



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

## **ARGININA, VITAMINAS E Y C EN LA RESPUESTA INMUNE Y ESTRÉS OXIDATIVO EN POLLOS DE ENGORDA CON DESAFÍO A *Eimeria spp* Y VIRUS DE LA ENFERMEDAD DEL NEWCASTLE**

**PABLO ALFREDO DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ**

**T E S I S**  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE :

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

2014

La presente tesis titulada: "Arginina, vitaminas E y C en la respuesta inmune y estrés oxidativo de pollos de engorda con desafío a *Eimeria spp* y virus de la enfermedad del Newcastle", realizada por el alumno: PABLO ALFREDO DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:


MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR


CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Arturo Pro Martínez

DIRECTOR DE TESIS

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ciro A. Ruiz Feria

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Alejda S. Hernández Cazares

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Narciso Gaytán

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2014

## RESUMEN

### **ARGININA, VITAMINAS E Y C EN LA RESPUESTA INMUNE Y ESTRÉS OXIDATIVO EN POLLOS DE ENGORDA CON DESAFÍO A *Eimeria spp* Y VIRUS DE LA ENFERMEDAD DEL NEWCASTLE**

**Pablo A. Domínguez Martínez, M.C.**

**Colegio de Postgraduados, 2014**

La oxidación causada por patógenos es un problema de suma importancia en animales. Pollos mixtos, de un día de edad (Cobb 500, n=624) fueron asignados al azar a uno de seis tratamientos. Como testigo se utilizó una dieta base (**T**; 40 mg de VE kg<sup>-1</sup> de alimento y 1.5% de ARG). El segundo tratamiento fue la dieta base + ARG (**ARG**; + 0.3%). El tercer tratamiento fue la dieta base + ARG + VE (**AVE**; + 0.3% y + 40 mg kg<sup>-1</sup> de alimento). El cuarto tratamiento fue la dieta base + ARG + VC (**AVC**; + 0.3% + 1 g kg<sup>-1</sup> de alimento). El quinto tratamiento fue la dieta base suplementada con VE + VC (**VEC**; + 40 mg + 1 g kg<sup>-1</sup> de alimento). El sexto tratamiento fue la dieta base + ARG + VE + VC (**AVEC**; + 0.3% + 40 mg + 1 g kg<sup>-1</sup> de alimento). Al día 14 todos los pollitos fueron inoculados oralmente con 100 veces la dosis normal de la vacuna contra coccidia Advent®. También se vacunó contra la enfermedad del virus de Newcastle a los 28 días de edad. Se evaluaron las lesiones intestinales (duodeno, yeyuno y ciego) y los pesos relativos de los órganos: bolsa de Fabricio, bazo y timo a los 23 días de edad. Se tomaron muestras de plasma antes (2 h) y después (12, 24 y 48 h) del desafío con coccidia, para determinar las concentraciones de malondialdehído, óxido nítrico y actividad de glutatión peroxidasa. A los 21, 35 y 38 días de edad se colectaron muestras de suero sanguíneo para la determinación de anticuerpos específicos al virus del Newcastle. Las lesiones en yeyuno fueron menores en los tratamientos AVC y VEC, mientras que en los ciegos de las aves del

tratamiento VEC presentaron las lesiones más fuertes; las lesiones en duodeno no se vieron afectadas por los tratamientos. Los pollos alimentados con la dieta AVEC tuvieron los niveles más bajos de malondialdehído antes del desafío con coccidia, pero 12 horas después del desafío sus niveles fueron mayores que los del tratamiento testigo, ARG y AVE. Las concentraciones plasmáticas de óxido nítrico antes del desafío fueron superiores en el tratamiento ARG; 12 h después del desafío las concentraciones de los tratamientos suplementados con vitamina C (AVC, AVE y AVEC) fueron significativamente ( $P < 0.05$ ) más altas que el resto de los tratamientos. La actividad de glutatión peroxidasa fue mayor antes y después del desafío, en los tratamientos suplementados con vitamina C. Los tratamientos no tuvieron efecto alguno sobre la cantidad de anticuerpos específicos al virus de la enfermedad del Newcastle. La suplementación de Arginina, vitamina E y C puede ayudar a modular el estrés oxidativo después de un desafío con coccidia.

Palabras Clave: arginina, vitamina E, vitamina C, *Eimeria*, pollo de engorda

## ABSTRACT

### **ARGININE, VITAMINS E AND C ON THE IMMUNE RESPONSE AND OXIDATIVE STRESS OF BROILER CHICKENS CHALLENGED WITH *Eimeria* spp. AND NEWCASTLE DISEASE VIRUS**

**Pablo A. Domínguez Martínez, M.C.**

**Colegio de Postgraduados, 2014**

Oxidation is a major problem associated with pathogen damage. One day-old mixed broilers (Cobb 500; n=624) were randomly assigned to one of six treatments: a basal diet (CTL; 40mg of vitamin E (VE) kg<sup>-1</sup> of feed and 1.5% Arginine (ARG)) or the basal diet plus ARG (ARG; 0.3%), ARG + VE (AVE; 0.3% and 40 mg kg<sup>-1</sup> of feed ), ARG + VC (AVC; 0.3% and 1g kg<sup>-1</sup> of feed), VE + VC (VEC; 40mg + 1g kg<sup>-1</sup> of feed), or ARG + VE + VC (AVEC; 0.3% + 40mg + 1g kg<sup>-1</sup> of feed). At d 14 all birds were orally challenged with 100x the normal dose of Advent<sup>®</sup> cocci-vaccine. Also, at d 28 all birds were vaccinated against Newcastle virus disease. Intestinal lesion scores in duodenum, jejunum and ceca were recorded, along with relative immune system organ weights at d 23. Plasma samples were taken before (2h) and after challenge (12, 24 and 48h) to determine malondialdehyde, nitric oxide and glutathione peroxidase activity. At days 21, 35 and 38 serum samples were taken to determine Newcastle disease virus antibodies. The jejunum LS was lower in the AVC and VEC birds than in CTL birds, whereas ceca LS was highest in AVE birds compared to other treatments, and the duodenum LS was not affected by treatments. Birds fed the AVEC diet had the lowest malondialdehyde levels before challenge, but higher levels of malondialdehyde than birds fed the CTL, ARG or AVE 12h after challenge. Before challenge ARG birds had higher (P< 0.05) nitric oxide levels than AVEC-fed birds, but 12h after challenge birds fed the CTL, ARG or AVE diet had lower

nitric oxide levels than birds fed the AVC, VEC or AVEC diet. Before and after challenge glutathione activity was higher in treatments supplemented with vitamin C. There was no significant effect of dietary treatments on Newcastle disease virus antibodies. Supplementation of ARG, VE, and VC may help modulate the oxidative stress during a coccidiosis challenge.

Key words: arginine, vitamin E, vitamin C, *Eimeria*, broiler

## AGRADECIMIENTOS

La presente tesis se realizó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), en el Colegio de Postgraduados campus Montecillo.

Agradezco al Colegio de Postgraduados y al programa de Ganadería por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

A mi consejero el Dr. Arturo Pro Martínez por su apoyo y consejos durante la realización de este trabajo.

A mis asesores: el Dr. Ciro A. Ruíz Feria, la Dra. Aleida S. Hernández Cazares y el Dr. Carlos Narciso Gaytan, por su invaluable tiempo, consejos y correcciones para la conclusión de este trabajo.

## DEDICATORIAS

A MIS PADRES, HERMANOS Y TODA MI FAMILIA.

A todos ustedes gracias por todos sus consejos, pero sobre todo por su apoyo incondicional durante todo el trayecto de la Maestría, gracias a sus sabias palabras hoy me encuentro terminando un peldaño más en mi formación profesional.



## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT .....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
HIPOTESIS .....	3
OBJETIVOS .....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Coccidiosis .....	4
<i>Ciclo de Vida de la coccidia</i> .....	5
Enfermedad del Virus del Newcastle .....	6
Arginina.....	8
Vitamina E .....	9
Vitamina C .....	10
MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
Desafío y Manejo .....	12
Respuesta Inflamatoria y Estrés Oxidativo .....	13
<i>Oxido Nítrico (ON)</i> .....	13
<i>Malondialdehído (MDA)</i> .....	14
<i>Glutación Peroxidasa (GPx)</i> .....	14
Variables de Inmunidad .....	14
<i>Peso Relativo de los Órganos Inmunológicos (PROI)</i> .....	14
<i>ELISA (IgA)</i> .....	15
<i>ELISA (EVN)</i> .....	15
Lesiones Intestinales .....	16
Análisis Estadísticos.....	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
Respuesta Inflamatoria y Estrés Oxidativo .....	19
Variables de Inmunidad .....	23
Lesiones Intestinales .....	28

CONCLUSIÓN.....	31
LITERATURA CITADA.....	32

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1:</b> Efecto de la dieta en el peso vivo semanal de pollos de engorda, desafiados a los 14 días de edad con <i>Eimeria spp</i>	<b>18</b>
<b>Cuadro 2:</b> Efecto de la dieta sobre los niveles séricos de Inmunoglobulina A (ng/ml) en pollos a los 21 días de edad, desafiados <sup>3</sup> con una mezcla de <i>Eimeria spp.</i> a los 14 días de edad	<b>26</b>
<b>Cuadro 3:</b> Efecto de la dieta sobre los títulos de anticuerpos (Log <sub>10</sub> ) específicos a la Enfermedad del Newcastle, en suero sanguíneo de pollos de engorda	<b>28</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida típico de coccidios del genero <i>Eimeria</i>	<b>5</b>
<b>Figura 2:</b> Concentraciones de Óxido Nítrico ( $\mu\text{M}$ ) en plasma antes (AD) y después del desafío (DD) con <i>Eimeria spp</i>	<b>20</b>
<b>Figura 3:</b> Concentraciones de Malondialdehído ( $\mu\text{M}$ ) en plasma antes (AD) y después de desafío (DD) con <i>Eimeria spp</i>	<b>21</b>
<b>Figura 4:</b> Actividad de Glutación Peroxidasa (nmol/min/ml) en plasma, antes (AD) y después del desafío (DD) con <i>Eimeria spp</i>	<b>23</b>
Peso Relativo (%) de los Órganos Inmunológicos 9 días después del desafío con <i>Eimeria spp</i>	<b>25</b>
<b>Figura 6:</b> Lesiones Intestinales (Duodeno, Yeyuno y Ciego) 9 días después del desafío con <i>Eimeria spp</i>	<b>30</b>

## INTRODUCCIÓN

La coccidiosis en aves es una enfermedad causada por protozoarios del género *Eimeria*. Tradicionalmente la coccidiosis se controla con el uso de coccidiostatos, pero el uso prolongado de estas sustancias ha resultado en la aparición de cepas resistentes a dichos productos (Peek y Landman, 2011). Recientemente, la aplicación de vacunas contra coccidia ha reducido la dependencia de los coccidiostatos para el control de esta enfermedad (Vermeulen et al., 2001; Chapman et al., 2002). Un factor que ha limitado la eficacia de las vacunas es que, hasta ahora, no se ha aislado un antígeno capaz de producir una respuesta inmune que brinde protección suficiente ante una infección con *Eimeria* (Peek y Landman, 2011). La coccidiosis generalmente se asocia con daño a tejidos y estrés oxidativo, debido a la invasión de los esporozoitos en las células epiteliales (Conway y McKenzie, 2007) y a la producción de óxido nítrico (ON) como una respuesta inmune.

La resistencia de los parásitos a los coccidiostatos y la preocupación de los consumidores sobre los efectos de dichas sustancias en la salud humana, han despertado gran interés en la función que pueda jugar la nutrición ante infecciones con *Eimeria* (Allen et al., 1998; Gabriel et al., 2006).

Se ha demostrado que la suplementación de arginina (ARG) y vitamina E, tienen efecto contra las infecciones con coccidia; sin embargo, los resultados no han sido consistentes. Allen (1999), reportó que la suplementación de ARG a gallinas infectadas con *Eimeria* no causó un incremento en los niveles plasmáticos de ON; pero en un estudio realizado posteriormente, las aves que fueron alimentadas con 1.64% de ARG e infectadas con dosis elevadas de *Eimeria* tuvieron los niveles más altos de ON en plasma, lo anterior sugiere una

respuesta inmune con mayor intensidad (Allen y Fetterer, 2000). Colnago et al., (1984) reportaron que 100 UI de VE  $\text{kg}^{-1}$  de alimento, ayudaron al sistema inmune después de una inmunización con *Eimeria* y mejoraron en el peso corporal en comparación con las aves no suplementadas. Allen y Fetterer (2002) reportaron que la suplementación de 100 UI de VE  $\text{kg}^{-1}$  de alimento a gallinas infectadas con *Eimeria maxima* no tuvo efecto sobre el peso vivo o la conversión alimenticia, pero hubo un incremento en la cantidad de ooquistes excretados; además, aves expuestas a una infección severa con la misma especie de *Eimeria* y suplementadas con 200 UI de VE  $\text{kg}^{-1}$  tuvieron pesos corporales menores, sin afectar su conversión o la cantidad de ooquistes excretados. Pérez-Carbajal et al. (2010) reportaron que pollos vacunados contra coccidia y posteriormente desafiados con una mezcla de *Eimerias* mejoraron el estallido respiratorio, tanto de heterófilos y monocitos, aunado a eso, las aves enfrentaron una infección menos severa al consumir un suplemento de 80 UI de VE  $\text{kg}^{-1}$  y 0.3 % de ARG, sugiriendo un efecto aditivo entre ARG y VE.

Por otra parte, los efectos de la vitamina C (VC) en aves con infección de coccidia, no han sido bien documentados. Los pollos de engorda son capaces de sintetizar VC, sin embargo, no son completamente capaces de producir cantidades adecuadas hasta después de los 15 días de edad (Puls, 1994). Por si fuera poco, la cantidad de VC sintetizada por el ave puede ser insuficiente bajo condiciones de estrés (estrés térmico y enfermedades infecciosas). A parte de su función como un antioxidante, la VC ayuda a la resíntesis de la VE mediante la reconversión de la forma oxidada de alfa tocoferol a su forma reducida (Whitehead y Keller, 2003).

## **HIPOTESIS**

La suplementación concurrente de ARG, VE y VC pudieran tener un efecto aditivo o sinérgico, sobre el estatus de antioxidantes, respuesta inmune y desempeño productivo de pollos de engorda criados bajo condiciones comerciales, expuestos a un desafío con *Eimeria* y vacunados contra el virus de la enfermedad del Newcastle.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de este experimento fueron evaluar las variables asociadas con la respuesta del sistema inmune innato, el estatus de antioxidantes inmediatamente después del desafío, respuesta inmune a la vacunación contra el virus de la enfermedad del Newcastle y la respuesta productiva de pollos de engorda alimentados con dietas (libres de coccidiostatos) suplementadas con ARG, VE, VC y sus combinaciones.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Coccidiosis

La coccidiosis en pollos es una enfermedad causada por protozoarios del género *Eimeria*. Esta enfermedad es de importancia universal en la producción avícola. Una infección severa, capaz de producir manifestaciones clínicas es llamada “coccidiosis” y aquellas infecciones de menor severidad (sin manifestaciones clínicas), son llamadas “coccidiasis” (Conway y Mckenzie, 2007).

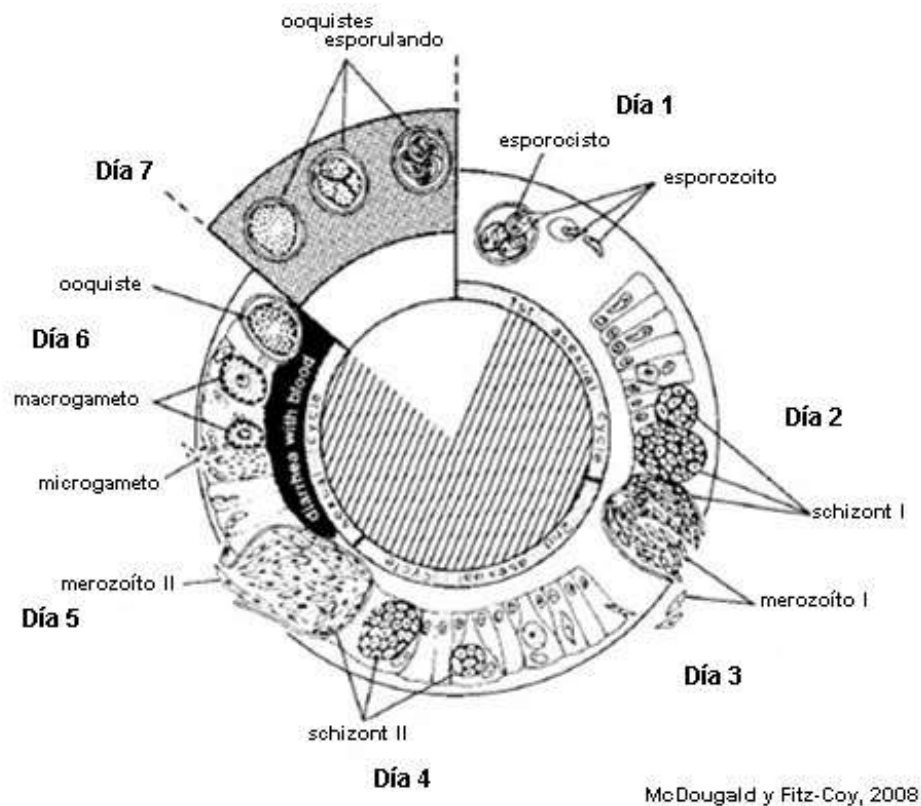
Estos parásitos se multiplican en el sistema digestivo ocasionando daños en el tejido, lo que resulta en la interrupción de los procesos de digestión y absorción de nutrientes. Además, hay pérdida de sangre, deshidratación, disminución en la pigmentación de la piel, y se incrementa la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas.

Como la mayoría de las enfermedades parasitarias, la coccidiosis generalmente es una enfermedad de animales jóvenes, debido a que se desarrolla inmunidad después de haber sido expuesto al parásito. Desafortunadamente no existe inmunidad cruzada entre especies de coccidias, por lo que brotes posteriores, pueden atribuirse a otras especies de *Eimeria* (McDougald y Fitz-Coy, 2008).

El ciclo de vida de los coccidios del género *Eimeria* es corto, además de su potencial reproductivo tan grande en aves de corral, a menudo resulta en brotes severos de la enfermedad, en parvadas de cualquier tamaño.

### Ciclo de Vida de la coccidia

El ciclo de vida de *Eimeria tenella* es típico de todas las especies de *Eimeria*, aunque en algunas varía el número de generaciones asexuales y el tiempo requerido para cada etapa de desarrollo. Después de que la pared del ooquiste es molida en la molleja, se liberan los esporozoitos, quienes son capaces de entrar (inmediatamente) en las células de la mucosa intestinal. Al menos 2 generaciones de esquizogonia (a veces hasta 4 generaciones), dan lugar a la fase sexual, donde los pequeños microgametos buscan y se unen a los macrogametos. El cigoto resultante, madura y se convierte en un ooquiste, el cual es liberado de la mucosa intestinal y desechado en las heces del ave. El ciclo completo generalmente se lleva a cabo en 4 ó 6 días, dependiendo de la especie (Figura 1).



**Figura 1:** Ciclo de vida típico de coccidios del genero *Eimeria*.



## **Enfermedad del Virus del Newcastle**

La importancia económica del virus de la enfermedad del Newcastle es grande a nivel mundial. Hasta antes del brote de influenza H5N1, la enfermedad de Newcastle representaba un gasto en la economía mundial mucho mayor al de cualquier otro virus de interés zootécnico. Para la industria avícola de países en vías de desarrollo, no sólo los brotes de la enfermedad representan pérdidas económicas; también las medidas de control y diagnóstico son fugas constantes de capital. Las pérdidas constantes causadas por la enfermedad de Newcastle tienen gran efecto sobre la cantidad y calidad de la dieta de poblaciones de escasos recursos. Por lo tanto, las pérdidas ocasionadas por el virus de la enfermedad de Newcastle, no deben cuantificarse únicamente en la industria; además, debe tomarse en cuenta el efecto sobre la salud humana y la disminución del potencial de crecimiento socioeconómico (Alexander y Senne, 2008).

El virus de la enfermedad del Newcastle posee una gran variedad de tipos, los cuales a su vez varían enormemente en la severidad de la enfermedad que producen. Esta gran variedad ha ocasionado problemas en la identificación de la enfermedad, por lo que se ha hecho una clasificación de las formas de la enfermedad, basándose en los signos clínicos que ocasiona en las aves (Alexander y Senne, 2008). La clasificación de las formas de la enfermedad es la siguiente:

- Forma de Doyle: es una infección aguda y letal que ataca aves de cualquier edad. Es frecuente encontrar lesiones hemorrágicas del sistema digestivo.

- Forma de Beach: es una infección aguda y a menudo letal que ataca aves de cualquier edad. Síntomas neurológicos y respiratorios caracterizan esta forma.
- Forma de Beaudette: es una infección menos patogénica, en la cual generalmente sólo se observan muertes en aves jóvenes. También hay síntomas neurológicos y respiratorios. Los virus que causan esta forma de la enfermedad han sido utilizados para elaborar vacunas vivas secundarias.
- Forma de Hitchner: es causada por virus de patotipos lentogénicos, generalmente se presentan infecciones respiratorias leves o aparentemente inexistentes. Estos virus se utilizan comúnmente para la fabricación de vacunas.
- Forma entérica-asintomática: esta forma causa principalmente infecciones intestinales, sin síntomas visibles. Algunas de las vacunas de virus vivos usan esta forma.

En pollos y gallinas, la patogenicidad de la enfermedad del Newcastle está determinada principalmente por la cepa del virus; aunque la dosis, vía de administración, edad del ave y el ambiente también tienen efecto. Cabe mencionar que en cuanto más joven sea inoculada el ave, más fuerte será la infección. Al parecer la genética no tiene efecto sobre la susceptibilidad a la enfermedad. La infección vía nasal, ocular o bucal acentúan los síntomas respiratorios.

Se cree que la transmisión de la enfermedad entre aves, normalmente se da mediante la inhalación de aerosoles expulsados por otras aves o mediante la ingestión de partículas contaminadas.

El promedio de incubación del virus es de 5 ó 6 días, aunque hay reportes que indican la aparición de la sintomatología desde los 2 hasta 16 días después de que el ave fue expuesta (Alexander y Senne, 2008). La duración del periodo de incubación se ve influenciada por otros factores como la edad del ave y el ambiente.

### **Arginina**

La Arginina es uno de los aminoácidos más versátiles en las células animales. Funciona como un precursor de proteínas y de óxido nítrico, urea, poliaminas, prolina, glutamato y creatina (Wu y Morris, 1998).

Este aminoácido fue aislado por primera vez de las semillas de lupino en 1886 e identificado como componente de las proteínas animales en 1895. La estructura de la arginina fue establecida mediante la hidrólisis alcalina para producir ornitina y urea y de la síntesis de ornitina-benzoilo. Posteriormente, se demostró que la arginina es necesaria para el crecimiento óptimo de los pollos y de las ratas jóvenes, no así para las ratas adultas sanas. Como resultado de estos hallazgos, se llegó a la clasificación inicial de la arginina como un aminoácido “no esencial” para humanos adultos (en buen estado de salud), pero como esencial para mamíferos jóvenes en crecimiento y carnívoros (Wu y Morris, 1998).

Hubo descubrimientos clave en los que se reportó que la arginina es el precursor para la síntesis de nitritos/nitratos en mamíferos, y que el óxido nítrico es el factor relajante derivado del endotelio. Ahora se sabe que muchos tipos de células utilizan arginina para generar óxido nítrico (Wu y Morris, 1998); el cual es pieza clave en una gran diversidad de procesos (vasodilatación, respuestas inmunes, neurotransmisión y la adhesión de plaquetas y leucocitos).

A raíz de todos estos descubrimientos se ha despertado un gran interés en las funciones que desempeña la arginina en la bioquímica, fisiología y nutrición humana y animal.

## **Vitamina E**

Se clasifica a la vitamina E como un nutriente esencial para todas las especies animales, incluyendo a los humanos. Sin embargo, hay discrepancias en cuanto a bajo qué circunstancias es necesario suplementarla y en que concentración (Combs, 2008).

A diferencia de otras vitaminas, la vitamina E no solo no es tóxica, al parecer puede ser beneficiosa cuando se suplementa en concentraciones considerablemente mayores a aquellas propuestas para prevenir síntomas clínicos de su deficiencia.

En la naturaleza solo las plantas son capaces de sintetizar la vitamina E, por lo tanto, las fuentes importantes para la alimentación humana y animal son los aceites vegetales, semillas y cereales. Hoy en día la vitamina E también se produce de manera sintética.

La función principal de la vitamina E es actuar como un antioxidante. Prácticamente participa en el mantenimiento y protección de todas las membranas celulares del cuerpo. Su función antioxidante involucra la reducción de radicales libres, por lo tanto protege de los daños que éstos pudieran causar (Combs, 2008).

El mantenimiento y protección de las membranas celulares es clave en el funcionamiento del sistema inmunológico, ya que protege a las células del sistema inmune de las especies de oxígeno reactivas (producto de procesos inflamatorios). Esas especies de oxígeno reactivo se producen principalmente por células fagocíticas. Cuando los neutrófilos y macrófagos activados se encuentran o ingieren una bacteria, liberan una gran cantidad de

O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un proceso llamado estallamiento respiratorio. Estas especies reactivas son importantes en el control de patógenos; sin embargo, también pueden ser dañinas para las mismas células inmunológicas si no son controladas. Por lo tanto, es de suma importancia mantener un balance positivo de antioxidantes (vitamina E), mediante la suplementación a niveles superiores a los ingeridos comúnmente en dietas para humanos y animales (Combs, 2008).

### **Vitamina C**

Solo unas cuantas especies requieren de la suplementación de vitamina C, ya que carecen de una enzima para su síntesis. Para la mayoría de las especies, el ácido ascórbico es un metabolito común de la glucosa, pero no es un componente esencial de sus dietas (Combs, 2008). Muchas de sus funciones involucran un sistema de óxido-reducción, que le permiten (junto con la vitamina E) actuar como antioxidantes.

La vitamina C es el antioxidante soluble en agua de mayor abundancia en plasma, tejidos intersticiales y fases solubles de la célula, por lo tanto, actúa como una primer línea de defensa contra las especies reactivas presentes en esos espacios (Combs, 2008).

Se ha descubierto que el ácido ascórbico afecta la función inmune del organismo de distintas maneras (Combs, 2008). Estimula la producción de interferones, la respuesta quimiotáctica y proliferativa de los neutrófilos, evita la inactivación enzimática ocasionada por radicales libres (productos del estallamiento respiratorio).

La suplementación de vitamina C también tiene beneficios bajo condiciones de estrés ambiental, dado que en esas condiciones la demanda metabólica de la vitamina supera la síntesis endógena de la misma. Este es el caso de las aves criadas en sistemas de

producción intensivos. Aunque las aves normalmente no requieren de vitamina C exógena, bajo condiciones de manejo intensivo, claramente se observa un beneficio a raíz de su suplementación (Combs, 2008).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron pollos mixtos (hembras y machos) recién nacidos (Cobb 500; n=624) y fueron asignados al azar a uno de seis tratamientos.

Como testigo se utilizó una dieta base (**T**; 40 mg de VE kg<sup>-1</sup> de alimento y 1.5% de ARG). El segundo tratamiento fue la dieta base + ARG (**ARG**; + 0.3%). El tercero fue la dieta base + ARG + VE (**AVE**; + 0.3% y + 40 mg kg<sup>-1</sup> de alimento). El cuarto tratamiento fue la dieta base + ARG + VC (**AVC**; + 0.3% + 1 g kg<sup>-1</sup> de alimento). El quinto tratamiento fue la dieta base suplementada con VE + VC (**VEC**; + 40 mg + 1 g kg<sup>-1</sup> de alimento). El sexto tratamiento fue la dieta base + ARG + VE + VC (**AVEC**; + 0.3% + 40 mg + 1 g kg<sup>-1</sup> de alimento).

Todas las dietas fueron formuladas para cubrir o exceder las recomendaciones nutricionales del NRC (1994) para pollos de engorda. No se agregaron coccidiostatos ni promotores de crecimiento.

La Arginina fue agregada como L-arginina HCl (Sigma-Aldrich, Milwaukee, MI), la vitamina E se suplementó como  $\alpha$ -tocoferol (Producers Cooperative Association, Bryan, TX) y la vitamina C fue añadida en forma de ácido ascórbico (Rovimix Stay-C 35, DSM Nutritional Products Inc. Freeport, TX).

Los pollos fueron criados bajo una temperatura de inicio de 32° C, la cual fue decreciendo 2° C semanalmente hasta alcanzar los 20° C. Se utilizó un programa de iluminación de 18 horas de luz y 6 horas de obscuridad. Una densidad final de 14 aves/ m<sup>2</sup> fue utilizada en cada uno de los corrales.

### **Desafío y Manejo**

Al día 14 todos los pollitos fueron inoculados oralmente con 100 veces la dosis normal de la vacuna contra coccidia Advent®. Dicha vacuna contiene ooquistes viables de *E. acervulina* (cepa VND-A10), *E. máxima* (cepa VND-M27) y *E. tenella* (cepa VND-T49) (Novus International Inc. St. Louis, MO).

Durante todo el experimento las aves tuvieron libre acceso a alimento y agua. Se obtuvieron pesos vivos y consumos de alimento semanalmente para determinar la conversión alimenticia para cada uno de los tratamientos.

Dos horas antes y 12, 24 y 48 horas después de inocular a los pollos con coccidios, se tomaron 10 pollos al azar de cada tratamiento, para obtener muestras de plasma sanguíneo. Al día 21, 35 y 38 nuevamente se seleccionaron 10 pollos al azar para obtener suero sanguíneo.

A los 28 días de edad todos los pollitos fueron vacunados intraocularmente contra la Enfermedad del Newcastle (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, Iowa). Previamente, a los 21 días de edad (7 días antes de la vacunación) y después a los 35 y 38 días de edad (7 y 10 días después de la vacunación, respectivamente) se colectó suero sanguíneo de 10 pollos por tratamiento para determinar los títulos de anticuerpos específicos al Virus de la Enfermedad del Newcastle. Cabe mencionar que para los análisis relacionados con

Newcastle, se tomó en cuenta otro grupo (testigo negativo; TN ) de pollos de la misma edad que no había sido desafiado con *Eimeria*, pero que habían sido criados bajo las mismas condiciones (luz, temperatura, agua y alimento *ad libitum*) y estuvieron consumiendo la misma dieta que el testigo del estudio.

Para la obtención del plasma sanguíneo, se usaron tubos con EDTA como anticoagulante (BD, Franklin Lakes, NJ). Una vez tomada la muestra, los tubos fueron centrifugados a 1000 veces g durante 10 minutos a 4° C, se colectó el sobre nadante y fue almacenado a -80° C hasta su análisis. Para el suero, se dejó coagular la sangre durante dos horas a temperatura ambiente y después los tubos fueron centrifugados a 1000 veces g durante 10 minutos a 4° C, el sobrenadante fue colectado y almacenado a -80° C hasta su análisis.

## **Respuesta Inflamatoria y Estrés Oxidativo**

### *Oxido Nítrico (ON)*

El plasma sanguíneo tomado 2 horas antes y 12, 24 y 48 horas después del desafío fue utilizado para la determinación de ON a través de sus productos finales *in vivo* Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y fueron utilizadas como se indica en el manual del Kit de Análisis Colorimétrico para Nitrito/Nitrato (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). El kit mide la conversión enzimática de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , seguida de la conversión del  $\text{NO}_2^-$  a un compuesto azo púrpura causado por la adición de los reactivos de Griess. La medición de la absorbancia (a 540 nm) de las muestras permite determinar con gran precisión la concentración total de Nitrito/Nitrato.



### *Malondialdehído (MDA)*

El plasma sanguíneo tomado 2 horas antes y 12, 24 y 48 horas después del desafío fue utilizado para la determinación de las concentraciones de MDA. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se utilizaron como es descrito en el manual del Kit de análisis de TBARS (substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, por sus siglas en inglés) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). El producto de la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico a altas temperaturas (+90° C) y bajo condiciones acidas, fue medido colorimétricamente a una longitud de onda de 535 nm.

### *Glutación Peroxidasa (GPx)*

Las muestras de plasma tomadas 2 horas antes y 12, 24 y 48 horas después del desafío se usaron para determinar la actividad de la GPx. La actividad de la enzima se mide indirectamente por medio de una reacción con la glutación reductasa (GR), usando el Kit de Análisis de Glutación Peroxidasa (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Una reducción del hidroperóxido por la GPx produce glutación oxidado (GSSG), el cual es reducido a su vez por la GR y el NADPH. La oxidación del NADPH produce una reducción en la absorbancia (cuando se mide a 340 nm), esta tasa de reducción es directamente proporcional a la actividad de la GPx en la muestra.

## **Variables de Inmunidad**

### *Peso Relativo de los Órganos Inmunológicos (PROI)*

Doce pollos de cada tratamiento se seleccionaron al azar y fueron sacrificados por hipercapnia a los 23 días de edad, se usaron para determinar el peso relativo de los órganos

inmunológicos (peso relativo = peso del órgano x 1000 / BW). La Bolsa de Fabricio, Bazo y Timo fueron retirados cuidadosamente y liberados de tejido conectivo para pesarse individualmente (peso fresco).

#### *ELISA (IgA)*

Las muestras de suero sanguíneo tomadas en el día 21 (7 días después del desafío) se usaron para la detección de IgA, siguiendo las instrucciones del Kit ELISA para IgA de gallinas (Bethyl Laboratories, Inc. Montgomery, TX). La IgA presente en las muestras se liga a la anti-inmunoglobulina IgA de pollo y después se cataliza una reacción colorimétrica mediante la adición de peroxidasa de rábano y el sustrato TMB (3,3',5,5' – tetrametilbenzidina), se produce un color azul el cual se torna amarillo mediante la adición de ácido sulfúrico diluido para terminar la reacción. La absorbancia a 450 nm es proporcional a la cantidad de IgA presente en las muestras.

#### *ELISA (EVN)*

El suero sanguíneo tomado los días 21, 35 y 38 fue utilizado para la cuantificación de anticuerpos de la Enfermedad del Virus del Newcastle, siguiendo el protocolo del Kit de prueba para anticuerpos de EVN de IDEXX (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME). Los anticuerpos de la EVN forman un complejo con los antígenos con los que previamente se ha recubierto la micro placa. Se añade un conjugado y un sustrato enzimático y la formación de color subsiguiente está relacionada con la cantidad de anticuerpos de la EVN, cuando se lee la absorbancia a 650 nm.

## **Lesiones Intestinales**

Doce pollos por tratamiento fueron sacrificados en el día 23 y fueron utilizados para determinar la severidad de las lesiones intestinales causadas por coccidios. El duodeno, yeyuno y ciegos son los principales sitios de infección de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* (respectivamente). Se utilizó una escala de 0 a 4, en la cual, una puntuación de 0 indica la ausencia de lesiones visibles y una puntuación de 4 representa el mayor grado de lesiones (Johnson y Reid, 1970).

## **Análisis Estadísticos**

Los datos fueron analizados según un diseño completamente al azar, utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS® 9.0 (Cary, NC, 2006). Cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ) se utilizó una prueba de Tukey para separar diferencias entre medias. Los datos de lesiones intestinales se analizaron mediante una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las infecciones con *Eimeria* ocurren cuando un pollo ingiere ooquistes esporulados, tan pronto entran al organismo del ave, se despliega la primera respuesta por parte del sistema inmune innato para intentar detener la invasión. Los ooquistes son triturados en la molleja y se liberan los esporozoitos, los que son capaces de invadir las células del huésped. Entre 12 y 48 horas después de la invasión, los esporozoitos pasan a una etapa de alimentación en la cual se les conoce como trofozoítos (Conway y McKenzie, 2007). Debido al ciclo de vida tan corto y la velocidad con que las coccidias invaden al huésped, aunado a la rapidez con la que el sistema inmune innato responde a la infección; el objetivo de este estudio fue investigar si la suplementación concurrente de ARG, VE y VC por encima de los niveles recomendados (NRC, 1994) tiene algún efecto sobre el estrés oxidativo (MDA), ON, actividad de GPx a partir de las 12 horas post-desafío con *Eimeria spp*, sobre la respuesta productiva e inmunidad del ave (peso relativo de los órganos inmunológicos, IgA y anticuerpos específicos a la enfermedad del virus de Newcastle).

A los 7 días de edad sólo se detectaron diferencias entre las aves del tratamiento VEC y AVE (Cuadro 1), las del grupo VEC fueron más pesadas ( $174\pm 1.9$  g y  $164\pm 2.2$ , respectivamente). El hecho de que los pollos en el tratamiento VEC hayan sido más pesados a los 7 días de edad, quizá se debió a la suplementación de vitamina C, ya que los riñones no sintetizan ácido ascórbico en las cantidades requeridas por el ave, sino, hasta después de los 15 días de edad (Puls, 1994). Después de los 7 días no se observaron diferencias significativas en el peso vivo de las aves, hasta los 42 días de edad (Cuadro 1). Se encontró que los pollos del grupo VEC ( $2,806\pm 74$  g) fueron más pesados que los del grupo AVC ( $2,452\pm 67$  g). Los pollos de 42 días de edad tenían sus riñones completamente

desarrollados y fueron capaces de sintetizar ácido ascórbico en las cantidades requeridas, aunque bajo condiciones de estrés (altas temperaturas, enfermedades infecciosas, etc.) la VC sintetizada por el ave es insuficiente, se ha propuesto que en estos casos, la suplementación de VC ayuda a alcanzar un crecimiento adecuado de las aves aun en condiciones de estrés (Amakye-Anim et al., 2000; Lohakare et al., 2005). Las diferencias encontradas a los 7 y 42 días de edad, pudieran deberse a la suplementación de Arginina. Varios estudios (Fuller et al., 1967; Keshavarz y Fuller, 1971a,b; Chamrupollert et al., 2002) han demostrado que la suplementación de ARG puede reducir el crecimiento, ya que en esas condiciones se utiliza a la metionina como donadora de grupos metilo para la síntesis de creatina, lo que resulta en una menor cantidad de metionina disponible para crecimiento. Sin embargo, la conversión alimenticia y consumo de alimento no se vieron afectados a lo largo del experimento. La mortalidad tampoco se vio afectada por alguno de los tratamientos durante todo el estudio.

**Cuadro 1.** Efecto de la dieta<sup>1</sup> en el peso vivo semanal de pollos de engorda, desafiados<sup>2</sup> a los 14 días de edad con *Eimeria spp.*

Semana	T	ARG	AVE	AVC	VEC	AVEC	EE	P >
1	0.168 <sup>ab</sup>	0.169 <sup>ab</sup>	0.164 <sup>b</sup>	0.169 <sup>ab</sup>	0.174 <sup>a</sup>	0.170 <sup>ab</sup>	0.0017	0.014
2	0.460	0.460	0.450	0.450	0.471	0.446	0.0075	0.218
3	0.722	0.693	0.732	0.640	0.746	0.733	0.0259	0.091
4	1.246	1.245	1.148	1.190	1.312	1.217	0.0375	0.097
5	1.854	1.694	1.875	1.777	2.072	1.863	0.0862	0.107
6	2.537 <sup>ab</sup>	2.662 <sup>ab</sup>	2.596 <sup>ab</sup>	2.452 <sup>b</sup>	2.806 <sup>a</sup>	2.561 <sup>ab</sup>	0.0672	0.029

<sup>a-b</sup>Medias sin superíndice igual son significativamente diferentes (P<0.05). Los valores son el promedio de 10 observaciones.

<sup>1</sup>Se utilizó una dieta base como testigo (**T**; 40 mg de vitamina E kg<sup>-1</sup> de alimento y 1.5% de Arginina), la dieta base más Arginina (**ARG**; +0.3%), dieta base más Arginina + vitamina E (**AVE**; +0.3% y +40mg kg<sup>-1</sup>de alimento), dieta base más Arginina + vitamina C (**AVC**; +0.3% y +1g kg<sup>-1</sup> de alimento), dieta base más vitamina E y C (**VEC**; +40mg y +1g kg<sup>-1</sup> de alimento), y dieta base más Arginina, vitamina E y C (**AVEC**; +0.3%, +40mg y +1g kg<sup>-1</sup> de alimento).

<sup>2</sup>Los pollos fueron desafiados con 100 veces las dosis normal de la vacuna para coccidia Advent® (45x10<sup>4</sup> ooquistes viables). La vacuna contiene un mezcla de *E. tenella*, *E. maxima*, y *E. acervullina*.

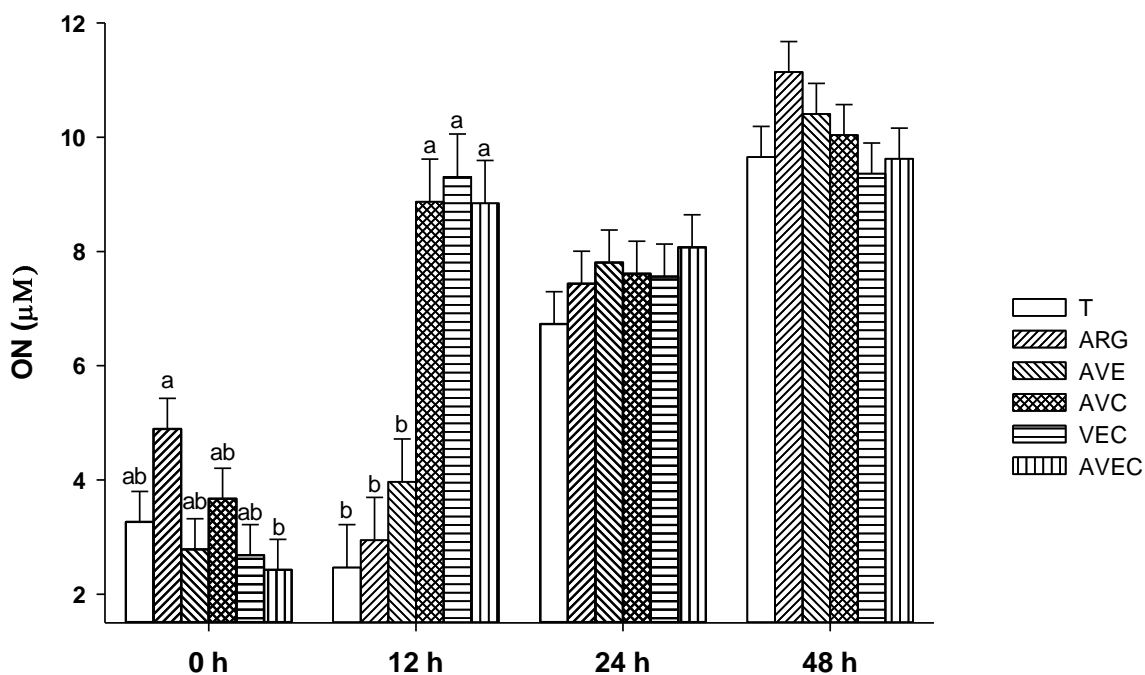
## **Respuesta Inflamatoria y Estrés Oxidativo**

Antes de ser inoculados los pollos con *Eimeria*, los que recibieron la dieta con ARG tuvieron niveles significativamente más altos de ON que los de la dieta AVEC (Figura 2). Doce horas después de la inoculación las muestras de plasma revelaron que los tratamientos suplementados con vitamina C (AVC, VEC y AVEC), tuvieron concentraciones totales de Nitrito/Nitrato considerablemente mayores a las de los grupos T, ARG y AVE (Figura 2). Las concentraciones de ON se mantuvieron altas a las 24 y 48 horas, sin haber diferencias significativas entre tratamientos. El ON es un mediador de inmunidad innata, niveles más altos de ON sugieren una respuesta inmune de mayor intensidad en pollos suplementados con VC. Ruíz-Feria (2009) propuso que la VC puede tener un efecto aditivo en combinación con la arginina y VE, incrementando la bio-disponibilidad del ON. Por otra parte, Lee et al. (2008) reportaron que la VC estimula la actividad de interferón- $\gamma$ , incrementando la cantidad de RNAm para interferón; a través del sistema de NADPH oxidasa, aumentando la producción de ON e incrementando la cantidad de enzimas lisosomales, lo que promueve la destrucción de microorganismos (Schroder et al., 2004).

Los macrófagos de los pollos producen especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden reaccionar con el ON y así producir especies reactivas de nitrógeno (Qureshi, 1998; Flannagan et al., 2009). Una producción excesiva de estas especies reactivas puede causar la oxidación de biomoléculas y daño celular (Kehrer, 1993; Flannagan et al., 2009). La VE puede parar la peroxidación de los lípidos, pero este proceso implica la formación de formas oxidadas de la vitamina, las cuales podrían actuar como agentes pro-oxidantes (Schneider, 2005). El ácido ascórbico también puede formar un radical (ascorbato) y así actuar como un antioxidante por sí mismo; también puede participar en sistema

antioxidante de la VE, convirtiendo las formas oxidadas de la vitamina E nuevamente a  $\alpha$ -tocoferol (Whitehead y Keller, 2003).

**Figura 2:** Concentraciones de Óxido Nítrico ( $\mu\text{M}$ ) en plasma antes (AD) y después del desafío (DD) con *Eimeria spp.*

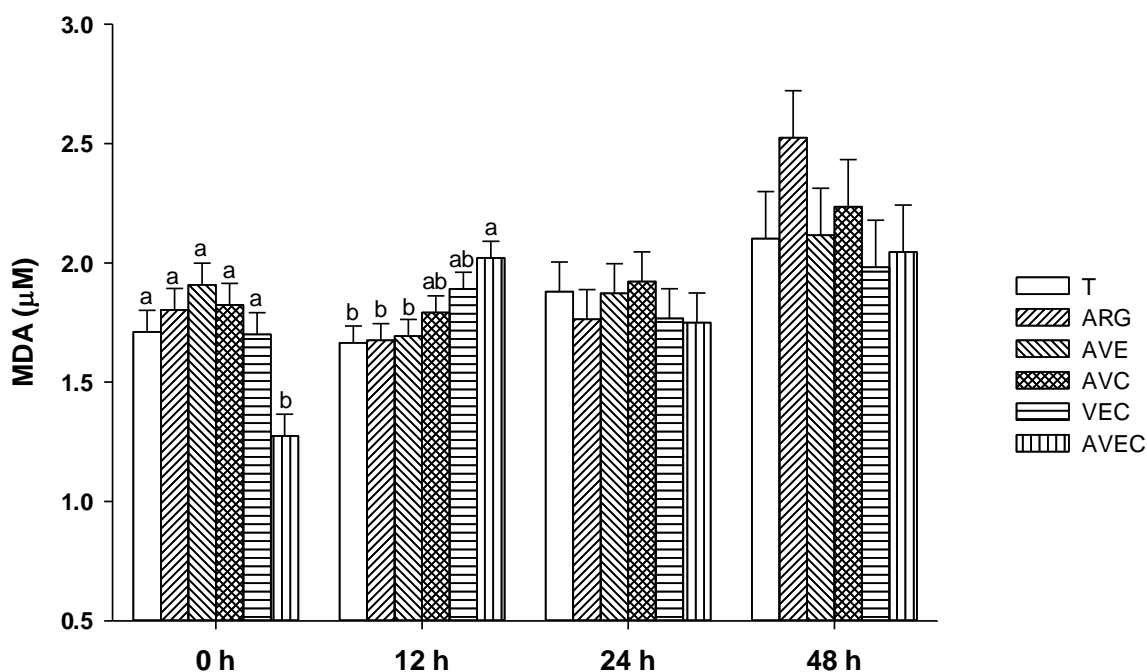


Concentraciones de Óxido Nítrico (ON) en plasma, en pollos de 14 días de edad, antes (AD) y después del desafío (DD; 12h, 24h y 48h) con 100 veces la dosis normal de la vacuna para coccidia Advent® ( $45 \times 10^4$  ooquistes viables de *E. tenella*, *E. maxima* y *E. acervulina*). Se utilizó una dieta basal como testigo (T; 40mg de vitamina E  $\text{kg}^{-1}$  de alimento y 1.5% de Arginina), la dieta basal más Arginina (ARG; +0.3%), dieta base más Arginina + vitamina E (AVE; +0.3% y +40mg  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), dieta base más Arginina + vitamina C (AVC; +0.3% y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), dieta base más vitamina E y C (VEC; +40mg y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), y por último la dieta base más Arginina, vitamina E y C (AVEC; +0.3%, +40mg y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento). Las dietas se formularon para cubrir o exceder los requerimientos, no se agregaron coccidiostatos ni promotores de crecimiento. <sup>a-e</sup> Las barras representan las medias y error estándar de 10 observaciones. Barras sin superíndice en común, son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

El plasma tomado antes de la infección con coccidia, mostró que las concentraciones de MDA eran significativamente menores en pollos que recibieron la dieta AVEC comparado con los cinco tratamientos restantes (Figura 3). Después de doce horas de inoculados, los pollitos del tratamiento AVEC no presentaron diferencias con los tratamientos AVC y VEC, mientras que al comparar con los pollos testigo, ARG y AVE si se encontraron

diferencias (Figura 3). Las muestras tomadas 24 y 48 h después del desafío no mostraron diferencias entre tratamientos. Pollos alimentados con la dieta AVEC tuvieron concentraciones plasmáticas de Nitrito/Nitrato mayores que los T, ARG y AVE (Figura 2), doce horas después de ser infectados con *Eimeria*. Basándose en lo anterior, esa mayor concentración de ON pudo haber causado daño celular, el cual lleva a una producción elevada de MDA; quizá las vitaminas no fueron capaces de eliminar todos los radicales libres e incluso pudieron haber actuado como agentes pro-oxidantes.

**Figura 3:** Concentraciones de Malondialdehído ( $\mu\text{M}$ ) en plasma antes (AD) y después de desafío (DD) con *Eimeria spp.*

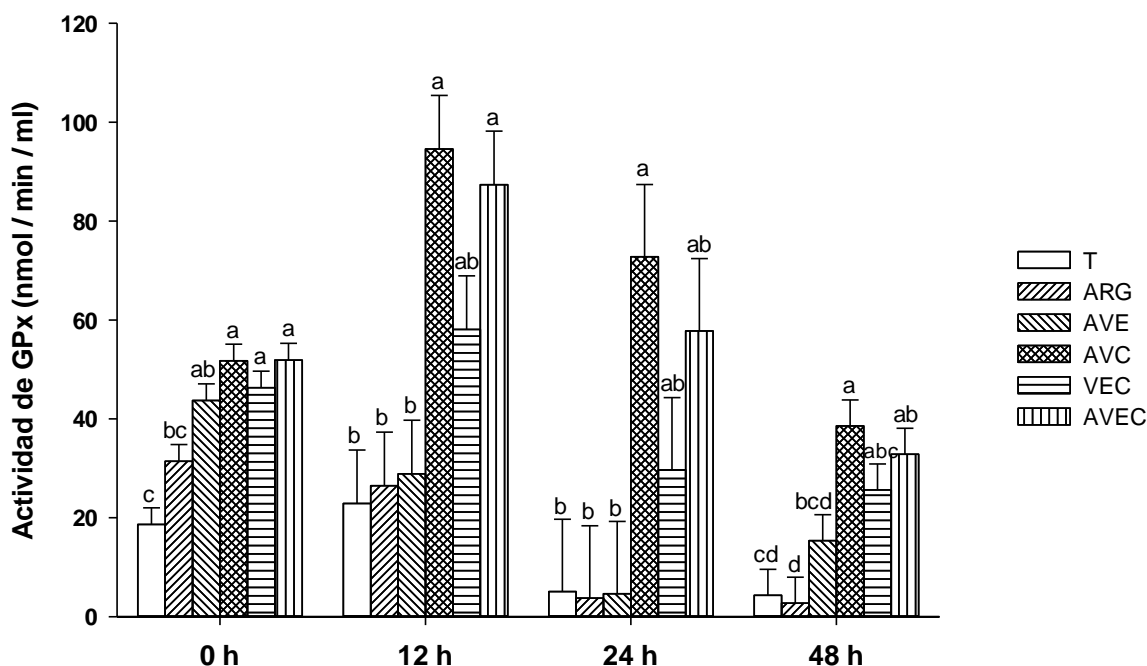


Concentraciones de Malondialdehído (MDA) en plasma, en pollos de 14 días de edad, antes (AD) y después del desafío (DD; 12h, 24h y 48h) con 100 veces la dosis normal de la vacuna para coccidia Advent® ( $45 \times 10^4$  ooquistes viables de *E. tenella*, *E. maxima* y *E. acervulina*). Se utilizó una dieta basal como testigo (T; 40mg de vitamina E  $\text{kg}^{-1}$  de alimento y 1.5% de Arginina), la dieta basal más Arginina (ARG; +0.3%), dieta base más Arginina + vitamina E (AVE; +0.3% y +40mg  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), dieta base más Arginina + vitamina C (AVC; +0.3% y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), dieta base más vitamina E y C (VEC; +40mg y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), y por último la dieta base más Arginina, vitamina E y C (AVEC; +0.3%, +40mg y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento). Las dietas se formularon para cubrir o exceder los requerimientos, no se agregaron coccidiostatos ni promotores de crecimiento. <sup>a-e</sup> Las barras representan las medias y error estándar de 10 observaciones. Barras sin superíndice en común, son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).



La actividad de la GPx (Figura 4) antes del desafío fue mayor en los pollos AVC, VEC y AVEC a comparación a los pollos testigo y ARG, pero no hubo diferencias con los del tratamiento AVE. Los valores para los grupos ARG y AVE no fueron diferentes entre sí. Pollos alimentados con la dieta AVE mostraron una mayor actividad de la GPx que los testigos. Estos resultados sugieren que la suplementación de vitaminas antioxidantes (VE y VC) incrementa la actividad de la GPx cuando las aves no están encarando una infección. Después del desafío (12 h), los pollos de las dietas AVC y AVEC tuvieron mayor actividad que los T, ARG y AVE; no se registraron diferencias al comparar con los pollos de la dieta VEC (Figura 4). GPx tuvo mayor actividad (24 h después del desafío con *Eimeria*) en las aves del grupo AVC comparado con las de los grupos T, ARG y AVE, pero sin diferencias estadísticas con respecto a los tratamientos VEC y AVEC. A las 48 horas post-infección los pollos del tratamiento AVC presentaron la actividad más alta de GPx (Figura 4), este valor sólo fue significativamente mayor al compararlo con los T, ARG y AVE. Koinarski et al., (2005) encontraron que ocho días post- infección con *Eimeria acervulina*, los niveles plasmáticos de VC se redujeron como consecuencia del estrés oxidativo causado por la infección. Aydemir *et al.* (2000) encontraron un incremento en la actividad de la superóxido dismutasa y de GPx de hasta un 20 y 33% respectivamente, al suplementar ácido ascórbico en la dieta. Un estudio llevado a cabo por Wang *et al.* (2011) con patitas Jing-ding, encontraron que suplementar VC en la dieta se incrementa la actividad de GPx y superóxido dismutasa en suero sanguíneo e hígado de las patitas. Nuestros resultados evidencian un incremento significativo en la actividad de GPx, como resultado de la adición de VC (en combinación con ARG, VE o ambas). Posiblemente, estos resultados sean producto de un ahorro de GPx gracias a la acción antioxidante de la vitamina C (y VE, aun a niveles basales en la dieta, 40 mg kg<sup>-1</sup> de alimento).

**Figura 4:** Actividad de Glutación Peroxidasa (nmol/min/ml) en plasma, antes (AD) y después del desafío (DD) con *Eimeria spp.*



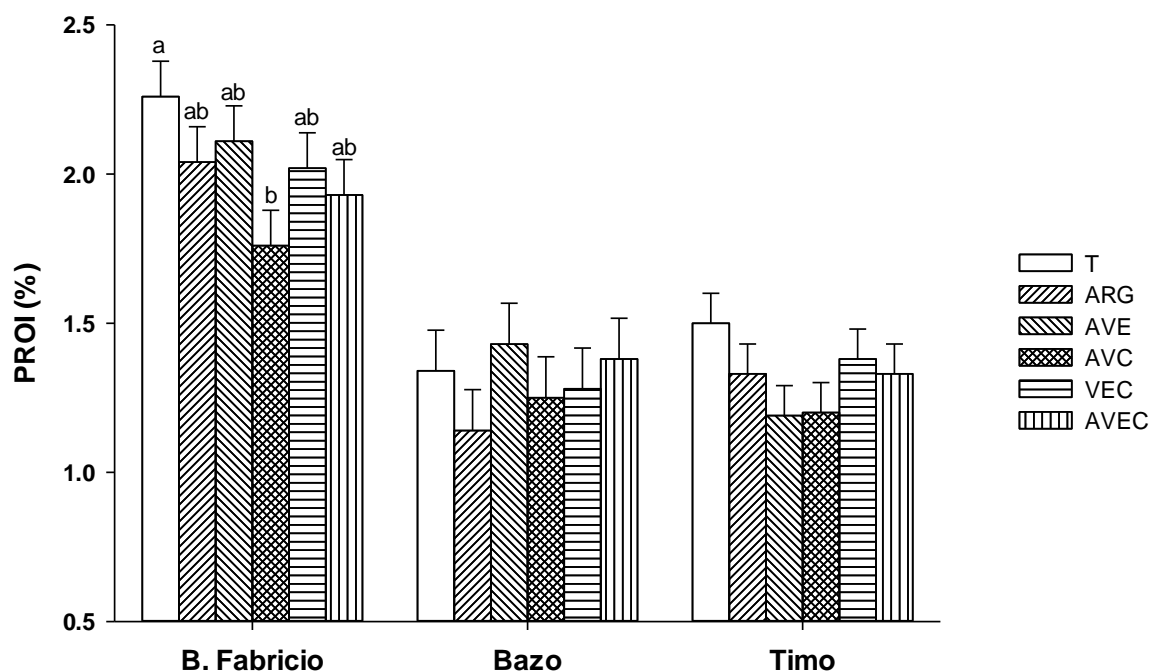
Actividad plasmática de Glutación Peroxidasa (GPx), en pollos de 14 días de edad, antes (AD) y después del desafío (DD; 12h, 24h y 48h) con 100 veces la dosis normal de la vacuna para coccidia Advent® ( $45 \times 10^4$  ooquistes viables de *E. tenella*, *E. maxima* y *E. acervulina*). Se utilizó una dieta basal como testigo (T; 40mg de vitamina E  $\text{kg}^{-1}$  de alimento y 1.5% de Arginina), la dieta basal más Arginina (ARG; +0.3%), dieta base más Arginina + vitamina E (AVE; +0.3% y +40mg  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), dieta base más Arginina + vitamina C (AVC; +0.3% y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), dieta base más vitamina E y C (VEC; +40mg y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), y por último la dieta base más Arginina, vitamina E y C (AVEC; +0.3%, +40mg y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento). Las dietas se formularon para cubrir o exceder los requerimientos, no se agregaron coccidiostatos ni promotores de crecimiento. <sup>a-e</sup> Las barras representan las medias y error estándar de 10 observaciones. Barras sin superíndice en común, son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

### VARIABLES DE INMUNIDAD

El peso relativo de la Bolsa de Fabricio (Figura 5), únicamente mostró diferencias entre los pollos testigo y aquellos alimentados con la dieta AVC, donde las Bolsas fueron más pesadas en el primer grupo de aves. Los pesos del bazo y timo no se vieron afectados por los tratamientos (Figura 5). En trabajos previos no mostraron cambios en el peso relativo de

la Bolsa de Fabricio al suplementar las dietas con ARG (Abdukalykova y Ruíz-Feria, 2006; Ruíz-Feria y Abdukalykova, 2009), pero la adición de 80 mg de VE kg<sup>-1</sup> de alimento tiende a mejorar los pesos de la Bolsa, comparado con niveles de VE más bajos o altos en la dieta. Abou-Zeid *et al.* (1999) reportaron que suplementar 1000 mg de ácido ascórbico kg<sup>-1</sup> de alimento incrementó los índices de la Bolsa de Fabricio y timo, el conteo de células blancas y los títulos de hemaglutinación. Pollos de engorda infectados con el virus de la bursitis infecciosa suplementados con (1000 ppm) de ácido ascórbico tuvieron las Bolsas más livianas, pero las lesiones histopatológicas de mayor severidad en dicho órgano, interesantemente, estas aves no desarrollaron signos clínicos de la enfermedad (Amakye-Anim *et al.*, 2000). Hubo un efecto positivo de ARG y VE sobre los pesos relativos del timo, mientras que el bazo no mostró cambio alguno (Abdukalykova y Ruíz-Feria, 2006; Ruíz Feria y Abdukalykova, 2009). Konjufca y colaboradores (2004) reportaron bazos más pesados en pollos suplementados con VE, pero en el caso del timo no encontraron diferencias significativas.

**Figura 5:** Peso Relativo (%) de los Órganos Inmunológicos 9 días después del desafío con *Eimeria spp.*



Peso Relativo (%) de los Órganos Inmunológicos (Bolsa de Fabricio, Bazo y Timo) en pollos de 23 días de edad, desafiados a los 14 días de edad con 100 veces la dosis normal de la vacuna para coccidia Advent® ( $45 \times 10^4$  ooquistes viables de *E. tenella*, *E. maxima* y *E. acervulina*). Se utilizó una dieta basal como testigo (**T**; 40mg de vitamina E  $\text{kg}^{-1}$  de alimento y 1.5% de Arginina), la dieta basal más Arginina (**ARG**; +0.3%), dieta base más Arginina + vitamina E (**AVE**; +0.3% y +40mg  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), dieta base más Arginina + vitamina C (**AVC**; +0.3% y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), dieta base más vitamina E y C (**VEC**; +40mg y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), y por último la dieta base más Arginina, vitamina E y C (**AVEC**; +0.3%, +40mg y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento). Las dietas se formularon para cubrir o exceder los requerimientos, no se agregaron coccidiostatos ni promotores de crecimiento. El peso relativo de los órganos = peso fresco del órgano  $\times$  1000/peso del pollo. <sup>a-c</sup> Las barras representan las medias y error estándar de 12 observaciones. Barras sin superíndice en común, son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

La Inmunoglobulina A es un anticuerpo con gran presencia en las secreciones corporales, por lo tanto, IgA podría actuar como una primer línea de defensa contra patógenos que pudieran ingresar a través de la mucosa intestinal (Muir et al., 2000; Davison et al., 2008).

La tendencia en los títulos de anticuerpos de IgA se ve reflejada en los títulos de IgA sérico

(Muir et al., 2002). Las muestras de suero tomadas a los 21 días de edad después del desafío con *Eimeria* revelaron que los pollos AVEC tuvieron una mayor concentración de IgA (ng/ml), pero no se encontraron diferencias con el resto de los tratamientos (Cuadro 2). Pérez-Carbajal et al., (2010) no encontraron diferencias en IgA sérico 14 días después de la infección con una mezcla de especies de *Eimeria*, a pesar de los tratamientos dietéticos. Por otra parte, en un estudio realizado por Abdukalykova y Ruíz-Feria (2006) se encontró que niveles de ARG y VE similares a los utilizados en este estudio, podrían tener efectos complementarios en la respuesta inmune, es decir, ARG puede mejorar los efectos de la VE. Patitas suplementadas con 400 y 800 mg de VC kg<sup>-1</sup> de alimento, incrementaron significativamente los títulos de IgM e IgA (sérico), además entre 150 y 800 mg de VC kg<sup>-1</sup> aumentaron los títulos de IgG, al ser comparados con el testigo (Wang et al., 2010).

**Cuadro 2.** Efecto de la dieta<sup>1</sup> sobre los niveles sericos<sup>2</sup> de Inmunoglobulina A (ng/ml) en pollos a los 21 días de edad, desafiados<sup>3</sup> con una mezcla de *Eimeria spp.* a los 14 días de edad.

	CTL	ARG	AVE	AVC	VEC	AVEC	EE	P>
IgA (ng/ml)	0.455	0.434	0.476	0.499	0.453	0.515	0.058	0.933

<sup>a-b</sup>Medias sin superíndice en común son significativamente diferentes. Los valores son el promedio de 10 observaciones.

<sup>1</sup>Se utilizó una dieta basal como testigo (**T**; 40mg de vitamina E kg<sup>-1</sup> de alimento y 1.5% de Arginina), la dieta basal más Arginina (**ARG**; +0.3%), dieta base más Arginina + vitamina E (**AVE**; +0.3% y +40mg/kg de alimento), dieta base más Arginina + vitamina C (**AVC**; +0.3% y +1g kg<sup>-1</sup> de alimento), dieta base más vitamina E y C (**VEC**; +40mg y +1g kg<sup>-1</sup> de alimento), y por último la dieta base más Arginina, vitamina E y C (**AVEC**; +0.3%, +40mg y +1g kg<sup>-1</sup> de alimento).

<sup>2</sup>Las muestras de suero fueron tomadas a los 21 días de edad (7 días después del desafío).

<sup>3</sup>Los pollos fueron desafiados con 100 veces las dosis normal de la vacuna para coccidia Advent® (45 x 10<sup>4</sup> ooquistes viables).La vacuna contiene un mezcla de *E. tenella*, *E. maxima*, y *E. acervullina*.

Los títulos de anticuerpos específicos al virus de la Enfermedad del Newcastle (VEN) de las muestras tomadas siete días antes de la vacunación no mostraron diferencias estadísticas

entre tratamientos (Cuadro 3). Siete y diez días después de la vacunación tampoco se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 3); sin embargo, los títulos fueron un poco más elevados en todos los tratamientos al compararlos con los títulos de las muestras pre-vacunación. Lo anterior sugiere que la vacuna fue aplicada correctamente, ya que hubo un incremento en la cantidad de anticuerpos específicos al VEN. También es posible observar que los pollos usados como testigo negativo (TN) no fueron desafiados con *Eimeria spp.*) mostraron títulos numéricamente más altos pre y pos-vacuna (10 días) que los otros tratamientos, lo que indica que el sistema inmune, de los pollos de los seis grupos restantes, estaba ligeramente deprimido debido a la coccidiosis. Kidd et al. (2001) no encontraron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos de VEN, al suplementar ARG de 90 a 120% las recomendaciones del NRC (1994). Contrario a estos resultados Lin et al., (2003) encontraron que la suplementación de 350 mg kg<sup>-1</sup> de alimento de ácido ascórbico produjo un incremento significativo en los títulos de anticuerpos (VEN) en gallinas vacunadas contra Newcastle. Se produjo el mismo efecto en los títulos de gallinas sin vacunar, al ser suplementadas con 350 ó 1050 mg de ácido ascórbico kg<sup>-1</sup> de alimento. La suplementación de VC no produjo diferencias significativas en la cantidad de anticuerpos de Newcastle a los 14 ó 28 días pos-vacunación en pollos de engorda (Lohakare et al., 2003).

**Cuadro 3.** Efecto de la dieta<sup>1</sup> sobre los títulos de anticuerpos (Log<sub>10</sub>) específicos a la Enfermedad del Newcastle, en suero sanguíneo de pollos de engorda.

	T	ARG	AVE	AVC	VEC	AVEC	TN	EE	P>
AV <sup>2</sup>	1.683	1.640	1.779	1.646	1.875	1.734	2.064	0.117	0.18
DV <sup>2</sup>									
7d	2.980	2.678	2.719	2.681	2.726	2.679	2.749	0.026	0.85
10d	2.978	2.967	2.930	2.928	2.820	3.046	3.122	0.011	0.56

<sup>a-b</sup>Medias sin superíndice en común son significativamente diferentes. Los valores son el promedio de 10 observaciones.

<sup>1</sup>Se utilizó una dieta basal como testigo (**T**; 40mg de vitamina E kg<sup>-1</sup> de alimento y 1.5% de Arginina), la dieta basal más Arginina (**ARG**; +0.3%), dieta base más Arginina + vitamina E (**AVE**; +0.3% y +40mg kg<sup>-1</sup> de alimento), dieta base más Arginina + vitamina C (**AVC**; +0.3% y +1g kg<sup>-1</sup> de alimento), dieta base más vitamina E y C (**VEC**; +40mg y +1g/kg de alimento), y por último la dieta base más Arginina, vitamina E y C (**AVEC**; +0.3%, +40mg y +1g kg<sup>-1</sup> de alimento).

<sup>2</sup>Los pollos fueron vacunados intraocularmente a los 28 días de edad, utilizando una vacuna con virus vivo (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, Iowa) de la Enfermedad del Newcastle. Se tomaron 10 muestras de sangre para obtener suero sanguíneo 7 días antes de la vacuna (AV) y a los 7 y 10 días después de la vacuna (DV).

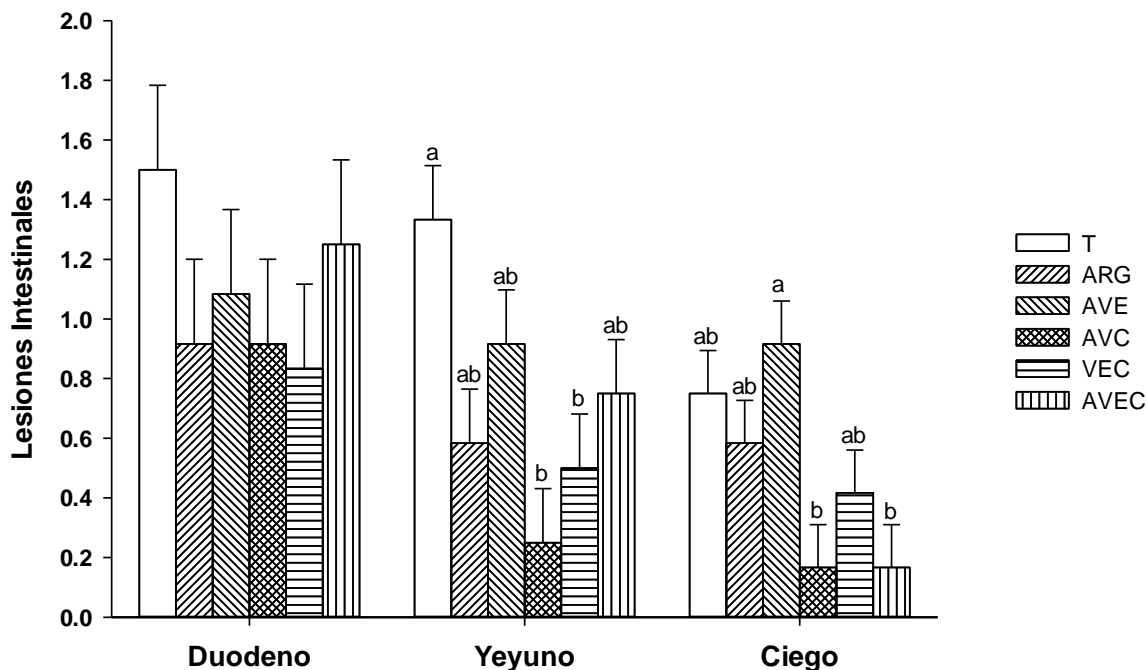
### Lesiones Intestinales

Nueve días después de ser infectados, los pollos no mostraron diferencias significativas en las lesiones del duodeno a pesar de los tratamientos (Figura 6), aunque en los pollos testigo las lesiones fueron numéricamente mayores que el resto de los tratamientos. Las lesiones en el yeyuno, evidenciaron que el grupo testigo tuvo lesiones más severas que aquellos consumiendo la dieta AVC (Figura 6). Nuevamente, los pollos testigo tuvieron lesiones de mayor severidad (numéricamente), en comparación con los cuatro tratamientos restantes (ARG, AVE, VEC y AVEC). Pollos que consumieron la dieta AVE tuvieron las lesiones más notables en el ciego y las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a los tratamientos AVC y AVEC (Figura 6).

Las lesiones en el yeyuno sugieren que la suplementación de ARG, VE y VC pueden aminorar las lesiones en el tejido ocasionadas por una infección de *Eimeria*. Pérez-Carbajal et al., (2010) no encontraron diferencias estadísticas en las lesiones de las tres regiones del intestino a los 7 y 14 días post-infección, en pollos suplementados con diferentes niveles de ARG y VE. A los 17 días (post-infección) las aves que consumieron una dieta alta en ARG (0.6%), tuvieron lesiones menos severas que aquellas que con la dieta con un nivel medio de ARG (0.3%). Allen y Fetterer (2002) infectaron pollos con dos cepas de *Eimeria maxima* y suplementaron sus dietas con diferentes niveles de VE en dos trabajos. Los pollos que estaban enfrentando una infección severa mostraron una tendencia a disminuir las lesiones intestinales a medida que la cantidad de VE suplementada en la dieta incrementaba, aunque sólo hubo diferencias entre los grupos que consumieron 0 y 153 ppm de VE. En el segundo experimento la suplementación de VE no tuvo efecto sobre las lesiones de la región media del intestino (yeyuno).



**Figura 6:** Lesiones Intestinales (Duodeno, Yeyuno y Ciego) 9 días después del desafío con *Eimeria spp.*



Lesiones en Duodeno, Yeyuno y Ciegos de pollos de 23 días de edad, desafiados a los 14 días de edad con 100 veces la dosis normal de la vacuna para coccidia Advent® ( $45 \times 10^4$  ooquistes viables de *E. tenella*, *E. maxima* y *E. acervulina*). Se utilizó una dieta basal como testigo (T; 40mg de vitamina E  $\text{kg}^{-1}$  de alimento y 1.5% de Arginina), la dieta basal más Arginina (ARG; +0.3%), dieta base más Arginina + vitamina E (AVE; +0.3% y +40mg  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), dieta base más Arginina + vitamina C (AVC; +0.3% y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), dieta base más vitamina E y C (VEC; +40mg y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento), y por último la dieta base más Arginina, vitamina E y C (AVEC; +0.3%, +40mg y +1g  $\text{kg}^{-1}$  de alimento). Las dietas se formularon para cubrir o exceder los requerimientos, no se agregaron coccidiostatos ni promotores de crecimiento. <sup>a-c</sup> Las barras representan las medias y error estándar de 12 observaciones. Barras sin superíndice en común, son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Las lesiones se evaluaron utilizando una escala de 0 a 4, descrita por Johnson y Reid (1970). Una puntuación de 0 indica la ausencia de lesiones severas, mientras que una calificación de 4 indica el más alto grado de patogenicidad.

## CONCLUSIÓN

Estos resultados muestran que la suplementación de ARG, VE ó ambas, en combinación con VC produce un incremento en la cantidad de ON plasmático, después de un desafío con *Eimeria*, quizá por una mejor respuesta inmune. La actividad de GPx también se vio favorecida en esos mismos tratamientos (AVC, VEC y AVEC), antes y después del desafío con *Eimeria*, esto sugiere una mejor capacidad antioxidante en los pollos alimentados con estas dietas. Las aves de los tratamientos AVC y VEC tuvieron las lesiones menos severas en yeyuno, mientras que en el ciego las aves de los tratamientos AVC y AVEC fueron las menos afectadas. No hubo efecto de los tratamientos sobre la cantidad de anticuerpos específicos al virus de la enfermedad del Newcastle. Suplementar ARG, VE y VC con niveles superiores a los recomendados por el NRC (1994) puede disminuir los efectos negativos de la coccidiosis e incluso mejorar la respuesta inmune de aves infectadas.

## LITERATURA CITADA

- Abdukalykova, S.T. and C.A. Ruiz-Feria. 2006. Arginine and vitamin E improve cellular and humoral immune response of broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 5:121-127.
- Abou-Zeid, A.E., F.F. Mohamed, y S.B.A. El-Soud. 1999. Impact of vitamin C and/ or zinc supplementation on performance and immunity of broilers. *Egypt. Poult. Sci. J.* 19:635-655.
- Allen, P.C. 1999. Effects of daily oral doses of L-arginine on coccidiosis infections in chickens. *Poult. Sci.* 78:1506-1509.
- Allen, P. C., H. D. Danforth, y C. Augustine. 1998. Dietary modulation of avian coccidiosis. *Int. J. Parasitol.* 8: 1131-1140.
- Allen, P. C., y R. H. Fetterer. 2000. Effect of *Eimeria acervulina* infections on plasma l-arginine. *Poult. Sci.* 79:1414–1417.
- Allen, P.C. y R.H. Fetterer. 2002. Interaction of dietary vitamin E with *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poult. Sci.* 81:41-48.
- Alexander, D.J. y D.A. Senne. 2008. Capítulo 3: Newcastle Disease, other Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. Páginas: 72-100. En: *Diseases of Poultry* 12<sup>th</sup> ed. 2008. Iowa, USA.
- Amakye-Anim, J., T.L. Lin, P.Y. Hester, D. Thiagarajan, B.A. Watkins, y C.C Wu. 2000. Ascorbic acid supplementation improved antibody response to infectious bursal disease vaccination in chickens. *Poult. Sci.* 79:680-688.
- Aydemir, T., R. Ozturk, L.A. Bozkaya, y L. Tarhan. 2000. Effects of antioxidant vitamins A, C, E and trace elements Cu, Se on CuZnSOD, GSH-Px, CAT and LPO levels in chicken erythrocytes. *Cell Biochem. and Func.* 18:109-115.
- Chamruspollert, M., G.M. Pesti and R.I. Bakalli. 2002. Dietary interrelationships among arginine, methionine, and lysine in young broiler chicks. *British J. Nutrition.* 88, 655-660.
- Chapman, H.D., T.E. Cherry, H.D. Danforth, G. Richards, M.W. Shirley y R.B. Williams. 2002. Sustainable coccidiosis control in poultry production: The role of live vaccines. *Int. J. Parasitol.* 32:617-629.

- Combs, G.F. 2008. Capítulo 7: Vitamin E. páginas: 181-212. Capítulo 9: Vitamin C. páginas: 213-232. En: *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. 3ra edición. Elsevier Academic Press.
- Colnago, G. L., L. S. Jansen, y P. L. Long. 1984. Effect of selenium and vitamin E on the development of immunity to coccidiosis in chickens. *Poult. Sci.* 63: 1136-1143.
- Conway, D.P. and M.E. McKenzie. 2007. *Poultry Coccidiosis: Diagnostic and testing Procedures*. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Publishing Professional. Ames, Iowa, USA.
- Davison, F., K.E. Magor, y B. Kaspers. 2008. Structure and evolution of avian immunoglobulins. *Avian Immunology*, pages 107-127, ed. Academic Press, London, UK.
- Flannagan, R.S. G. Cosio, y S. Grinstein. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:355-366.
- Fuller, H.L., S.I. Chang and D.K. Potter. 1967. Detoxification of dietary tannic acid by chicks. *J. Nutrition.* 91, 477-482.
- Gabriel, I., S. Mallet, y M. Leconte. 2006. Effect of whole wheat feeding on the development of coccidial infection in broiler chickens until market-age. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129: 179- 303.
- Johnson, J. y Reid, W.M. 1970. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 28:30-36.
- Keher, J.P. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 23:21-48.
- Keshavarz, K. and H.L. Fuller. 1971a. Relationship of arginine and methionine in the nutrition of the chicks and the significance of creatine biosynthesis in their interaction. *J. Nutrition.* 101, 217-222.
- Keshavarz, K. and H.L. Fuller. 1971b. Relationship of arginine and methionine to creatine formation in chicks. *J. Nutrition.* 101, 855-862.
- Kidd, M.T., E.D. Peebles, S.K. Witmarsh, J.B. Yeatman y R.F. Wideman Jr. 2001. Growth and Immunity of Broiler Chicks as Affected by Dietary Arginine. *Poult. Sci.* 80:1535-1542.
- Koinarski, V., N. Georgieva, V. Gadjeva y P. Petkov. 2005. Antioxidant status of infected broiler chickens, with *Eimeria acervulina*. *Revue Med. Vet.* 10:498-502.

- Konjufca, V.K., W.G. Bottje, T.K. Bersi, y G.F. Erf. 2004. Influence of dietary vitamin E on phagocytic functions of macrophages in broilers. *Poult. Sci.* 83:1530-1534.
- Lee, C.W., X.D. Wang, K.L. Chien, Z. Ge, B.H. Rickman, A.B. Rogers, A. Varro, M.T. Whary, T.C. Wang and J.G. Fox. 2008. Vitamin C supplementation does not protect L-gulono- $\gamma$ -lactone oxidase-deficient mice from *Helicobacter pylori*-induced gastritis and gastric premalignancy. *Int. J. Cancer* 122(5): 1068-1076
- Lin, H., J. Buyse, Q. Sheng, Y. Xie y J. Song. 2003. Effects of ascorbic acid supplementation on the immune function and laying performance of heat-stressed laying hens. *Food, Agriculture & Environment* Vol 1(2):103-107.
- Lohakare, J.D., M.H. Ryu, T.W. Hahn, J.K. Lee y B.J. Chae. 2005. Effects of supplemental ascorbic acid on the performance and immunity of commercial broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 14:10-19.
- McDougald, L.R. y S.H. Fitz-Coy. 2008. Capitulo 20: Protozoal Infections, paginas 1067-1085. En: *Diseases of Poultry* 12<sup>th</sup> ed. 2008. Iowa, USA.
- Muir, W.I., W.L. Byrden, y A.J. Husband. 2000. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. *Develop. Comp. Immun.* 24:325-342.
- Muir, W.I., A.J. Husband, y W.L. Byrden. 2002. Dietary supplementation with vitamin E modulates avian intestinal immunity. *Brit. J. Nutr.* 87:579-585.
- NRC. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9<sup>th</sup> ed. National Academy Press. Washington, DC.
- Peek, H.W. y W.J.M. Landman. 2011. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet. Qtrly.* 31:3, 143-161.
- Perez-Carbajal, C., Caldwell, D., Farnell, M., Stringfellow, K., Pohl, S., Casco, G., Pro-Martinez, A. & Ruiz-Feria, C. A. 2010. Immune response of broiler chickens fed different levels of arginine and vitamin E to a coccidiosis vaccine and *Eimeria* challenge. *Poult. Sci.* 89:1870–1877.
- Puls, R. 1994. *Vitamin levels in animal health. Diagnostic Data and Bibliographies*. Sherpa International, Clearbook, BC, Canada.
- Qureshi, M.A. 1998. Role of macrophages in avian health and disease. *Poult. Sci.* 77:978-982.
- Ruiz-Feria, C.A. 2009. Concurrent supplementation of arginine, vitamin E, and vitamin C improve cardiopulmonary performance in broiler chickens. *Poult. Sci.* 88:526-535.

- Ruiz-Feria, C.A. y S.T. Abdukalykova. 2009. Arginine and Vitamin E improve the antibody responses to infectious bursal disease virus (IBDV) and sheep red blood cells in broiler chickens. *Brit. Poult. Sci.* 50:3, 291-297.
- Schneider, C. 2005. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.* 49:7-30.
- Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi and D.A. Hume. 2004. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163-189.
- Vermeulen, A.N., D.C. Schaap, y T.P. Schetters. 2001. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Vet. Parasitol.* 100:13-20.
- Wang, A., F. Xie, Y.H. Wang y J.L. Wu. 2010. Effects of vitamin C supplementation on growth performance and antioxidant status of layer ducklings. *J. Anim. Physiol. and Anim. Nutr.* 95:533-539.
- Whitehead. C.C. y T. Keller. 2003. An update on ascorbic acid in poultry. *W. Poult. Sci. J.* 59:161-184.
- Wu, G. y S.M. Morris. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336: 1-17.