industrialmente, *L. casei* tiene aplicaciones como probióticos en humanos, como cultivo iniciador ácido-productor para fermentaciones de leche y especialmente como cultivos para la intensificación y aceleración de desarrollo de sabores en ciertas variedades de quesos madurados con bacterias⁸⁷.

Huda-Faujan, N. *et al.* Mencionan que “algunas de estas bacterias en su metabolismo utilizan carbohidratos como fuente de energía, lo que genera ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico, butírico y láctico), los cuales han demostrado poseer propiedades benéficas para la salud del tracto intestinal. Entre esto se puede destacar el ácido butírico, que sirve como fuente de energía para las células del intestino, estimula la proliferación celular, regula la apoptosis y contribuye a mantener la integridad de la pared intestinal”⁸⁸.

Por otra parte, “están las bacterias productoras de ácido láctico; estas son las más utilizadas como probióticos, debido su capacidad para adaptarse y proliferar en las condiciones intestinales, lo que genera múltiples efectos positivos en la salud de las aves”⁸⁹.

⁸⁶ MOHAMED, M. *Lactobacillus* as a Probiotic Feed for Chickens [En línea] en: International Journal of Poultry Science. India, 2009, vol. 8, n°8 [consultada: 25 oct. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <file:///C:/Users/Invitado/Downloads/fin1498.pdf>

⁸⁷ KLAENHAMMER, T., Y KULLEN, M. Selección y diseño de probióticos [en línea] en: Revista Internacional de Microbiología de Alimentos, 1999. Vol. 50, n°1 – 2 [consultada: 6 nov. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160599000768?via%3Dihub>

⁸⁸ HUDA-FAUJAN, N., *et al.* The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects, citado por DIAZ, E., ISAZA, J., y ANGEL, D. Probióticos en la avicultura: una revisión. Bogotá, 2017. N° 35. p. 178.

⁸⁹ *Ibis.*, p. 178.

4.11.1. Mecanismos de acción de los probióticos. Los probióticos presentan múltiples mecanismos de acción a través de los cuales coadyuvan a generar estabilidad en la flora intestinal, lo que evita la proliferación de bacterias enteropatógenas. Como primer mecanismo se encuentra la “exclusión competitiva”; esta permite a los microorganismos probióticos colonizar ampliamente el intestino, lo que obliga a las bacterias patógenas a competir por un lugar de adhesión en la pared intestinal, hace que se disminuya la obtención de nutrientes y dificulta la proliferación de microorganismos perjudiciales⁹⁰.

Matsuzaki y Chin, señalan que otro mecanismo por el cual los probióticos contribuyen en la protección del hospedero es la estimulación del sistema inmune tanto innato como celular. Dentro de los efectos ejercidos en el sistema inmune innato, se puede observar la capacidad que poseen los probióticos de aumentar la actividad de las células natural killer (NK), que se destacan por su efecto citotóxico y por producir citoquinas que actúan como inmunomoduladores y agentes proinflamatorios⁹¹.

Sin embargo, Lescheid, D. afirma que se ha estudiado otro mecanismo antiinflamatorio de los probióticos en el que algunos de sus productos metabólicos tienen la capacidad de interactuar con receptores de señalización como el NF-kb (factor nuclear kappa B), lo cual evita la producción de agentes inflamatorios que afecten la integridad de la mucosa intestinal⁹².

Bai y acompañantes, por otra parte dicen que se ha demostrado que la administración de estos aditivos en la dieta posee efectos quimiotácticos, mediados por citoquinas, metaloproteinasas y prostaglandinas, que estimulan la respuesta inmune celular, lo que aumenta la producción de inmunoglobulinas (IgA, IgM e IgY) y la migración de linfocitos T⁹³.

⁹⁰ FULLER, R, citado por DIAZ, ISAZA y ANGEL, Op. cit., p. 178.

⁹¹ MATSUZAKI, T., y CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic. *Immunol Cell Biol.* 2000; 78 (1):67-73, citado por DIAZ, E., ISAZA, J., y ANGEL, D. Probióticos en la avicultura: una revisión. Bogotá, 2017. N° 35. p. 178.

⁹² LESCHIED, David. Los probióticos como reguladores de la inflamación: Una revisión [en línea] en: *Alimentos funcionales en salud y enfermedad (Alemania)*: 2014 [consultada: 17 nov. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.ffhdj.com/index.php/ffhd/article/view/2/4>

⁹³ BAI, S., et al. Effects of diets supplemented with probiotics on growth performance and intestinal immune characteristics of chickens [en línea] en: *Poultry Science (China)*: 2013. [consultada: 26 nov. 2020]. Disponible en la dirección electrónica:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0032579119395677?token=715971C1BB4B16F14C77AB B4E77095A2177CA2B72B59DFC9F32DDAF37E928DF3C27135CE03E908036AD977E2D6319FF>

Otro beneficio de la suplementación probiótica se efectúa sobre la capa de mucina, constituyente principal del intestino con funciones de lubricación y de protección. Esta actúa como filtro seleccionador de nutrientes e impide el paso de moléculas y agentes nocivos.

También se ha descrito que factores como la fibra en la dieta, la ingesta de treonina y mediadores inflamatorios, asociados a la suplementación con microorganismos probióticos, puede contribuir a aumentar la secreción de mucina debido a que generan estímulo en los genes encargados de desarrollar sus componentes, lo cual contribuye a mantener la integridad de la mucosa intestinal⁹⁴.

Cao y colaboradores señalan que las bacterias ácido-lácticas utilizadas como probióticos poseen un metabolismo anaerobio, en el que se fermenta glucosa y se produce ácido láctico, disminuyen el pH intestinal, lo cual dificulta la reproducción y colonización de bacterias patógenas, y ayuda a prevenir la generación de lesiones en la superficie de absorción del intestino⁹⁵.

Coskum explica que los probióticos también favorecen por su efecto antioxidante, dado que en los últimos años se le ha atribuido también este potencial a la microbiota intestinal, debido a que algunas bacterias, como *Lactobacillus delbrueckii*, poseen la capacidad de producir glutatión, que es uno de los principales antioxidantes no enzimáticos involucrados en la defensa contra los radicales libres. Por lo tanto, una correcta población de microorganismos entéricos puede contribuir a incrementar las concentraciones de estos antioxidantes no enzimáticos, lo que protege la integridad de los tejidos del intestino⁹⁶.

⁹⁴ CABALLERO, F., et al. The VSL#3-probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells [en línea] en: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol (Canada): 2007 [consultada: 2 dic. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpgi.00265.2006>

⁹⁵ CAO, G., et al. Efectos de un probiótico, *Enterococcus faecium*, sobre el rendimiento del crecimiento, la morfología intestinal, la respuesta inmune y la microflora cecal en pollos de engorde desafiados con *Escherichia coli* K88 [en línea] en: ciencia avícola (China): 2013 [consultada: 12 dic. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119384093?via%3Dihub>

⁹⁶ COSKUN, S., ASLIM, B., y YUKSEKDAG, Z. Effect of two strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on nitric oxide generation and antioxidant status of rat small intestine [en línea] en: Med Chem Res, 2010. Vol. 19, n° 9 [consultada: 13 dic. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/225769862_Effect_of_two_strains_of_Lactobacillus_delbrueckii_subsp_bulgaricus_on_nitric_oxide_generation_and_antioxidant_status_of_rat_small_intestine

Mountzouris y colaboradores⁹⁷, sugieren que los mecanismos anteriormente detallados son de gran importancia ya que promueven la eubiosis y equilibrio de la flora intestinal y mejoran la salud de las aves, puesto que ayudan a proteger la pared intestinal. Esta funciona como barrera natural contra bacterias patógenas y sustancias tóxicas presentes en el intestino y la integridad de las criptas y las vellosidades intestinales permiten una correcta absorción de los nutrientes suministrados en el alimento.

4.11.2. Efectos benéficos de los probióticos. Los efectos potenciales de los probióticos se resumen a continuación:

Incremento del tamaño de las vellosidades del intestino. Pelicano y colaboradores⁹⁸, hallaron que las microvellosidades del yeyuno de aves suplementadas con probióticos hasta el día 21 de edad fueron significativamente ($p < 0,01$) más largas (230 μm) comparadas con las que no recibieron suplementación (200 μm).

Otro ensayo en el que se suplementaron aves hasta los 42 días de edad, con una mezcla de siete tipos de microorganismos probióticos, se observó efecto significativo ($p < 0,05$) en el aumento del tamaño de las vellosidades del íleon, y pasaron de medir $458,3 \pm 37,45 \mu\text{m}$ a $675,0 \pm 25,0 \mu\text{m}$ ⁹⁹.

Otros estudios observaron un aumento significativo ($p < 0,05$) sobre el peso de las aves; registraron $1863,6 \text{ g} \pm 26,87$ después de suplementar con *Pediococcus acidilactic* a una dosis de 109 ufc/g, mientras que en el grupo control el peso corporal fue de $1661,31 \text{ g} \pm 26,75$. Respecto a la conversión alimenticia, estos investigadores también evidenciaron efecto significativo ($p < 0,05$), ya que se pasa de un índice de $1,930 \text{ g} \pm 0,021$ a uno de $1,850 \text{ g} \pm 0,021$ ¹⁰⁰.

⁹⁷ MOUNTZOURIS, K., et al. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasmaimmunoglobulins, and cecal microflora composition [en línea] en: Ciencia avícola (Austria): 2010, Vol. 89. N°1 [Consultada: 21 dic. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119424061>

⁹⁸ PELICANO, E., et al. Productive traits of broiler chickens fed diets containing different growth promoters [en línea] en: Rev Bras Cienc Avi. 2004. Vol. 6, n° 3 [Consultada: 10 ene. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <http://www.scielo.br/pdf/rbca/v6n3/a08v6n3.pdf>

⁹⁹ BESKI, S., y SARDARY, S. Effects of dietary supplementation of probiotic and synbiotic on broiler chickens hematology and intestinal integrity. [en línea] en: Int J Poult Sci. 2015. Vol. 14, n° (1) [consultada: 12 ene. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/ijps/2015/31-36.pdf>

¹⁰⁰ ALKHALF, A., ALHAJ, M., y AL-HOMIDAN, I. Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens [en línea] en: Saudi J Biol Sci, 2010. Vol. 17, n° (3) [Consultada: 16 ene. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3730717/pdf/main.pdf>

Como menciona Castillo y colaboradores¹⁰¹, el efecto antiinflamatorio de ciertas bacterias probióticas podría estar también relacionado con la protección de estos microorganismos contra los patógenos. El uso de cepas probióticas en la alimentación de aves mostró un aumento significativo de IgA e IgG en el intestino.

El aumento de los niveles de IgA locales resultantes de la ingestión de la fórmula probiótica puede contribuir a la mejora de la resistencia de la mucosa contra las infecciones gastrointestinales.

Rajput y colaboradores¹⁰², sustentan que la IgA es un elemento primario de la respuesta inmune de la mucosa intestinal para defenderse contra agentes patógenos; es producida y diferenciada por las células plasmáticas de la mucosa intestinal. Se ha demostrado en diferentes estudios que las concentraciones de IgA e IgG mejoraron después de la administración de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*.

Butel, dice que la permeabilidad intestinal puede ser alterada por toxinas producidas por agentes patógenos los cuales pueden inducir inflamación en el epitelio intestinal. Se ha demostrado que los probióticos inducen factores que son capaces de reforzar la integridad de la barrera intestinal y proteger contra las bacterias patógenas, induciendo la producción de moco o de defensinas¹⁰³.

Castillo afirma que varias cepas de probióticos son capaces de producir una amplia variedad de sustancias antimicrobianas, las más comunes son los ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético) que inducen una reducción en el pH fecal, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, y compuestos antibacterianos¹⁰⁴.

¹⁰¹ CASTILLO, N., et al. Probiotics: An alternative strategy for combating salmonellosis Immune mechanisms involved [en línea] en: Food Research International (Argentina): 2012. N° 45. P. 834 [Consultada: 16 ene. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996911002614>

¹⁰² RAJPU, R., et al. Efecto de *Saccharomyces boulardii* y *Bacillus subtilis* B10 sobre la modulación de la ultra estructura intestinal y el mecanismo de desarrollo de inmunidad de la mucosa en pollos de engorde [en línea] en: ciencia avícola (China): 2013. Vol. 92, n° 4 [Consultada: 30 ene. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S003257911938678X?token=AB2376787705088CC7518BA7EA1BBD61D21508A2ECA3943578B57A33AE734E9C126C2C89E1AA25C018EDD1203C28640C>.

¹⁰³ BUTEL, M. Probiotics, gut microbiota and health [En línea] en: Médecine et Maladies Infectieuses, 2014. Vol. 44, n°1 [Consultada: 4 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X13003077>

¹⁰⁴ CASTILLO, Op. cit., p. 833.

El primer paso en la patogénesis es la adhesión a las células epiteliales del intestino; una de las principales propiedades de los probióticos es la capacidad que tienen para adherirse a la mucosa intestinal, la cual tiene gran influencia en la defensa del organismo, ya que las bacterias benéficas conforman una barrera de exclusión a los microorganismos patógenos, fundamentalmente, por la ocupación de los sitios de adhesión y la estimulación del sistema inmune¹⁰⁵.

4.12. MICROENCAPSULACIÓN

Las investigaciones se han enfocado hacia el empleo del proceso de microencapsulación como estrategia, para mejorar la viabilidad de los probióticos durante su paso por el tracto gastrointestinal. Según Champagne y Fustier citados por Perez y colaboradores¹⁰⁶, la microencapsulación es definida como la tecnología de empaquetamiento de sólidos, líquidos y gaseosos con materiales de recubrimiento de distinta naturaleza, para dar lugar a cápsulas de tamaño micrométrico que pueden liberar su contenido de manera controlada bajo la influencia de condiciones específicas.

Como indican Picot y Lacroix citados por Perez y colaboradores¹⁰⁷, hasta el momento los microorganismos probióticos que han sido microencapsulados pertenecen a los generos *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, y *Streptococcus*. Varios estudios han demostrado que los cultivos probióticos pueden protegerse mediante una variedad de materiales microencapsulantes, como por ejemplo los alginatos y sus combinaciones, el almidón, los derivados de celulosa, gelatina, la mezcla de xantano-gelatina, carrageno y sus mezclas, las gomas (arábica y guar), el quitosano, las maltodextrinas y las proteínas de suero de leche.

¹⁰⁵ CASTILLO, Op. cit., p. 833.

¹⁰⁶ CHAMPAGNE, C., y FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, citado por PEREZ, Heidy. et al. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos [En línea] en: Revista ICIDCA (Cuba): 2013, vol. 47, núm. 1 [Consultada: 7 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223126409003.pdf>

¹⁰⁷ PICOT, A., y LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt, citado por PEREZ, Heidy. et al. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos [En línea] en: Revista ICIDCA (Cuba): 2013, vol. 47, núm. 1 [Consultada: 7 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223126409003.pdf>

Sabikhi, et al, citado por Pérez y colaboradores¹⁰⁸, mencionan varios métodos de microencapsulación tales como la extrusión, emulsión, lecho fluidizado y secado por aspersión, polimerización interfacial y coacervación, entre otras. Los beneficios de la microencapsulación de probióticos están dados por la facilidad de producir cultivos sensibles al oxígeno, mejorar la supervivencia cuando se exponen a soluciones gástricas, bilis, acidificación, calor, congelación, estabilidad durante el almacenamiento en forma seca y protección contra contaminantes y bacteriófagos.

4.13. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE TEJIDOS

4.13.1. Técnica histológica. Se denomina técnica histológica al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico (animal o vegetal) con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través de los microscopios ópticos y electrónicos¹⁰⁹.

4.13.2. Utilidad de colorantes para el diagnóstico histopatológico

- **Hematoxilina y eosina (H/E).** Se describe la tinción de hematoxilina y eosina (H/E) como un método de tinción de rutina en histología y citología. Es una coloración basada en dos etapas, la primera una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina) y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xantenico ácido (eosina). La hematoxilina en combinación con sales de aluminio, hierro o cromo, forma un colorante activo, la hemateina, formada por oxidación de la hematoxilina. Este se usa como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color azul/negro y aportando un buen detalle de los mismos. Por este motivo, se suele usar junto con un colorante citoplasmático, generalmente la eosina, que aporta una graduación entre el rosa, y el rojo a las estructuras y matrices celulares de carácter catiónico (a las que la hematoxilina no tiñe o lo hace muy débilmente). Se consigue así un buen contraste de las preparaciones microscópicas facilitando su observación¹¹⁰.

¹⁰⁸ SABIKHI, L., et al. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions, citado por PEREZ, Heidy. et al. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos [En línea] en: Revista ICIDCA (Cuba): 2013, vol. 47, núm. 1 [Consultada: 7 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223126409003.pdf>

¹⁰⁹ MONTALVO, Cesar. Técnica histológica (en línea). En: UNAM: 2010 [Consultada: 17 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf

¹¹⁰ SANTOS, Vidal. Tinción Hematoxilina-Eosina. Trabajo de fin de máster módulo de química orgánica. Barcelona, España. Julio, 2017. p.4

- **Ácido peryódico de Schiff (PAS).** Se algunos polisacáridos (particularmente, glucógeno), así como las mucoproteínas que contienen mucopolisacáridos neutros. Esta técnica es útil para valorar la degeneración fibrinoide, ya que tiñe de rojo los depósitos de fibrina y permite visualizar elementos infecciosos como parásitos y hongos. Como agente oxidante que rompe algunas cadenas de carbón convirtiéndolas en dialdehídos, la tinción de PAS se considera parte de la histoquímica moderna de mucopolisacáridos, mucoproteínas y polisacáridos. La reacción se debe a que el ácido peryódico oxida las uniones carbono-carbono de los carbohidratos donde hay hidroxilos adyacentes y NH₂ primarios o grupos amino secundarios, cediendo aldehídos que pueden reaccionar con el reactor Schiff, responsable de la coloración roja provocada por la unión de leucofucsina con dialdehido¹¹¹.

- **Alcian Blue pH 2.5.** Alcian blue pH 2.5 se usa con objeto de identificar, por microscopía óptica, mucinas débilmente sulfatadas en muestras de tejidos. Se pueden utilizar muestras (incluidas en parafina) procesadas de la manera habitual. El fijador preferido es formol tamponado neutro. Con ayuda de microscopía óptica, las mucinas sulfatadas no resultan visibles en preparaciones con hematoxilina y eosina. El uso de soluciones con distintos valores de pH ayuda en la distinción entre los mucopolisacáridos ácidos sulfatados y los no sulfatados. Las sulfomucinas fuertemente ácidas se tiñen débilmente o no llegan a teñirse¹¹².

Además de los anteriormente descritos también se usan muchos otros colorantes en la preparación de tejidos para estudios histológicos como se indica en el cuadro 1.

¹¹¹ SERVIANSKY, Tamar., et al. Utilidad de la tinción PAS para el diagnóstico histopatológico [en línea] en: DermatologíaCMQ, 2013. Vol. 11, n° (1) [consultada: 22 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2013/dcm131c.pdf>

¹¹² ARTISAN, T. Alcian Blue pH 2.5 [en línea] en: Dako, 2020 [consultada: 27 feb 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/127129001.PDF>

Cuadro 1. Colorantes y reacciones histológicas comunes

Reactivo	Resultado
Hematoxilina	<i>Azul:</i> núcleo; regiones ácidas del citoplasma; matriz de cartílago
Eosina	<i>Rosa:</i> regiones básicas del citoplasma; fibras de colágena
Tricrómica de Masson	<i>Azul oscuro:</i> núcleo <i>Rojo:</i> músculo, queratina, citoplasma <i>Azul claro:</i> mucinógeno, colágena
Colorante de orceína para fibras elásticas	<i>Pardo:</i> fibras elásticas
Colorante Weigert para fibras elásticas	<i>Azul:</i> fibras elásticas
Tinciones argénticas	<i>Negro:</i> fibras reticulares
Hematoxilina férrica	<i>Negro:</i> estriaciones de músculo, núcleos, eritrocitos
Ácido peryódico de Schiff (PAS)	<i>Magenta:</i> moléculas ricas en glucógeno y carbohidratos
Colorantes de Wright y Giemsa	Se utilizan para tinciones diferenciales de células hemáticas <i>Rosa:</i> eritrocitos, gránulos de eosinófilos <i>Púrpura:</i> núcleos de leucocitos, gránulos basófilos <i>Azul:</i> citoplasma de monocitos y linfocitos
Azul Alcian	Se utiliza para teñir polisacáridos ácidos como glicosaminoglicanos en cartílagos y otras estructuras corporales, algunos tipos de mucopolisacáridos., glucocáliz sialilado de células, etc.

Fuente: TREJO, Ana. Descripción microscópica del sistema reproductivo femenino del cuy (*cavia porcellus*). Pasto, Nariño. 2016. Trabajo de grado para optar por el título de Médico veterinario.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

Se tomaron muestras provenientes del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) del ensayo experimental derivado del proyecto de investigación “DETERMINACIÓN *in vivo* DEL EFECTO PROBIÓTICO DE *Lactobacillus casei* MICROENCAPSULADO, SOBRE MORFOLOGÍA INTESTINAL, RESPUESTA INMUNOLÓGICA, PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y PRODUCTIVOS, EN POLLO DE ENGORDE ROSS” En el estudio las variables cuantitativas se evaluaron bajo un diseño completamente aleatorizado (DIA), desarrollado por Gámez y Zambrano¹¹³. Para la evaluación morfológica de los tejidos provenientes del experimento se empleó un estudio de tipo descriptivo.

5.1. LOCALIZACIÓN

El estudio se realizó en el Laboratorio de fisiología y reproducción animal y la clínica veterinaria Carlos Martínez Hoyos de la universidad de Nariño- Pasto Colombia.

5.2. TAMAÑO DE MUESTRA

La presente investigación es de tipo experimental. En este contexto, se evaluaron pollos de engorde, raza Ross de un día de edad, los cuales se trasladaron a una zona de aislamiento convencional de las instalaciones de la Clínica Veterinaria “Carlos Martínez Hoyos” de la Universidad de Nariño, donde cumplieron su ciclo de producción (45 días) bajo condiciones estandarizadas de manejo zootécnico y veterinario. Se manejaron 5 tratamientos de 21 animales y 3 repeticiones de 7 aves por cada tratamiento, para un total de 105 pollos por los 5 tratamientos.

El ensayo experimental empleó 5 tratamientos: T0, T1, T2, T3 y T4 con 21 aves cada uno, 3 repeticiones por tratamiento, para un total de 105 individuos (Tabla 1). Cada tratamiento se agrupó de la siguiente forma: T0 alimento sin antibióticos ni anticoccidiales, T1 alimento balanceado más antibióticos y anticoccidiales, T2 agua de bebida más probiótico comercial, T3 alimento concentrado mas *Lactobacillus casei* sin microencapsular o en aspersión, T4 alimento concentrado mas *Lactobacillus casei* microencapsulado.

¹¹³ GAMEZ y ZAMBRANO, Op., cit., p.1.

Tabla 1. Distribución de los tratamientos en las unidades de experimentación

Tratamiento	Repetición	No de aves por repetición	Total aves por tratamiento
T0 alimento sin antibióticos ni anticoccidial	1	7	21
	2	7	
	3	7	
T1 alimento balanceado más antibióticos y anticoccidiales	1	7	21
	2	7	
	3	7	
T2 Agua de bebida más probiótico comercial	1	7	21
	2	7	
	3	7	
T3 alimento concentrado mas <i>Lactobacillus casei</i> sin microencapsular/aspersión	1	7	21
	2	7	
	3	7	
T4 Alimento concentrado mas <i>Lactobacillus casei</i> microencapsulado.	1	7	21
	2	7	
	3	7	

Fuente: la presente investigación-año 2022.

Para la evaluación morfológica se muestrearon 6 animales por cada tratamiento (2 animales de cada repetición), para un total de 30 muestras de intestino delgado de los 5 tratamientos (tabla 2), de las cuales se realizaron tres cortes a cada uno de los segmentos anatómicos del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), los cuales se almacenaron en cassettes para tejidos, se realizó coloración de hematoxilina y eosina y tinción diferencial de Alcian Blue.

La cepa de *Lactobacillus casei* empleada en el ensayo experimental fue *L. Casei* ATCC 334¹¹⁴.

Tabla 2. Muestras por cada tratamiento y cada repetición

Tratamientos	Número de repeticiones (r)	Número de muestras por repetición	Total de muestras
T0 Alimento balanceado sin antibióticos ni anticoccidiales.	r1	2	6
	r2	2	
	r3	2	
T1 Alimento balanceado más antibióticos y anticoccidiales.	r1	2	6
	r2	2	
	r3	2	
T2 agua de bebida más Probiótico comercial.	r1	2	6
	r2	2	
	r3	2	
T3 Alimento balanceado más <i>Lactobacillus casei</i> sin microencapsular/aspersión	r1	2	6
	r2	2	
	r3	2	
T4 Alimento balanceado más <i>Lactobacillus casei</i> microencapsulado	r1	2	6
	r2	2	
	r3	2	
TOTAL			30

Fuente: la presente investigación-año 2022.

¹¹⁴ GAMEZ Y ZAMBRANO, Op cit., p. 2.

5.2.1. Plan de suministro de alimento. El alimento formulado se proporcionó a los pollos, dos veces al día, siguiendo las especificaciones establecidas por el manual de pollos de engorde de la casa comercial Solla S.A. (Anexo A). El suministro del probiótico comercial y *L. casei* se suministró de forma continua desde los 7 a los 45 días de edad y se trabajó con cinco tratamientos de la siguiente manera:

- T0: alimento balanceado sin antibióticos ni anticoccidiales
- T1 alimento balanceado más antibióticos y anticoccidiales
- T2 agua de bebida más probiótico comercial
- T3 alimento concentrado más *L. casei* sin microencapsular/ aspersion
- T4 alimento concentrado más *L. casei* microencapsulado

• **Inclusión del alimento balanceado sin antibiótico ni anticoccidial.** Se suministró de acuerdo a su contenido nutricional y con las especificaciones de los requerimientos nutricionales de la línea Ross en cada etapa de crecimiento¹¹⁵.

• **Inclusión del probiótico comercial.** El probiótico comercial fue suministrado en el agua de bebida, la cantidad de probiótico adicionado (relación v/p) fue proporcional a 1 gr de probiótico por cada 20 Lt de agua, siguiendo las instrucciones para su preparación y adición según lo recomendado por el fabricante.

• **Inclusión del probiótico microencapsulado en la ración.** Una vez microencapsulado el probiótico se suministró en la ración diaria de los pollos, mezclado de manera homogénea con el alimento balanceado, con el fin de ofrecer mayor viabilidad a la cepa en estudio, frente a factores medio ambientales y gastrointestinales. El probiótico se proporcionó en la ración diaria de los pollos, mezclado de manera homogénea en la porción de alimento de la primera comida de la mañana en una cantidad manejada a criterio del investigador, de 2 gramos por comedero (7 pollitos), con el fin de que sea consumido en su totalidad y garantizar que no se humedezca el preparado.

¹¹⁵ ROSS 308 AP. América Latina pollo de engorde. Especificaciones de nutrición [en línea] en: Ross una marca aviagen, 2017 [Consultada: 19 mar. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: http://es.staging.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Ross-308AP-Broiler-Nutrition-Specs-2017-ES.pdf

• **Inclusión y viabilidad en la ración de *Lactobacillus casei* sin microencapsular.** Inicialmente se realizó un ajuste del inóculo de *L. casei*. Posteriormente, el inóculo fue adicionado por aspersión sobre el alimento balanceado, que se distribuyó de manera homogénea en bandejas y se puso en incubadora a 37°C por 30 minutos para su secado, se empacó en bolsas y se almacenó en cajas de cartón, con una frecuencia de 4 días al inicio del experimento y 2 días al final del mismo. Se trabajó una cantidad de inóculo probiótico adicionado (relación v/p) del 20%, según lo recomendado por Ramírez¹¹⁶.

5.2.2. Técnica de muestreo. En la realización del presente estudio, se consideraron los principios de ética biomédica descritos por Beauchamp y Childress¹¹⁷, que establece los principios de respeto de la autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia. Para la manipulación de los animales incluidos en el estudio, se tuvo en cuenta los protocolos establecidos en la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio¹¹⁸”, que tiene como objetivo promover el cuidado humano y el uso de animales de laboratorio, proporcionando información para optimizar el bienestar animal, la calidad de la investigación y el avance del conocimiento científico que es relevante para los seres humanos y los animales, además se consideró la normatividad nacional vigente: resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud Colombiano la ley 84 de 1989¹¹⁹, que contempla los lineamientos para el uso de animales vivos en experimentos e investigación, así como el sacrificio de animales y la crueldad para con los animales. El sacrificio de los animales se realizó mediante el método establecido por las autoridades competentes y no generó sufrimiento en los animales.

“Se utilizó un equipo de aturdimiento eléctrico, el cual permite desarrollar un método humanitario de aturdimiento previo al sacrificio”¹²⁰, éste último se hizo mediante dislocación cervical. Se desarrolló el muestreo de los animales, según lo descrito

¹¹⁶ RAMÍREZ, C. Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inhibidoras de microorganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. Trabajo de grado doctorado en Procesos Biotecnológicos. Brazil: Universidad Federal do Paraná, 2005.

¹¹⁷ BEAUCHAMP, T. Y CHILDRESS, J. Principios de Ética Biomédica. [en línea] en: Bioética & Debat. Diciembre, 2011. Vol. 17, n° 64, p.3. . [citado: 10 de julio de 2022]. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Produccion_Animal/Produccion_Animal/Bioetica.pdf

¹¹⁸ NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Santiago, Chile. 2011. Octava edición.

¹¹⁹ REPÚBLICA DE COLOMBIA MINISTERIO DE SALUD. Resolución n° 008430 (4 DE OCTUBRE DE 1993). Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Artículo 87. Santafé de Bogotá, D.C. 1993.

¹²⁰ HUMANE SLAUGHTER ASSOCIATION. Sacrificio práctico de aves de corral. [en línea] en: Humane slaughter association. Reino unido, 2013. p.21. [citado: 10 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.hsa.org.uk/downloads/sacrificiopracicodeavesdecorral.pdf>

por Díaz-Fierro¹²¹. Se ubicaron las aves en decubito dorsal, se incidió la piel entre el lado interno de cada muslo y el abdomen con tijera y se desarticuló ambas articulaciones coxofemorales haciendo tracción manual. Se seccionó la pared muscular abdominal siguiendo ambas arcadas costales hacia dorsal a partir del esternón. Se cortó las articulaciones costovertebrales y los huesos coracoides/clavícula, que mantienen unida la caja torácica al torso del ave. Se fragmentaron las articulaciones costovertebrales del lado opuesto mediante tracción manual, volcando la caja torácica hacia ese lado. Se escindió la unión entre proventrículo y molleja, separando la molleja y tubo digestivo del resto de los tejidos abdominales, posteriormente se identificaron y extrajeron los órganos abdominales comprometidos en el estudio, específicamente intestino delgado (figura 1), identificando referencias anatómicas para localizar los órganos al momento de la evaluación microscópica.

Se muestrearon 6 animales de cada tratamiento (2 animales de cada repetición), lo que proporcionó un total de 30 muestras de intestino delgado en los 5 tratamientos, las cuales, a su vez se seccionaron en los tres segmentos: duodeno, yeyuno e íleon, posteriormente las muestras se almacenaron en cassettes para tejidos (figura 2), según lo reportado por Astaiza et.al¹²².

En la elaboración de los micropreparados se realizaron tres cortes de cada segmento, esto con el objetivo de tener una mayor área representativa del tejido y también para evaluar el segmento anatómico si en un caso dado se presentaran artefactos por procesamiento y se dañara la muestra, lo cual permitió minimizar ese riesgo.

Finalmente se realizaron las diferentes tinciones, dando como resultado 20 micropreparados/laminas histológicas (10 para histología/Hematoxilina y Eosina y 10 para tinción histoquímica/Alcian Blue) en los 5 tratamientos, los micropreparados se rotularon con la letra de B desde B1 hasta B10 (tabla 3). Estas técnicas se llevaron a cabo en Laboratorio de Patología de la Fundación Hospital San Pedro del Municipio de Pasto y en el laboratorio de patología de la Universidad Nacional de Colombia respectivamente.

¹²¹ DIAZ, Stefany. Manual de necropsia aviar. (En línea). En: Slideshare. (Consultada: 20 feb. 2020). Disponible en la dirección electrónica: <https://es.slideshare.net/StefanyFierro1/manual-de-necropsia-aviar>

¹²² ASTAIZA, J. M., et. al. Estandarización de la técnica de necropsia en cuyes (*cavia porcellus*) en el laboratorio de patología veterinaria de la Universidad de Nariño [en línea]. En: Revista de investigación pecuaria, 2013. vol. 2. no. 2, p. 183 [Consultada: 12 abr. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://revistas.udenar.edu.co/index.php/revip/article/view/448>

Tabla 3. Micropreparados/láminas histológicas para tinción inmunohistoquímica/Alcian Blue y para histología/Hematoxilina y Eosina en los 5 tratamientos

Identificación de lámina histológica	Tratamiento	N° de cortes microscópicos por cada segmento y de cada repetición (R1, R2 Y R3)	Total de cortes microscópicos
B1	T0	3 duodeno, 3 yeyuno y 3 íleon	9
B2	T0	3 duodeno, 3 yeyuno y 3 íleon	9
B3	T1	3 duodeno, 3 yeyuno y 3 íleon	9
B4	T1	3 duodeno, 3 yeyuno y 3 íleon	9
B5	T2	3 duodeno, 3 yeyuno y 3 íleon	9
B6	T2	3 duodeno, 3 yeyuno y 3 íleon	9
B7	T3	3 duodeno, 3 yeyuno y 3 íleon	9
B8	T3	3 duodeno, 3 yeyuno y 3 íleon	9
B9	T4	3 duodeno, 3 yeyuno y 3 íleon	9
B10	T4	3 duodeno, 3 yeyuno y 3 íleon	9

Fuente: la presente investigación-año 2022.

5.2.3. Evaluación microscópica de tejidos. Se efectuó la descripción teniendo en cuenta la metodología empleada por el laboratorio de patología veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia modificada por el laboratorio de patología de la universidad de Nariño, lo citado por Jubb en 2016 y los parámetros establecidos por Orbes y Mesias y el grupo de investigación MIFARVET¹²³ cuadro 2. considerando los siguientes aspectos: reconocimiento histológico del órgano, descripción y evaluación en objetivos de 4X, 10X y 40X.

La evaluación microscópica se realizó mediante un doble ciego, una herramienta metodológica, la cual permite prevenir que los resultados de una investigación

¹²³ JUBB, A., KENNEDY, D., y PALMER, J. Pathology of Domestic Animals, citado por MESIAS, Nathaly., y ORBES, Adriana. Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 y *Lactobacillus casei* ATCC® 334 con características probióticas en la alimentación de cuyes (*cavia porcellus*) en fase de levante como alternativa al uso de antibióticos. Pasto: Universidad de Nariño, 2016. p. 61.

puedan estar influidos por el efecto placebo o por el sesgo del observador, para ello una persona ajena al estudio rotuló las laminas, esto con el fin que los investigadores no conocieran el orden ni a que tratamiento corresponde cada micropreparado histológico. Las láminas fueron evaluadas por dos observadores (observador 1 y observador 2), al final los dos investigadores compararon los resultados. Si existía concordancia de acuerdo a los criterios de evaluación microscopica establecidos se validaban los resultados. En los casos en los cuales existía discordancia entre los dos observadores se reevaluaron las láminas de forma independiente mediante la metodología de la segunda opinión, acorde a lo que propone Gibson y colaboradores¹²⁴.

El resultado se validadaba de acuerdo a la concordancia entre la segunda opinión y la similitud con el observador uno o dos. No se tuvieron en cuenta en la evaluación los tejidos que mostraron cambios morfológicos consistentes con autólisis post mortem.

¹²⁴ GIBSON, K., OLIVIER, A., y MEYERHOLZ, D. Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research [en línea]. En: *Veterinary Pathology (USA)*: 2013. 50(6) p. 1008 [Consultada: 30 abr. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985813485099>

Cuadro 2. Criterios de evaluación microscópicos de los micropreparados histológicos

CRITERIO DE EVALUACIÓN	CLASIFICACIÓN
Atrofia vellosidades	Sin alteración – leve – moderada – severa – no evaluado
Fusión de vellosidades	Sin alteración – leve – moderada – severa – no evaluado
Hiperplasia de glándulas	Sin alteración – leve – moderada – severa – no evaluado
Disturbio: cambios microcirculatorios (hemorragia – congestión – enlodamiento – discrasia)	Sin alteración – leve – moderada – severa – no evaluado
Disturbio: cambios asociados a muerte celular: necrosis (coagulación – caseificación – licuefacción – necrosis fibrinoide – mixta)	Sin alteración – leve – moderada – severa – no evaluado
Diaño celular reversible: cambio hidrópico	Sin alteración – leve – moderada – severa – no evaluado
Disturbio: infiltrado inflamatorio: tipo de celularidad:	Mononuclear – mixto – supurativo – linfocitos – macrófagos – plasmáticas
Grado de severidad:	Sin alteración – leve – moderada – severa – no evaluado
Patrón de distribución:	Focal – multifocal – difuso – intersticial – embolico – cráneo – ventral
Estrato afectado:	Superficie apical – región media – glándula intersticial – quilífero central – toda extensión
Disturbio: metaplasia	Sin alteración – leve – moderada – severa – no evaluado
Disturbio: Hiperplasia	Sin alteración – leve – moderada – severa – no evaluado

Fuente: la presente investigación-año 2022.

Para el análisis, interpretación y registro fotográfico de las láminas H/E se empleó un microscopio óptico Nikon Eclipse E200 con cámara fotográfica de alta resolución de 14 megapíxeles serie TP614000S incorporada y el programa TouPView (x64). Este procedimiento se realizó en el laboratorio de fisiología y reproducción animal de la Universidad de Nariño.

Figura 1. Toma de muestra de intestino delgado



Fuente: la presente investigación-año 2022.

Figura 2. Bloques referenciados, para la identificación de tejidos en las láminas



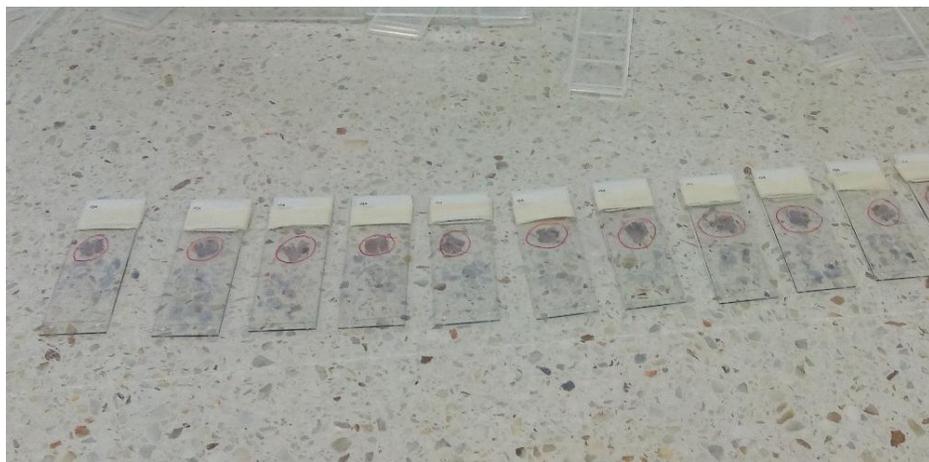
Fuente: la presente investigación-año 2022.

Figura 3. (A y B). Rotulo de láminas histológicas correspondientes a intestino delgado de pollo Ross utilizando el método de doble ciego

A.



B.



Fuente: la presente investigación-año 2022.

5.3. TINCIONES ESPECIALES - HISTOQUÍMICA

Finalizado el reconocimiento y evaluación de los segmentos mediante H/E y teniendo en cuenta los hallazgos histológicos encontrados, se realizó la tinción diferencial de alcian blue para evaluar la densidad y espesor de la capa de mucina intestinal mediante marcación de las células caliciformes.

Se efectuó el conteo de las células con marcación positiva a la coloración en un área tisular de 2,37mm² de área tisular. El espesor de la capa de mucina se determinó realizando la medición del grosor total de dicha capa con inmunomarcación positiva de la región apical del enterocito, mediante el programa ToupView (x64) adaptado a la cámara de microfotografía de 14 megapíxeles. El cálculo del área tisular siguió la metodología establecida citada en Meuten¹²⁵.

5.4. VARIABLES DE ESTUDIO

- Tipo de alteración histopatológica (trastornos microcirculatorios, inflamación, cambios asociados a muerte celular, depósitos, trastornos del crecimiento).
- Patrón de distribución de las lesiones.
- Grado de severidad (leve, moderado, severo).

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este estudio se empleó estadística descriptiva mediante la utilización de tablas de frecuencia, gráficas y la determinación porcentual de cada una de las variables de estudio. La descripción de los hallazgos se realizó únicamente de las lesiones microscópicas.

¹²⁵ MEUTEN, Donald Tumors in Domestic Animals. Fifth Edition. USA: Editorial Offices. 2017.

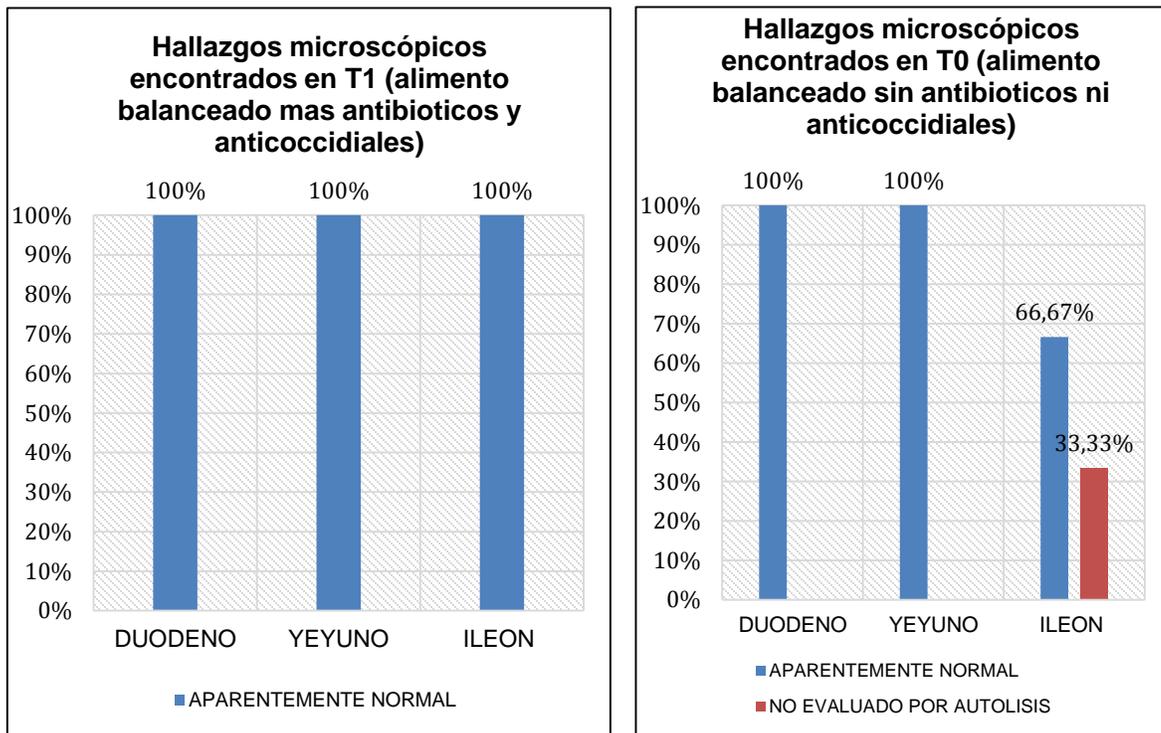
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

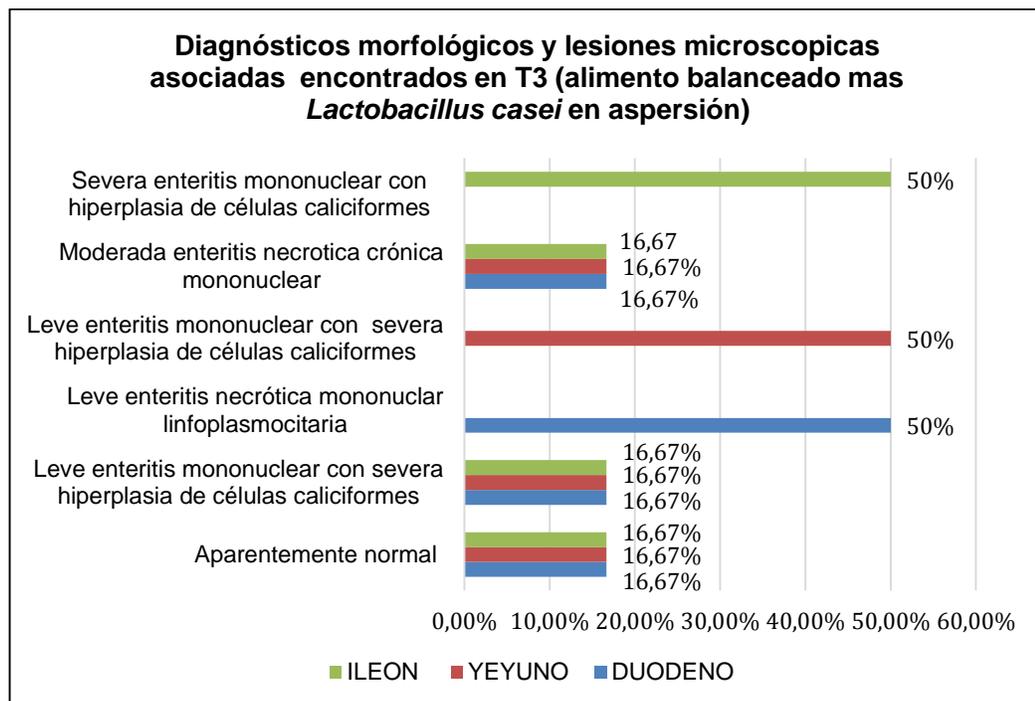
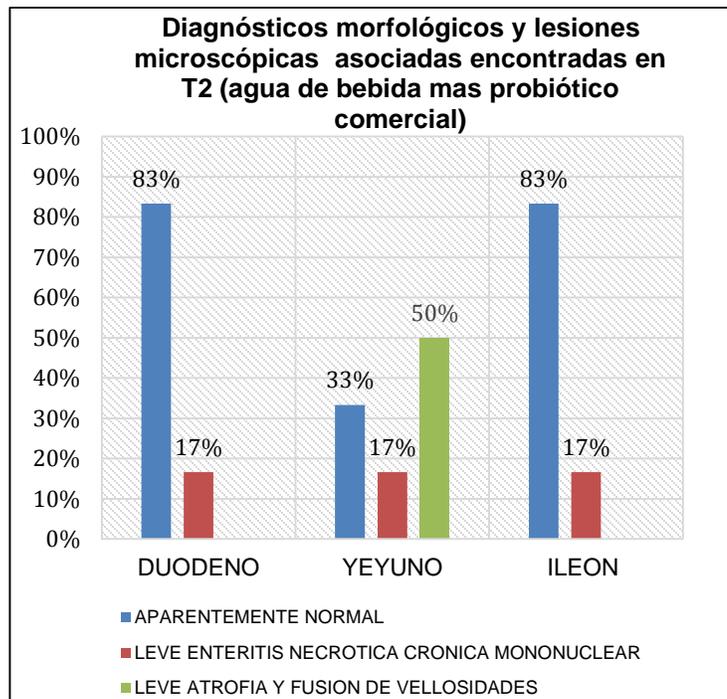
No se pudo llevar a cabo la evaluación morfométrica de las vellosidades de intestino delgado, porque los tejidos presentaron lesiones y alteraciones microscópicas, en las cuales se perdió la integridad de la superficie apical de los enterocitos e hizo muy difícil la medición del espesor de la capa de mucina intestinal.

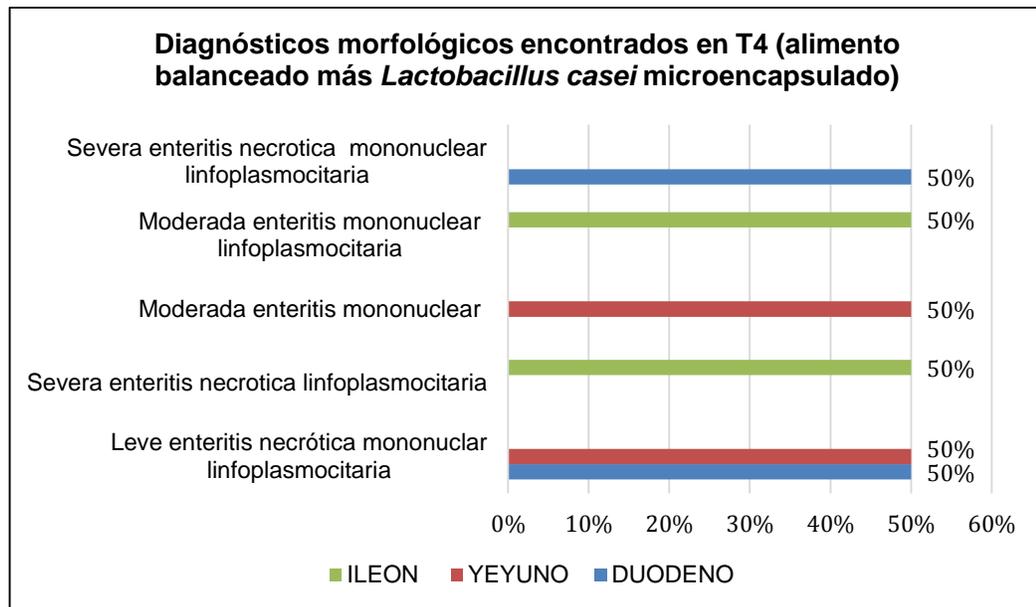
6.1. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE TEJIDOS

6.1.1. Descripción microscópica de los diagnósticos morfológicos encontrados en las láminas de Hematoxilina y Eosina (H/E). En la figura 4 se resume de forma general los diagnósticos morfológicos y hallazgos microscópicos encontrados en los tratamientos 0, 1, 2, 3 y 4 en cada uno de los segmentos de intestino delgado de pollo Ross que se sometieron a las diferentes dietas.

Figura 4. Distribución de los hallazgos microscópicos encontrados en los tratamientos 0, 1, 2, 3 y 4 en duodeno, yeyuno e íleon







Fuente: la presente investigación-año 2022.

El T0 (alimento balanceado sin antibióticos ni anticoccidiales) no presentó alteraciones microscópicas, no obstante, el 33% de los tejidos en íleon no se pudieron evaluar por autólisis. En T1 (alimento balanceado más antibióticos y anticoccidiales) el 100% de los tejidos en los tres segmentos anatómicos se encontraba normal. En T2 (agua de bebida más probiótico comercial) el 17% de los cortes en los tres segmentos (duodeno, yeyuno e íleon) presentaron leve enteritis necrótica crónica mononuclear y el 50% de los cortes en yeyuno evidenció leve atrofia y fusión de vellosidades.

El T3 (alimento concentrado más *L. casei* sin microencapsular/ aspersión) evidenció diferentes tipos de lesiones. En íleon el 50% de los cortes histológicos presentó severa enteritis mononuclear con hiperplasia de células caliciformes, en yeyuno en el 50% de los cortes se observó leve enteritis mononuclear con severa hiperplasia de células caliciformes y el 50% de los tejidos en duodeno evidenció leve enteritis necrótica mononuclear linfoplasmocitaria. En los tres segmentos el 17% mostró moderada enteritis necrótica mononuclear, el 17% leve enteritis mononuclear con severa hiperplasia de células caliciformes en duodeno, yeyuno e íleon y el 17% restante en las tres porciones de intestino delgado no presentó alteraciones.

En T4 (alimento concentrado más *L. casei* microencapsulado) el 50% de los cortes en duodeno evidenció severa enteritis necrótica mononuclear linfoplasmocitaria, el 50% en íleon moderada enteritis mononuclear linfoplasmocitaria, en yeyuno el 50% de los tejidos con moderada enteritis mononuclear; por otra parte, el 50% de los tejidos restantes en íleon exhibieron severa enteritis necrótica linfoplasmocitaria y duodeno así como yeyuno presentaron 50% de los cortes con leve enteritis necrótica mononuclear linfoplasmocitaria.

El análisis de las láminas de hematoxilina y eosina revela hallazgos importantes, por ejemplo, en T0 (alimento balanceado sin antibióticos ni anticoccidiales) la mayor parte de los tejidos no mostraron cambios importantes. El tratamiento 1 (alimento balanceado más antibióticos y anticoccidiales) se evidenció que ningún segmento (duodeno, yeyuno e íleon) presentó alteraciones significativas en la totalidad de los tejidos de este tratamiento.

Por el contrario los tratamientos 2, 3 y 4 presentaron diferentes tipos de lesiones y distintos grados de severidad con mayor porcentaje en el tratamiento 4, este fenómeno posiblemente se encuentre asociado a la inclusión de bacterias probióticas en las dietas suministradas; el tratamiento 2 compuesto por una dieta de alimento concentrado más probiótico comercial mostró un porcentaje bajo (17%) de leve enteritis necrótica crónica mononuclear en cada uno de los segmentos y solo en yeyuno se presentó leve atrofia y fusión de vellosidades (50%).

Los patrones inflamatorios y de muerte celular evidenciados en este estudio se han reportado por Chan y colaboradores¹²⁶, en estudios clínicos utilizando probióticos contra enfermedades inducidas por disbiosis. Se encontró que *Lactobacillus plantarum* MF1298 administrado a una dosis CFU/día de 1×10^{10} , durante seis semanas a sujetos con síndrome de intestino irritable generó un agravamiento de dichos síntomas, el ensayo concluyó que el agravamiento sintomático relacionado con la ingesta de *L. plantarum* MF 1298 fue un efecto directo del microbio en la pared intestinal y no causado por cambios en la microbiota fecal, así como lo reporto Per y colaboradores¹²⁷.

¹²⁶ CHAN, Yee., ESTAKI, Mehbrod., y GIBSON, Deanna. Consecuencias clínicas de la disbiosis inducida por la dieta [en línea]. En: *Annales Nestlé* (Canada) 2013. N° 63 [Consultada: 21 jul. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <http://www.altmedrev.com/archive/publications/9/2/180.pdf?fbclid=IwAR0c7ODZObgDIUdI88NVx8TI219LOOUUiGU45uVLjQkQU7DR4lwL7Np2ZhU>

¹²⁷ PER, Farup., et al. Probiotics, Symptoms, and Gut Microbiota: What Are the Relations? A Randomized Controlled Trial in Subjects with Irritable Bowel Syndrome [en línea]. En: *Gastroenterol Res Pract* (Noruega): 2012. p. 5. [Consultada: 29 jul. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415104/pdf/GRP2012-214102.pdf>

Leber, et al¹²⁸, en un ensayo clínico en el cual se suministró *Lactobacillus casei Shirota* en dosis de CFU/día 1.95×10^{10} durante tres meses a pacientes con síndrome metabólico resulto en un aumento en la inflamación, ya que los niveles de proteína C reactiva de alta sensibilidad aumentaron leve pero significativamente luego de tres meses dentro del grupo de probióticos.

Adicionalmente, en una revisión sistemática realizada por Jensen y Bjørnvad¹²⁹, investigaron los efectos clínicos de los probióticos cuando se utilizan en la prevención o el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, identificaron 17 estudios que cumplieron los criterios de inclusión para ser incluidos en la revisión sistemática: 12 se referían a enfermedades gastrointestinales agudas y 5 a enfermedades gastrointestinales crónicas, estos autores concluyeron que los datos actuales apuntan hacia un efecto muy limitado y posiblemente sin importancia clínica para la prevención o el tratamiento de la enfermedad gastrointestinal aguda y que para la enfermedad gastrointestinal crónica, la intervención dietética sigue siendo la clave principal del tratamiento, mientras que el suplemento probiótico no parece aportar una mejora significativa.

Sin embargo, los estudios a menudo no tenían el poder estadístico suficiente, lo que subraya la necesidad de futuros estudios más grandes, preferiblemente multicéntricos.

En un estudio realizado por Gámez y Zambrano¹³⁰, se encontró que después del suministro de *Lactobacillus Plantarum* a 300 pollos durante un periodo de los 7 a los 35 días de edad, incrementaron las lesiones histopatológicas, además resaltan la importancia de mejorar la investigación en cuanto a la cantidad de inóculo a suministrar.

¹²⁸ LEBER, B., et al. The influence of probiotic supplementation on gut permeability in patients with metabolic syndrome: an open label randomized pilot study [en línea]. En: European Journal of Clinical Nutrition (Austria): 2012. N° 66 [Consultada: 2 ago. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.nature.com/articles/ejcn2012103.pdf>

¹²⁹ JENSEN Anders y BJØRNVAD Charlotte. Clinical effect of probiotics in prevention or treatment of gastrointestinal disease in dogs: A systematic review. [en línea]. En: Journal of veterinary internal medicine. Copenhagen, Denmark, 2019. p.1862, 33 (5). [citado: 5 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31313372/>

¹³⁰ GÁMEZ, Henry y ZAMBRANO, Edward. Adición de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado sobre parámetros intestinales, inmunes, productivos y bioquímica sanguínea en pollos. [en línea]. En: biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, revista de la facultad de ciencias agrarias, universidad del Cauca. Pasto, 2020. p.2. [citado: 10 de agosto de 2021]. Disponible en: [file:///C:/Users/Invitado/Downloads/1502-Texto%20del%20art%C3%ADculo-4926-1-10-20200711%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Invitado/Downloads/1502-Texto%20del%20art%C3%ADculo-4926-1-10-20200711%20(1).pdf)

En un estudio realizado por Mesías y Orbes¹³¹, donde se suministró *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 Y *Lactobacillus casei* ATCC® 334 con características probióticas en la alimentación de cuyes (*cavia porcellus*) en fase de levante como alternativa al uso de antibióticos durante 45 días, concluyó que posiblemente el inóculo suministrado a los cuyes causó lesiones en el tejido intestinal, sin embargo estos resultados no pudieron ser atribuidos únicamente a las bacterias lácticas administradas, sino quizá a la interacción con el medio de crecimiento PRO en el cual se encontraban o también a la proliferación de bacterias patógenas. En este estudio los resultados posiblemente pueden estar influenciados por la interacción o factores no controlados que pudieron interferir con el probiótico y factores no controlados del ensayo experimental, como factores ambientales, forma de administración, tiempo de administración y dosis del inóculo, densidad de animales, estrés, edad de las aves entre otros.

En el protocolo empleado en el estudio se efectuó la evaluación morfológica y se realizó aspersión del probiótico en el alimento balanceado comercial y formulado distribuido homogéneamente en una bandeja. Como menciona Corrier et al. Citado por Londero¹³², la aplicación por aspersión, ya sea manual o automática permite tratar a los pollitos con rapidez después de la eclosión y asegura un reparto equilibrado de los materiales de tratamiento. Sin embargo, en este caso es posible que haya disminuido la viabilidad del probiótico Cayra et al.¹³³, los autores anteriormente referenciados mencionan que son microorganismos muy sensibles y se ven afectados por factores ambientales con los que interactúan, tales como el pH, oxígeno, temperatura, etc. Por lo anterior se sugiere realizar ensayos de viabilidad del inóculo, ya que se cuenta con poca información acerca de conservación de *L.casei* administrado en aspersión.

¹³¹ MESIAS, Laura., y ORBES, Adriana. Evaluación *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 y *Lactobacillus casei* ATCC® 334 con características probióticas en la alimentación de cuyes (*cavia porcellus*) en la fase de levante como alternativa al uso de antibióticos. Pasto: Universidad de Nariño, 2016. p. 105.

¹³² CORRIER, D., et al. Provision of lactose to molting hens enhances resistance to salmonella enteritidis colonization. *Journal of Food Protection*, 60(1), 10-15, citado por LONDERO, Alejandra. Alimentos funcionales: Obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kefir. Trabajo de grado para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas. Argentina: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), 2012.

¹³³ CAYRA, Efraín., et al. Evaluación de la Estabilidad y Viabilidad de Dos Cepas Probióticas Microencapsuladas por Lecho Fluidizado [En línea] en: información tecnológica (Peru): 2020, Vol. 26 [consultada: 27 ago. 2021]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v28n6/art05.pdf>

Lo contrario sucede con la técnica de microencapsulación, de la cual Jurado y Zambrano¹³⁴, reportan que el crecimiento de la bacteria es de 3×10^{12} y 4×10^{12} UFC/mL, a 37 y 45°C, respectivamente. Las aves tienen una temperatura interna promedio de 41°C, por lo que los resultados a 45°C indican viabilidad de *L. casei* a las condiciones internas de las aves.

En el presente estudio, los tratamientos 3 y 4 correspondientes al suministro de *L. casei* en aspersión y *L. casei* microencapsulado respectivamente, fueron los más afectados en los tres segmentos de intestino delgado, con diagnósticos morfológicos correspondientes a leves, moderadas y severas enteritis necróticas (crónicas o agudas) mononucleares, algunos de estos tejidos con infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario y otros con hiperplasia de células caliciformes. Esta evidencia morfológica podría sugerir que la administración de *L. casei* en pollos Ross provocó lesiones y no demostró un efecto benéfico en la morfología intestinal en el protocolo experimental citado por Gámez y Zambrano¹³⁵.

En el ensayo experimental la dosis administrada de probiótico microencapsulado fue criterio de los investigadores. Sin embargo, se encontraron lesiones con el suministro de la bacteria, lo que indicó que probablemente se deba ajustar la dosis, la frecuencia y la vía de suministro, para evitar este tipo de alteraciones. La formación de una lesión puede estar influenciada por la dosis, la duración, la ruta de exposición y también de factores propios del huésped así como lo señala Silbergeld¹³⁶.

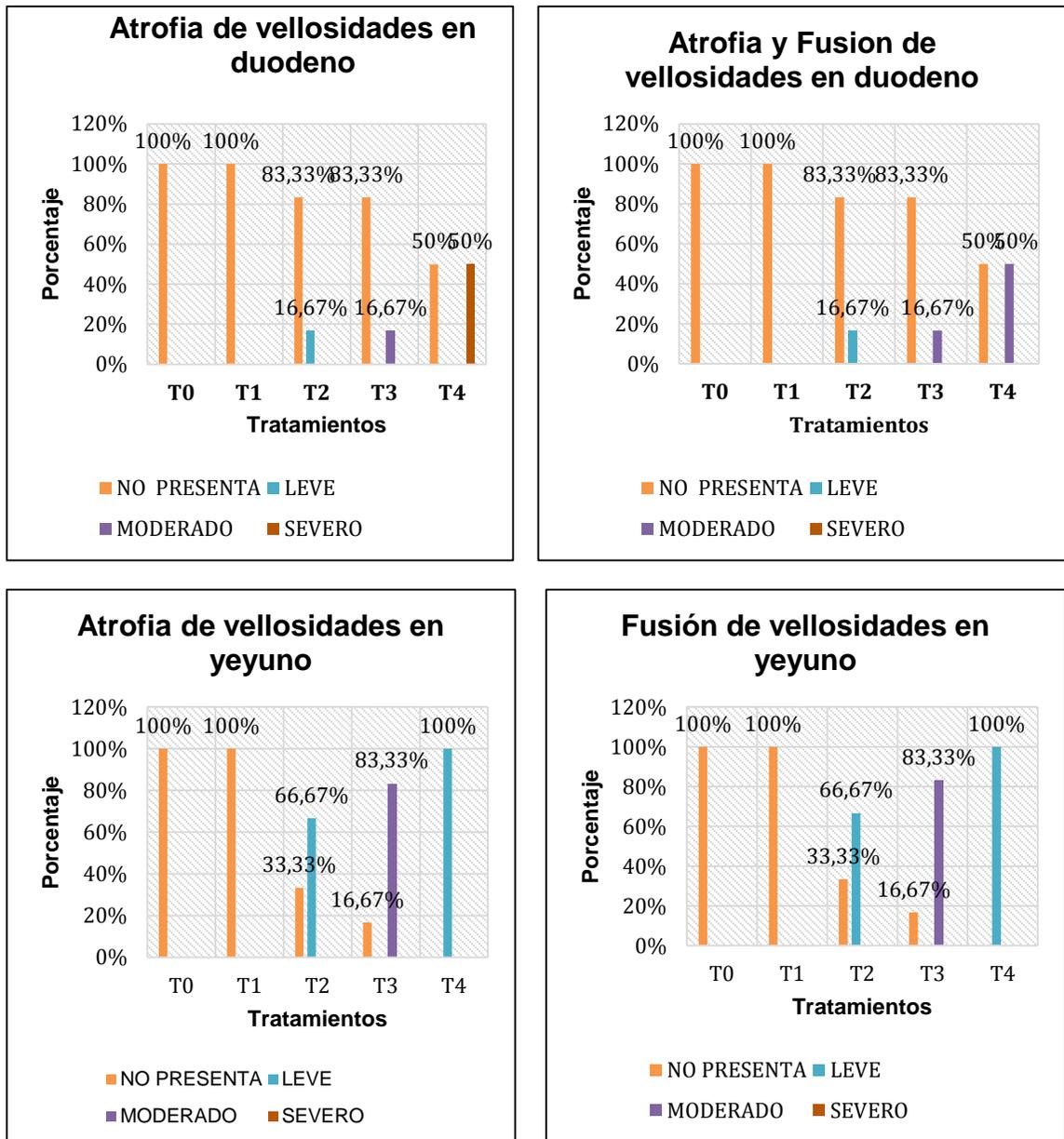
- **Hallazgos microscópicos en duodeno, yeyuno e íleon.** En la figura 5 se evidencia la frecuencia con la que se presentó atrofia y fusión de vellosidades en los segmentos evaluados.

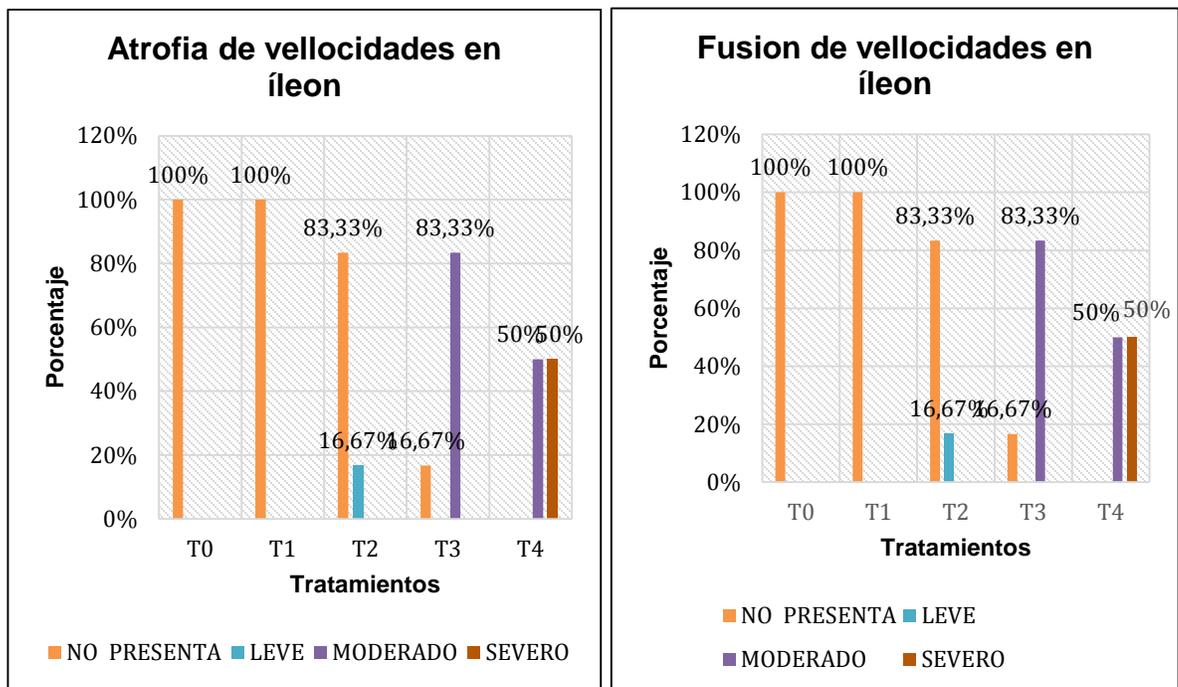
¹³⁴ JURADO, Henry., y ZAMBRANO, Edward. Efecto de *Lactobacillus casei* microencapsulado sobre la salud intestinal y parámetros bioquímicos y productivos en pollo de engorde [en línea] en: Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica (Pasto): 2020 [consultada: 3 sep. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/1480/1980#citations>

¹³⁵ GAMEZ y ZAMBRANO. Op. cit., p. 1.

¹³⁶ SILBERGELD, Ellen. Toxicología [en línea] en: Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. 2021 [consultada: 12 sep. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.insst.es/documents/94886/161958/Cap%C3%ADtulo+33.+Toxicolog%C3%ADa>

Figura 5. Atrofia y fusión de vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular





Fuente: la presente investigación-año 2022.

Para evaluar la atrofia y fusión de vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon se utilizó el patrón de severidad de leve, moderado y severo. Cabe mencionar que las alteraciones anteriormente mencionadas se evaluaron por separado pero corresponden a un mismo corte histológico.

En duodeno el T0 y T1 no presentaron atrofia, ni fusión de vellosidades; en T2 correspondiente a duodeno el 17% de los cortes histológicos evidenció leve atrofia y fusión de vellosidades, los tejidos restantes en este tratamiento no presentaron alteración. En T3 se observó el 17% de los cortes con moderada atrofia de vellosidades y con moderada fusión de vellosidades. En T4 el 50% de los tejidos presentó severa atrofia de vellosidades y moderada fusión de vellosidades.

En yeyuno los tratamientos 0, 1, 2, 3 y 4 presentaron de forma similar todas las alteraciones, en cuanto a atrofia de vellosidades y fusión de vellosidades por ejemplo, T0 y T1 no presentaron ni fusión ni atrofia, T2 el 66,67% de los tejidos mostraron leve atrofia y leve fusión, en T3 se observó al 83,33% de los cortes con moderada atrofia y moderada fusión de vellosidades, finalmente, el 100% de los tejidos presentaron leve atrofia y leve fusión en el tratamiento 4.

De igual forma en íleon, en los tratamientos 0, 1, 2, 3, y 4 no hubo variación entre ellos en cuanto a la presentación de atrofia y fusión de vellosidades, en T0 y T1 no se observó ningún tejido con atrofia ni fusión, en T2 el 16,67% presentó leve atrofia y leve fusión, en T3 el 83.33% de los tejidos exhibió moderada atrofia y moderada fusión, en T4 el 50% de los cortes presentó moderada atrofia y moderada fusión de vellosidades y el 50% de los tejidos con severa atrofia y severa fusión de vellosidades.

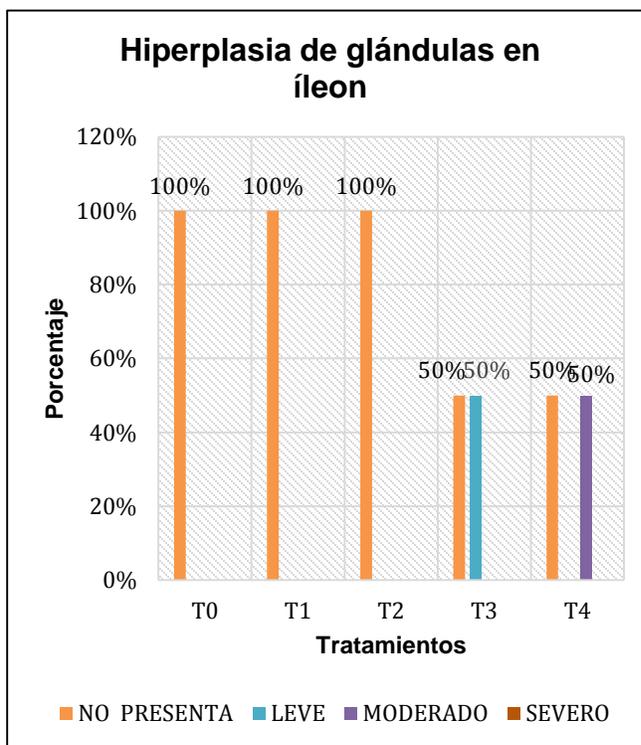
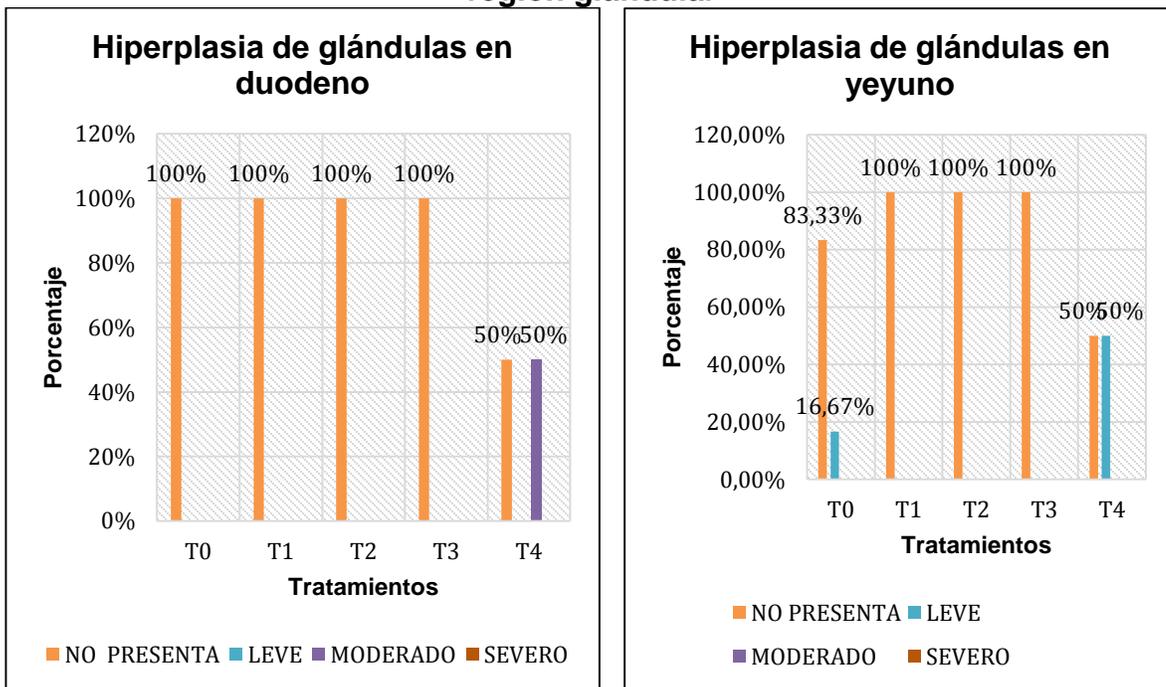
Se puede determinar que los tratamientos más afectados fueron 2, 3 y 4, resaltando el tratamiento 4. Medina citado por Mesías y Orbes¹³⁷ refiere que algunas causas que llevan a atrofia y fusión de vellosidades pueden ser: una incrementada pérdida de enterocitos causada por virus, protozoarios, bacterias o toxinas bacterianas, que producen además hiperplasia del epitelio de las criptas.

Lo anterior permite deducir, que el inóculo suministrado posiblemente generó estas alteraciones, debido a que los animales afectados en su mayoría corresponden a tratamientos donde se evaluó el inóculo (*L. casei* ATCC 334), ya que dicho inóculo no hace parte de la dieta normal del pollo, además la disposición del alimento más el probiótico pudo haber favorecido el crecimiento de diferentes microorganismos tanto benéficos como patógenos. Sin embargo, se requieren otros estudios específicos mediante análisis de regresión logística para determinar la causalidad entre el desarrollo de la lesión y el agente.

En la figura 6 se expone la frecuencia con la que se presentó la hiperplasia de glándulas en los diferentes segmentos de intestino delgado evaluados.

¹³⁷ MEDINA, Maritza. Determinación de algunas características patológicas del complejo entérico porcino en cerdos de producción intensiva, C citado por MESIAS, Nathaly., y ORBES, Adriana. Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 y *Lactobacillus casei* ATCC® 334 con características probióticas en la alimentación de cuyes (*cavia porcellus*) en fase de levante como alternativa al uso de antibióticos. Pasto: Universidad de Nariño, 2016.

Figura 6. Hiperplasia de glándulas en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular



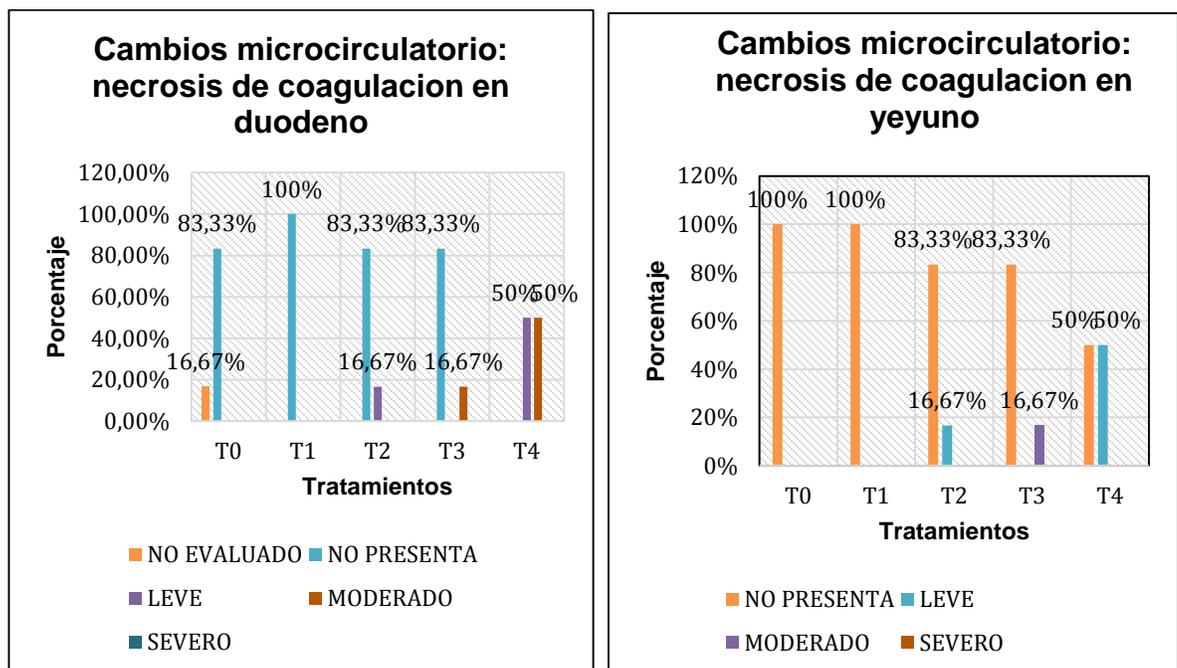
Fuente: la presente investigación-año 2022.

En duodeno, en T4 se observó el 50% de los tejidos con moderada hiperplasia de glándulas. En yeyuno se presentó leve hiperplasia de glándulas en un 16.67% correspondiente a T0 y en un 50% de los cortes histológicos en el T4. En íleon se observó en T3 el 50% de los tejidos con leve hiperplasia y moderada hiperplasia de las glándulas en el 50% de los tejidos de T4.

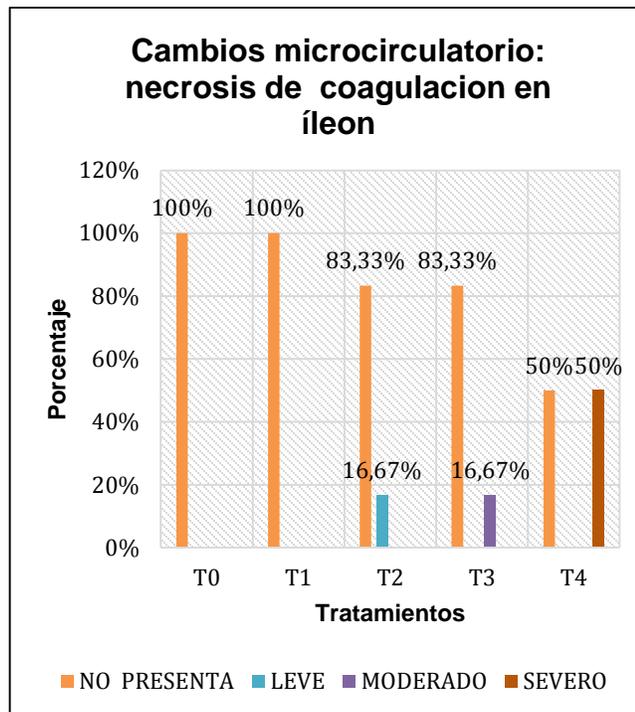
Según lo expuesto por Mesías y Orbes¹³⁸ la hiperplasia corresponde a un aumento de tamaño de las glándulas, debido a que sus células han aumentado en número y se genera en respuesta a diversos estímulos como por ejemplo una lesión persistente. En este caso probablemente se causó por el suministro continuo del probiótico *L. casei*. Es importante resaltar que los tratamientos 3 y 4 fueron los que más presentaron esta alteración en los tres segmentos y que dichos tratamientos fueron precisamente los que recibieron el probiótico *L. casei* tanto en aspersión como microencapsulado.

En la figura 7 se especifican los cambios asociados a muerte celular observados en los segmentos de intestino delgado evaluados.

Figura 7. Cambios asociados a muerte celular: necrosis de coagulación en los segmentos de intestino delgado evaluados en mucosa región glandular



¹³⁸ MESIAS y ORBES, Op., Cit., p. 107.



Fuente: la presente investigación-año 2022.

Los tratamientos donde más se observó necrosis de coagulación fueron en los tratamientos 2, 3 y 4 con un grado de severidad de leve, moderado y severo. En duodeno, yeyuno e íleon del T2 el 16.67% de los tejidos presentó leve necrosis de coagulación, de igual forma, en el T3 en los tres segmentos de intestino delgado evaluados se observó que un 16.67% presentó leve necrosis de coagulación y el T4 fue el más afectado en todos los segmentos, donde el 50% de los tejidos presentaron leve necrosis de coagulación y el 50% restante en duodeno moderada necrosis de coagulación y el 50% de los tejidos con leve necrosis de coagulación en yeyuno y 50% con severa coagulación en íleon.

Según Pérez citado por Mesías y Orbes¹³⁹ existen tres formas principales de muerte celular: necrosis, apoptosis y autofagia. La necrosis hace referencia a los cambios morfológicos que sufren las células cuando mueren debido a una lesión grave. Desde el punto de vista morfológico, la forma más característica de la necrosis es la denominada oncosis, en la que aparece edema celular, con cariólisis (disolución del núcleo), cariorrexis (fragmentación de la cromatina al azar) y picnosis (condensación de la cromatina).

¹³⁹ PÉREZ, José Luis. Etiología y patogenia general, citado por MESIAS, Nathaly., y ORBES, Adriana. Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 y *Lactobacillus casei* ATCC® 334 con características probióticas en la alimentación de cuyes (*cavia porcellus*) en fase de levante como alternativa al uso de antibióticos. Pasto: Universidad de Nariño, 2016. p. 111.

Por otro lado, Guerini y Spitale¹⁴⁰ mencionan que la causa etiológica o el tejido afectado podemos diferenciar distintos tipos de necrosis: por coagulación, licuefacción y caseosa. Como afirma Pretell¹⁴¹ la necrosis de coagulación se produce por una coagulación de las proteínas estructurales de la célula y se genera pérdida de agua que condiciona la momificación de la célula, microscópicamente se observa necrosis estructurada, lo que quiere decir que no se pierde la arquitectura normal del tejido y se dibujan los contornos de las estructuras y de las células, las cuales pierden el núcleo y forman masas homogéneas, eosinófilas. La causa más frecuente de este tipo de necrosis es por isquemia.

Es importante destacar que los tratamientos 2, 3 y 4 que recibieron el probiótico comercial, en aspersión y microencapsulado respectivamente, evidenciaron en mayor grado necrosis de coagulación, probablemente a una interacción entre los *Lactobacillus* o bacterias patógenas, así como también lo reportan Mesías y Orbes¹⁴², además de que el suministro fue continuo desde los 7 hasta las 45 días de edad. .

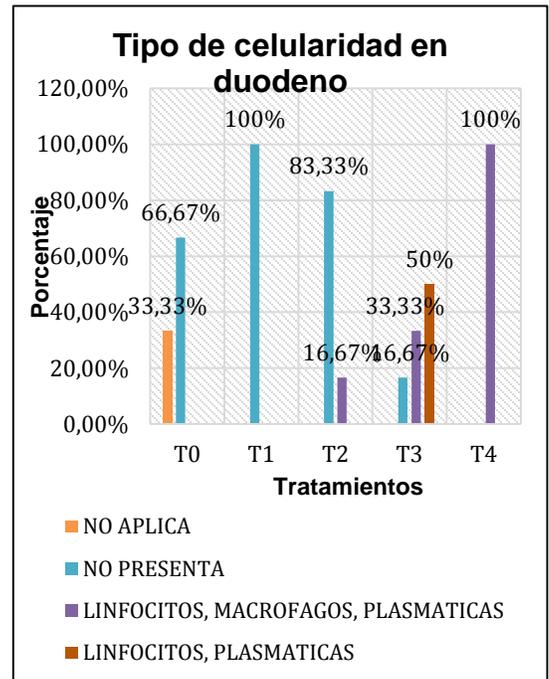
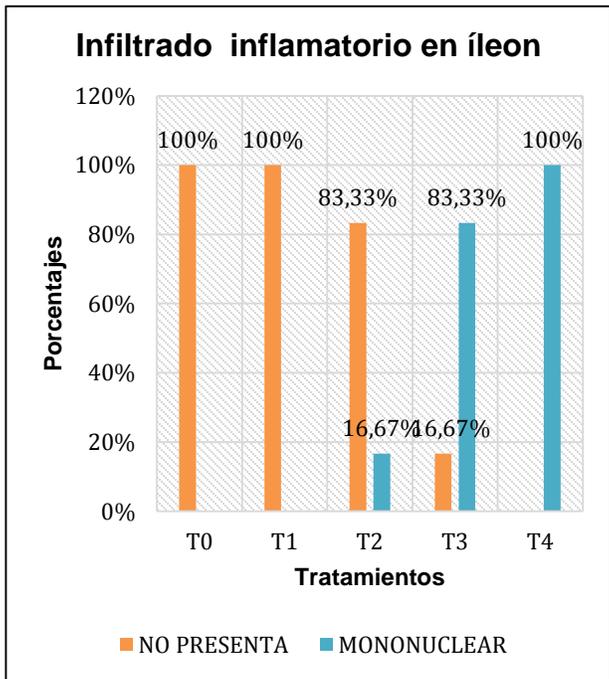
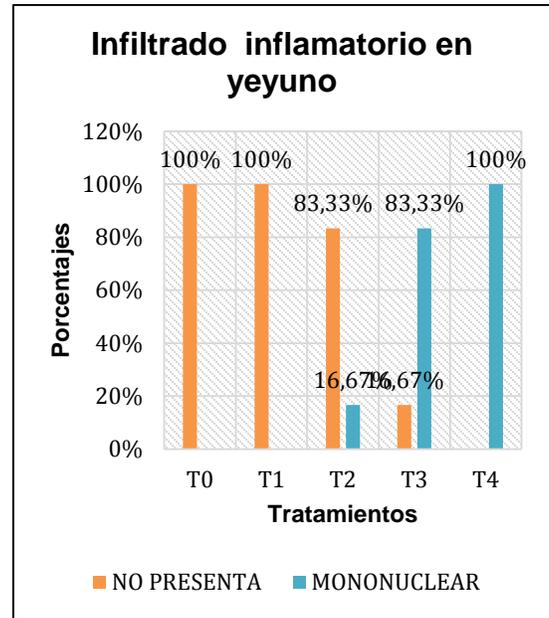
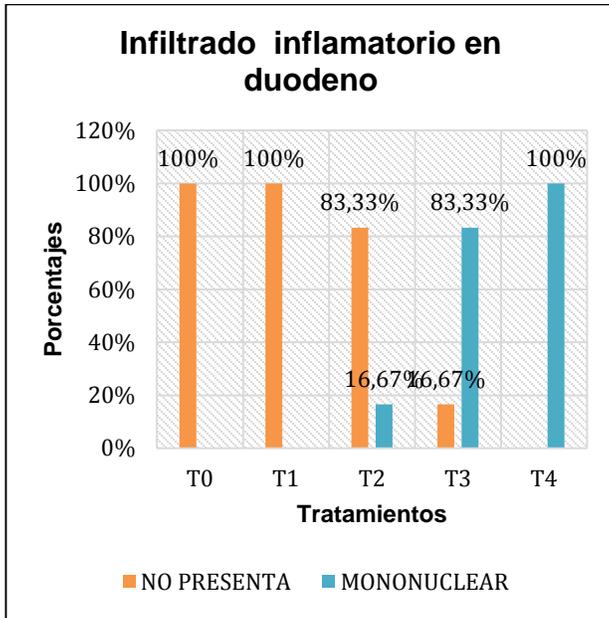
En la figura 8 se presentan los cambios inflamatorios en los tres segmentos con respecto al infiltrado inflamatorio, tipo de celularidad, grado de severidad y patrón de distribución.

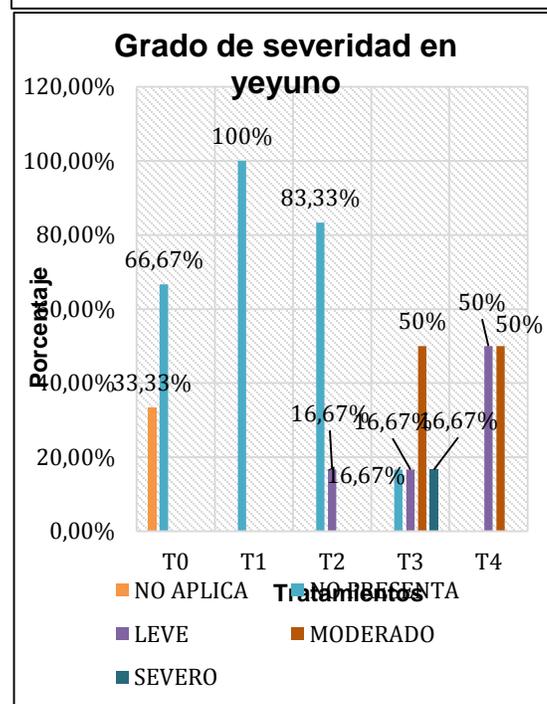
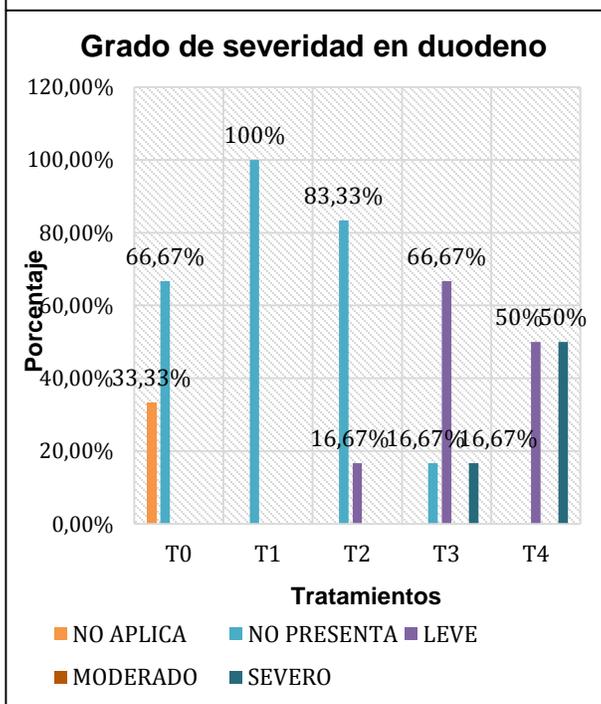
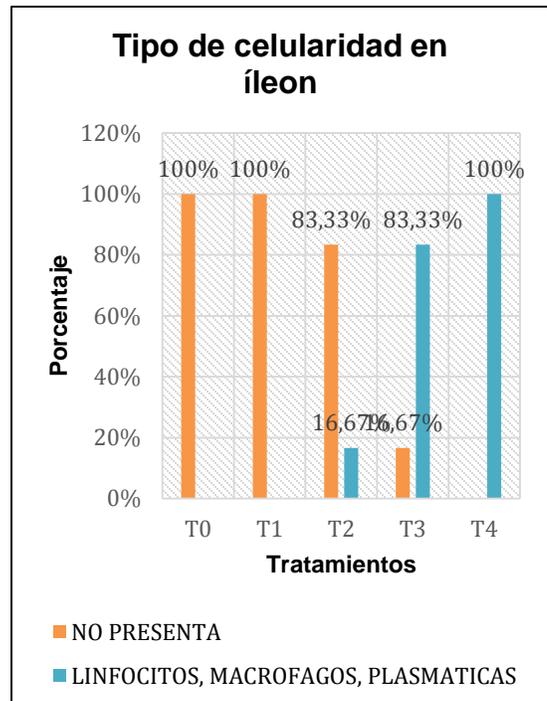
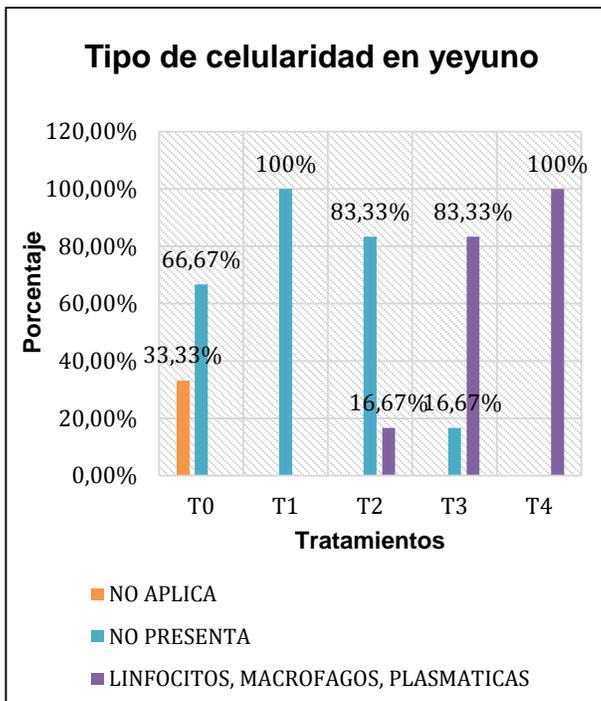
¹⁴⁰ GUERINI, Julio., y SPITALE, Luis Santos. Lesión, adaptación y diferenciación celular [en línea]. En: Patología humana. 2014 [Consultada: 8 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: http://segundacatedradepatologia.webs.fcm.unc.edu.ar/files/2015/04/CAPITULO_2_-_2015.pdf

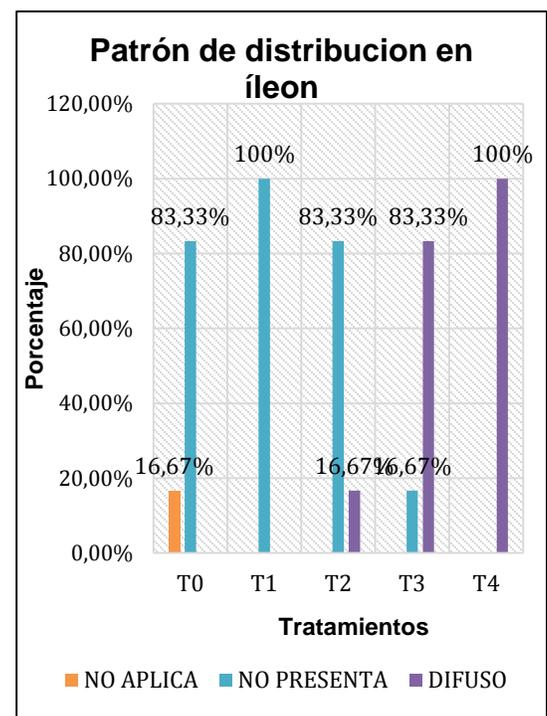
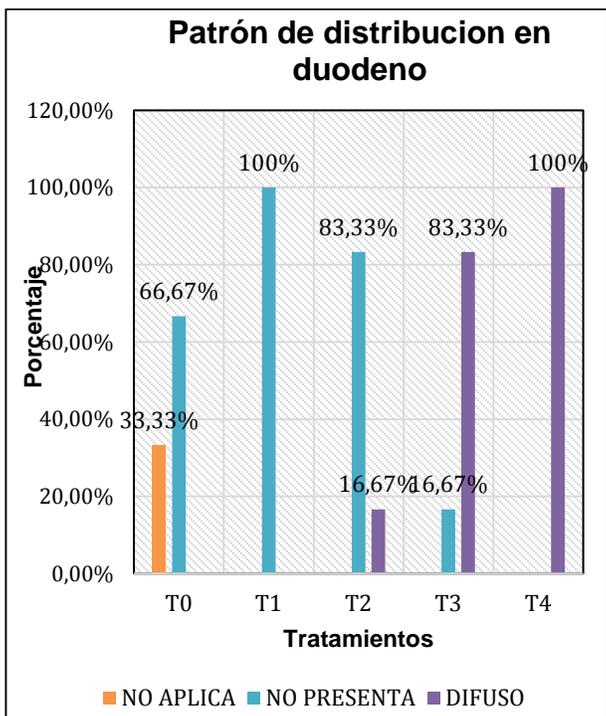
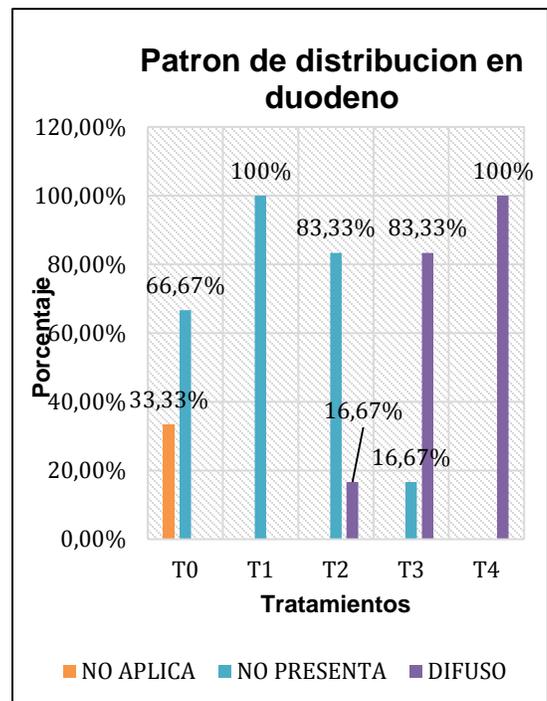
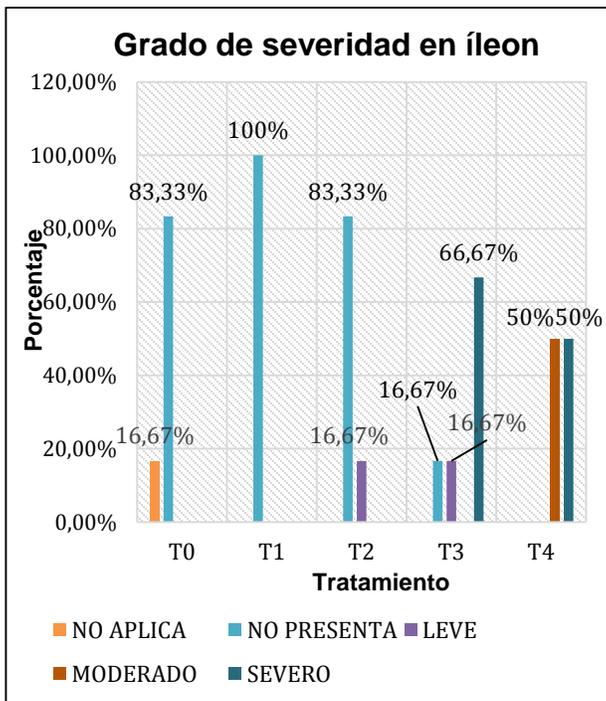
¹⁴¹ PRETELL, Bertha. Necrosis [en línea]. En: SlideShare. 2010 [consultada: 8 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://es.slideshare.net/oscarjz/necrosis-4777532>

¹⁴² MESIAS y ORBES, Op. cit., p. 112.

Figura 8. Infiltrado inflamatorio en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular







Fuente: la presente investigación-año 2022.

En los tres segmentos de intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) se evaluó: infiltrado inflamatorio: mononuclear; tipo de celularidad: linfocitos, macrófagos y células plasmáticas y patrón de distribución.

El infiltrado inflamatorio mononuclear se presentó por igual en todos los segmentos, con un 16.67% de afectación en el tratamiento 2, el 83.33 % de los tejidos en tratamiento 3 y el 100% en el tratamiento 4. En el tipo de celularidad se presentaron linfocitos, macrófagos y células plasmáticas en mayor proporción, en los tratamientos 2, 3 y 4 siendo predominante en éste último, donde obtuvo el 100% de los tejidos afectados en todos los segmentos.

En cuanto al grado de severidad los tratamientos más afectados fueron 2, 3 y 4 en todos los segmentos, donde T2 tuvo el 16.67% de afectación con grado de severidad leve en duodeno, yeyuno e íleon; en T3 para duodeno la afectación fue del 16.67% con grado de severidad de severo, un 66.67% de leve y T4 tuvo un 50% de afectación con grado de severidad leve y otro 50% severo; en yeyuno la afectación de T3 fue del 16.67% con grado de severidad leve, un 50% moderado y un 16.67% y el tratamiento más afectado fue el 4 con el 100% de tejidos lesionados en grado de severidad leve moderado y severo; en íleon T3 tuvo una afectación del 16.67% con un grado de severidad leve, un 66.67% severo y para T4 la afectación fue del 50% moderado y 50% severo. Finalmente el patrón de distribución fue difuso para todos los tratamientos y en todos los segmentos y tuvo la misma afectación: 16.67% en T2, 83.33% en T3 y el 100% en T4.

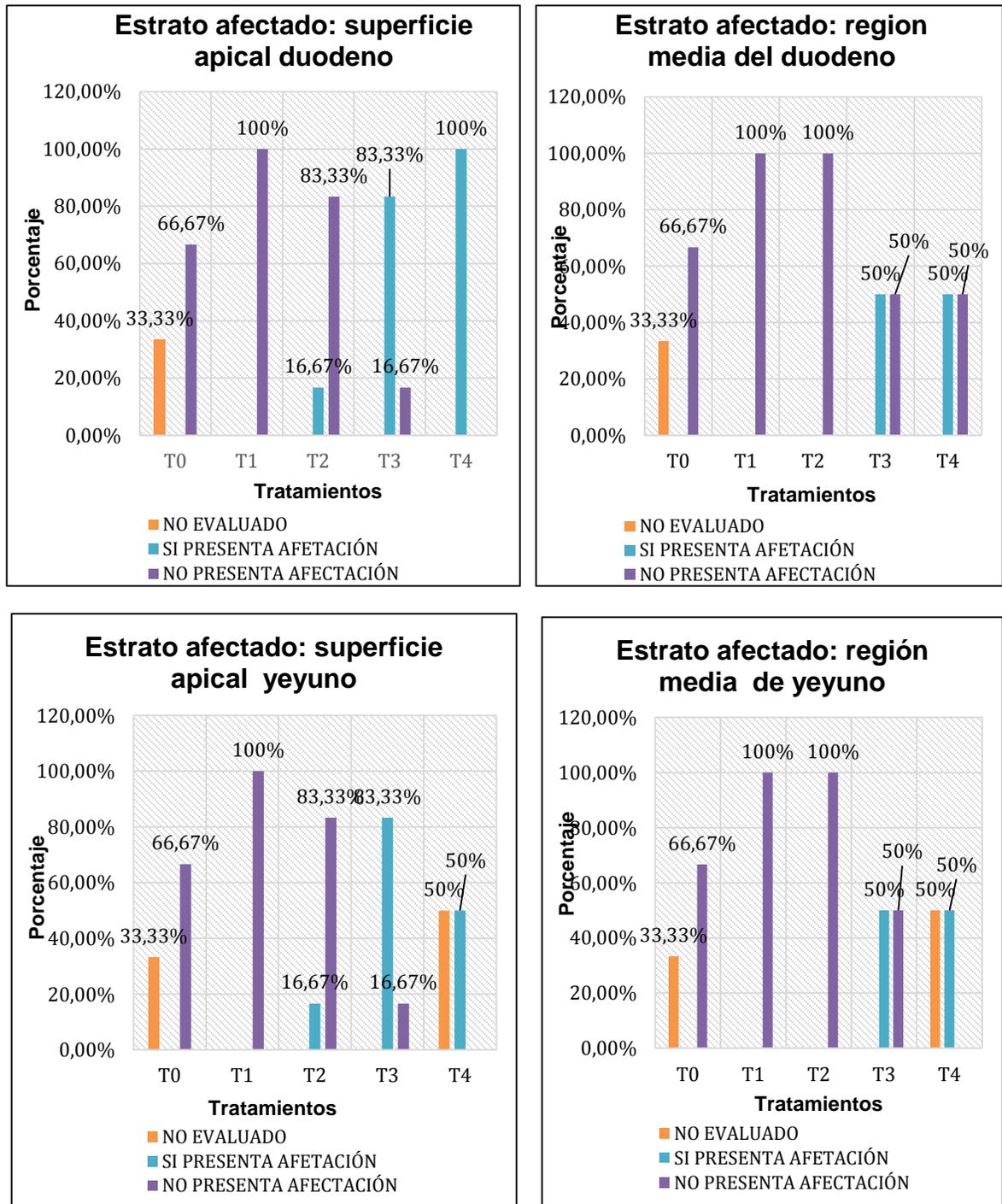
Cuando se habla de un infiltrado inflamatorio mononuclear en este estudio refiere a que existe un depósito de células formadas por un núcleo redondo, las cuales comprenden a los linfocitos (B y T) y los monocitos que son un tipo de célula inmunitaria. En este caso el tipo de células encontradas fueron linfocitos, macrófagos y células plasmáticas como respuesta celular y humoral a un daño tisular por la formación de anticuerpos.

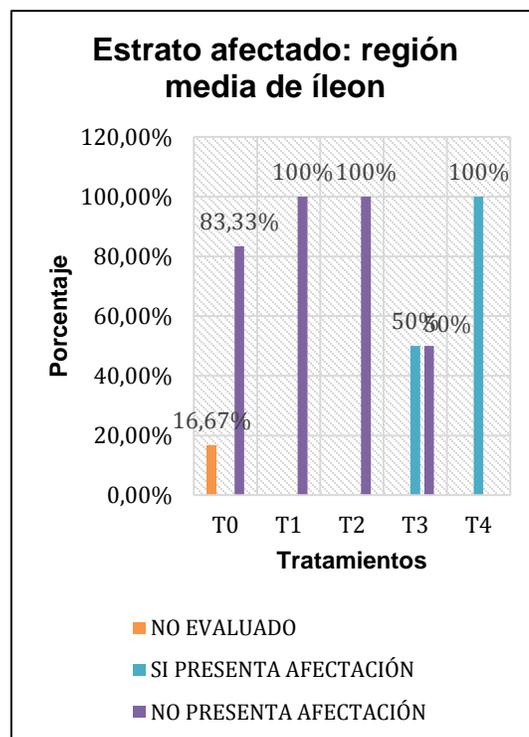
El patrón de distribución difuso representa que el infiltrado inflamatorio se distribuye por toda la vellosidad, así como también lo señalan Mesías y Orbes¹⁴³ en su estudio. Con respecto a la severidad del infiltrado inflamatorio éste se presentó en grado leve, moderado y severo, siendo los tratamientos con la administración del probiótico (tratamientos 2, 3 y 4) los lesionados y en mayor proporción la afectación en cuanto al grado de severidad se dio en los tratamientos 3 y 4 a los cuales se les suministró el probiótico *Lactobacillus casei* ATT335 en aspersion y microencapsulado respectivamente.

¹⁴³ MESIAS y ORBES, Op. Cit., p. 116.

En figura 9 se puede diferenciar el estrato de la vellosidad más afectado por las alteraciones ya expuestas.

Figura 9. Estrato afectado de la vellosidad en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular





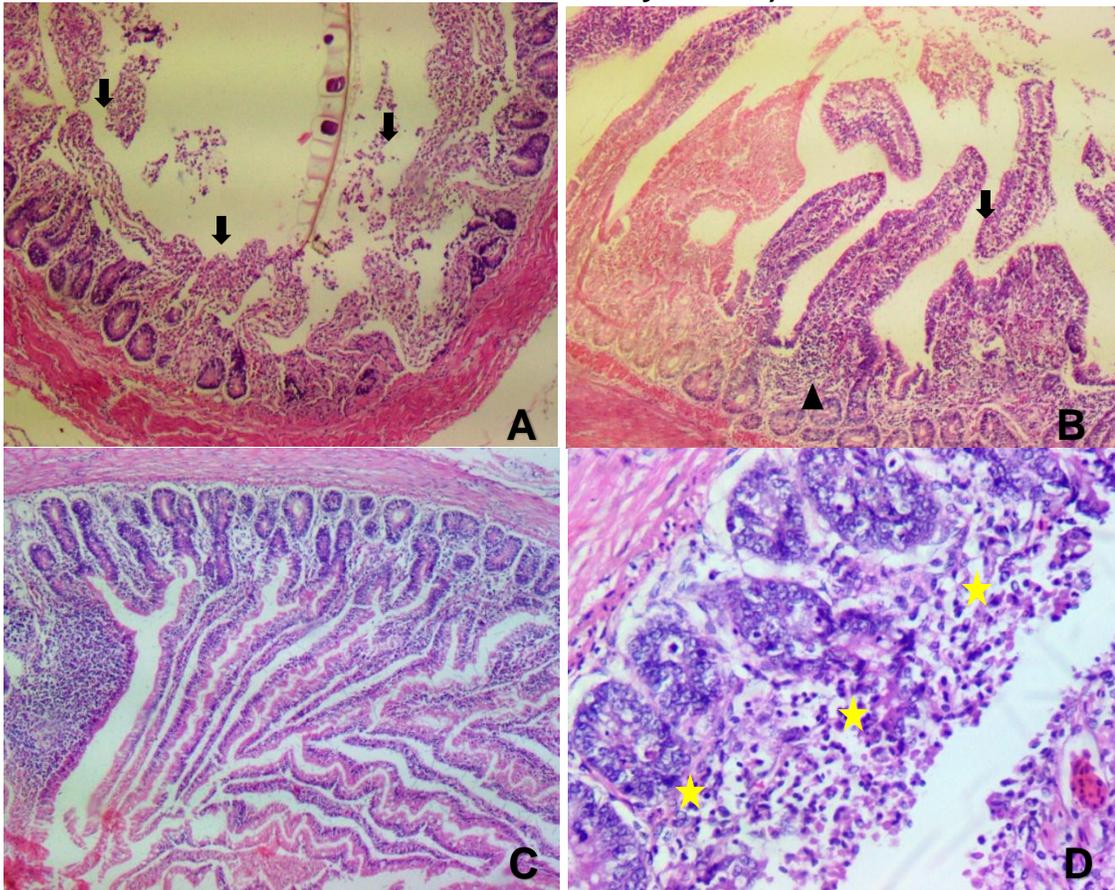
Fuente: la presente investigación-año 2022.

Referente a este hallazgo, los tratamientos más afectados fueron 2, 3 y 4 y los dos últimos en mayor proporción, en todos los segmentos evaluados. En el duodeno la superficie apical fue la que más afectación sufrió un 16,67% de afectación en el tratamiento 2, con 83,33% T3 y con 100% T4, mientras que en la región media del duodeno se presentó el 50% de afectación de los tejidos afectados tanto en el tratamiento 3 como en el 4. En cuanto al yeyuno se presentó una situación similar que la del duodeno con la única diferencia que en la superficie apical del tratamiento 4 del yeyuno fueron tres los tratamientos afectados. Para íleon la afectación fue igual que en duodeno sin embargo en el tratamiento 4 de la región media del íleon se presentaron seis tejidos afectados.

En este estudio se identificó que la base de la vellosidad no sufrió afectación, únicamente la región media y apical. Es importante tener en cuenta que el daño está relacionado con el estrato afectado, entre más profundo es más severo y el periodo de recuperación de la vellosidad es más largo, como lo afirman Mesías y Orbes.

En cuanto a este estudio la base de la vellosidad no sufrió afectación, únicamente la región media y la superficie apical lo que podría sugerir que la causa de la lesión se encuentra en el lumen, la punta y la región media de la vellosidad y no proviene de procesos de localización distante al intestino.

Figura 10. A–D. Descripción y registro fotográfico (láminas de hematoxilina y eosina)



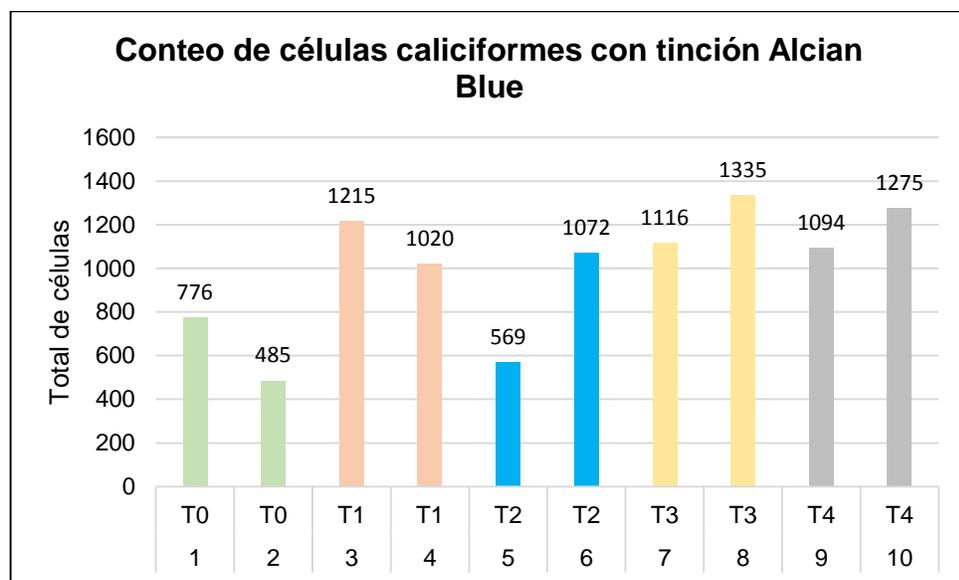
Fuente: la presente investigación-año 2022.

En la anterior figura se puede apreciar el Intestino delgado de pollo Ross. H/E. 10X (A); 4X (B); 10X (C); 10X (D); 4X. Nótese atrofia y fusión de vellosidades (flechas), infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario difuso en lámina propia, severo y extenso (punta de flecha). Severa y extensa necrosis de la mucosa intestinal (estrella).

En las figuras de la A – D se pueden apreciar fotografías de muestras de tejido de intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) con la descripción de las lesiones microscópicas encontradas.

6.1.2. Evaluación de láminas de histoquímica. La histoquímica realizada en este estudio fue con tinción Alcian Blue a un pH de 2.5. Se avaluó utilizando la cámara de microfotografía de alta resolución y el software ToupView (X64) adaptado a la cámara de 14 megapíxeles. Cabe mencionar que no se pudo llevar a cabo la evaluación morfométrica de las vellosidades de intestino delgado, porque los tejidos presentaron lesiones y alteraciones microscópicas, en las cuales se perdió la integridad de la superficie apical de los enterocitos e hizo muy difícil la medición del espesor de la capa de mucina intestinal.

Figura 11. Se presenta el resultado del conteo de células caliciformes en los diferentes tratamientos con tinción Alcian Blue



Fuente: la presente investigación-año 2022.

Se realizó el conteo de células caliciformes por campo en el microscopio con un objetivo de 40X, en la tabla 4 se menciona el número de células presentes por tratamiento.

Tabla 4. Conteo de células caliciformes por tratamiento

Tratamiento	Total células caliciformes
T 0	1261
T 1	1235
T 2	1641
T 3	2451
T 4	2369

Fuente: la presente investigación-año 2022.

Las células caliciformes se presentaron en mayor cantidad en los tratamientos 3 y 4 en comparación con el resto de los tratamientos, en donde disminuye casi a la mitad el número de dichas células (T0, T1 y T2).

Mejía, Molist y Pombal¹⁴⁴, señalan que las células caliciformes, son células epiteliales especializadas o glándulas unicelulares secretoras de mucus, presentes en los revestimientos epiteliales de las mucosas de las vías respiratorias y el aparato digestivo. Las células caliciformes también secretan proteínas antimicrobianas, quimiocinas y citocinas que demuestran funciones en la inmunidad innata, más allá del mantenimiento de una barrera.

Dao y Le¹⁴⁵, reportan que clínicamente las células caliciformes están asociadas con enfermedades respiratorias y a enfermedades inflamatorias del intestino. Las células caliciformes también pueden formar una línea de defensa en la mucosa intestinal y tienen una función secretora común. Estas células captan antígenos a través de agonistas colinérgicos, regulados por el receptor muscarínico 4. Qin *et al* citado por Salvo *et al*¹⁴⁶ mencionan que células caliciformes o células de Goblet con propiedades hidrófobas y tensoactivas, previenen la adhesión de las bacterias entéricas al epitelio intestinal.

¹⁴⁴ MEJÍA, M., MOLIST, P., y POMBAL M.A. Glándulas Unicelulares Intraepiteliales (En línea): En: Atlas de histología vegetal y animal. Tejidos animales. 2019 [Consultada: 16 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_glandular.php

¹⁴⁵ DAO, Phuong., y LE, Patrick. Histología, Células Caliciformes [en línea]. En: StatPearls. 2020 [Consultada: 16 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553208/#!po=84.4828>

¹⁴⁶ QIN, X., et al. Hydrophobicity of mucosal surface and its relationship to gut barrier function. 2008. Citado por SALVO, Eloisa., et al. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas [en línea]. En: Revista Española de Enfermedades Digestivas (España): 2015, Vol. 107, N° 11. [Consultada: 20 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: http://scielo.isciii.es/pdf/diges/v107n11/es_revision.pdf

Deplancke y Gaskins citados por Roldan¹⁴⁷, explican que existen diferentes tipos de glicoproteínas (neutras, ácidas sulfatadas y ácidas no sulfatadas) de acuerdo a su estructura química, las glicoproteínas ácidas protegen el epitelio intestinal contra la degradación por la acción de las glucosidasas, aumentan la resistencia del moco contra la acción de las bacterias evitando la translocación de estas mismas y pueden regular la transferencia de proteínas o fragmentos así como de iones y fluidos.

En un estudio realizado por Gámez, Zambrano y Fajardo¹⁴⁸ se encontró que las células caliciformes fueron marcadas con tinción alcian blue, sin embargo los animales que consumieron dietas con *Lactobacillus plantarum* no tuvieron un conteo significativo de dichas células, dado que se suministró a pollos Ross, diferentes dietas con y sin probiótico y las de mayor conteo de células caliciformes fueron aquellas que no contenían *L. plantarum*, estos resultados no se pudieron explicar de forma clara, dado que se esperaba que los tejidos de animales con administración de prebiótico obtuvieran mayores conteos.

En este estudio la tinción con Alcian Blue fue positiva en todos los tratamientos, en la figura 12 (A y B) se observa las células fuertemente coloreadas por el colorante Alcian Blue a un pH de 2,5 lo que evidencia que las células caliciformes contienen mucina acida,¹⁴⁹ esto reflejó el efecto del probiótico sobre el intestino delgado y que muy posiblemente la capa de moco pudo haber tenido varias funciones en el epitelio intestinal de los pollos, como lubricación, protección, defensa inmunológica, digestión y absorción, ya que Smith citado por Roldan¹⁵⁰, describen que la capa de moco intestinal puede conferir dichos beneficios.

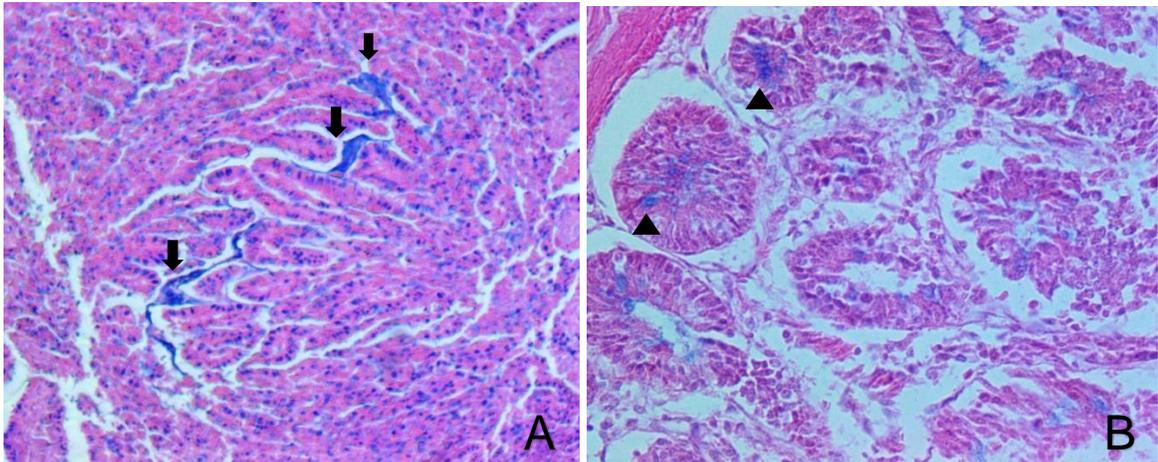
¹⁴⁷ DEPLANCKE, B., y GASKINS, H. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer, citado por ROLDAN, Jesús. Evaluación histomorfométrica e histoquímica del intestino anterior de alevinos de Tilapia Nilótica (*oreochromis niloticus*) suplementadas con aceites esenciales en el alimento. Perú: Universidad peruana Cayetano Heredia, 2020. p.9.

¹⁴⁸ JURADO, Henry., ZAMBRANO, Edward., y FAJARDO, Catalina. Adición de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado sobre parámetros intestinales, inmunes, productivos y bioquímica sanguínea en pollos [en línea]. en: Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. (Pasto): 2020. p. 10 [Consultada: 22 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/1502/1181>

¹⁴⁹ RUSSELL, Myers. Técnicas especiales de tinción para la evaluación de mucinas. [En línea]. en: Leicabiosystems (Alemania): 2019 [Consultada: 23 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.leicabiosystems.com/es/knowledge-pathway/special-stain-techniques-for-the-evaluation-of-mucins/>

¹⁵⁰ SMITH, L. Digestive functions in teleost fishes, citado por ROLDAN, Op. cit., p. 44.

Figura 12. Marcación positiva para la tinción diferencial alcian blue en células caliciformes



Fuente: la presente investigación-año 2022.

En la anterior figura se evidencia el Intestino delgado de pollo Ross, tinción Alcian Blue. 10X (A); 40X (B). Nótese marcación positiva para la tinción diferencial alcian blue en células caliciformes (cabeza de flecha) y el marcado aumento del grosor en la capa de mucina (flecha)

Sin embargo, los tratamientos 3 y 4 presentaron mayor conteo de células caliciformes y corresponden a los tratamientos que mostraron mayor severidad en las lesiones microscópicas, el mayor número de células caliciformes probablemente esté relacionado como un mecanismo compensatorio de protección frente a patógenos. Desafortunadamente el número de muestras es reducido y un cultivo microbiológico de patógenos hubiese permitido realizar la asociación entre las lesiones de los tratamientos (T0 al T4) y en el conteo de células caliciformes.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permiten sugerir que la administración de *Lactobacillus casei* a pollos Ross bajo las condiciones experimentales establecidas por Gámez y Zambrano¹⁵¹, provocaron leves, moderadas y severas enteritis necróticas (crónicas o agudas) mononucleares, algunos de estos tejidos con infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario y otros con hiperplasia de células caliciformes.

En la evaluación de los micropreparados de H/E, los tratamientos 3 y 4 correspondientes al suministro de *L. casei* en aspersion y *L. casei* microencapsulado respectivamente, presentaron el mayor número de lesiones microscópicas en los tres segmentos de intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon).

El análisis de las láminas de H/E en íleon evidenció distintos tipos de lesiones microscópicas y en diferentes grados de severidad, sin embargo, las lesiones de mayor presentación fueron moderada enteritis mononuclear, severa enteritis mononuclear con hiperplasia de células caliciformes y leve enteritis necrótica mononuclear.

Las láminas de H/E correspondientes a duodeno evidenciaron varias lesiones microscópicas, pero la alteración más representativa en este segmento fue leve enteritis necrótica mononuclear linfoplasmocitaria, seguida de severa enteritis necrótica mononuclear linfoplasmocitaria y moderada enteritis necrótica mononuclear.

Los resultados de la interpretación de las láminas de H/E indican que la lesión más representativa en yeyuno fue leve enteritis necrótica mononuclear, seguida de moderada enteritis mononuclear.

Los tratamientos 3 y 4 presentaron mayor conteo de células caliciformes y corresponden a los tratamientos que mostraron mayor severidad en las lesiones microscópicas, el mayor número de células caliciformes probablemente esté relacionado como un mecanismo compensatorio del tracto intestinal de protección ante patógenos.

¹⁵¹ GÁMEZ y ZAMBRANO, Op., cit., p. 1.

7.2 RECOMENDACIONES

La evidencia morfológica encontrada en este estudio propone reevaluar y ajustar el protocolo de administración del probiótico *L. casei* tanto en aspersión como en microencapsulación.

Se recomienda realizar la aspersión del probiótico *L. casei* al concentrado con mayor frecuencia, buscando obtener una mejor viabilidad del microorganismo.

Se sugiere realizar aislamientos de *Lactobacillus spp.*, de la flora intestinal residente normal o autóctona de pollo Ross a experimentar y no de cepas comerciales, con el fin de evitar interacciones entre ellas.

Se plantea realizar un análisis bioquímico con un kit de ELISA para medir interleucina B y así obtener un parámetro de respuesta inflamatoria entre los grupos del tratamiento.

Se propone realizar ensayos donde se haga un ajuste de dosis, frecuencia y vía de administración del probiótico *L. casei*, para evitar lesiones y alteraciones microscópicas del tracto gastrointestinal en pollo Ross.

Se sugiere correlacionar los hallazgos morfológicos de este estudio con los resultados de un cultivo microbiológicos para enterobacterias patógenas así como la medición de las unidades formadoras de colonias bacterianas.

BIBLIOGRAFÍA

ABAD, Rodrigo., et al. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones práctica [en línea] En: centro de biotecnología (Ecuador): 2017, p. 103 [Consultada: 29 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas

AITKEN, R. A Histochemical Study of the Stomach and Intestine of the Chicken, Citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 19.

ALKHALF, A., ALHAJ, M., y AL-HOMIDAN, I. Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens [en línea] en: Saudi J Biol Sci, 2010. Vol. 17, n° (3) [Consultada: 16 ene. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3730717/pdf/main.pdf>

APAJALAHTI, J., y KETTUNEN, A. Efecto de la dieta sobre la flora microbiana en el tracto gastrointestinal de aves [en línea]. En: Danisco Innovation. 2003, p. 43 [Consultada: 15 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/28179835_Efecto_de_la_dieta_sobre_la_flora_microbiana_en_el_tracto_gastrointestinal_de_aves

ARTISAN, T. Alcian Blue pH 2.5 [en línea] en: Dako, 2020 [consultada: 27 feb 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/127129001.PDF>

ASTAIZA, J. M., et al. Estandarización de la técnica de necropsia en cuyes (*cavia porcellus*) en el laboratorio de patología veterinaria de la Universidad de Nariño [en línea]. En: Revista de investigación pecuaria, 2013. Vol. 2. no. 2, p. 183 [Consultada: 12 abr. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://revistas.udenar.edu.co/index.php/revip/article/view/448>

AVIAGEN. America latina pollo de engorde. Pollo de engorde Ross 308 AP [en línea]. En: AVIAGEN. 2017. [Consultada: 24 mar. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Ross308AP-Broiler-PO-2017-ES.pdf

BAI, S., et al. Effects of diets supplemented with probiotics on growth performance and intestinal immune characteristics of chickens [en línea] en: Poultry Science (China): 2013. [Consultada: 26 nov. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0032579119395677?token=715971C1B B4B16F14C77ABB4E77095A2177CA2B72B59DFC9F32DDAF37E928DF3C2713 5CE03E908036AD977E2D6319FF6>

BEFUS, A., et al. Gut associated lymphoid tissue in the chicken. I Morphology, ontogeny and some functional characteristics of Peyer's patches, citado por GOMEZ, Gabriela et al. El sistema inmune digestivo en las aves [en línea]. En: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (México): 2010 [Consultada: 10 ago. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67413203003.pdf>

BESKI, S., y SARDARY, S. Effects of dietary supplementation of probiotic and synbiotic on broiler chickens hematology and intestinal integrity [en línea] en: Int J Poult Sci. 2015. Vol. 14, n° (1) [consultada: 12 ene. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/ijps/2015/31-36.pdf>

BEAUCHAMP, T., y CHILDRESS, J. Principles of Biomedical Ethics. Five Ed. USA: Oxford University Press inc, 2001.

BOLELI, I., MAIORKA, A., y MACARI, M. Estructura funcional do trato digestório, Citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 10.

BUTEL, M. Probiotics, gut microbiota and health [En línea] en: Médecine et Maladies Infectieuses, 2014. Vol. 44, n°1 [Consultada: 4 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X13003077>

CABALLERO, F., et al. The VSL#3-probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells [en línea] en: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol (Canada): 2007 [consultada: 2 dic. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajpgi.00265.2006>

CALNEK, B. Enfermedades de las aves. 2° ed. España: Manual Moderno, 2000. p. 268.

CAO, G., et al. Efectos de un probiótico, *Enterococcus faecium*, sobre el rendimiento del crecimiento, la morfología intestinal, la respuesta inmune y la microflora cecal en pollos de engorde desafiados con *Escherichia coli* K88 [en línea] en: ciencia avícola (China): 2013 [consultada: 12 dic. 2020]. Disponible en la dirección electrónica:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119384093?via%3Dihub>

CASTILLO, N., et al. Probiotics: An alternative strategy for combating salmonellosis Immune mechanisms involved [en línea] en: Food Research International (Argentina): 2012. N° 45. P. 834 [Consultada: 16 ene. 2021]. Disponible en la dirección electrónica:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996911002614>

CAYRA, Efraín., et al. Evaluación de la Estabilidad y Viabilidad de Dos Cepas Probióticas Microencapsuladas por Lecho Fluidizado [En línea] en: información tecnológica (Peru): 2020, Vol. 26 [consultada: 27 ago. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v28n6/art05.pdf>

CHAMPAGNE, C., y FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, citado por PEREZ, Heidi et al. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos [En línea] en: Revista ICIDCA (Cuba): 2013, vol. 47, núm. 1 [Consultada: 7 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223126409003.pdf>

CHAN, Yee, ESTAKI, Mehbrod y GIBSON, Deanna. Consecuencias clínicas de la disbiosis inducida por la dieta [en línea]. En: *Annales Nestlé* (Canada) 2013. N° 63 [Consultada: 21 jul. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <http://www.altmedrev.com/archive/publications/9/2/180.pdf?fbclid=IwAR0c7ODZObgDIUdl88NVx8TI2I9LOOUUiGU45uVLjQkQU7DR4lwL7Np2ZhU>

CORRIER, D., et al. Provision of lactose to molting hens enhances resistance to *salmonella enteritidis* colonization. *Journal of Food Protection*, 60(1), 10-15, citado por LONDERO, Alejandra. Alimentos funcionales: Obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kefir. Trabajo de grado para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas. Argentina: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), 2012.

COSKUN, S., ASLIM, B., y YUKSEKDAG, Z. Effect of two strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* on nitric oxide generation and antioxidant status of rat small intestine [en línea] en: *Med Chem Res*, 2010. Vol. 19, n° 9 [consultada: 13 dic. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/225769862_Effect_of_two_strains_of_Lactobacillus_delbrueckii_subsp_bulgaricus_on_nitric_oxide_generation_and_antioxidant_status_of_rat_small_intestine

DAO, Phuong., y LE, Patrick. Histología, Células Caliciformes [en línea]. En: *StatPearls*. 2020 [Consultada: 16 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553208/#!po=84.4828>

DEPLANCKE, B., y GASKINS, H. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer, citado por ROLDAN, Jesús. Evaluación histomorfométrica e histoquímica del intestino anterior de alevinos de *Tilapia Nilótica* (*oreochromis niloticus*) suplementadas con aceites esenciales en el alimento. Perú: Universidad peruana Cayetano Heredia, 2020. p.9.

DIAZ, Stefany. Manual de necropsia aviar (En línea). En: Slideshare. (Consultada: 20 feb. 2020). Disponible en la dirección electrónica: <https://es.slideshare.net/StefanyFierro1/manual-de-necropsia-aviar>

DIAZ, Elvis., IZASA, Jaime., y ANGEL, Daniela. Probióticos en la avicultura: una revisión. [En línea]. En: *Rev. Med. Vet. (Bogotá)*: 2017 [consultada: 16 feb.2020]. Disponible en la dirección electrónica: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n35/0122-9354-rmv-35-00175.pdf>

DIPLOK, A. Scientific concepts of functional food in Europe, Citado por CARRILLO, Raúl., y ACEVEDO, Bibiana. Simbióticos, prebióticos y probióticos en la práctica clínica [en línea]. En: *Revista Investigación Médica Sur México*. (Mexico): 2009 [Consultada: 16 feb. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2009/ms094b.pdf>

DUMONCEAUX, T., et al. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. Citado por ABAD, Rodrigo., et al. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones prácticas [en línea] En: *centro de biotecnología (Ecuador)*: 2017 Consultada: 29 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas

ECKMAN, M., y ELAM, T. Potential effects of the withdrawal of anticoccidials in Japan. Unpublished, citado por DOMINGUEZ, Ignacio. Influencia de la integridad intestinal sobre el rendimiento y rentabilidad aviares [en línea]. En: aviNews (Brasil): 2015, p. 1 [Consultada: 2 may. 2020]. Disponible la dirección electrónica: <https://avicultura.info/influencia-de-la-integridad-intestinal-sobre-el-rendimiento-y-rentabilidad-aviares/> p. 1.

ESTRADA, Mónica. Anatomía y fisiología aviar [en línea]. En: plataforma académica universidad de Antioquia (Medellín): 2011 [Consultada: 24 mar. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.academia.edu/33327975/ANATOMIA_Y_FISIOLOGIA_AVIAR_documento

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food 2002. [En línea]. En: FAO: 2002 [Consultada: 5 sep. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.sochipe.cl/Revista-Chilena-de-Pediatria-88-4-2017/files/assets/downloads/page0095.pdf>

FENAVI. El sector avícola en Colombia creció el 4.5% en 2018 [en línea]. En: FENAVI (Bogotá): 2018 [consultada: 20 feb. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://fenavi.org/comunicados-de-prensa/el-sector-avicola-crecio-45-en-2018/>

FRAPPIER, B. Digestive System, Citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 19.

FULLER, R. Probiotics in man and animals, citado por DIAZ, E., ISAZA, J., y ANGEL, D. Probióticos en la avicultura: una revisión. Bogotá, 2017. N° 35, p

GAGGÌA, F., MATTARELLI, P., y BIAVATI B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production, citado por DIAZ, E., ISAZA, J., y ANGEL, D. Probióticos en la avicultura: una revisión. Bogotá, 2017. N° 35.

GAMEZ, Henry., y ZAMBRANO, Johnny. Determinación *in vivo* del efecto probiótico de *Lactobacillus casei* microencapsulado, sobre morfología intestinal, respuesta inmunológica, parámetros bioquímicos y productivos, en pollo de engorde Ross. Pasto: UDENAR, 2019.

GÁMEZ, Henry., y ZAMBRANO, Edward. Adición de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado sobre parámetros intestinales, inmunes, productivos y bioquímica sanguínea en pollos [en línea]. En: biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, revista de la facultad de ciencias agrarias, universidad del Cauca (Pasto): 2020. p. 2. [Consultada: 10 ago. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612021000100217

GIBSON, K., OLIVIER, A., y MEYERHOLZ, D. Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research [en línea]. En: Veterinary Pathology (USA): 2013. 50(6) p. 1008 [Consultada: 30 abr. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985813485099>

GOMEZ, Gabriela., et al. El sistema inmune digestivo en las aves [en línea]. En: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (México): 2010, p. 9 [Consultada: 10 ago. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67413203003.pdf>

GLICK, B., et al. A scanning electron microscope study of Cecal Tonsil: The basic unit of the Cecal Tonsil, citado por GOMEZ, Gabriela, et al. El sistema inmune digestivo en las aves [en línea]. En: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (México): 2010 [Consultada: 10 ago. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67413203003.pdf>

GUARNER, F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad [en línea]. En: NutrHosp. (España): 2007, p. 1. [Consultada: 1 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v22s2/fisiologia2.pdf>

GUERINI, Julio., y SPITALE, Luis Santos. Lesión, adaptación y diferenciación celular [en línea]. En: Patología humana. 2014 [Consultada: 8 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: http://segundacatedradepatologia.webs.fcm.unc.edu.ar/files/2015/04/CAPITULO_2_-_2015.pdf

HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 9.

HUDA-FAUJAN, N., et al. The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects, citado por DIAZ, E., ISAZA, J., y ANGEL, D. Probióticos en la avicultura: una revisión. Bogotá, 2017. N° 35. p. 178.

JENSEN, Anders, y BJØRNVAD, Charlotte. Clinical effect of probiotics in prevention or treatment of gastrointestinal disease in dogs: A systematic review [en línea]. En: Journal of veterinary internal medicine (Dinamarca): 2019. p. 1862, 33 (5) [Consultada: 5 ago. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31313372/>

JEURISSEN, J., et al. Meckel's diverticle: a gut associated lymphoid organ in chickens, citado por GOMEZ, Gabriela, et al. El sistema inmune digestivo en las aves [en línea]. En: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (México): 2010 [Consultada: 10 ago. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67413203003.pdf>

JUBB, A., KENNEDY, D., y PALMER, J. Pathology of Domestic Animals, citado por MESIAS, Nathaly., y ORBES, Adriana. Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 y *Lactobacillus casei* ATCC® 334 con características probióticas en la alimentación de cuyes (*cavia porcellus*) en fase de levante como alternativa al uso de antibióticos. Pasto: Universidad de Nariño, 2016. p. 61.

JURADO, Henry., y ZAMBRANO, Edward. Efecto de *Lactobacillus casei* microencapsulado sobre la salud intestinal y parámetros bioquímicos y productivos en pollo de engorde [en línea] en: Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica (Pasto): 2020 [consultada: 3 sep. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/1480/1980#citations>

JURADO, Henry., ZAMBRANO, Edward., y FAJARDO, Catalina. Adición de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado sobre parámetros intestinales, inmunes, productivos y bioquímica sanguínea en pollos [en línea]. En: Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. (Pasto): 2020. p. 10 [Consultada: 22 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/1502/1181>

KLAENHAMMER, T., Y KULLEN, M. Selección y diseño de probióticos [en línea] en: Revista Internacional de Microbiología de Alimentos, 1999. Vol. 50, n°1 – 2 [consultada: 6 nov. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160599000768?via%3Dihub>

LEBER, B., et al. The influence of probiotic supplementation on gut permeability in patients with metabolic syndrome: an open label randomized pilot study [en línea]. En: European Journal of Clinical Nutrition (Austria): 2012. N° 66 [Consultada: 2 ago. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.nature.com/articles/ejcn2012103.pdf>

LESCHEID, David. Los probióticos como reguladores de la inflamación: Una revisión [en línea] en: Alimentos funcionales en salud y enfermedad (Alemania): 2014 [consultada: 17 nov. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.ffhdj.com/index.php/ffhd/article/view/2/4>

MANZANO, Claudia., ESTUPIÑAN, Claudia., y POVEDA, Elpidia. Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia [en línea]. En: revista chilena de nutrición. (Chile): 2012 [Consultada 20 feb. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182012000100010

MATSUZAKI, T., y CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic. *Immunol Cell Biol.* 2000; 78 (1):67-73, citado por DIAZ, E., ISAZA, J., y ANGEL, D. Probióticos en la avicultura: una revisión. Bogotá, 2017. N° 35. p. 178.

MATTE, Fabrizio. Influencia de la microflora sobre la salud intestinal de las aves [en línea]. En: (Brasil): 2019 [Consultada: 10 mar. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.vetanco.com/es/wp-content/uploads/sites/3/2017/10/INFLUENCIA-DE-LA-MICROFLORA-SOBRE-LA-SALUD-INTESTINAL-DE-LAS-AVES-1>

MEDINA, Maritza. Determinación de algunas características patológicas del complejo entérico porcino en cerdos de producción intensiva, C citado por MESIAS, Nathaly., y ORBES, Adriana. Evaluación *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 y *Lactobacillus casei* ATCC® 334 con características probióticas en la alimentación de cuyes (*cavia porcellus*) en fase de levante como alternativa al uso de antibióticos. Pasto: Universidad de Nariño, 2016.

MEJÍA, M., MOLIST, P., y POMBAL M.A. Glándulas Unicelulares Intraepiteliales (En línea): En: Atlas de histología vegetal y animal. Tejidos animales. 2019 [Consultada: 16 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: https://mmegias.webs.uvigo.es/guaida_a_glandular.php

MESIAS, Laura., y ORBES, Adriana. Evaluación *in vivo* de *lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 y *Lactobacillus casei* ATCC® 334 con características probióticas en la alimentación de cuyes (*cavia porcellus*) en la fase de levante como alternativa al uso de antibióticos. Pasto: Universidad de Nariño, 2016. p. 105.

MEUTEN, Donald Tumors in Domestic Animals. Fifth Edition. USA: Editorial Offices. 2017.

MILIÁN, Grethel. Empleo de probióticos basado en *Bacillus spp* de sus endosporas en la producción avícola [en línea]. En: Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe (España): 2008, p. 1. [Consultada: 14 mar. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <http://www.redalyc.org/pdf/1930/193015494001.pdf>

MOHAMED, M. *Lactobacillus* as a Probiotic Feed for Chickens. [En línea] en: International Journal of Poultry Science. India, 2009, vol. 8, n°8 [consultada: 25 oct. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/42972968_Lactobacillus_as_a_Probiotic_Feed_for_Chickens

MONTALVO, Cesar. Técnica histológica (en línea). En: UNAM: 2010 [Consultada: 17 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf

MOUNTZOURIS, K., et al. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition [en línea] en: Ciencia avícola (Austria): 2010, Vol. 89. N°1 [Consultada: 21 dic. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119424061>

NAKPHAICHIT, M., et al. The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. Citado por ABAD, Rodrigo, et al. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones práctica [en línea] En: centro de biotecnología (Ecuador): 2017 Consultada: 29 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Santiago, Chile. 2011. Octava edición.

PELICANO, E., et al. Productive traits of broiler chickens fed diets containing different growth promoters [en línea] en: Rev Bras Cienc Avi. 2004. Vol. 6, n° 3 [Consultada: 10 ene. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <http://www.scielo.br/pdf/rbca/v6n3/a08v6n3.pdf>

PER, Farup, et al. Probiotics, Symptoms, and Gut Microbiota: What Are the Relations? A Randomized Controlled Trial in Subjects with Irritable Bowel Syndrome [en línea]. En: Gastroenterol Res Pract (Noruega): 2012. p. 5. [Consultada: 29 jul. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415104/pdf/GRP2012-214102.pdf>

PÉREZ, José Luis. Etiología y patogenia general, citado por MESIAS, Nathaly., y ORBES, Adriana. Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 y *Lactobacillus casei* ATCC® 334 con características probióticas en la alimentación de cuyes (*cavia porcellus*) en fase de levante como alternativa al uso de antibióticos. Pasto: Universidad de Nariño, 2016. p. 111.

PÉREZ, Julián., y GARDEY, Ana. Definición de histología [En línea] en: definición.de. 2018 [consultada: 10 abri. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://definicion.de/histologia/>

PRETELL, Bertha. Necrosis [en línea]. En: SlideShare. 2010 [consultada: 8 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://es.slideshare.net/oscarjz/necrosis-4777532>

PICOT, A., y LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt, citado por PEREZ, Heidy et al. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos [En línea] en: Revista ICIDCA (Cuba): 2013, vol. 47, núm. 1 [Consultada: 7 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223126409003.pdf>

PULGARIN, Diana. Evaluación de parámetros productivos utilizando tres niveles crecientes de glicerol en dietas para pollos de engorde. Bogota: Universidad de Cundinamarca, 2015, p. 18.

QIN, X., et al. Hydrophobicity of mucosal surface and its relationship to gut barrier function. 2008. Citado por SALVO, Eloisa., et al. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas [en línea]. En: Revista Española de Enfermedades Digestivas (España): 2015, Vol. 107, N° 11. [Consultada: 20 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: http://scielo.isciii.es/pdf/diges/v107n11/es_revision.pdf

RAJPU, R., et al. Efecto de *Saccharomyces boulardii* y *Bacillus subtilis* B10 sobre la modulación de la ultra estructura intestinal y el mecanismo de desarrollo de inmunidad de la mucosa en pollos de engorde [en línea] en: ciencia avícola (China): 2013. Vol. 92, n° 4 [Consultada: 30 ene. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S003257911938678X?token=AB2376787705088CC7518BA7EA1BBD61D21508A2ECA3943578B57A33AE734E9C126C2C89E1AA25C018EDD1203C28640C>.

RAMÍREZ, C. Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. Trabajo de grado doctorado en Procesos Biotecnológicos. Brazil: Universidad Federal do Paraná, 2005.

REGULATION (EC) NO. 1831/2003. Oficial Journal of European Union, citado por DIAZ, E., ISAZA, J., y ANGEL, D. Probióticos en la avicultura: una revisión. Bogotá, 2017. N° 35, p. 175.

REPÚBLICA DE COLOMBIA MINISTERIO DE SALUD. Resolución nº 008430 (4 DE OCTUBRE DE 1993). Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Artículo 87. Santafé de Bogotá, D.C. 1993.

RODRIGUEZ, Javier. Integridad intestinal del pollo de engorde [en línea]. En: Montana. 2004 [Consultada: 17 may. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <http://bibliotecavirtual.corpmontana.com/bitstream/handle/123456789/2504/M000203.pdf?sequence=7&isAllowed=y>

ROSS 308 AP. América Latina pollo de engorde. Especificaciones de nutrición [en línea] en: Ross una marca aviagen, 2017 [Consultada: 19 mar. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: http://es.staging.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Ross-308AP-Broiler-Nutrition-Specs-2017-ES.pdf

RUEDA, Leidy. Acompañamiento técnico al laboratorio de Norgtech en la utilización de estabilizadores de pasaje digestivo en pollos de engorde. Bucaramanga: Universidad Francisco de Paula Santander, 2012.

RUSSELL, Myers. Técnicas especiales de tinción para la evaluación de mucinas. [En línea]. En: Leicabiosystems (Alemania): 2019 [Consultada: 23 oct. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.leicabiosystems.com/es/knowledge-pathway/special-stain-techniques-for-the-evaluation-of-mucins/>

SABIKHI, L., et al. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions, citado por PEREZ, Heidy et al. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos [En línea] en: Revista ICIDCA (Cuba): 2013, vol. 47, núm. 1 [Consultada: 7 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223126409003.pdf>

SAKI, A., et al. Effect of Mannanase on Broiler Performance, Ileal and In-vitro Protein Digestibility, citado por DOMINGUEZ, Ignacio. Influencia de la integridad intestinal sobre el rendimiento y rentabilidad aviares [en línea]. En: aviNews (Brasil): 2015, p. 4 [Consultada: 2 may. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://avicultura.info/influencia-de-la-integridad-intestinal-sobre-el-rendimiento-y-rentabilidad-aviares/>

SALANITRO, J., et al. Bacteria isolated from the duodenum, ileum, and cecum of young chicks. Citado por ABAD, Rodrigo et al. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones práctica [en línea] En: centro de biotecnología (Ecuador): 2017 Consultada: 29 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica:

https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas

SANTOS, Vidal. Tinción Hematoxilina-Eosina. Trabajo de fin de máster módulo de química orgánica. Barcelona, España. Julio, 2017. p.4

SCHREZENMEIR, J., y DE VRESE M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition [en línea]. *En: The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, p. 361 [consultada: 29 sep. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/361s/4737561>

SERVIANSKY, Tamar., et al. Utilidad de la tinción PAS para el diagnóstico histopatológico [en línea] en: *DermatologíaCMQ*, 2013. Vol. 11, n° (1) [consultada: 22 feb. 2021]. Disponible en la dirección electrónica: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2013/dcm131c.pdf>

STANLEY, D., et al. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens, Citado por ABAD, Rodrigo., et al. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones práctica [en línea] *En: centro de biotecnología (Ecuador): 2017* Consultada: 29 jul. 2020]. Disponible en la dirección electrónica:

https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas

TURK, D The Anatomy of the Avian Digestive Tract as Related to Feed Utilization. Citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 12.

VINDEROLA, CG., MEDICI, M., y PERDIGÓN G. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria [en línea]. *En: J Appl Microbiol*, 2004 [consultada: 12 oct. 2020]. Disponible en la dirección electrónica: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2004.02158.x>

ZANUZZI, C., y BARBEITO, C. Sistema Digestivo, citado por HERRERA, Juan., HUBERNAM, Yosef., y FELIPE, Antonio. Evaluación de la protección conferida por *Lactobacillus reuteri* como probiótico en pollos mediante histomorfometría intestinal. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario. Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 2018. p. 20.

ANEXOS

Anexo A. Distribución de lesiones microscópicas encontradas en duodeno, yeyuno e íleon de pollo Ross

TRATAMIENTO	ALTERACIÓN	DUODENO		YEYUNO		ÍLEON	
		FREC.	%	FREC.	%	FREC.	%
T0	No evaluada	0	0	1	16,67	2	33,33
	Aparentemente normal	6	100	5	83,33	4	66,67
T1	Aparentemente normal	6	100	6	100	6	100
T2	Aparentemente normal	5	83,33	2	33,33	5	83,33
	Leve enteritis crónica mononuclear	1	16,67	1	16,67	1	16,67
	Leve atrofia y fusión de vellosidades	0	0	3	50	0	0
T3	Aparentemente normal	1	16,67	1	16,67	1	16,67
	Leve enteritis necrótica mononuclear linfoplasmocitaria	3	50	0	0	0	0
	Leve enteritis mononuclear	1	16,67	1	16,67	1	16,67
	Moderada enteritis necrótica crónica mononuclear	1	16,67	1	16,67	1	16,67
	Moderada enteritis mononuclear con severa hiperplasia de células caliciformes	0	0	3	50	0	0
	Severa enteritis mononuclear con hiperplasia de células caliciformes severa con leve hiperplasia del epitelio	0	0	0	0	3	50
T4	Leve enteritis necrótica mononuclear linfoplasmocitaria con distribución difusa	3	50	3	50	0	0
	Severa enteritis necrótica mononuclear linfoplasmocitaria con distribución difusa	3	50	0	0	0	0
	Moderada enteritis mononuclear con distribución difusa	0	0	3	50	0	0
	Severa enteritis necrótica linfoplasmocitaria con distribución difusa	0	0	0	0	3	50
	Moderada enteritis mononuclear linfoplasmocitaria con distribución difusa	0	0	0	0	3	50

Anexo B. Atrofia y fusión de vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular

DUODENO - ATROFIA DE VELLOSIDADES										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	6	100	6	100	5	83,33	5	83,33	3	50
Leve	0	0	0	0	1	16,67	0	0	0	0
moderado	0	0	0	0	0	0	1	16,67	0	0
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	50

DUODENO - FUSIÓN DE VELLOSIDADES										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	6	100	6	100	5	83,33	5	83,33	3	50
Leve	0	0	0	0	1	16,67	0	0	0	0
moderado	0	0	0	0	0	0	1	16,67	0	0
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	50

YEYUNO - ATROFIA DE VELLOSIDADES										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	6	100	6	100	2	33,33	1	16,67	6	100
Leve	0	0	0	0	4	66,67	0	0	6	100
moderado	0	0	0	0	0	0	5	83,33	0	0
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

YEYUNO - FUSIÓN DE VELLOSIDADES										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
Sin alteraciones	6	100	6	100	2	33,33	1	16,67	6	100
Leve	0	0	0	0	4	66,67	0	0	6	100
moderado	0	0	0	0	0	0	5	83,33	0	0
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ÍLEON - ATROFIA DE VELLOSIDADES										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
Sin alteraciones	6	100	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Leve	0	0	0	0	1	16,67	0	0	0	0
moderado	0	0	0	0	0	0	5	83,33	3	50
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	50

ÍLEON - FUSIÓN DE VELLOSIDADES										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
Sin alteraciones	6	100	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Leve	0	0	0	0	1	16,67	0	0	0	0
moderado	0	0	0	0	0	0	5	83,33	3	50
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	50

**Anexo C. Hiperplasia de glándulas en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa
región glandular**

DUODENO										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	6	100	6	100	6	100	6	100	3	50
Leve	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
moderado	0	0	0	0	0	0	0	0	3	50
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

YEYUNO										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	5	83,33	6	100	6	100	6	100	3	50
Leve	1	16,67	0	0	0	0	0	0	3	50
moderado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ILEÓN										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	6	100	6	100	6	100	3	50	3	50
Leve	0	0	0	0	0	0	3	50	0	0
moderado	0	0	0	0	0	0	0	0	3	50
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo D. Cambios asociados a muerte celular: coagulación en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular

DUODENO - COAGULACIÓN										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
No evaluado	1	16,67	0	0	0	0	0	0	0	0
Sin alteraciones	5	83,33	6	100	5	83,33	5	83,33	0	0
Leve	0	0	0	0	1	16,67	0	0	3	50
moderado	0	0	0	0	0	0	1	16,67	3	50
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

YEYUNO - COAGULACIÓN										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	6	100	6	100	5	83,33	5	83,33	3	50
Leve	0	0	0	0	1	16,67	0	0	3	50
moderado	0	0	0	0	0	0	1	16,67	0	0
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ÍLEON - COAGULACIÓN										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	6	100	6	100	5	83,33	5	83,33	3	50
Leve	0	0	0	0	1	16,67	0	0	0	0
moderado	0	0	0	0	0	0	1	16,67	0	0
severa	0	0	0	0	0	0	0	0	3	50

**Anexo E. Cambios inflamatorios en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa
región glandular**

DUODENO - INFILTRADO INFLAMATORIO										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	6	100	6	100	5	83,33	5	83,33	0	0
Mononuclear	0	0	0	0	1	16,67	1	16,67	6	100

DUODENO - TIPO DE CELULARIDAD										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
No evaluado	2	33,33	0	0	0	0	0	0	0	0
sin alteraciones	4	66,67	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
linfocitos, macrófagos, plasmáticas	0	0	0	0	1	16,67	2	33,33	6	100
linfocitos, plasmáticas	0	0	0	0	0	0	3	50	0	0

DUODENO - GRADO DE SEVERIDAD										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
No evaluado	2	33,33	0	0	0	0	0	0	0	0
Sin alteraciones	4	66,67	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Leve	0	0	0	0	1	16,67	4	66,67	3	50
moderado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
severa	0	0	0	0	0	0	1	16,67	3	50

DUODENO - PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
No evaluado	2	33,33	0	0	0	0	0	0	0	0
Sin alteraciones	4	66,67	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Difuso	0	0	0	0	1	16,67	5	83,33	6	100

YEYUNO - INFILTRADO INFLAMATORIO										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
Sin alteraciones	6	100	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Mononuclear	0	0	0	0	1	16,67	5	83,33	6	100

YEYUNO - TIPO DE CELULARIDAD										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
No evaluado	2	33,33	0	0	0	0	0	0	0	0
sin alteraciones	4	66,67	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
linfocitos, macrófagos, plasmáticas	0	0	0	0	1	16,67	5	83,33	6	100

YEYUNO - GRADO DE SEVERIDAD										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
No evaluado	2	33,33	0	0	0	0	0	0	0	0
Sin alteraciones	4	66,67	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Leve	0	0	0	0	1	16,67	1	16,67	3	50
moderado	0	0	0	0	0	0	3	50	3	50
severa	0	0	0	0	0	0	1	16,67	0	0

YEYUNO - PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
No evaluado	2	33,33	0	0	0	0	0	0	0	0
Sin alteraciones	4	66,67	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Difuso	0	0	0	0	1	16,67	5	83,33	6	100

ÍLEON - INFILTRADO INFLAMATORIO										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
Sin alteraciones	6	100	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Mononuclear	0	0	0	0	1	16,67	5	83,33	6	100

ÍLEON - TIPO DE CELULARIDAD										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
sin alteraciones	6	100	6	100	5	83,33	5	83,33	0	0
linfocitos, macrófagos, plasmáticas	0	0	0	0	1	16,67	1	16,67	6	100

ÍLEON - GRADO DE SEVERIDAD										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
No evaluado	1	16,67	0	0	0	0	0	0	0	0
Sin alteraciones	5	83,33	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Leve	0	0	0	0	1	16,67	1	16,67	0	0
moderado	0	0	0	0	0	0	0	0	3	50
severa	0	0	0	0	0	0	4	66,67	3	50

ÍLEON – PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
No evaluado	1	16,67	0	0	0	0	0	0	0	0
Sin alteraciones	5	83,33	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Difuso	0	0	0	0	1	16,67	5	83,33	6	100

Anexo F. Estrato afectado en duodeno, yeyuno e íleon en mucosa región glandular

ESTRATO AFECTADO: SUPERFICIE APICAL DE DUODENO										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	4	66,67	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Con alteraciones	0	0	0	0	1	16,67	5	83,33	6	100
No evaluado	2	33,33	0	0	0	0	0	0	0	0

ESTRATO AFECTADO: REGIÓN MEDIA DEL DUODENO										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	4	66,67	6	100	6	100	3	50	3	50
Con alteraciones	0	0	0	0	0	0	3	50	3	50
No evaluado	2	33,33	0	0	0	0	0	0	0	0

ESTRATO AFECTADO: SUPERFICIE APICAL DE YEYUNO										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	4	66,67	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Con alteraciones	0	0	0	0	1	16,67	5	83,33	3	50
No evaluado	2	33,33	0	0	0	0	0	0	3	50

ESTRATO AFECTADO: REGION MEDIA DE MUCOSA DE YEYUNO										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	4	66,67	6	100	6	100	3	50	0	0
Con alteraciones	0	0	0	0	0	0	3	50	3	50
No evaluado	2	33,33	0	0	0	0	0	0	3	50

ESTRATO AFECTADO: SUPERFICIE APICAL DE ÍLEON										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	5	83,33	6	100	5	83,33	1	16,67	0	0
Con alteraciones	0	0	0	0	1	16,67	5	83,33	6	100
No evaluado	1	16,67	0	0	0	0	0	0	0	0

ESTRATO AFECTADO: REGION MEDIA DE MUCOSA DE ÍLEON										
TIPO	T0		T1		T2		T3		T4	
	Frec.	%								
Sin alteraciones	5	83,33	6	100	6	100	3	50	0	0
Con alteraciones	0	0	0	0	0	0	3	50	6	100
No evaluado	1	16,67	0	0	0	0	0	0	0	0