



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS EN CABRITOS  
SUPLEMENTADOS CON LA LEVADURA PROBIÓTICA  
*Debaryomyces hansenii* CBS 8339

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Agricultura Sustentable )

P r e s e n t a

**Dante Gijon Díaz**

La Paz, Baja California Sur, agosto de 2024.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 08 del Mes de julio del 2024, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Estudios inmunológicos en cabritos suplementados con la levadura probiótica *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 "**

Presentada por el alumno:

**Dante Gijon Díaz**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Agricultura sustentable**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Director /Co-Director de Tesis



Dra. Miriam Goretty Angulo Villavicencio  
Directora/Co-Directora de Tesis



Dr. José Alfredo Guevara Franco  
Co-Tutor



Dra. Alejandra Nieto Garibay,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos.



La Paz, Baja California Sur, a 08 de julio de 24

Los miembros del comité de tesis del estudiante Dante Gijon Díaz del Programa de Maestría en Ciencias en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Agricultura Sustentable ) revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:  
iThenticate
- Filtros utilizados:  
Excluir citas y bibliografías  
Excluir las coincidencias inferiores a 12 palabras
- Porcentajes de similitud:  
Máximo 20% para tesis Posgrado  
Se muestra captura de pantalla

**Informe antiplagio Tesis Gijon Díaz Dante**

ORIGINALITY REPORT

**12%**

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	<a href="http://cibnor.repositorioinstitucional.mx">cibnor.repositorioinstitucional.mx</a> <small>Internet</small>	1048 words — 9%
2	<a href="http://eprints.uanl.mx">eprints.uanl.mx</a> <small>Internet</small>	53 words — < 1%
3	<a href="http://www.austral.edu.ar">www.austral.edu.ar</a> <small>Internet</small>	41 words — < 1%
4	<a href="http://ri-ng.uaq.mx">ri-ng.uaq.mx</a> <small>Internet</small>	30 words — < 1%
5	<a href="http://www.microbiosymas.com">www.microbiosymas.com</a> <small>Internet</small>	25 words — < 1%
6	<a href="http://ciad.repositorioinstitucional.mx">ciad.repositorioinstitucional.mx</a> <small>Internet</small>	24 words — < 1%
7	<a href="http://dspace.cibnor.mx:8080">dspace.cibnor.mx:8080</a> <small>Internet</small>	24 words — < 1%
8	<a href="http://buleria.unileon.es">buleria.unileon.es</a> <small>Internet</small>	19 words — < 1%
9	<a href="http://www.teses.usp.br">www.teses.usp.br</a> <small>Internet</small>	17 words — < 1%
10	<a href="http://repositoriouba.sisbi.uba.ar">repositoriouba.sisbi.uba.ar</a> <small>Internet</small>	

**Firmas del Comité**

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dra. Miriam Goretty Angulo Villavicencio

Dr. José Alfredo Guevara Franco

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Director de Tesis

Dra. Miriam Goretty Angulo Villavicencio  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dr. José Alfredo Guevara Franco  
Universidad Autónoma de Baja California Sur  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Dra. Miriam Goretty Angulo Villavicencio  
Dr. José Alfredo Guevara Franco

### **Jurado de Examen**

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Dra. Miriam Goretty Angulo Villavicencio  
Dr. José Alfredo Guevara Franco

### **Suplente**

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

## Resumen

La diarrea inducida por *Escherichia coli* es una de las principales afecciones en cabritos destetados, provocando del 15 al 40% de mortalidad y pérdidas económicas. Los tratamientos empleados es la aplicación de antibióticos, sin embargo *E. coli* ha generado una rápida resistencia a los antibióticos por su uso desmedido. Una de las alternativas para combatir esta afección es el uso de probióticos, como la levadura *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 que ha demostrado la capacidad de modular el sistema inmune e inducir protección contra infecciones en animales. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la inclusión de *D. hansenii* en la dieta sobre la respuesta inmune y protección contra la infección *ex vivo* por *E. coli* 25 en cabritos al destete. Primeramente, la levadura *D. hansenii* se cultivó en medio YPD suplementada con 1  $\mu$ L/mL de cloranfenicol (50mg/mL) a 30 °C en agitación constante (120 rpm) de 24 a 48 h. Posteriormente, la biomasa fue obtenida mediante centrifugación (5000 rpm, 4 °C, 15 min) e incorporada en la dieta (0.3%) y ofrecida diariamente a cabritos Sannen  $\times$  Nubia destetados durante 14 días. Muestras de sangre periférica y heces de los cabritos en experimentación se obtuvieron el primer y decimocuarto día del tratamiento. Finalmente, se analizaron parámetros inmunológicos en leucocitos de sangre periférica como la actividad fagocítica, explosión respiratoria, óxido nítrico, actividad mieloperoxidasa, evaluación de genes relacionados al sistema inmune y producción de anticuerpos IgA totales en heces de cabritos. La producción de anticuerpos aumentó ( $p < 0.05$ ) en el grupo suplementado con *D. hansenii* en el primer y segundo muestreo comparado con el control. La suplementación con la levadura *D. hansenii* estimuló la sobreexpresión ( $p < 0.05$ ) de los genes receptores *TLR2* y *TLR6*, moduladores *SYK* y *RAF1* y factor de transcripción *AP1* al decimocuarto día del experimento. La viabilidad no mostró evidencia de inmunoprotección en leucocitos de cabritos suplementados con *D. hansenii* antes y después de un reto con *E. coli* 25. En conclusión, la suplementación con *D. hansenii* incrementó la producción total de IgA y la expresión de los genes relacionados al sistema inmune en leucocitos de sangre periférica de cabritos, sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que el uso de *D. hansenii* CBS 8339 no es la mejor opción para la suplementación en cabritos en esta etapa productiva.

**Palabras clave:** Inmunoestimulante; patógenos; salud animal.

ORCID:0009-0001-8351-5493.

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez



Dra. Miriam Goretty Angulo Villavicencio

## Summary

Diarrhea induced by *Escherichia coli* is one of the main diseases in weaned kids, causing 15 to 40% mortality and economic losses. The treatments used are the application of antibiotics; however, *E. coli* has generated a rapid resistance to antibiotics due to their excessive use. One of the alternatives to combat this condition is probiotics, such as the yeast *Debaryomyces hansenii* CBS 8339, which has demonstrated the ability to modulate the immune system and induce protection against animal infections. Therefore, this work aimed to evaluate the inclusion of *D. hansenii* in the diet on the immune response and protection against ex vivo *E. coli* 25 infection in weaned kids. First, *D. hansenii* yeast was cultured in a YPD medium supplemented with 1  $\mu$ L/mL of chloramphenicol (50mg/mL) at 30 °C under constant agitation (120 rpm) from 24 to 48 h. Subsequently, the biomass was obtained by centrifugation (5000 rpm, 4 °C, 15 min), incorporated into the diet (0.3%), and offered daily to weaned Sannen  $\times$  Nubia goats for 14 days. Samples of peripheral blood and feces of the experimental kids were obtained on the first and fourteenth day of treatment. Finally, immunological parameters were analyzed in peripheral blood leukocytes such as phagocytic activity, respiratory burst, nitric oxide, myeloperoxidase activity, evaluation of immune-related genes, and total IgA antibody production in kid feces. Antibody production increased ( $p < 0.05$ ) in the group supplemented with *D. hansenii* in the first and second sampling compared to the control. Supplementation with *D. hansenii* yeast stimulated overexpression ( $p < 0.05$ ) of *TLR2* and *TLR6* receptor genes, *SYK* and *RAF1* modulators, and *AP1* transcription factor on the 14th day of the experiment. Viability showed no evidence of immunoprotection in leukocytes from goat kids supplemented with *D. hansenii* before and after the challenge with *E. coli* 25. In conclusion, supplementation with *D. hansenii* increased total IgA production and the expression of immune system-related genes in goat peripheral blood leukocytes, however, the results obtained in this research showed that the use of *D. hansenii* CBS 8339 is not the best option for supplementation in goats at this productive stage.

**Keywords:** Immunostimulant; pathogens; animal health.  
ORCID:0009-0001-8351-5493.

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez



Dra. Miriam Goretty Angulo Villavicencio

## Dedicatoria

*Para mi archi, por siempre ser el primero en creer en mí, un saludo hasta arriba.*

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo otorgado mediante la beca con el número 829301 para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) por permitirme realizar mis estudios de maestría, así como las facilidades brindadas por el personal que conforma esta gran institución para la obtención del grado académico como Maestro en Ciencias.

A la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por todas las facilidades brindadas, por el tiempo y dedicación hacia nosotros, procurando que tuviéramos una experiencia grata y amena dentro de estos dos años; así como al personal que lo conforman, quienes siempre estuvieron con la mayor disposición para solucionar los problemas que se llegaron a presentar. ¡Gracias!

A los proyectos de CONACYT INFR-2014-01/225924 y PDCPN2014-01/248033, los cuales financiaron este estudio, haciendo posible la obtención de los datos dentro de este proyecto de investigación.

Al Dr. Carlos Angulo, por brindarme su apoyo contante durante toda mi maestría, por la paciencia de explicarme, así como el buscar soluciones a los obstáculos dentro de esta investigación; todas sus enseñanzas, las cuales me permitieron crecer académicamente y, sobre todo, el siempre tener las puertas abiertas dentro del grupo de trabajo.

A la Dra. Miriam Angulo, por todo su apoyo durante mi trabajo experimental, por ayudarme en todo momento tanto dentro como fuera del laboratorio, guiarme, mostrarme un nuevo panorama dentro de la investigación y motivarme para seguir superándome, la paciencia de entrenarme en diferentes técnicas y estar dispuesta a resolver las dudas que se generaron durante este trayecto.



Al Dr. José Alfredo Guevara, quien siempre estuvo con la mayor disposición y apoyo durante los experimentos, así como brindarme todas las facilidades para realizar esta investigación y aconsejarme sobre las dudas dentro de este trabajo experimental.

A la Dra. Martha Reyes, por todo su apoyo en las diferentes técnicas utilizadas para obtener los resultados en este trabajo, así como ser la persona quien me abrió las puertas al mundo de la investigación y motivarme constantemente para superar los obstáculos que se presentaron.

A la Universidad Autónoma de Baja California Sur y al Departamento Académico de Ciencia Animal y Conservación del Hábitat por todas las facilidades dentro de sus instalaciones para los experimentos dentro de la unidad de Ovinos y Caprinos de la Posta zootécnica, así mismo a las personas quienes me ayudaron dentro de este proyecto, al Dr. Emanuel Junco, quien estuvo conmigo desde el inicio hasta final del experimento, asesorándome en el manejo de los cabritos así como buscando diferentes alternativas para desarrollar un trabajo de calidad con resultados relevantes; al Dr. José Ángel Armenta, quien siempre me apoyo durante el trabajo de nutrición animal, dándome consejos para el manejo del alimento y su cuidado, muchas gracias por siempre motivarme a seguir estudiando y brindándome todas las facilidades dentro y fuera de su laboratorio, de igual manera a la pMVZ. Guadalupe de J. Miranda Lara, pIPA. Jesús Alessa Rodríguez Mendoza, pIPA. José Manuel Burquez Geraldo y pIPA. Karla Michelle Romero Domínguez, quienes estuvieron conmigo apoyándome en los muestreos y manejo de los cabritos desde su nacimiento hasta el final del experimento. Muchísimas gracias por todo su apoyo; sin ustedes no se habrían conseguido los resultados de este experimento.

A los integrantes del grupo de inmunología y vacunología, quienes siempre me han apoyado dentro del laboratorio, motivarme y hacer un lugar ameno para trabajar; al Dr. Carlos, Dra. Martha, Dra. Eli, Dra. Miriam, Dr. Abel, Dr. Asdrúbal, MC. Kevyn, Marian, Fer, Marcio, Hassian, Mariel, Gaby, Sandra, Ale, Víctor y Cristian.

Al PACE por permitirme realizar esta labor tan grande como la difusión de la ciencia y mostrarme el gran impacto que genera dentro de las personas, tanto niños como adultos, así como a la Dra. Martha Reyes, Aline Ambriz Miranda y Sergio Valle Ceseña, por todo su apoyo durante mi

participación dentro de las diferentes actividades de esta noble labor de mostrar la ciencia e inspirar a las personas.

A mis amigos de la maestría, a quienes no me alcanzan las palabras para agradecerles todo el apoyo que me brindaron en estos dos años, por hacer más ameno todo este trayecto y hacerlo más pasajero y motivarme a seguir cuando más lo necesitaba; Josh, Nattut, Jairutt, Lau, Eduardo "Pollo", Cindy, María, Andy, Jesús, Eloy y Levi, así como a mi novia Marian, que sin su apoyo en los momentos más difíciles y alentarme a seguir incluso en los tiempos más complicados, ¡muchas gracias por todo!

A mis amigos Merlín, Daniel Contreras y Daniel Cevallos, quienes estuvieron siempre motivándome para obtener este logro; a Mimi, Iván, Esteban, Nacho, por estar presente y siempre motivarme a seguir adelante; Kath, Lili, Fer, Odette y Carlos, por siempre motivarme a seguir adelante, a Mane, que aun estando lejos seguimos apoyándonos para superarnos, a Brianda por la gran amistad y el apoyo dentro de momentos difíciles, brindar palabras de motivación y cuando estas fueron necesarias, así como a Perla Ginera, por todo el apoyo y la motivación que brindo para seguir superándome tanto académicamente como personalmente.

A mí Sensei Alberto y la Sensei Patricia, quienes me enseñaron a trabajar duro y prepararme para afrontar los obstáculos que pudiera aparecer durante mi camino, siempre estaré agradecido, ¡Osss!

Y un gran agradecimiento a mi familia, a mi madre y mi hermano por todo el apoyo que me brindaron desde el primer día, creer y alentarme a seguir creciendo, ser un pilar fundamental en mi vida, motivarme para obtener lo que fijo como una meta y sobre todo estar presente durante los momentos felices como en los difíciles. ¡Gracias por todo!

Un especial agradecimiento a mi padre, quien fue uno de los pilares para poder concretar todo esto, ser el primero en impulsarme a seguir adelante, así como inspirarme a siempre seguir luchando por todo, sé que estás conmigo en cualquier paso que doy, acompañándome, así como guiándome; un saludo hasta arriba, papá; esto es por ti y para ti.

## Contenido

Resumen.....	i
Summary.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xii
Abreviaturas.....	xiii
<b>1.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Problemática de la colibacilosis en cabritos al destete .....	1
1.2 Agente etiológico y transmisión.....	1
1.3 Transmisión.....	1
1.4 Signos clínicos .....	2
1.5 Patogénesis.....	2
1.6 Respuestas inmunes.....	3
1.7 Tratamientos.....	3
1.8 Zoonosis .....	4
1.9 Alternativas para la prevención de la colibacilosis en cabritos en etapas pre- y post-destete.....	4
1.9.1 Manejo preventivo e instalaciones adecuadas .....	4
1.9.2 Vacunas.....	4
1.9.3 Plantas medicinales.....	5
1.9.4 Prebióticos.....	5
1.9.5 Simbióticos .....	6
1.9.6 Probióticos.....	6
1.10 Levaduras como alternativa para prevenir la colibacilosis en cabritos .....	6
<b>2.ANTECEDENTES.....</b>	<b>8</b>
2.1 <i>Debaryomyces hansenii</i> como levadura probiótica cabritos.....	8
2.1.1 Estudios inmunológicos .....	8
2.1.2 Funciones probióticas.....	9
2.1.3 Uso de levaduras en la producción de cabritos.....	9
<b>3.JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>4.HIPÓTESIS.....</b>	<b>12</b>
<b>5.OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos particulares.....	13
<b>6.MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
6.1 Animales y alojamiento:.....	14
6.2 Cultivo de <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS 8339 .....	14
6.3 Dietas .....	14
6.3.1 Balanceo.....	14
6.4 Diseño del experimento .....	15
6.5 Extracción de leucocitos de sangre periférica de cabritos.....	15
6.6 Reto de leucocitos de cabritos con <i>Escherichia coli</i> .....	16
6.7 Viabilidad de leucocitos retados con <i>Escherichia coli</i> .....	16
6.8 Parámetros inmunológicos.....	16
6.8.1 Fagocitosis .....	16
6.8.2 Explosión respiratoria.....	17

6.8.3 Óxido nítrico .....	17
6.8.4 Mieloperoxidasa.....	18
6.8.5 Inmunoglobulinas A totales.....	18
6.8.6 Expresión de genes asociados a la respuesta inmune:.....	18
6.9 Análisis estadístico.....	21
<b>7.RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
7.1 Parámetro inmunológicos .....	22
7.1.1 Fagocitosis .....	22
7.1.2 Explosión respiratoria.....	23
7.1.3 Óxido nítrico .....	24
7.1.4 Mieloperoxidasa.....	25
7.1.5 inmunoglobulinas A totales.....	26
7.1.6 Expresión de genes asociados a la respuesta inmune.....	27
7.2 Viabilidad celular .....	33
<b>8.DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>9.CONCLUSIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>10.LITERATURA CITADA</b> .....	<b>40</b>

## Lista de figuras

- Figura 1.** Actividad fagocítica de leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) Fagocitosis de leucocitos retados con *E. coli* a la primera semana. b) Fagocitosis de leucocitos retados con *E. coli* a la segunda semana. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 22
- Figura 2.** Explosión respiratoria en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) Explosión respiratoria en leucocitos retados con *E. coli* a la primera semana. b) Explosión respiratoria en leucocitos retados con *E. coli* a la segunda semana. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 23
- Figura 3.** Concentración de nitritos como metabolito estable de la producción de óxido nítrico en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) Concentración de nitritos en leucocitos retados con *E. coli* a la primera semana. b) Concentración de nitritos en leucocitos retados con *E. coli* a la segunda semana. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 24
- Figura 4.** Actividad mieloperoxidasa (MPO) en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) MPO en leucocitos retados con *E. coli* a la primera semana. b) Concentración de nitritos en leucocitos retados con *E. coli* a la segunda semana. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 25
- Figura 5.** IgA total en heces de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) IgA total a la primera semana, los \*\*\*\* denotan significancia ( $p < 0.0001$ ) entre *Dh* y control. b) IgA total a la segunda semana, el \* indican significancia ( $p = 0.0152$ ) entre *Dh* y control. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 26
- Figura 6.** Expresión relativa del gen receptor de *TLR2* en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *TLR2* en la primera semana, \*\*\*\* representa significativo ( $p < 0,0001$ ) entre control y *Dh* + reto. b) Expresión relativa de *TLR2* en la segunda semana, los \*\*\* indican significancia ( $p = 0,0008$ ) entre control y *D. hansenii*, los \*\* representan significancia ( $p = 0,0083$ ) entre control + desafío y *Dh* + reto. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 27
- Figura 7.** Expresión relativa del gen receptor de *TLR4* en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *TLR4* en el primer muestreo, los \*\*\* muestran significancia ( $p = 0,0003$ ) entre control + desafío y *Dh* + reto. b) Expresión relativa de *TLR4* en el segundo muestreo, el \* representa significancia ( $p = 0,0137$ ) entre control + desafío y *Dh* + reto. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 28
- Figura 8.** Expresión relativa del gen receptor de *TLR6* en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E.*

*coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *TLR6* en el primer muestreo, \*\*\*\* muestra significancia ( $p < 0,0001$ ) entre control + desafío y *Dh* + reto. b) Expresión relativa de *TLR6* en el segundo muestreo, los \*\*\*\* representan diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre el control y *Dh*, los \*\* muestran significancia ( $p = 0,0028$ ) entre control + reto y *Dh* + desafío. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 29

**Figura 9.** Expresión relativa del gen receptor a *SYK* en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n= 10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *SYK* en el primer muestreo, \*\*\*\* denotando diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre control + reto y *Dh* + reto. b) Expresión relativa de *SYK* en el segundo muestreo, los \*\*\*\* muestran significativos ( $p < 0,0001$ ) entre el control y *Dh*. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 30

**Figura 10.** Expresión relativa del gen receptor a *RAF1* en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n= 10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *RAF1* en el primer muestreo, los \*\* representa diferencias significativas ( $p = 0,0012$ ) entre control + reto y *Dh* + reto. b) Expresión relativa de *RAF-1* en el segundo muestreo, los \*\*\* representan diferencias significativas ( $p = 0,0003$ ) entre el control y *Dh*, los \*\* muestran diferencias significativas ( $p = 0,0054$ ) entre control + reto y *Dh* + reto. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 31

**Figura 11.** Expresión relativa del gen receptor a *AP1* en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n= 10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *AP1* en el primer muestreo, \*\*\* denotan diferencias significativas ( $p = 0,0009$ ) entre control + reto y *Dh* + reto. b) Expresión relativa de *AP1* en el segundo muestreo, los \*\*\*\* representan diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre el control y *Dh*. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 32

**Figura 12.** Expresión relativa del gen receptor a *IL-1 $\beta$*  en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n= 10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *IL-1 $\beta$*  en el primer muestreo, \*\*\*\* denota significativo ( $p < 0,0001$ ) entre control + reto y *Dh* + reto. b) Expresión relativa de *IL1- $\beta$*  en el segundo muestreo, los \*\* \*\* demuestran diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre control + reto y *Dh* + reto. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. .... 33

**Figura 13.** Viabilidad de leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) Viabilidad de leucocitos retados con

*E. coli* a la primera semana. b) viabilidad de leucocitos retados con *E. coli* a la segunda semana. DMSO fue utilizado como control negativo. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. ....34

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Formulación de dieta control y tratamiento con levadura (0.3% de <i>D. hansenii</i> ) en cabritos.....	15
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de primers utilizadas en el experimento. ....	20



## Abreviaturas

<b>ACK:</b>	Ammonium-Chloride-Potassium (Amonio-Cloruro-Potasio).
<b>ADN:</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ADNc:</b>	Ácido desoxiribonucleico complementario.
<b>ADNsa:</b>	Desoxirribonucleasa.
<b>AP1:</b>	<i>Activator protein 1</i> (Proetína activadora 1).
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico.
<b>DAEC:</b>	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa.
<b>DMSO:</b>	<i>Dimethyl Sulfoxide</i> (Dimetilsulfóxido).
<b>EAEC:</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.
<b>EHEC:</b>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.
<b>EIEC:</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva.
<b>ELISA:</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
<b>EPEC:</b>	<i>Escherichia coli</i> enteropatogenica.
<b>ETEC:</b>	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica.
<b>IFN:</b>	<i>Interferon</i> .
<b>IFN-<math>\alpha</math>:</b>	<i>Interferon alfa</i> .
<b>IgA:</b>	Inmunoglobulinas A.
<b>IgM:</b>	Inmunoglobulinas M.
<b>IL-12:</b>	<i>Interlucina doce</i> .
<b>LPS:</b>	<i>Lipopolisacárido</i> .
<b>MPO:</b>	Mieloperoxidasa.
<b>MYD88:</b>	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i> (Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88).
<b>NBT:</b>	<i>Nitro blue tetrazolium</i> (nitroazul de tetrazolio).
<b>NOM:</b>	Norma oficial mexicana.
<b>NRC:</b>	National Research Council.
<b>ON:</b>	Óxido nítrico.
<b>PAMPs:</b>	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Patrones moleculares asociados a patógenos).
<b>PBS:</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> (Buffer fosfato salino).
<b>PBS-T:</b>	<i>Phosphate buffered saline with Tween</i> (Buffer fosfato salino con Tween).
<b>PCR:</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa).
<b>PRR:</b>	<i>Pattern recognition receptors</i> (Receptores de reconocimiento de patrones).
<b>RAF1:</b>	<i>Serine/threonine kinase</i> (serina/treonina cinasa).
<b>RPMI:</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> .
<b>STEC:</b>	<i>Escherichia coli</i> toxina semejante a Shiga.
<b>SYK:</b>	<i>Spleen associated tyrosine kinase</i> (Tirosina cinasa asociada al bazo).
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	<i>Transforming growth factor beta</i> (Factor de crecimiento transformante beta).
<b>TLR:</b>	<i>Toll-like receptors</i> (Receptores tipo toll).
<b>TLR2:</b>	<i>Toll-like receptors 2</i> (Receptores tipo toll 2).
<b>TLR4:</b>	<i>Toll-like receptors 4</i> (Receptores tipo toll 4).
<b>TLR6:</b>	<i>Toll-like receptors 6</i> (Receptores tipo toll 6).
<b>Tm:</b>	Melting temperature (Temperatura de fusión).

- TMB:** 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (3.3',5.5'tetrametilbencidina).
- TNF:** *Tumor necrosis factor* (Factor de necrosis tumoral).
- TNF- $\alpha$ :** *Tumor necrosis factor alpha* (Factor de necrosis tumoral alfa).
- UFC:** Unidades formadoras de colonia.
- VTEC:** *Escherichia coli* productora de toxina Vero.
- YPD:** *Yeast extract peptone dextrose* (extracto de levadura peptona dextrosa).

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Problemática de la colibacilosis en cabritos al destete**

Las enfermedades son la mayor causa de pérdidas económicas y dentro de ellas se encuentran las diarreas, causando del 15 al 40 % de mortalidad en cabritos (Kumar et al., 2003; Sharma *et al.*, 2020). Las diarreas son enfermedades que generan una disminución en el desempeño del cabrito, así como un gasto económico por medicación y cuidados (Sharma and Joshi, 2018). Particularmente la colibacilosis, o referida como diarrea inducida por *Escherichia coli*, es una de las principales enfermedades diarreicas en cabritos neonatales que provoca alta mortalidad (Smith and Sherman, 2009).

### **1.2 Agente etiológico y transmisión**

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria de la microbiota intestinal de animales y humanos (Chapman et al., 2001) que se excreta en las heces (McEvoy et al, 2003). Este microorganismo es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (Rodríguez-Ángeles, 2002). Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* responsables de diarreas se clasifican en seis grupos: “enterotoxigénica (ETEC)”, “enterohemorrágica, también conocida como productora de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC)”, “enteroinvasiva (EIEC)”, “enteropatógena (EPEC)”, “enteroagregativa (EAEC)” y “adherencia difusa (DAEC)” (Rodríguez-Angeles, 2002). El patotipo enterotoxigénico (*E. coli* ETEC) es el más común (Mishra et al., 2019). Esta es una cepa bacteriana de alta patogenicidad para cabritos desde los tres días postnacimiento que produce diarreas severas en las primeras dos semanas de vida (Costable et al., 2016).

### **1.3 Transmisión**

Una de las principales formas de adquirir la infección de *E. coli* es por la convivencia con animales infectados mediante la vía fecal-oral, la cual se incrementa por la falta de higiene en las instalaciones y el mal manejo de los animales (Resendiz et al., 2021). Por ejemplo, la falta de

desinfección del cordón umbilical al nacimiento, hacinamiento, calor y humedad excesiva favorecieron la transmisión de *E. coli* y la aparición de diarreas en cabritos (Dell'Elce *et al.*, 2019).

#### **1.4 Signos clínicos**

Los animales infectados por *E. coli* presentan diarreas blancas, fuertes cólicos y dolor abdominal, heces pastosas, y enteritis que puede culminar en la muerte por deshidratación (Costable *et al.*, 2016). La infección por *E. coli* ETEC comúnmente se presenta de forma repentina porque el periodo de incubación de la bacteria es corto, en un rango de 14 a 50 horas (Thompson Bonilla, 2009). Los signos patológicos en cabritos incluyen: bajo consumo de alimento, diarreas, cojeras y bajo desarrollo corporal (Lara-Duran, 2019). El intestino presenta lesiones caracterizadas por su engrosamiento con sangre, coágulos y manchas de color blanco (Bedotti, 2011).

#### **1.5 Patogénesis**

La bacteria *E. coli* ETEC es conocida por adherirse al epitelio del intestino delgado sin producir cambios morfológicos significativos inicialmente. El primer paso del proceso patogénico es la interacción de adhesinligando en las microvellosidades del intestino delgado, resultando en una unión no destructiva. Los antígenos más comunes de adhesión son las fimbrias F4(K88), F5(K99), F6(978P), F17(Fy/Att25), F41 y F18 (Nagy y Fekete, 1999).

La *E. coli* ETEC produce enterotoxinas (proteínas o péptidos) después de adherirse y proliferar en la mucosa intestinal, lo que conduce a una secreción excesiva de fluidos por los enterocitos (Costable *et al.*, 2016). La principal enterotoxina es la toxina Shiga 1 y 2 (Stx1, Stx2). Además, la bacteria utiliza factores de virulencia, entre los cuales se encuentran intimina (proteína de unión y eliminación de enterocitos) y hemolisina (Law, 2000).

En la patogenia también influye el factor hospedero a través de los receptores de adhesinas y enterotoxinas (Nagy y Fekete, 2005).

## 1.6 Respuestas inmunes

Los principales mecanismos de la respuesta inmune contra *E. coli* son: la activación del sistema del complemento, procesos inflamatorios y fagocíticos involucrados en la acción antimicrobiana. Algunas funciones del sistema del complemento incluyen la opsonización de los patógenos para ayudar en la fagocitosis, así como lisar la membrana de patógenos para destruirlos. Los procesos inflamatorios se ven activados por los mecanismos antimicrobianos, el daño por patógenos en los tejidos y la producción de citocinas por células del sistema inmune. Entre las citocinas principales se encuentran el factor de necrosis tumoral (TNF) y el interferón (IFN) (McGettrick et al., 2007; Iwasaki et al., 2010). Dentro de las respuestas celulares para la eliminación de patógenos encontramos la fagocitosis, que consiste en el reconocimiento de marcadores de la membrana de patógenos llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Éstos son reconocidos por los macrófagos con la ayuda de los receptores tipo toll (TLR). Posterior al reconocimiento y fagocitosis, los mecanismos iniciales para la eliminación de microorganismos incluyen los dependientes de oxígeno (explosión respiratoria y producción de óxido nítrico) e independientes de oxígeno (actividad de enzimas como la mieloperoxidasa). Otro mecanismo de la respuesta inmune asociado a la presencia de bacterias como *E. coli* es la producción de anticuerpos que ayudan a neutralizar toxinas y factores de propagación bacteriana, y a evitar la adhesión de bacterias dañinas a mucosas (Kumar, 2017).

## 1.7 Tratamientos

Los antimicrobianos son usados rutinariamente para el tratamiento de la colibacilosis (Constable, 2004). Sin embargo, *E. coli* ha generado una rápida resistencia a los antibióticos por su uso inadecuado (Voravuthikunchai et al., 2004). Incluso, la aplicación prolongada de antibióticos es dañina para la mucosa intestinal de los cabritos neonatos, provocando mala absorción de nutrimentos y diarreas (Sharma et al., 2022). Además, en ocasiones no hay disponibilidad o acceso a los antibióticos apropiados para tratar la infección por *E. coli*, lo que es un problema para combatir esta infección (Ma et al., 2021).

## **1.8 Zoonosis**

Los caprinos y otros rumiantes son reservorios de cepas de *E. coli* patógenas que pueden ser transmitidas a los humanos por la comida, ambiente (Aditya et al., 2023), agua (Hale et al., 2012), contacto directo o indirecto con animales (Durso et al., 2005). Por ejemplo, el diario de intoxicación alimentaria (Food Poison Journal, por sus siglas en inglés) reportó la infección de 7 personas, entre ellos 3 niños, que presentaron diarreas y náuseas en Seattle, Washington, por consumo de carne de bovino y caprino (Clark, 2022). En otro estudio realizado en México, Ríos-Muñiz et al. (2019) destacaron la prevalencia de *E. coli* patógena en niños y adultos con 17 casos en la ciudad de México, 21 Yucatán y 43 en Sinaloa. De hecho, la bacteria es una de las más transmitidas a los humanos por alimentos debido a su presencia natural en el tracto intestinal de estos animales (Lim et al., 2007).

## **1.9 Alternativas para la prevención de la colibacilosis en cabritos en etapas pre- y post-destete**

### **1.9.1 Manejo preventivo e instalaciones adecuadas**

El manejo zootécnico es una alternativa viable para reducir los riesgos y prevenir enfermedades a temprana edad (Lorenzutti et al., 2017). Adicionalmente, el diseño y construcción de instalaciones adecuadas proveen un espacio seguro para la crianza, alimentación y prevención de infecciones (Aiello, 2000). Por ejemplo, Kritas *et al.* (2003) demostraron que el manejo preventivo con áreas de calentamiento y protección disminuyó más de 3 veces la morbilidad, mortalidad y duración de las diarreas en cabritos.

### **1.9.2 Vacunas**

La corriente actual en el desarrollo de vacunas inmunogénicas veterinarias es el uso de bacterias vivas atenuadas, muertas o inactivadas, la membrana celular o toxoides de la bacteria (McVey et al., 2010). El uso de bacterias vivas atenuadas genera una respuesta inmune más eficiente, provocando una respuesta tanto celular como humoral (Unnikrishnan, 2012). La vacuna comercial ROTAVEC® CORONA con antígenos inactivados de Rotavirus, Coronavirus y *E. coli* ha demostrado un incremento en la concentración de anticuerpos contra *E. coli* en sangre y calostro de vacas

lactantes, así como en la sangre de las crías (Recca *et al.*, 2003; Crouch *et al.*, 2001). Por otra parte, la aplicación de Colidex® (incluye cepas inactivadas de *E. coli*) en lechones al destete aumentó la expresión de genes relacionados al sistema inmune (IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL 12) en el intestino (Vidal *et al.*, 2019). Otro ejemplo es la vacuna oral basada en subunidades de fimbrias F4 con *E. coli* ETEC que aumentaron la expresión de genes relacionados con la respuesta Th17 contra la infección (Luo *et al.*, 2015). Por otra parte, Calinescu (2005) encapsularon fimbrias F4 de ETEC y las administraron en el alimento para cerdos. Los resultados indican la expresión de receptores específicos de fimbrias en las placas de Peyers de porcinos.

### **1.9.3 Plantas medicinales**

El uso de plantas medicinales ha aumentado en la última década debido a su potente actividad antioxidante e inmunoestimulante relacionada a la presencia de compuestos bioactivos como los fenoles (Farinacci, 2008; De La Lastra *et al.*, 2007). La suplementación con plantas brinda una alternativa al uso de fármacos en la producción intensiva (Rochfort *et al.*, 2008). Dentro de las plantas con una alta cantidad de fenoles y polifenoles se encuentra el orégano, que le confieren las propiedades mencionadas anteriormente (Gutiérrez-Grijalva, 2017). Recientemente, Gijon (2019) demostró que los extractos de orégano a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estimularon la actividad antioxidante, capacidad fagocítica y genes relacionados al sistema inmune en leucocitos de sangre periférica de caprinos.

### **1.9.4 Prebióticos**

Un prebiótico se define como un ingrediente alimenticio no digerible que genera un efecto beneficio al hospedero estimulando el crecimiento selectivo y/o la actividad metabólica de un número limitado de bacterias (Gibson y Roberfoid, 1995). Los prebióticos permiten cambios tanto en la composición como en la actividad de bacterias favorables ya presentes en el tracto intestinal (microbiota) que confieren beneficios sobre el bienestar y salud del hospedero (Snel *et al.*, 2002). Además, los prebióticos tienen la función de servir como alimento (sustrato) para los microorganismos probióticos, estimulando su crecimiento, proliferación y generando una exclusión competitiva contra patógenos (Rodríguez *et al.*, 2005).

### 1.9.5 Simbióticos

Los simbióticos son el conjunto de probióticos y prebióticos, lo cual genera beneficios en el hospedero mediante un incremento de la supervivencia, adherencia y proliferación de microorganismos benéficos en el tracto intestinal (Monbelli, 2000). El efecto sinérgico entre prebióticos y probióticos pueden estimular el desarrollo de cepas específicas, contribuyendo a la instalación de una microbiota con beneficios para la salud (Roberfroid, 2000).

### 1.9.6 Probióticos

El uso de probióticos ha brindado una alternativa amigable con el medio ambiente, confiriendo protección contra infecciones patogénicas neonatales, además ayudan en la maduración y desarrollo del sistema inmune de caprinos (Chaucheyras-Durand et al. 2008). Las bacterias y levaduras confieren funciones probióticas mediante diferentes mecanismos de acción, entre los cuales se encuentran la inmunoestimulación (Vohra et al. 2016; Zoumpopoulou et al. 2018). Los probióticos más comunes son las bacterias, principalmente cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, las cuales colonizan el intestino evitando la adhesión de microorganismos patógenos no deseables en el intestino (Caja et al., 2003). Dentro de los microorganismos con potencial probiótico se encuentran algunas especies de levaduras. Algunas cepas de *Saccharomyces* han sido ampliamente evaluadas por su efecto probiótico. No obstante, otros géneros de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorulla* etc., han ganado mayor interés debido a sus potenciales características probióticas, antimicrobianas e inmunoestimulantes (Gil-Rodríguez et al., 2015; Shruthi et al., 2022).

### 1.10 Levaduras como alternativa para prevenir la colibacilosis en cabritos

Diversos estudios han reportado la reducción de la colonización intestinal de microorganismos patógenos, como *E. coli*, en rumiantes por la administración de *Saccharomyces cerevisiae* (Gracia, 2017). Por ejemplo, Liou et al. (2009) demostraron que la suplementación con *S. cerevisiae* (Origin XP yeast culture, Diamond V mills, USA) en vaquillas retadas con *E. coli* O:157H7 disminuyó la



presencia de la bacteria en las heces. Por otra parte, Stella et al. (2007) observaron una disminución en las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de *E. coli* y un aumento en las UFC de *S. cerevisiae* en heces de caprinos suplementados con la levadura. Por otra parte, la estimulación de leucocitos de caprinos con la levadura *Yarrowia lipolytica* demostró aumentar la respuesta inmune innata contra *E. coli* a través de un aumento de la actividad fagocítica, producción de óxido nítrico y la expresión de genes relacionados al sistema inmune (Angulo et al., 2021). De la misma manera, la administración oral de *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 en cabritos neonatos aumentó parámetros de la respuesta inmune innata (Angulo et al., 2020). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es estudiar el efecto de la levadura *Debaryomyces hansenii* sobre la productividad, la actividad inmunoestimulante y protección inmunitaria contra *E. coli* en cabritos al destete.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Debaryomyces hansenii* como levadura probiótica cabritos

#### 2.1.1 Estudios inmunológicos

Algunas levaduras marinas tienen efectos inmunoestimulantes, dentro de las cuales se encuentra *Debaryomyces hansenii* (Reyes-Becerril et al., 2008). Diferentes estudios han mostrado la capacidad inmunoestimulante y antioxidante de *D. hansenii* en peces (Reyes-Becerril et al., 2012). Un ejemplo es la inclusión de *D. hansenii* en la dieta del mero leopardo (*Mycteroperca rosacea*) que estimuló la ganancia de peso, producción de IgM, actividad de enzimas antioxidantes y la resistencia a la infección por *Amylodium ocellatum* (Reyes-Becerril et al., 2011a). Por otra parte, la administración de *D. hansenii* L2 en la dieta de dorada (*Sparus aurata*) incrementó la actividad fagocítica, producción de especies reactivas de oxígeno y la actividad peroxidasa (Reyes-Becerril et al., 2012). Recientemente, el potencial de  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* se ha evaluado como inmunoestimulantes para caprinos (Medina-Córdova et al., 2022). En un experimento se reportó que la estimulación de leucocitos caprinos con *D. hansenii* y sus  $\beta$ -glucanos promovió un aumento en la viabilidad celular, la actividad fagocítica, la actividad antioxidante, así como la expresión de genes relacionados al sistema inmune (Medina-Córdova et al., 2018). En otro estudio, Angulo et al., (2018) demostraron que la estimulación de leucocitos de cabritos con  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS 8339 aumentó parámetros del sistema inmune innato como la actividad fagocítica, producción de óxido nítrico y la viabilidad celular después de un reto con *E. coli*. Posteriormente, Angulo et al. (2019) mostraron que la administración oral de *D. hansenii* CBS 8339 en cabritos recién nacidos mejoró la supervivencia de leucocitos aislados de los cabritos suplementados después de un reto infeccioso con *E. coli* a través de un aumento en la explosión respiratoria, actividades de catalasa y superóxido dismutasa, y la modulación de la expresión de genes *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *RAF 1*, *SYK*, *MYD88*, *IL-1B* y *TNF- $\alpha$* . Dentro de las nuevas vertientes de estudio se encuentra el entrenamiento de la inmunidad innata, la cual se puede describir como la habilidad de mejorar la respuesta del sistema inmune contra una infección-estimulación con el mismo o diferentes patógeno así como con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Netea et al., 2015). Por ejemplo, la administración oral de  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS 8339 en cabritos recién nacidos preparó a las células del sistema inmune innato para responder contra un

reto con LPS, aumentando la actividad de la explosión respiratoria y la producción citocinas inflamatorias (Angulo et al., 2020).

### **2.1.2 Funciones probióticas**

Las levaduras de ambientes extremos les confieren propiedades únicas por la síntesis de biomoléculas funcionales de uso biotecnológico (Zaky et al. 2014). Un ejemplo es *Debaryomyces hansenii* aislada de diferentes ambientes, que ha sido considerada como probiótico por su capacidad de supervivencia, crecimiento celular, diferenciación y proliferación, y por estimular funciones digestivas, actividades antioxidante e inmunoestimulante en animales (Angulo et al., 2020). Angulo et al., (2019) reportaron la resistencia moderada de *D. hansenii* a sales biliares de caprinos y pH (2-5 a 6.5) en medio de cultivo. La suplementación con probióticos ha sido ampliamente descrita, resultando en beneficios a la salud como la regulación del sistema inmune y microbiota intestinal (Tsai et al., 2012). Algunos compuestos de los probióticos son reconocidos por el sistema inmune mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR), induciendo rutas de señalización detonando parámetros innatos y una primera respuesta del sistema inmune adaptativo (Lebeer et al. 2010). Uno de los principales compuestos inmunoestimulantes de *D. hansenii* son los  $\beta$ -glucanos (Angulo et al., 2020) que incrementan en caprinos la habilidad fagocítica, explosión respiratoria, actividad peroxidasa, y parámetros antioxidantes (Angulo *et al.* 2018; Media-Córdova et al. 2018).

### **2.1.3 Uso de levaduras en la producción de cabritos**

El uso de la levadura *Debaryomyces hansenii* sobre los parámetros de producción caprina no se ha reportado, pero sí en otras especies. Recientemente, la inclusión de *D. hansenii* en concentraciones del 1 al 2 % en dietas de larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) aumentó el crecimiento y supervivencia, mejoró la maduración del tracto digestivo e incrementó los niveles de actividad enzimática (Blandón et al., 2021). Por otra parte, Tovar et al. (2004) observaron una maduración más rápida del sistema digestivo mediante la incorporación de *D. hansenii* en larvas de *Dicentrachus labrax*, así como aumentos en el crecimiento y supervivencia. Por otro lado, Campa-Córdova et al. (2020) reportaron *D. hansenii* en dietas aumentó el peso final, consumo

aparente de alimento y disminuyó la tasa de conversión alimenticia en camarones (*Litopenaeus vannamei*). Teniendo en cuenta lo anterior, el uso de la levadura *Debaryomyces hansenii* en especies de interés pecuario, como los caprinos, podría ser una alternativa para incrementar el rendimiento productivo de los animales.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Dentro de la producción caprina se cuenta con la necesidad de alternativas naturales para la suplementación, principalmente en las primeras etapas productivas. El uso de probióticos es una opción natural que podría ser aplicada en caprinos de temprana edad. La levadura *Debaryomyces hansenii* tiene potencial probiótico para caprinos, aunque no se ha estudiado su efecto y los mecanismos inmunológicos en cabritos al destete. El uso de *D. hansenii* podría ser una alternativa natural para prevenir o mitigar las enfermedades oportunistas en etapas tempranas de los cabritos, permitiendo la obtención de productos con mejor calidad, beneficios económicos y sociales. Por otra parte, la utilización de la levadura *D. hansenii* podría disminuir el uso de antibióticos, la resistencia de los patógenos a ellos, y los residuos farmacológicos en carne de cabritos que podrían transmitirse a los seres humanos. Por todo lo anterior, el estudio de la aplicación de la levadura *D. hansenii* en cabritos al destete generaría conocimiento sobre su potencial uso para la prevención de enfermedades oportunistas en etapas de vida tempranas.

#### 4. HIPÓTESIS

Si la levadura *D. hansenii* CBS 8339 ha mostrado efectos inmunoestimulantes y protectores contra infecciones por *Escherichia coli* en cabritos recién nacidos, entonces, su suplementación oral modulará la respuesta inmunoprotectiva contra la infección por *E. coli* en cabritos en la etapa de destete.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de la suplementación de la levadura *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 sobre la respuesta inmunoprotectiva y productiva en cabritos en etapa de destete.

### 5.2 Objetivos particulares

- Analizar la respuesta inmune en cabritos suplementados con *D. hansenii* CBS 8339 en la etapa de destete.
- Determinar la protección contra un reto patogénico con *Escherichia coli* en leucocitos de cabritos suplementados con *D. hansenii* CBS 8339.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Animales y alojamiento:

El experimento se llevó a cabo en la unidad de caprinos y ovinos en la posta zootécnica de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, siguiendo la normatividad de las guías bioéticas de México (NOM-062-ZOO-1999 y NOM -008-ZOO-1994) con el propósito de evitar posibles factores de estrés dentro del manejo de los cabritos.

Se utilizaron 20 cabritos Sannen x Nubia lactantes de 6 semanas previos al destete, los cuales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos en diferentes corrales de 5.12 x 2.85 m. Los cabritos se identificaron mediante aretes con su número de registro. Los animales permanecieron 8 horas diarias y posteriormente regresaron con su madre durante una semana previa al destete. Dentro de los corrales tuvieron libre acceso a pastura fresca (alfalfa) y agua limpia.

### 6.2 Cultivo de *Debaryomyces hansenii* CBS 8339

La levadura *D. hansenii* se cultivó en medio YPD líquido (Sigma, St. Louis, MO, USA; Peptona 20 g/L, Dextrosa 20 g/L, Extracto de levadura 10 g/L) se suplementó con 1 µL/mL de cloranfenicol (50mg/mL) a 30 °C en agitación constante (120 rpm) de 24 a 48 h. Posterior al cultivo, se tomaron 2L de biomasa inicial la cual se añadió a un biorreactor con un tanque de 20L de medio YPD líquido en agitación constante con suministro de oxígeno. La biomasa fue obtenida mediante centrifugación (5000 rpm, 4 °C, 15 min) e incorporada en la dieta.

### 6.3 Dietas

#### 6.3.1 Balanceo

La formulación de las dietas fue realizada mediante los requisitos nutricionales para cabritos al destete acorde al National Research Council (NRC) (2007). para pequeños rumiantes donde se utilizaron las tablas relacionadas al aporte nutrimental de los ingredientes para la preparación de la dieta descrita en la Tabla 1.



**Tabla 1.** Formulación de dieta control y tratamiento con levadura (0.3% de *D. hansenii*) en cabritos.

	Dieta control	Dieta tratamiento
Ingredientes	Porcentaje en dieta (%)	
Alfalfa	46	45.7
Maíz	50	50
Melaza	2	2
Levadura ( <i>Debaryomyces hansenii</i> )	0	0.3
Mezcla mineral	2	2
Total	100	100

#### 6.4 Diseño del experimento

Los grupos experimentales consistieron en (1) grupo control (n=10) y (2) grupo *D. hansenii* (n=10). Cada uno homogenizado en peso y sexo de los cabritos. Los animales del grupo *D. hansenii* recibieron diariamente la levadura con un porcentaje del 0.3 % de la dieta por un periodo de 14 días. La levadura fue añadida y homogenizada en la dieta descrita anteriormente (apartado 6.3.1). Los cabritos control recibieron alimento de la dieta sin levadura. Se obtuvieron muestras de sangre de los cabritos el primer y catorceavo día de suplementación para evaluar parámetros inmunológicos.

#### 6.5 Extracción de leucocitos de sangre periférica de cabritos

La obtención de muestras de sangre periférica de los cabritos se realizó con ayuda de tubos BD Vacutainer® con heparina sódica (Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). El aislamiento de leucocitos se llevó a cabo mediante la metodología descrita por Azmi *et al.* (2006) con pequeñas modificaciones. La sangre fue diluida en medio RPMI 1640 (heparina 3x) (1:1 v/v); posteriormente se colocaron 1.25 mL en tubos Falcon de 15 mL los cuales fueron provistos con 2 mL de Histopaque®-1077 seguido de una centrifugación a 277 x *g* a 20°C por 20 min. Transcurrida la centrifugación, la capa leucocítica se incubó a temperatura ambiente adicionando 1 mL de buffer de lisis ACK (cloruro de

amonio-potasio) por 10 min con el fin de lisar los eritrocitos. Pasando el tiempo de espera se detuvo la reacción con 3 mL de PBS, y centrifugada a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Al terminar el ciclo, los leucocitos se re-suspendieron en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10 %) penicilina/estreptomicina (100 UI/mL, 100 mg/mL) y glutamina (1 %). Por último, se comprobó la viabilidad de los leucocitos mediante la prueba de exclusión de azul tripano utilizando el contador de células automatizado TC20 (BioRad, Hercules, CA, U.S.A.).

### **6.6 Reto de leucocitos de cabritos con *Escherichia coli***

Se colocó un mililitro de leucocitos ( $1 \times 10^6$  células por pozo) de cabritos suplementados con *D. hansenii* y dieta control en una placa de 24 pozos con fondo plano (Sigma, St. Louis, MO, USA). Subsecuentemente, los leucocitos fueron retados con el patógeno *E. coli* 25 (20  $\mu$ L;  $1 \times 10^8$  cel/mL) e incubados a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> atmosférico por 24 h.

### **6.7 Viabilidad de leucocitos retados con *Escherichia coli*.**

La viabilidad de los leucocitos de los cabritos del experimento fue determinada mediante el ensayo de reducción de resazurina siguiendo la metodología descrita por Riss *et al.* (2016). Brevemente, 100  $\mu$ L de leucocitos retados y no retados de ambos grupos fueron agregados a placas de 96 pozos ( $1 \times 10^6$  células/ml). Subsecuentemente, se agregó 10  $\mu$ L de solución de resazurina y se incubarán a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> por 4 h. La lectura de fluorescencia se realizó en un lector de microplacas de fluorescencia Varioskan™ Flash Multimode Reader a 560 nm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Como control positivo se utilizaron leucocitos de cabritos del grupo control y se expresó como el 100% de viabilidad. Como control negativo se utilizó DMSO.

## **6.8 Parámetros inmunológicos**

### **6.8.1 Fagocitosis**

La habilidad fagocítica de leucocitos de sangre periférica de cabritos se determinó por la técnica de rojo neutro acorde al método descrito por Teng *et al.* (2015). 100  $\mu$ L de leucocitos de los

cabritos ( $1 \times 10^6$  cel/mL) se añadieron en una placa de 96 pozos y se agregó 100  $\mu$ L de solución rojo neutro (0.085%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a cada pozo. Posteriormente, las células fueron incubadas a 37 °C por 4 h seguido de dos lavados con PBS para remover el rojo neutro no fagocitado. Los leucocitos se lisaron con buffer de lisis celular (ácido acético y etanol; 1:1, V/V). La absorbancia se midió a una densidad óptica a 570 nm en el espectrofotómetro Varioskan™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

### **6.8.2 Explosión respiratoria**

Para analizar la explosión respiratoria en leucocitos de sangre periférica de los cabritos, se utilizó el ensayo de azul de nitro-tetrazolio (NBT) siguiendo la metodología descrita por Kemenade et al. (1994). Se tomaron 100  $\mu$ L de leucocitos ( $1 \times 10^6$  cel/mL) por triplicados en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras se centrifugaron a 1000 x *g* por 1 min a temperatura ambiente eliminando el sobrenadante. El pellet obtenido se re-suspendió en solución NBT (1 mg/mL) para posteriormente ser incubada a oscuridad y temperatura ambiente por 2 h. Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron por 1000 x *g* por un 1 minuto. Posteriormente, se colocaron 100  $\mu$ L de metanol al 70 % (v/v) incubándose por 10 minutos. Las muestras se centrifugaron para eliminar el metanol. Luego se añadió 120  $\mu$ L de hidróxido de potasio a 2 M y 140  $\mu$ L de DMSO. Para finalizar, se tomaron 20  $\mu$ L colocándolos en placas de 96 pozos para leer absorbancia a una longitud de 655 nm en el espectrofotómetro.

### **6.8.3 Óxido nítrico**

La producción de óxido nítrico (ON) se cuantificó indirectamente por la concentración de nitritos por la reacción de Griess en las muestras mediante la metodología descrita por Neumann et al. (1995). Brevemente, 100  $\mu$ L de leucocitos de los cabritos ( $1 \times 10^6$  cel/mL) se añadieron por triplicado a una placa de 96 pozos y se agregaron 100  $\mu$ L de reactivo de Griess (4 mg/mL). La mezcla se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 15 minutos. Transcurrido el tiempo se leerá a 540 nm en el espectrofotómetro.

#### **6.8.4 Mieloperoxidasa**

La actividad total de mieloperoxidasa (MPO) se determinó mediante la metodología descrita por Quade y Roth (1997) con ligeras modificaciones. Se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de leucocitos de los cabritos ( $1 \times 10^6$  cel/mL) en una placa de 96 pozos. Luego se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  (20mM) de 3,3',5'5-tetrametilbencidina (TMB) y 5mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reacción colorimétrica se detuvo a los 2 min con 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico al 2M ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). La absorbancia fue leída a 450nm en el espectrofotómetro.

#### **6.8.5 Inmunoglobulinas A totales**

La evaluación de titulación de anticuerpo IgA totales en heces de los cabritos se realizó mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) siguiendo la metodología descrita por Lund et al. (1995). Las muestras fueron maceradas y disueltas en PBS inhibidor de proteasas al 5% de leche y centrifugar a  $1303 \times g$  por 10 minutos para la obtención del sobrenadante. El sobrenadante obtenido se diluyó con buffer de carbonato (0.2M, pH 9.6) en una proporción de 1:128, se colocó en placas de 96 pozos (Microwell Nune TM, Thermo ScientificTM) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Se realizaron tres lavados con PBS-T con 100  $\mu\text{L}$  con 5% de leche sin grasa (disuelta en PBS) a temperatura ambiente por 2 h. Después del lavado la placa fue incubada con 50  $\mu\text{L}$  de IgA anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (diluido 1:2000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) a temperatura ambiente por 2 h. Por último, la inmunodetección se reveló con una solución la cual consistió en una tableta de 3.3',5.5'tetrametilbencidina (TMB) (SIGMA; St. Louis, MO, USA) en 7.5 mL de buffer fosfato-citrato (pH 4.35) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1mM incubadas a 25 °C por 30 minutos. La reacción enzimática se detuvo con 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_4\text{SO}_4$ ) al 1M. Finalmente se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 450 nm.

#### **6.8.6 Expresión de genes asociados a la respuesta inmune:**

La extracción de ARN de leucocitos de los cabritos se realizó utilizando el reactivo TRIzol® Reagent (Invitrogen EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras se trataron con ADNsa I (Life Technologies), posteriormente la síntesis de ADNc se llevó a cabo con 1  $\mu\text{L}$  de ARN donde se

utilizó el kit de ImProm-II™ Reverse Transcription (Promega, EUA). La expresión de genes asociados al sistema inmune de cabritos se evaluó por PCR en tiempo real mediante CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Bio-Rad (Bio-Rad) y el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

Los primers necesarios para las reacciones fueron específicamente para caprinos como se describe en la Tabla 2. Las mezclas de reacción se incubaron a 98°C por 30 s, continuando con 40 ciclos a 98 °C por 10 s, siguiendo con un ciclo a 60 °C por 10 s, y concluyendo con la curva de disociación (melt) a 65-95°C. La especificidad del producto PCR en tiempo real se evaluó utilizando la curva de disociación la cual se elaboró después de la amplificación donde se visualizará un pico a la temperatura de fusión esperada ( $T_m$ ). La normalización del nivel de expresión de los genes se realizó con el gen 18s ribosomal. El cálculo de la expresión relativa de cada gen dentro del grupo *D. hansenii* contra el control se estimó mediante la ecuación de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Los resultados mayores al control expresaron un aumento, por otra parte, los resultados menores a uno expresaron una disminución.

**Tabla 2.** Secuencia de primers utilizadas en el experimento.

Gen	Longitud del producto (pb)	No. de acceso	Secuencias (5'-3')
TLR2	226	XM_012048489.1	TGACTTGACTCACAGATCCTC AACGAGAGGATGCAGCAC
TLR4	205	NM_001285603.1	ATCGACAACATCATTGACTCC AGCAGAATCAGAATGGCAG
TLR6	142	NM_001285574.1	CAAATGATGTGTGCAGAGCC TGCTTTACCTCTGCCATAC
Raf-1	140	XM_018066963.1	CGTGAACATCCTGCTCTTC CAATGTCAATCAGCTGGAAC
Syk	125	XM_005684191.3	CTAAGAAAGAGGCCATCCATACTCTGC ACACTCACTAGATGC
IL-1 $\beta$	109	D63351.1	ACATCCAGCTGCAGATTTCTC AAGACATGTTTCGTAAGGCACG
AP-1	101	XM_018044742.1	AGGAAGACAGGAGACAAGTGGCCGCCTCTTTTCCTTCAC
18S	100	DQ149973.1	TCGGGGATTGCAATTATTCACGGGCGGTGTGTACAAA

## 6.9 Análisis estadístico

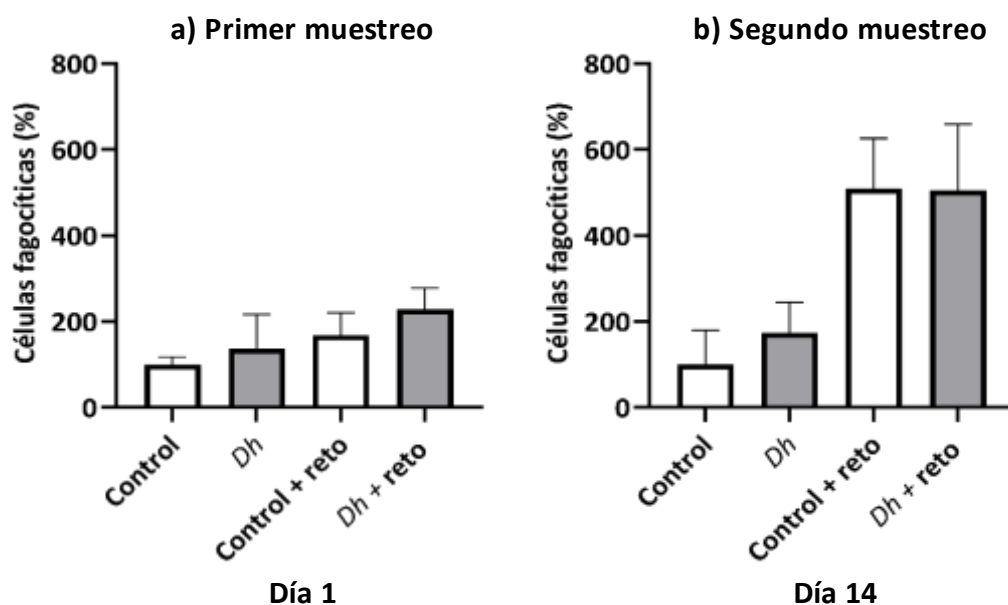
Las mediciones se realizaron por triplicado calculando la media y error estándar de la media (*EEM*) para cada grupo. Para las pruebas estadísticas se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de T (T student) dependiendo de la determinación biológica. En caso de existir diferencias, la comparación de medias se evaluó por un análisis *a posteriori* de *Tuckey*. Se consideró estadísticamente significativa a una  $p < 0.05$ . El análisis de los datos fue elaborado mediante el software GraphPad Prism versión 10.0.0 para Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Parámetro inmunológicos

#### 7.1.1 Fagocitosis

La actividad fagocítica en leucocitos de cabritos tuvo un comportamiento similar antes y después de un reto con *E. coli* al comparar entre el grupo control y *D. hansenii* en ambos muestreos; no obstante, la capacidad fagocítica mostró un aumento tanto por el grupo control como en el *D. hansenii* después de un estímulo bacteriano al primer y segundo muestreo sin mostrar diferencias significativas ( $p>0.05$ ) (Figura 1).

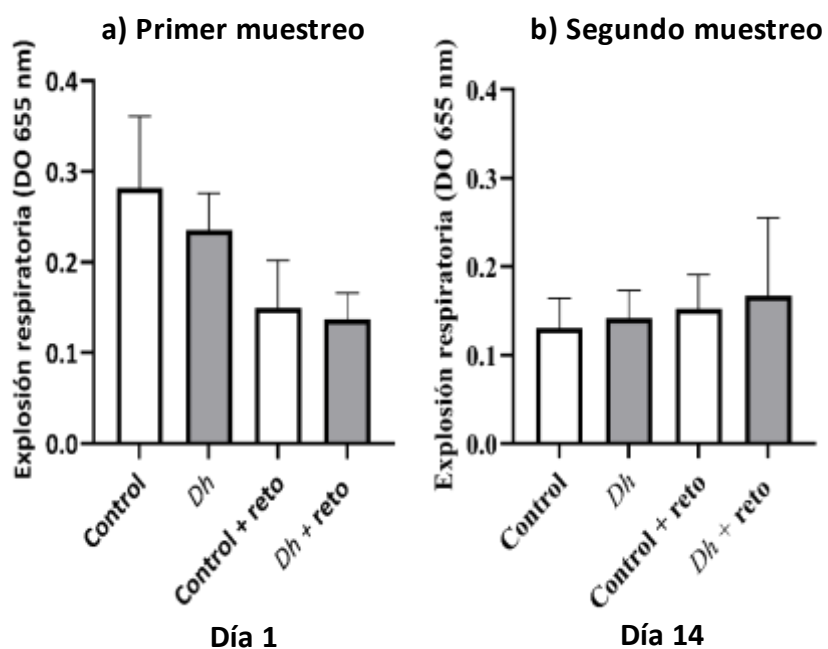


**Figura 1.** Actividad fagocítica de leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) Fagocitosis de leucocitos retados con *E. coli* a la primera semana. b) Fagocitosis de leucocitos retados con *E. coli* a la segunda semana. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.



### 7.1.2 Explosión respiratoria

Los resultados obtenidos mediante el análisis de la explosión respiratoria no denotaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre el grupo control y *D. hansenii* antes y después de un reto patogénico con *E. coli* mostrando un comportamiento similar entre ellos en ambos muestreos. (Figura 2).

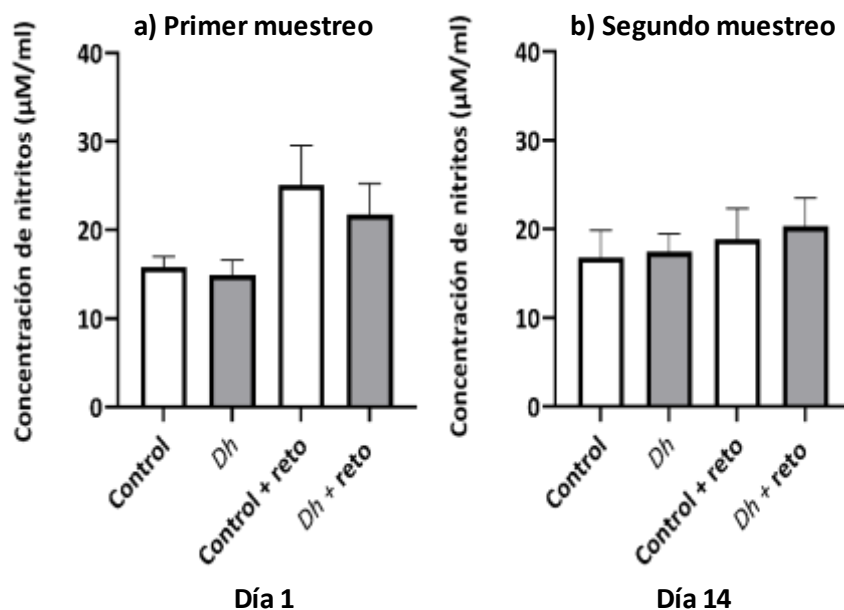


**Figura 2.** Explosión respiratoria en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) Explosión respiratoria en leucocitos retados con *E. coli* a la primera semana. b) Explosión respiratoria en leucocitos retados con *E. coli* a la segunda semana. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.

### 7.1.3 Óxido nítrico

La producción de óxido nítrico en leucocitos de sangre periférica de cabritos mostró un comportamiento similar entre grupo control y suplementados con *D. hansenii* sin denotar diferencias significativas ( $p>0.05$ ) antes y después de un reto bacteriano con *E. coli* en ambos muestreos.

3).

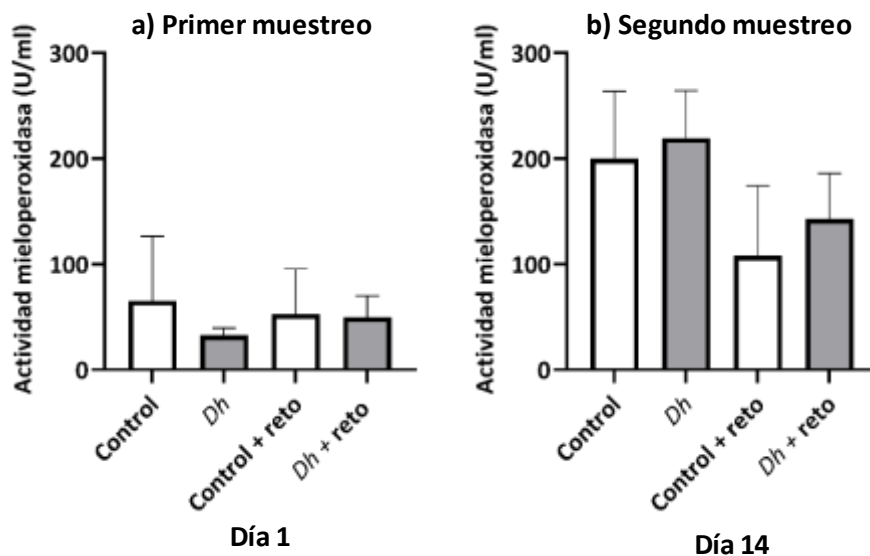


(Figura

**Figura 3.** Concentración de nitritos como metabolito estable de la producción de óxido nítrico en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) Concentración de nitritos en leucocitos retados con *E. coli* a la primera semana. b) Concentración de nitritos en leucocitos retados con *E. coli* a la segunda semana. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.

### 7.1.4 Mieloperoxidasa

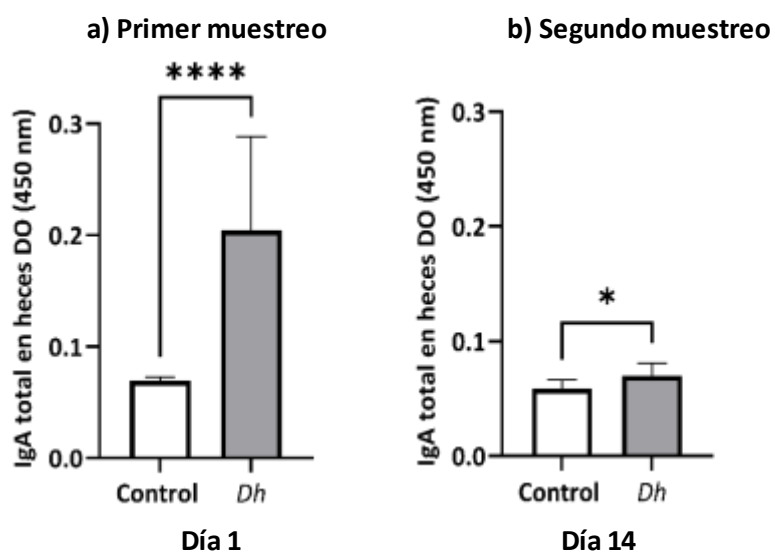
Los resultados obtenidos mediante el análisis sobre la actividad mieloperoxidasa en leucocitos de cabritos presentó un comportamiento similar antes y después de un reto con *E. coli* al ser comparados entre el grupo *D. hansenii* y control sin mostrar diferencias significativas ( $p>0.05$ ), tanto para el primer como segundo muestreo. (Figura 4).



**Figura 4.** Actividad mieloperoxidasa (MPO) en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) MPO en leucocitos retados con *E. coli* a la primera semana. b) Concentración de nitritos en leucocitos retados con *E. coli* a la segunda semana. Las barras representan la media ± E.E.

### 7.1.5 inmunoglobulinas A totales

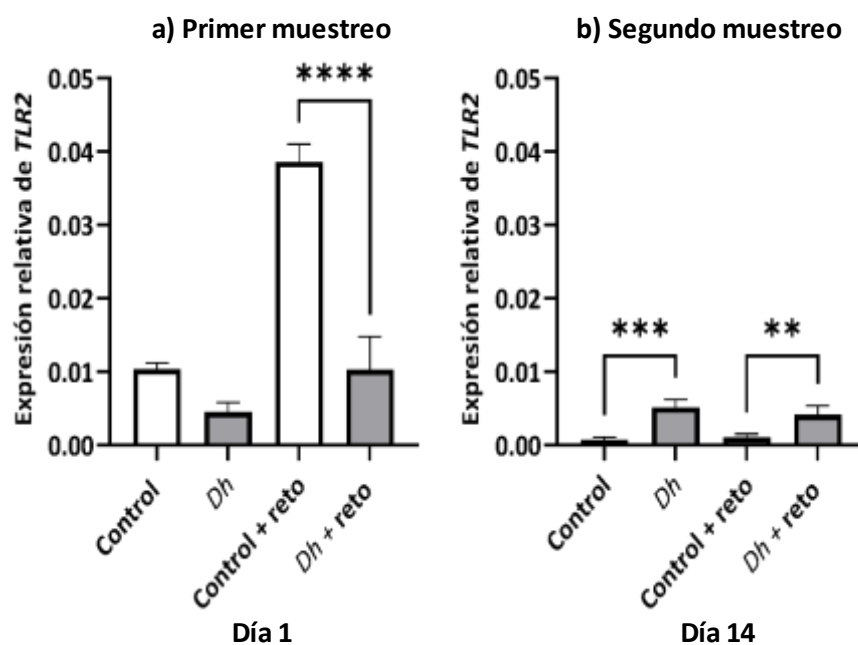
La producción de IgA en heces de cabritos suplementados en dieta con *D. hansenii* mostró un incremento denotando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al primer y segundo muestreo al ser comparados con el grupo control (Figura 5).



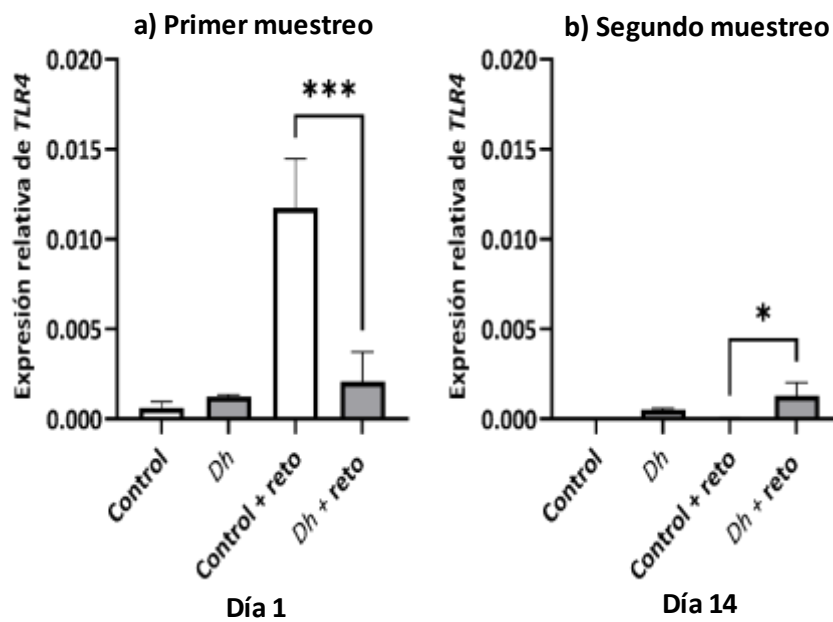
**Figura 5.** IgA total en heces de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) IgA total a la primera semana, los \*\*\*\* denotan significancia ( $p < 0.0001$ ) entre Dh y control. b) IgA total a la segunda semana, el \* indican significancia ( $p = 0.0152$ ) entre Dh y control. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.

### 7.1.6 Expresión de genes asociados a la respuesta inmune

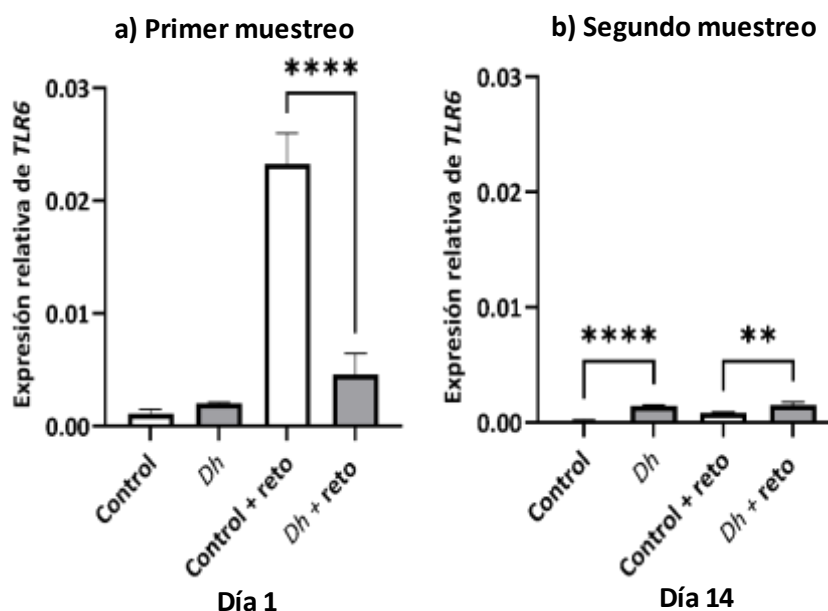
La expresión de los genes receptores *TLR2*, *TLR4* y *TLR6* en leucocitos de cabritos suplementados con *D. hansenii* mostraron una supresión de estos genes después de un reto con *E. coli* en comparación con el grupo control (Figura 6a; Figura 7a; Figura 8a). Por otra parte, al segundo muestreo se observó un incremento en la expresión de estos genes por parte de los leucocitos del grupo *D. hansenii* antes y después de un estímulo patogénico con *E. coli* mostrando diferencias significativas al ser comparadas con el grupo control (Figura 6b; Figura 7b; Figura 8b).



**Figura 6.** Expresión relativa del gen receptor de *TLR2* en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *TLR2* en la primera semana, \*\*\*\* representa significativo ( $p < 0,0001$ ) entre control y *Dh + reto*. b) Expresión relativa de *TLR2* en la segunda semana, los \*\*\* indican significancia ( $p=0,0008$ ) entre control y *D. hansenii*, los \*\* representan significancia ( $p=0,0083$ ) entre control + desafío y *Dh + reto*. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.

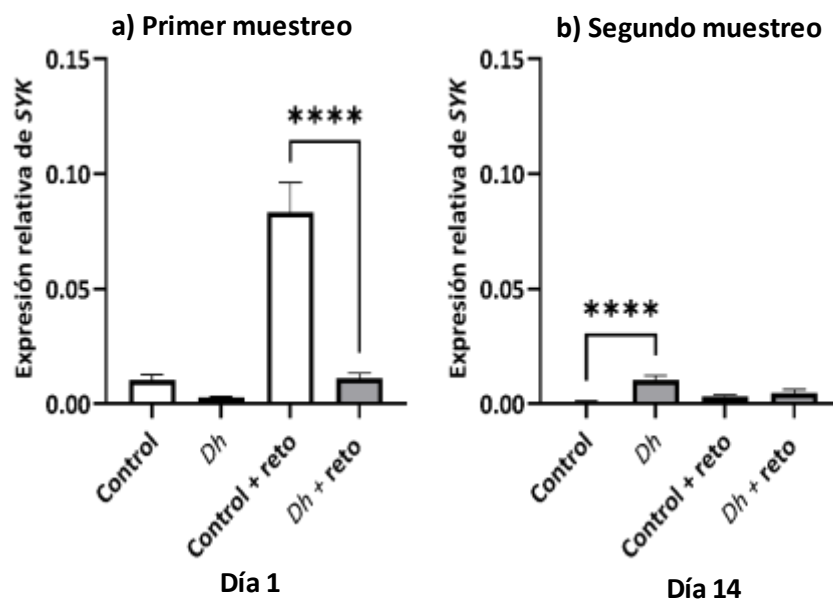


**Figura 7.** Expresión relativa del gen receptor de *TLR4* en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *TLR4* en el primer muestreo, los \*\*\* muestran significancia ( $p=0,0003$ ) entre control + desafío y *Dh* + reto. b) Expresión relativa de *TLR4* en el segundo muestreo, el \* representa significancia ( $p=0,0137$ ) entre control + desafío y *Dh* + reto. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.



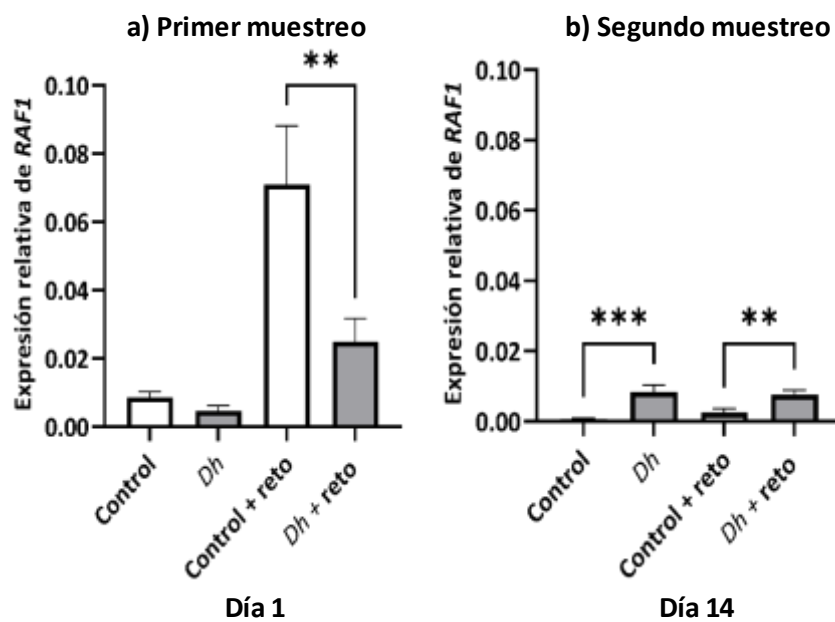
**Figura 8.** Expresión relativa del gen receptor de *TLR6* en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *TLR6* en el primer muestreo, \*\*\*\* muestra significancia ( $p < 0,0001$ ) entre control + desafío y *Dh* + reto. b) Expresión relativa de *TLR6* en el segundo muestreo, los \*\*\*\* representan diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre el control y *Dh*, los \*\* muestran significancia ( $p = 0,0028$ ) entre control + reto y *Dh* + desafío. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.

La expresión de los genes moduladores *SYK* y *RAF1* mostraron una supresión de estos genes en leucocitos de sangre periférica de cabritos del grupo *D. hansenii* al ser retados con *E. coli* comparado con el grupo control al primer muestreo (Figura 9a; Figura 10a); en cambio, al segundo muestreo se observó un aumento en la regulación de estos genes por parte de los cabritos estimulados con levadura comparado con los animales que no recibieron suplementación oral después de un reto patogénico con *E. coli*, mostrando diferencia significativa entre grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 9b; Figura 10b).



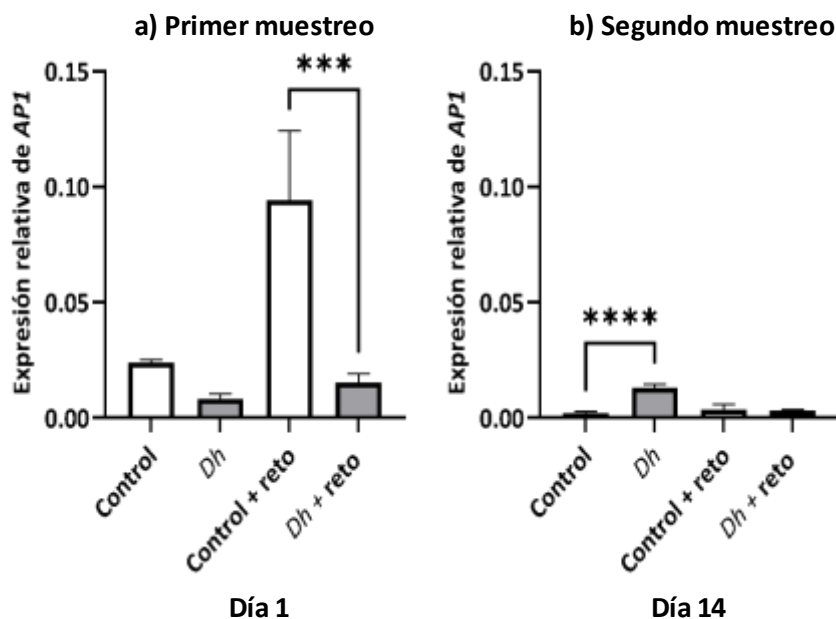
**Figura 9.** Expresión relativa del gen receptor a SYK en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n= 10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de SYK en el primer muestreo, \*\*\*\* denotando diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre control + reto y Dh + reto. b) Expresión relativa de SYK en el segundo muestreo, los \*\*\*\* muestran significativos ( $p < 0,0001$ ) entre el control y Dh. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.





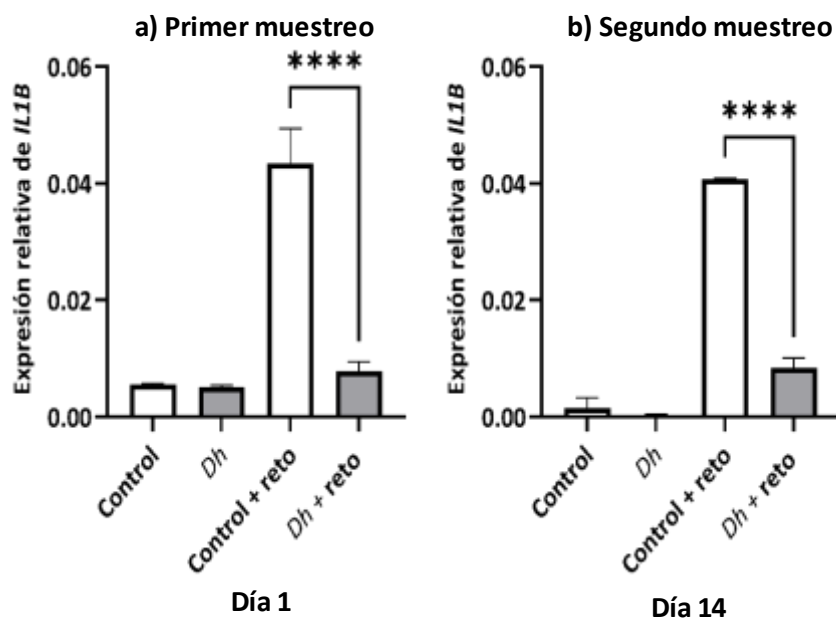
**Figura 10.** Expresión relativa del gen receptor a *RAF1* en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n= 10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *RAF1* en el primer muestreo, los \*\* representa diferencias significativas ( $p=0,0012$ ) entre control + reto y *Dh* + reto. b) Expresión relativa de *RAF-1* en el segundo muestreo, los \*\*\* representan diferencias significativas ( $p=0,0003$ ) entre el control y *Dh*, los \*\* muestran diferencias significativas ( $p=0,0054$ ) entre control + reto y *Dh* + reto. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.

La expresión del gen de factor de transcripción *AP1* mostró una supresión en su modulación en leucocitos de sangre periférica del grupo *D. hansenii* después de un reto bacteriano al primer muestreo contrastado con el grupo control. Sin embargo, al segundo muestreo se observó una sobreexpresión del gen *AP1* permaneciendo sin cambios antes y después de un reto con *E. coli* por parte del grupo *D. hansenii* en comparación con el grupo control, denotando diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Figura 10).



**Figura 11.** Expresión relativa del gen receptor a *AP1* en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n= 10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *AP1* en el primer muestreo, \*\*\* denotan diferencias significativas ( $p=0,0009$ ) entre control + reto y *Dh* + reto. b) Expresión relativa de *AP1* en el segundo muestreo, los \*\*\*\* representan diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre el control y *Dh*. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.

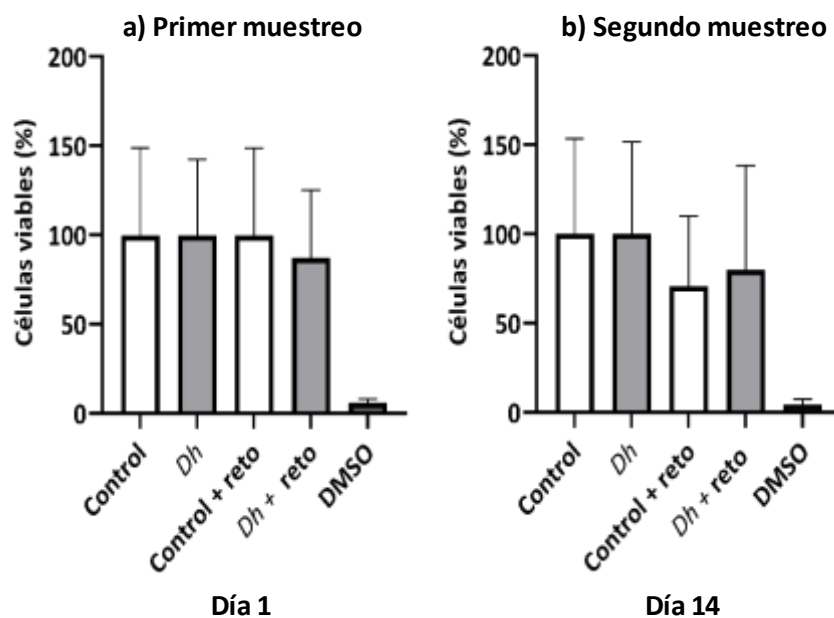
La expresión relativa del gen *IL1 $\beta$*  mostró una supresión en leucocitos de sangre periférica de cabritos estimulados con *D. hansenii* después de un reto patogénico con *E. coli* comparado con el grupo control en ambos muestreos, mostrando diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Expresión relativa del gen receptor a *IL-1 $\beta$*  en leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n= 10) y no suplementados (control n=10) en dieta con *D. hansenii*. Las muestras se recolectaron a las 24 horas de inmunoestimulación e inmunoestimulación con *E. coli*. Los leucocitos no desafiados representan el grupo de control. Las barras representan la media  $\pm$  SE. a) Expresión relativa de *IL-1 $\beta$*  en el primer muestreo, \*\*\*\* denota significativo ( $p < 0,0001$ ) entre control + reto y Dh + reto. b) Expresión relativa de *IL1- $\beta$*  en el segundo muestreo, los \*\*\*\* demuestran diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre control + reto y Dh + reto. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.

## 7.2 Viabilidad celular

Se midió la viabilidad celular de leucocitos de sangre periférica de cabritos destetados con dieta control y dieta suplementada con la levadura *D. hansenii* CBS8339. Las células se retaron con *E. coli* 25. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos el primer y segundo muestreo. Sin embargo, se observó un incremento de células viables por parte del grupo *D. hansenii* (79.9%) que fueron retadas con *E. coli* 25 al segundo muestreo (Figura 13).



**Figura 13.** Viabilidad de leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados (*D. hansenii* n=10) y no suplementados (control n=10) con *D. hansenii*. a) Viabilidad de leucocitos retados con *E. coli* a la primera semana. b) viabilidad de leucocitos retados con *E. coli* a la segunda semana. DMSO fue utilizado como control negativo. Las barras representan la media  $\pm$  E.E.

## 8. DISCUSIÓN

La viabilidad celular es implementada como un indicador sobre la protección brindada por probióticos contra retos bacterianos (Kim et al., 2006; Kamiloglu et al., 2020). En este estudio, contrastado con el grupo control, la viabilidad en leucocitos de cabritos suplementados con *D. hansenii* no se vio afectada antes y después de un reto patogénico con *E. coli*. En este sentido, Angulo et al (2019) reportó un aumento en la viabilidad celular al décimo cuarto y trigésimo día en leucocitos de cabritos neonatos suplementados con *D. hansenii* CBS 8339 después de un reto con *E. coli* comparado con el grupo control; sin embargo, no mostró diferencias significativas. En un estudio similar, cabritos neonatos estimulados oralmente con  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS 8339 mejoró la supervivencia celular después de un reto *in vivo* con LPS comparado con el grupo control (Angulo et al., 2020). Los resultados obtenidos en este estudio son comparables con lo reportado en leucocitos estimulados con glucanos y lisados con distintas cepas de *D. hansenii* (Medina-Córdova et al., 2018, 2021).

El sistema inmune está conformado por órganos, tejidos, células y moléculas, formando una defensa coordinada contra patógenos (Matos et al., 2017). Dentro de la respuesta inmune se encuentra la actividad fagocítica, explosión respiratoria, producción de óxido nítrico y actividad mieloperoxidasa, entre otras (Maurizio et al., 2021). Los resultados obtenidos en esta investigación, demostró que cabritos del grupo control y *D. hansenii* mostraron una actividad similar en fagocitosis, explosión respiratoria, actividad mieloperoxidasa y producción de óxido nítrico, antes y después de un reto patogénico. No obstante, diferentes estudios han mostrado resultados contrastantes. En este aspecto, leucocitos de sangre periférica de cabritos suplementados con *D. hansenii* CBS 8339 mostraron un comportamiento similar o incremento en la producción de óxido nítrico, explosión respiratoria y actividad mieloperoxidasa dependiendo de muestreo al décimo quinto y trigésimo día, así como al ser retados con *E. coli*, comparado con el grupo control (Angulo et al., 2019). Este comportamiento es comparable con leucocitos de caprinos estimulados de manera *in vitro* por 24 h con  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS 8339 antes y después de un estímulo con *E. coli* (Angulo et al., 2018) e *in vivo* mediante protocolo inmunidad entrenada con  $\beta$ -glucanos de esta misma levadura (Angulo et al., 2020). Asimismo, leucocitos de caprinos estimulados de manera *in vitro* implementando glucano y lisados de diferentes cepas de

*D. hansenii* obteniendo una respuesta inmune similar. Ejemplo de ello, glucanos de *D. hansenii* DhhBCS005 y DhhBCS006 presentaron un comportamiento similar en producción de óxido nítrico comparado con células sin estímulo del grupo control; mientras que leucocitos incubados con glucanos provenientes de *D. hansenii* DhhBCS003 y DhhBCS006 fueron comparables con la actividad mieloperoxidasa respecto al grupo control (Medina-Córdova et al., 2018). Por otra parte, células estimuladas mediante lisados con cepas de *D. hansenii* DhhBCS002, DhhBCS003, DhhBCS004 y DhhBCS005 obtuvieron un comportamiento similar por parte de la actividad fagocítica y producción de óxido nítrico que leucocitos del grupo control; en cambio, células estimuladas con lisados de *D. hansenii* DhhBCS001, DhhBCS003 y DhhBCS004 obtuvieron una baja actividad mieloperoxidasa (Medina-Córdova et al., 2021). No obstante, los autores mostraron un aumento en explosión respiratoria en células estimuladas con glucanos, así como lisados con diferentes cepas de *D. hansenii* contrastado con el grupo control (Medina-Córdova et al., 2018, 2021). Por otro lado, el presente estudio mostró un incremento de IgA en heces de cabritos suplementados con *D. hansenii* al primer y segundo muestreo, comparado con el grupo control. La producción de IgA mediante la suplementación con *D. hansenii* en cabritos no ha sido evaluada. Sin embargo, estimulación en becerros con *Saccharomyces cerevisiae boulardii* aumentó la secreción de IgA e IgA-plasmídico en células de íleon y colon, mostrando una posible inmunoprotección contra infecciones intestinales (Villot et al., 2020). Asimismo, corderos en crecimiento estimulados con *Saccharomyces cerevisiae* por 90 días aumentó la producción de IgA en suero los días 60, 75 y 90 contrastado con los animales sin estímulo (Mahmoud et al., 2020). Por lo tanto, diferentes cepas de *D. hansenii*, experimentación *in vitro* o *in vivo*, etapa productiva, así como periodo de suplementación son factores de importancia para una respuesta en la modulación del sistema inmune.

Uno de los elementos principales del sistema inmune son los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) reaccionando con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Janeway, 1989). Dentro de los PRRs, los receptores tipo Toll (TLRs) han sido identificados para diferentes PAMPs, como mananos y  $\beta$ -glucanos de la pared celular (Thoma-Uszynski et al., 2001; Zhou et al., 2021). El desencadenamiento en la señalización de receptores TLR es mediada por reguladores intracelulares (ej. SYK) coordinando la respuesta de efectores, tales como citoquinas

proinflamatorias ejemplo de IL-1 $\beta$  (Medzhitov, 2007; Mócsai et al., 2010). En el presente trabajo, los genes *TLR2*, *TLR4* y *TLR6* mostraron una supresión en su expresión en leucocitos de cabritos suplementados con *D. hansenii* antes de un reto bacteriano contrastado con los cabritos del grupo control en el primer muestreo. En comparación, se observó una sobreexpresión de estos mismos genes por parte del grupo *D. hansenii* contrastado con el grupo control antes y después de un reto con *E. coli* al segundo muestreo. En este sentido, Angulo et al. (2019) demostró que la estimulación con *D. hansenii* CBS8339 en células de cabritos neonatos no aumentó la expresión de genes receptores *TLR2* y *TLR6* en muestreos los días 15 y 30 antes y después de un reto con *E. coli*. Mientras que  $\beta$ -glucanos de diferentes cepas de *D. hansenii* aumentaron la expresión de *TLR2* y *TLR4* tras la exposición a *E. coli* mediante un bioensayo *in vitro* e *in vivo* en cabritos (Angulo et al., 2018; Medina-Córdova et al., 2018). Asimismo, *Dectina-1* se encuentra relacionada en el reconocimiento de  $\beta$ -glucanos en la pared celular desencadenando la activación de reguladores como *SYK* y *RAF1* (Batbayar et al., 2012). Los resultados del presente estudio, no mostró una amplificación por parte del gen *Dectina-1*. En este sentido, un estudio mediante la suplementación oral de *D. hansenii* en cabritos neonatos mostró una supresión en la expresión del gen *Dectina-1* (Angulo et al., 2019). En cambio, la estimulación con  $\beta$ -glucanos de levaduras incrementaron la expresión del gen *Dectina-1* en células de caprinos y monocitos de terneros (Angulo et al., 2018; Reyes-Becerril et al., 2021; Angulo et al., 2023). En conjunto, los estudios sobre la expresión proponen que el gen *Dectina-1* posiblemente no reconoce los  $\beta$ -glucanos de la levadura completa *D. hansenii*, pero si  $\beta$ -glucanos aislados de esta misma levadura. En la presente investigación, cabritos suplementados con levadura disminuyeron la expresión de los genes *SYK* y *RAF1* al primer muestreo; mostrando una subexpresión al segundo muestreo en estos genes por parte del grupo *D. hansenii* después de un reto bacteriano en comparación del grupo control. En trabajo previos, la suplementación *in vivo* con *D. hansenii* CBS 8339 en cabritos neonatos mostraron una sobreexpresión de *SYK* y *RAF1* al primer muestreo (día 15) antes de un reto con *E. coli* en leucocitos, disminuyendo su expresión al segundo muestreo (día 30) antes y después de un estímulo con *E. coli* contrastado con el grupo control (Angulo et al., 2019). En otro estudio, leucocitos de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS 8339 aumento la expresión de los genes *RAF1* y *SYK* antes de un reto con *E. coli* contrastado con el grupo control (Angulo et al., 2018). La estimulación con *D. hansenii* denota la activación sobre las rutas de *SYK* y *RAF1*

(relacionadas a *Dectina-1*), incluso cuando no se muestra una sobre expresión del gen *Dectina-1*. La pared celular de levaduras está conformada por  $\alpha$ -mananos,  $\alpha$ -manosas y N-mananos los cuales pueden ser reconocidos por receptores como, *Dectina-2*, *MINCLE*, y *DC-SIGN*, los cuales pueden activar la ruta de señalización de *SYK* y *RAF1* (Kerrigan et al., 2011; Tang et al., 2018). De la misma manera, se analizó la expresión relativa de mRNA del factor de transcripción *AP1*. El primer muestreo, no mostró sobreexpresión del gen *AP1* en leucocitos de cabritos suplementados con *D. hansenii* antes y después de un reto con *E. coli* comparado con el grupo control. Curiosamente, la expresión relativa del gen *AP1* incremento en leucocitos de cabritos destetados suplementados con *D. hansenii* antes de un estímulo con *E. coli* contrastado con el grupo control al día 14. De manera similar, Angulo et al. (2019) reportaron una sobreexpresión de mRNA *AP1* en cabritos neonatos suplementados oralmente con *D. hansenii* CBS8339. En general, los resultados sobre la expresión de genes muestran que la inclusión de *D. hansenii* CBS8339 en dietas para cabritos destetados puede activar la ruta de señalización de *TLR (2,6) /AP1*. Estos resultados transcriptómicos deberán ser validados a nivel de proteínas en futuros estudios.

Monocitos, macrófagos entre otras células del sistema inmune secretan *IL-1 $\beta$* , involucrando diferentes procesos inflamatorios y proinflamatorios en diferentes tipos de células (Rider et al., 2011). En esta investigación, la expresión del gen *IL-1 $\beta$*  mostró una disminución por parte del grupo *D. hansenii* retados con *E. coli* comparado con el grupo control en ambos muestreos. Por el contrario, leucocitos de cabritos neonatos suplementados con *D. hansenii* mostró un aumento en la expresión de *IL-1 $\beta$*  antes de un reto con *E. coli* en muestreos los días 15 y 30 en comparación con el control (Angulo et al., 2019). Curiosamente, la estimulación con *D. hansenii* cepa DhBCS004 disminuyó la expresión del gen *IL-1 $\beta$*  en pargo dorado (Reyes-Becerril et al., 2021). Los resultados en la expresión del gen *IL-1 $\beta$*  en el presente trabajo de investigación podría estar asociada con un efecto antiinflamatorio por parte de la levadura probiótica *D. hansenii* CBS 8339 en cabritos destetados, lo cual amerita una futura investigación.



## 9. CONCLUSIÓN

La suplementación oral con la levadura probiótica *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 en dietas para cabritos en la etapa del destete mostró un incremento en la producción de IgA en ambos muestreos, así como, la expresión de los genes receptores *TLR2*, *TLR4* y *TLR6*, los genes moduladores *SYK* y *RAF1*, el gen del factor de transcripción *AP1*, al decimocuarto día antes y después de un reto patogénico con *E. coli* 25 en leucocitos de sangre periférica de cabritos destetados. Sin embargo, *D. hansenii* CBS 8339 no es la mejor opción para estimular el sistema inmunitario brindando protección contra enfermedades por *E. coli* en cabritos al destete.

Perspectivas para futuros estudios: (1) Analizar la suplementación con diferentes cepas de *D. hansenii*; (2) estudiar vías alternas para la administración; (3) analizar la inmunoprotección contra diferentes bacterias de interés productivo en cabritos.

## 10. LITERATURA CITADA

- Aditya, A., Tabashsum, Z., Martinez, Z. A., Tung, C. W., Suh, G., Nguyen, P., y Biswas, D. (2023). Diarrheagenic *E. coli* and their antibiotic resistance patterns in dairy farms and their microbial ecosystems. *Journal of Food Protection*, 86(3): 100051.
- Aiello S.E. (2000). El manual Merck de veterinaria. Ed. Océano Grupo Editorial, S. A: España.
- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Cepeda-Palacios, R., Tovar-Ramírez, D., Esteban, M. Á., y Angulo, C. (2019). Probiotic effects of marine *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 on innate immune and antioxidant parameters in newborn goats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:2339-2352. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09621-5>.
- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Cepeda-Palacios, R., y Angulo, C. (2020). Oral administration of *Debaryomyces hansenii* CBS8339- $\beta$ -glucan induces trained immunity in newborn goats. *Developmental & Comparative Immunology*, 105: 103597. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103597>
- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Medina-Córdova, N., Tovar-Ramírez, D., y Angulo, C. (2020). Probiotic and nutritional effects of *Debaryomyces hansenii* on animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104:7689-7699.
- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Medina-Córdova, N., Tovar-Ramírez, D., y Angulo, C. (2020). Probiotic and nutritional effects of *Debaryomyces hansenii* on animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104:7689-7699.
- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio, F., y Angulo, C. (2018). *Debaryomyces hansenii* CBS 8339  $\beta$ -glucan enhances immune responses and down-stream gene signaling pathways in goat peripheral blood leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 88:173-182. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.07.017>.
- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., y Angulo, C. (2021). *Yarrowia lipolytica* N6-glucan protects goat leukocytes against *Escherichia coli* by enhancing phagocytosis and immune signaling pathway genes. *Microbial Pathogenesis*, 150:104735. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104735>.
- Angulo, M., y Angulo, C. (2023). Immunometabolic changes of  $\beta$ -glucan-trained immunity induction and inhibition on neonatal calf immune innate cells. *Molecular Immunology*, 159:58-68. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2023.05.008>.
- Azmi, A.S., Bhat, S. H. S., Hanif, Hadi, S. M. (2006). Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative ADN breakage: a putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Letters*, 580(2):533-538.
- Batbayar, S., Lee, D. H., y Kim, H. W. (2012). Immunomodulation of fungal  $\beta$ -glucan in host defense signaling by dectin-1. *Biomolecules and Therapeutics*, 20(5): 433. [10.4062/biomolther.2012.20.5.433](https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.5.433)
- Bedotti, D. O., y Rossanigo, C. E. (2011). Manual de reconocimiento de enfermedades del caprino: Diagnóstico de las enfermedades más comunes en la región centro oeste del país. *Publicación técnica*, 82.
- Blandón, V., y Adarely, L. (2021). Uso de levaduras marinas *Debaryomyces hansenii*, administradas en microdietas elaboradas con concentrado de proteína de soya para el destete de larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*). *Tesis Licenciatura*. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada.

- Cagigas, A. L. de las y Blanco, J. (2002). "Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa". *Revista Cubana Alimentación y Nutrición*, 16(1):63–68. [http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16\\_1\\_02/ali10102.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_1_02/ali10102.htm).
- Caja, G., García, E. G., Flores, C., Carro, M. D., y Albanell, E. (2003). Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. In 19. *Curso de Especialización "Avances en nutrición y alimentación animal"*, pp. 212.
- Calinescu, C., Mulhbacher, J., Nadeau, É., Fairbrother, J. M., y Mateescu, M. A. (2005). Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(1), 53-60.
- Campa-Córdova, A. I., Yenni-Morales, C., Guzmán-Murillo, M. A., y Aguirre-Guzman, G. (2020). Evaluación de la respuesta productiva e inmune en juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei* alimentado con mezclas probióticas. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 55(1):73-78. 427.
- Campos-Granados, C. (2014). El sistema inmune en los mamíferos: las defensas del cuerpo. *Nutrición Animal Tropical*, 8(1):80-93.
- Chapman, P. A., Malo, A. C., Ellin, M., Ashton, R., y Harkin, M. A. (2001). *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses, and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1-2):139-150.
- Chaucheyras-Durand F, Walker ND, Bach A (2008) Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Anim Feed Science Technology*, 145(1-4):5-26
- Clark, B. (2022). Seven with *E. coli* in Seattle-King County in East African Community. *Food Poison Journal*. Disponible en: <https://www.foodpoisonjournal.com/food-poisoning-information/seven-with-e-coli-in-seattle-king-county-in-east-african-community/>. [consulta: 23 enero 2023]
- Collado, V. M., Porrás, R., Cutuli, M. T., y Gómez-Lucía, E. (2008). El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(1):1-16.
- Constable, P. D. (2004). Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(1):8-17.
- Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., y Grünberg, W. (2016). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier Health Sciences.
- Crouch, C. F., Oliver, S., y Francis, M. J. (2001). Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and *Escherichia coli* F5 (K99). *Veterinary Record*, 149(4):105-108.
- De La Lastra, C. A., y Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, 35(5):1156-1160.
- Dell'Elce, A., Menseguez, S., Castromán, R., Anadón, A., Ferrer, A., López, A., ... y Formentini, E. (2019). Propuesta de una dosis de marbofloxacin para el tratamiento de infecciones asociadas a *Escherichia coli* en cabras de tres semanas de vida. *Revista FAVE. Sección Ciencias veterinarias*, 18(2):55-67.
- Durso, L. M., Reynolds, K., Bauer Jr, N., y Keen, J. E. (2005). Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157: H7 infections among livestock exhibitors and visitors at a Texas county fair. *Vector-Borne & Zoonotic Diseases*, 5(2):193-201.

- Farinacci, M., Colitti, M., Sgorlon, S., y Stefanon, B. (2008). Immunomodulatory activity of plant residues on ovine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126(1-2):54-63.
- Fernández, R. D., de la Caridad Rodríguez, H., Argilagos, G. B., y de Oca, R. V. M. (2014). Efecto probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* en parámetros hemáticos y metabólicos de terneros en pastoreo. *Revista de Producción Animal*, 26(3):13-13.
- Ghazanfar, S., Anjum, M., Azim, A., y Ahmed, I. (2015). Effects of dietary supplementation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on growth performance, blood parameters, nutrient digestibility, and fecal flora of dairy heifers. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 25(1): 53–59.
- Gibson, G. R., y Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6):1401-1412.
- Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412.
- Gijon, D. (2019). Evaluación del potencial antioxidante e inmunoestimulante del orégano (*Lippia palmeri* Watts) en leucocitos de sangre periférica de caprinos. *Tesis Licenciatura*. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Área de Conocimiento de Ciencias Agropecuarias, Departamento Académico de Ciencia Animal y Conservación del Hábitat. Disponible: <https://koha.uabcs.mx/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=41533>.
- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., y Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2):1156-1162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.042>.
- Girardin, S. E., Travassos, L. H., Hervé, M., Blanot, D., Boneca, I. G., Philpott, D. J., ... y Mengin-Lecreux, D. (2003). Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43):41702-41708.
- Gracia, J. R. (2017). Efecto de la suplementación de un probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre enteropatógenos ambientales en cabritos con crianza artificial. *Tesis Maestría*. Universidad autónoma de Querétaro. Repositorio Académico Universidad de Querétaro. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1354>.
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Picos-Salas, M. A., Leyva-López, N., Criollo-Mendoza, M. S., Vazquez-Olivo, G., y Heredia, J. B. (2017). Flavonoids and phenolic acids from oregano: Occurrence, biological activity and health benefits. *Plants*, 7(1):2.
- Hale, C. R., Scallan, E., Cronquist, A. B., Dunn, J., Smith, K., Robinson, T., y Clogher, P. (2012). Estimates of enteric illness attributable to contact with animals and their environments in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 54(5):S472-S479.
- Iwasaki A, Medzhitov R. (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 327(5963):291-295.
- Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, (54):1-13.
- Kemenade, B. L. V. V., Groeneveld, A., Rens, B. T. V., y Rombout, J. H. (1994). Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Experimental Biology*, 187(1):143-158.
- Kerrigan, A. M., y Brown, G. D. (2011). Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends in Immunology*, 32(4):151-156. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.01.002>.

- Kritas, S. K., Burriel, A. R., Tzivara, A. H., Govaris, A., Kyriakis, S. C., Karatzias, H., y Vlemmas, J. (2003). Prevention of scours in neonatal kids after modification of management and experimental vaccination against *Escherichia coli*. *Small Ruminant Research*, 50(1-2):51-56.
- Kumar, R. (2017). Bacterial immunity and host defense mechanisms. *Journal of Immuno Virology*, 1(5). <https://doi:10.19080/JOJIV.2017.01.555575>.
- Kumar, S., Vihan, V. S. y Deoghare, P. R. (2003). Economic implication of diseases in goats in India with reference to implementation of a health plan calendar. *Small Ruminant Research*, 47(2):159-164.
- Lara-Duran, J. A., Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L., y Delgadillo-Ruiz, O. (2019). Incidencia de *Escherichia coli* O157: H7 en heces de rumiantes lactantes con síndrome diarreico. *Revista MVZ Córdoba*, 24(3):7339-7345.
- Law, D. (2000). Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5):729-745.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., y De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3):171-184. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2297>.
- Lim, J. Y., Li, J., Sheng, H., Besser, T. E., Potter, K., y Hovde, C. J. (2007). *Escherichia coli* O157:H7 colonization at the rectoanal junction of long-duration culture-positive cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4):1380-1382.
- Liou, L., Sheng, H., Ferends, W., Schneider, C., Hristov, A. N., Yoon, I., y Hovde, C.J. (2009). Reduced carriage of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feed yeast culture supplement. *The Professional Animal Scientist*, 25(5):553-558.
- Lorenzutti, A. M., y Aguilar, M. S. (2017). Aspectos sanitarios de la producción caprina. *Panorama Actual Del Medicamento*, 41(409):1103-12.
- Lund, T., Chiayvareesajja, J., Larsen, H. J., y Røed, K. H. (1995). Antibody response after immunization as a potential indirect marker for improved resistance against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 5(2):109-119.
- Luo, Y., Van Nguyen, U., de la Fe Rodriguez, P. Y., Devriendt, B., y Cox, E. (2015). F4+ ETEC infection and oral immunization with F4 fimbriae elicits an IL-17-dominated immune response. *Veterinary Research*, 46(1):1-14.
- Ma, F., Xu, S., Tang, Z., Li, Z., y Zhang, L. (2021). Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health*, 3(1):32-38.
- Macedo, R., Arredondo, V., Rodríguez, J., Ramírez, J., y López, B. (2010). Efecto del sistema de producción, de la época de nacimiento y del sexo sobre la mortalidad neonatal de corderos Pelibuey. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(1):77-84. <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/205>.
- Mahmoud, M. M., Youssef, I. M. I., Abd El-Tawab, M. M., Bakr, H. A., Eissa, N. A., Hassan, M. S., y Sobiech, P. (2020). Influence of probiotic and yeast culture supplementation on selected biochemical and immunological parameters of growing lambs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 23(1):5-12. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2019.131413>.
- Matos, L., Muñoz, M. C., Molina, J. M., Rodríguez, F., Perez, D., Lopez, A., ... y Ruiz, A. (2017). Protective immune responses during prepatency in goat kids experimentally infected with *Eimeria ninakohlyakimovae*. *Veterinary Parasitology*, 242:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.016>.

- Maurizio, E., Trangoni, M. D., Rossi, U. A., Dunleavy, M., Colato, C., y Rossetti, C. A. (2021). Characterization of innate immune response to *Brucella melitensis* infection in goats with permissive or restrictive phenotype for *Brucella* intramacrophagic growth. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 234:110223. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110223>.
- McEvoy, J. M., Doherty, A. M., Sheridan, J. J., Thomson-Carter, F. M., Garvey, P., McGuire, L., ... y McDowell, D. A. (2003). The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157: H7 at a commercial beef abattoir. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2):256-266.
- McGettrick, A. F., y O'Neill, L. A. (2007). Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. *British Journal of Haematology*, 139(2):185-193.
- McVey, S., y Shi, J. (2010). Vaccines in veterinary medicine: a brief review of history and technology. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 40(3):381-392.
- Medina-Córdova, N. M., Becerril, M. R., Angulo, M., y Angulo, C. (2021). Immunobiological effects of marine *Debaryomyces Hansenii*-derived lysates on goat peripheral blood leukocytes. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25(1). <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.3667>.
- Medina-Córdova, N., Reyes-Becerril, M., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa-Córdova, A. I., y Angulo, C. (2018). Immunostimulant effects and potential application of  $\beta$ -glucans derived from marine yeast *Debaryomyces hansenii* in goat peripheral blood leukocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116:599-606. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.061>.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164):819-826. <https://doi.org/10.1038/nature06246>.
- Mishra, A. K., Singh, D. D., Gururaj, K., Kumar, A., Dixit, A., Shrama, N., ... y Yadav, S. (2019). Molecular characterization of diarrhoeogenic *Escherichia coli* isolated from neonatal goat-kids. *Journal of Animal Research*, 9(1):51-59.
- Mócsai, A., Ruland, J., y Tybulewicz, V. L. (2010). The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nature Reviews Immunology*, 10(6):387-402. <https://doi.org/10.1038/nri2765>.
- Mombelli, B., & Gismondo, M. R. (2000). The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16(4):531-536. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(00\)00322-8](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00322-8).
- Nagy, B., y Fekete, P. Z. (1999). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary research*, 30(2-3):259-284.
- Neumann, N. F., Fagan, D., y Belosevic, M. (1995). Macrophage activating factor (s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, 19(6):473-482.
- Ogbuewu, I. P., y Mbajiorgu, C. A. (2023). Meta-analysis of *Saccharomyces cerevisiae* on enhancement of growth performance, rumen fermentation and haemato-biochemical characteristics of growing goats. *Heliyon*, 9(3).
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9):45.

- Quade, M. J., y Roth, J. A. (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58(3-4):239-248.
- Recca, A., Calvo, E., Crouch, C.F., Navetat, H., Rizet, C., Guijarro, R., Perez-Garcia, J., Francis, M.J. (2003) Comparative lactogenic antibody responses of cattle from European field trials with a new enteric disease vaccine. *Veterinary Record*, 152(24):751-752.
- Resendiz, G. P., Romero, F. A., Pérez, C. F., Núñez, L. G., Hernández, J. G., López, E. H., y Aparicio, E. D. (2021). Enfermedades infecciosas de relevancia en la producción caprina, historia, retos y perspectivas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 12:205-223.
- Reyes-Becerril, M., Angulo, C., Angulo, M., y Esteban, M. Á. (2021). Probiotic properties of *Debaryomyces hansenii* BCS004 and their immunostimulatory effect in supplemented diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Research*, 52(6):2715-2726. <https://doi.org/10.1111/are.15123>.
- Reyes-Becerril, M., Ascencio-Valle, F., Meseguer, J., Tapia-Paniagua, S.T., Moriñigo, M.A., y Esteban, M.Á., (2012). *Debaryomyces hansenii* L2-enriched diet enhances the immunity status, gene expression and intestine functionality in gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Aquaculture Research*, 43(8):1107-1118. <https://doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02914.x>.
- Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramirez, D., Ascencio-Valle, F., y Esteban, M.Á., (2008). Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Fish and Shellfish Immunology*, 25(6):731-739. [https://DOI: 10.1016/j.fsi.2008.02.010](https://DOI:10.1016/j.fsi.2008.02.010).
- Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., y Apte, R. N. (2011). IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *The Journal of Immunology*, 187(9):4835-4843. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102048>.
- Ríos-Muñiz, D., Cerna-Cortés, J. F., Morán-García, N., Meza-Segura, M., y Estrada-García, T. (2019). *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos murinos. *Gaceta Médica de México*, 155(4):410-416.
- Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor. (2016). Cell viability assays. En *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Roberfroid, M. B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6):1682S-1687S.
- Roberfroid, M. B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6):1682S-1687S.
- Rochfort, S., Parker, A. J., y Dunshea, F. R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69(2):299-322.
- Rodríguez, F., y Castro, M. (2005). Levaduras: probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6(1):26-38.
- Rodríguez-Ángeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5):464-475.
- Rosilawati, K., Nurul Faizah, Z. y Saipul, Bahari, A.R. (2016). Investigation of high fatality among lambs in sheep farms in Pekan, Pahang, Malaysia. *Malaysian Journal Veterinary Research*, 7(2):127-133.

- Sharma, N., Mishra, A. K., Kumar, A., Srivastava, A., Gururaj, K., Singh, D. D., y Pawaiya, R. V. S. (2022). Antibacterial activity of traditionally used plants against the resistant enteropathogenic *Escherichia coli*. *Indian Journal of Animal Research*, 56(6):759-763.
- Sharma, S. K. y Joshi, M. (2018). Epidemiological studies on calf diarrhea. *Indian Veterinary Journal*, 95(03):32-34.
- Sharma, S. K., Manat, N., y Joshi, M. (2020). Prevalence of colibacillosis in goat kids in Udaipur district of Rajasthan. *Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*, 16(2, 3, 4), 98-100.
- Shruthi, B., Deepa, N., Somashekaraiah, R., Adithi, G., Divyashree, S., y Sreenivasa, M. Y. (2022). Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. *Biotechnology Reports*, 34: e00716.
- Smith, M.C. y Sherman, D.M. (2009). Digestive system In: *Goat Medicine*. Wiley.
- Snel, J., Harmsen, H. J. M., Van der Wielen, P. W. J. J., y Williams, B. A. (2002). Dietary strategies to influence the gastro-intestinal microflora of young animals, and its potential to improve intestinal health. *I Nutrition and Health of the Gastrointestinal tract* (pp. 37-69). Wageningen Academic.
- Stella, A. V., Paratte, R., Valnegri, L., Cigalino, G., Soncini, G., Chevaux, E. y Savoini, G. (2007). Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Ruminant Research*, 67(1):7-13.
- Suárez-Machín, C., y Guevara-Rodríguez, C. A. (2017). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la alimentación de rumiantes. *Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(2):21-30.
- Tang, J., Lin, G., Langdon, W. Y., Tao, L., y Zhang, J. (2018). Regulation of C-type lectin receptor-mediated antifungal immunity. *Frontiers in Immunology*, 9:326162. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00123>.
- Tauxe R.V. (1997). Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 3:425-34.
- Taylor, L. H., Latham, S. M., y Woolhouse, M. E. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1411):983-989.
- Teng, L., Fu, H., Wang, M., Deng, C., y Chen, J. (2015). Stimulation of RAW264. 7 macrophages by sulfated *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide *in vitro*. *Molecular Medicine Reports*, 12(4):5545-5553.
- Thoma-Uszynski, S., Stenger, S., Takeuchi, O., Ochoa, M. T., Engele, M., Sieling, P. A., Modlin, R. L. (2001). Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors, *Science*, 291:1544-1547. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61883-2](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61883-2).
- Thompson Bonilla, M. D. R. (2009). Caracterización inmunológica de un modelo murino de infección y persistencia con una cepa de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), aislada de humano. *Tesis Doctoral*. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México.
- Tizard, I. (2009). *Veterinary Immunology: An Introduction*. 8<sup>th</sup> ed. Saunders Elsevier. Missouri, United States. 529 pp.



- Tovar-Ramírez, D., J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe y R. Vázquez-Juárez. (2004). Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, 234(1-4):415-427.
- Tsai, Y. T., Cheng, P. C., y Pan, T. M. (2012). The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96: 853-862. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4407-3>.
- Unnikrishnan, M., Rappuoli, R., y Serruto, D. (2012). Recombinant bacterial vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 24(3):337-342.
- Vidal, M. G. R., Pascoal, L. M., Martínez, F. J. P., Torres, J. J. Q., Cuadrado, J. M. A., y Luna, A. M. (2019). Control de "*Escherichia coli*" mediante vacunación parenteral. *Badajoz Veterinaria*, (16):17-23.
- Villot, C., Chen, Y., Pedgerachny, K., Chaucheyras-Durand, F., Chevaux, E., Skidmore, A., ... y Steele, M. A. (2020). Early supplementation of *Saccharomyces cerevisiae* boulardii CNCM I-1079 in newborn dairy calves increases IgA production in the intestine at 1 week of age. *Journal of Dairy Science*, 103(9):8615-8628. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18274>
- Vohra, A., Syal, P., y Madan, A. (2016). Probiotic yeasts in livestock sector. *Animal Feed Science and Technology*, 219:31-47.
- Voravuthikunchai, S., Lortheeranuwat, A., Jeeju, W., Sririrak, T., Phongpaichit, S., y Supawita, T. (2004). Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1):49-54.
- Xi, M., Feng, Y., Li, Q., Yang, Q., Zhang, B., Li, G., ... y Xia, X. (2015). Prevalence, distribution, and diversity of *Escherichia coli* in plants manufacturing goat milk powder in Shaanxi, China. *Journal of Dairy Science*, 98(4):2260-2267.
- Zaky, A. S., Tucker, G. A., Daw, Z. Y., y Du, C. (2014). Marine yeast isolation and industrial application. *FEMS Yeast Research*, 14(6):813-825.
- Zhou, Y., Cheng, L., Lei, Y. L., Ren, B., y Zhou, X. (2021). The interactions between *Candida albicans* and mucosal immunity. *Frontiers in Microbiology*, 12:652725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652725>.
- Zoumpopoulou, G., Kazou, M., Alexandraki, V., Angelopoulou, A., Papadimitriou, K., Pot, B., y Tsakalidou, E. (2018). Probiotics and prebiotics: an overview on recent trends. *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*, 1-34.