

# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE POLLOS DE  
ENGORDA MEDIANTE DIETAS SUPLEMENTADAS CON ARGININA,  
VITAMINA E Y MANANO-OLIGOSACÁRIDOS**

CHAN DÍAZ DAVID JESÚS

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO


2012

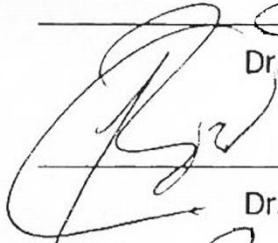
**MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE POLLOS DE  
ENGORDA MEDIANTE DIETAS SUPLEMENTADAS CON  
ARGININA, VITAMINA E Y MANANO-OLIGOSACÁRIDOS**

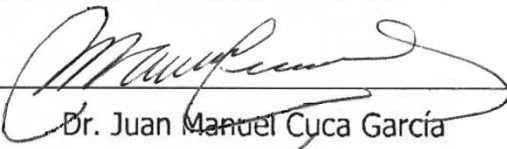
La presente tesis, titulada: **Modulación de la respuesta inmune de pollos de engorda mediante dietas suplementadas con arginina, vitamina E y manano-oligosacáridos**, realizada por el alumno: **David Jesús Chan Díaz** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

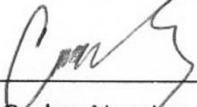
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**  
**GANADERÍA**

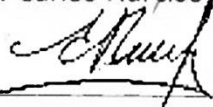
**CONSEJO PARTICULAR**


CONSEJERO:   
Dr. Arturo Pro Martínez

DIRECTOR DE TESIS:   
Dr. Ciro Abel Ruíz Feria

ASESOR:   
Dr. Juan Manuel Cuca García

ASESOR:   
Dr. Carlos Narciso Gaytán

ASESOR:   
Dra. Martha Elva Ramírez Guzmán

ASESOR:   
Dr. Jaime Gailegos Sánchez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero de 2012

# MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE POLLOS DE ENGORDA MEDIANTE DIETAS SUPLEMENTADAS CON ARGININA, VITAMINA E Y MANANO-OLIGOSACÁRIDOS

David Jesús Chan Díaz, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2012

Se realizaron dos experimentos para evaluar dietas suplementadas con arginina (ARG), vitamina E (VE) y manano-oligosacáridos (MOS) en la inmunidad de pollos. En el primero, 700 pollos (1 día de edad), fueron divididos en 28 grupos y recibieron una de cuatro dietas: T1 = 1.31 % ARG y 10 mg de VE/kg; T2 = T1 + 0.3% de ARG; T3 = T1 + 70 mg de VE y T4 = T1 + 0.3 % ARG + 70 mg de VE. A los 12 días de edad, recibieron las vacunas contra Newcastle (EN), bronquitis, influenza (IA) y viruela; las variables evaluadas fueron la reacción postvacunal y la respuesta inmune. En el segundo experimento, 200 pollos (1 día de edad) fueron divididos en ocho tratamientos con arreglo factorial 2 x 4, los factores fueron: La vacuna contra coccidiosis (aplicada o no), y cuatro dietas: dieta testigo (1.4 % de ARG + 40 mg de VE/kg), dieta AVE (testigo + 0.3 % de ARG + 40 mg de VE), dieta MOS (testigo + 0.2 % de MOS) y dieta AEM (testigo + 0.3 % de ARG + 40 mg de VE + 0.2% de MOS). A los 24 días de edad, todos los pollos fueron inoculados con 200,000 ovoquistes de *Eimeria* spp. Las variables evaluadas fueron: la inflamación y el daño asociado a la coccidiosis. En el experimento uno, se encontró que la suplementación de ARG y VE reducen la reacción postvacunal y mejoran la respuesta inmune; mientras que, en el segundo experimento, se encontró que pollos alimentados con dietas suplementadas con ARG, VE y MOS tuvieron una menor inflamación y daño por coccidiosis, de manera dependiente a la vacuna. En conclusión, la suplementación de ARG, VE y MOS en dietas de pollos de engorda modulan la respuesta inmune.

**Palabras clave:** inmunidad, arginina, vitamina E, MOS, pollos de engorda.

# IMMUNE RESPONSE MODULATION IN BROILER CHICKENS BY ARGININE, VITAMIN E AND MANNANOLIGOSACCHARIDES SUPPLEMENTED DIETS

David Jesús Chan Díaz, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2012

Two trials were performed to evaluate arginine (ARG), vitamin E (VE) and mannanoligosaccharides (MOS) supplemented diets on broiler chickens immunity. In the first experiment, 700 chicks (1 day old) were divided into 28 pens and fed one of four diets: T1 = 1.31% of ARG and 10 mg of VE/kg; T2 = T1 + 0.3% of ARG; T3 = T1 + 70 mg of VE and T4 = T1 + 0.3% of ARG + 70 mg of VE. At 12 days old, all chickens were vaccinated against Newcastle disease, infectious bronchitis, avian influenza and fowl pox; the traits evaluated were: the postvaccinal reaction and the immune response. In the second trial, 200 chicks (1 day old) were divided into eight treatment with factorial arrangement 2 x 4, the factors were: vaccine against coccidiosis (vaccinated or not) and four diets: control (1.4 % of ARG + 40 mg of VE), AVE diet (control + 0.3% of ARG and 40 mg of VE), MOS diet (control + 0.2% of MOS) and AEM diet (control + 0.3% of ARG + 40 mg of VE + 0.2% of MOS). At 24 days old, all chickens were inoculated with 20,000 oocysts *Eimeria* spp. The traits evaluated were: the inflammation and the damage associated to coccidiosis. In the experiment one, it was founded that ARG and VE decreased the postvaccinal reaction and improve the immune response; meanwhile, chickens fed ARG, VE and MOS supplemented diets had lessened inflammation and the damaged associated to coccidiosis, in a dependent way to vaccine. It is concluded that, ARG, VE and MOS supplementation in broiler chickens diets can modulate the immune response.

**Keywords:** immunity, arginine, vitamin E, MOS, broiler chickens.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Florencio Chan Ventura y Rosario del Socorro Díaz Ek, por inculcarme los valores familiares.

A mis hermanos Wilberth Florencio y Candelaria del Rosario por el cariño incondicional que me brindan.

A mi esposa Coyolxauhqui y a Ameyali por su cariño, amor y paciencia.

A toda la familia Chan Ventura y Díaz Ek, que con sus enseñanzas me ayudaron a salir adelante.

A todos mis amigos de Chapingo, del Colegio de Postgraduados, y a mis amigos de Atlatongo, Teotihuacan, a Armando Cruz, Don Jacobo y sus familiares.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al pueblo de México, que por medio de su pago de impuestos, han financiado mi formación académica, a través, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Arturo Pro Martínez por sus atinados consejos durante mi formación profesional. Pero sobre todo, por la confianza que ha depositado en mí, ya que gracias a sus enseñanzas me ha ayudado a superarme como persona.

Al Dr. Ciro Abel Ruíz Feria, por haberme invitado a participar en su equipo de trabajo, a través, de la estancia de investigación realizada en el departamento de avicultura en la universidad de Texas A&M.

Al Dr. Manuel Cuca García, por compartirme sus experiencias, a través, de sus enseñanzas académicas.

Al Dr. Jaime Gallegos, por sus comentarios para la mejora de este escrito.

Al Dr. Carlos Narciso Gaytán, por su apoyo brindado en la mejora de la redacción de esta tesis, así como por hacerme participe en sus proyectos de investigación.

A la Dra. Martha Elva Ramírez Guzmán, por su colaboración en el análisis estadístico de esta tesis.

Al Dr. Víctor Valdés Narváez, por sus observaciones sobre este escrito.

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
1. Planteamiento del problema.....	5
2. Objetivos.....	6
2.1 General.....	6
2.2 Específicos.....	6
3. Hipótesis.....	7
4. Revisión de literatura.....	8
4.1 La inmunidad en las aves.....	8
4.2 Inmunidad innata.....	9
4.2.1 Barreras físicas o constitutivas.....	10
4.2.2 Respuestas químicas.....	11
4.2.2.1 Fase de respuesta aguda a las infecciones.....	11
4.2.2.2 Proteínas de la fase aguda (PFA).....	12
4.3 Inmunidad adquirida.....	13
4.3.1 Inmunidad humoral.....	14
4.3.1.1 Tipos de inmunoglobulinas.....	16
4.3.2 Inmunidad celular.....	18
4.4 Inmunodepresión.....	21
4.5 Interrelaciones entre nutrición e inmunidad.....	23
4.5.1 Formas de regular la inmunidad por los nutrientes.....	24
4.5.2 Periodos críticos de requerimientos de nutrientes del sistema inmune...	26
5. Literatura citada.....	29
<b>CAPITULO I. EFFECTS OF ARGININE AND VITAMIN E SUPPLEMENTED DIETS ON THE IMMUNOLOGICAL RESPONSE OF BROILERS CHICKENS</b> .....	32
1.1 Introduction.....	34
1.2 Material and methods.....	36
1.3 Results and discussion.....	40
1.4 Conclusions.....	46
1.5 References.....	47



**CAPITULO II. EFFECTS OF ARGININE, VITAMIN E, AND  
MANNANOLIGOSACCHARIDES ON INFLAMMATION, IMMUNE RESPONSE  
AND OOCYST SHEDDING AFTER A CHALLENGE WITH EIMERIA**

<b>SPP</b> .....	51
2.1 Introduction.....	53
2.2 Material and Methods.....	55
2.3 Results.....	61
2.4 Discussion.....	67
2.5 References.....	74
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES</b> .....	78
1. Conclusiones.....	78
2. Recomendaciones.....	78

## ÍNDICE DE CUADROS

Table 1. Control diet composition and nutrient content.....	37
Table 2. Percentage of respiratory noise (RN), sudden movements of head (SMH) and tearing (TE).....	41
Table 3. Antibody titers (Log2) against Newcastle disease (ND) and Avian Influenza (AI).....	43
Table 4. Effects of diet, vaccination, and their interactions on plasma concentration of malondialdehyde (MDA, $\mu\text{mol} / \text{L}$ ), nitric oxide (NO, $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) and ovotransferrin (OVT, Log10 ng / mL) in broilers chickens before and after a challenged with a field mix of <i>Eimeria</i> spp.....	61
Table 5. Effects of diet, vaccination, and their interactions on intestinal lesion score and oocyst shedding (Log 10 / g of feces) in broilers chickens challenged at d 24 with a field mix of <i>Eimeria</i> spp.....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 1. Plasma malondialdehyde (MDA) concentration at 28 d-old of broilers chickens challenged at 24 d-old with a mix field inoculums $2 \times 10^5$ oocysts of <i>Eimeria</i> spp. ( <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> and <i>E. tenella</i> ).....	62
Figure 2. Plasma nitric oxide concentration ( $\mu$ mol / L) in 15 d-old of broiler chickens challenged at 24 d-old with a mix field inoculums $2 \times 10^5$ oocysts of <i>Eimeria</i> spp. ( <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> and <i>E. tenella</i> ).....	63
Figure 3. Thymus weight at 30 d-old of broiler chickens challenged at 24 d-old with a mix field inoculums $2 \times 10^5$ oocysts of <i>Eimeria</i> spp. ( <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> and <i>E. tenella</i> ).....	64
Figure 4. Lesion score in the upper intestine area at 30 d-old of broiler chickens challenged at 24 d-old with a mix field inoculums $2 \times 10^5$ oocysts of <i>Eimeria</i> spp. ( <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> and <i>E. tenella</i> ).....	65
Figure 5. Oocysts shedding in the feces at d 31 of broiler chickens challenged at 24 d-old with a mix field inoculums $2 \times 10^5$ oocysts of <i>Eimeria</i> spp. ( <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> and <i>E. tenella</i> ).....	67

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

La producción avícola en México es de gran importancia, no sólo por el número de empleos directos e indirectos que genera (1'153,000 UNA, 2010), sino también, porque aporta proteínas de origen animal (carne y huevo) más baratas. Por ejemplo, para el año 2012 el salario mínimo establecido en la zona "C" (la zona más baja) es de \$59.08 ([www.sat.gob.mx](http://www.sat.gob.mx)) y el precio promedio reportado en enero del 2012 para el huevo, carne de pollo, cerdo y res fueron de: 19.5, 26.5, 38.5 y 44.5 \$/kg, respectivamente ([www.economia-sniim.gob.mx](http://www.economia-sniim.gob.mx)). Es decir, una persona que vive en la zona "C" y gana el salario mínimo, podría adquirir 3.0, 2.2, 1.5 o 1.3 kg de alguno de estos productos, respectivamente.

El hecho de que los productos avícolas sean los más baratos, explica parcialmente su alta demanda. El consumo anual por persona reportado para huevo y carne de pollo es 23 y 26 kg, respectivamente (UNA, 2010). Es por ello que México está posicionado en los primeros lugares a nivel mundial, tanto en consumo, como en producción de carne y huevo. Sin embargo, esta alta productividad, demanda también sistemas de producción eficientes, para ello la nutrición tiene una función fundamental, dado que representa entre 60-80 % del costo total, y porque las funciones bioquímicas y fisiológicas de las aves para mantenimiento, producción (incluyendo reproducción) e inmunidad son dependientes del estado nutricional de las aves (Cuca *et al.*, 2010).

El objetivo en la producción avícola es obtener un máximo beneficio económico, a través, de parvadas saludables y con una conversión alimenticia acorde al potencial genético. Para lograrlo, es necesario una serie de medidas como: un estricto control de enfermedades (a través de extensos programas de vacunación), programas adecuados de manejo (incluyendo medidas de bioseguridad) y buenos programas nutricionales. Estas medidas, están relacionadas con la habilidad del pollo para establecer una óptima respuesta inmune. Sin embargo, en los sistemas de producción de pollo de engorda, éstos están expuestos a diversos factores estresantes que reducen su potencial genético y nutricional para una producción eficiente (Hoerr, 2010). Un efecto de estos factores estresantes es la inmunodepresión, la cual, como su nombre lo indica, es el estado de depresión temporal o permanente del sistema inmune. Durante la inmunodepresión, en los pollos, se incrementa la susceptibilidad a enfermedades virales, bacterianas y parasitarias, además, hay interferencia con la inmunidad adquirida mediante la vacunación (Hoerr, 2010).

Por ello, en las aves es importante evitar los estados de inmunodepresión, para que durante la exposición a algún patógeno tengan una respuesta inmune lo suficientemente alta para combatirlos, pero no excesiva o prolongada. Porque, mantener una respuesta inmune, ya sea innata o adquirida, es metabólicamente costosa, dado que induce anorexia, catabolismo del musculo, y cambios en el uso de nutrimentos para crecimiento hacia síntesis de proteínas hepáticas (fase de respuesta aguda) y hacia las células inmunitarias para su proliferación (Klasing y Korver, 1997; Humphrey y Klasing, 2004; Le Floc'h *et al.*, 2004;).

Dos nutrimentos con funciones reguladoras del sistema inmune, que podrían resolver esta situación son arginina y vitamina E.

La arginina, es un aminoácido esencial para aves, es importante para la síntesis de proteínas y diversas funciones metabólicas, y es el único sustrato para la síntesis de óxido nítrico (NO), el cual, entre otras funciones, sirve para destruir a los microorganismos fagocitados por las células del sistema inmune (Fernandes y Murakami, 2010). Por lo que, durante la activación de la inmunidad innata la demanda de arginina para síntesis de NO se incrementa haciéndola indisponible para síntesis de proteína para crecimiento.

La vitamina E es un antioxidante y sirve para contrarrestar el daño potencial a las células y tejidos del sistema inmune durante el estrés oxidativo (Le Floc'h *et al.*, 2004). Además, se ha reportado que la suplementación de vitamina E reduce el proceso de heterofilia durante la inflamación, ya que los heterófilos, a través de la secreción del contenido de sus gránulos, pueden causar daño en el tejido cercano (Harmon, 1998; Leshchinsky y Klasing, 2003).

El uso de prebióticos como los manano-oligosacáridos, favorece el crecimiento de bacterias benéficas sobre las patógenas y modulan el tejido linfoide asociado a los intestinos, mejorando la salud intestinal e incrementando la respuesta inmune sistémica a ciertos patógenos (Ewing, 2008).

Estudios previos, indican que la suplementación de arginina y vitamina E tiene funciones complementarias en la respuesta inmune de aves sometidas a desafíos virales (vacuna contra bursitis infecciosa), parasitarios (vacuna e infección contra *Eimeria spp.*) y metabólicos (hipertensión pulmonar; Lorenzoni

y Ruiz-Feria, 2006; Abdukalykova *et al.*, 2008; Bautista-Ortega y Ruiz-Feria, 2010; Pérez-Carbajal *et al.*, 2010). También, se ha reportado que en pollos alimentados con manano-oligosacáridos se incrementa la población de bacterias benéficas (bifidobacterias) en el ciego, se incrementa la altura de las vellosidades intestinales y el número de células Goblet en el yeyuno, así mismo, se reduce la población de *Escherichia coli* en la cama (Barhuoo *et al.*, 2007).

## **1. Planteamiento del problema**

El uso de nutrimentos moduladores y prebióticos en pollos de engorda, podrían ayudar en primer lugar, obtener pollos con una buena salud intestinal y que puedan tener una respuesta inmune ante patógenos, lo suficientemente fuerte para destruirlos; pero, sin causar daño celular oxidativo al tejido propio, ni reducir la eficiencia en el uso de nutrientes para crecimiento. En segundo lugar, podrían ayudar a eliminar el uso de antibióticos promotores del crecimiento en las aves, dado que existe preocupación por parte de las instituciones de salud, de que se puedan transferir bacterias resistentes a antibióticos, a través de la carne de pollo, hacia los consumidores finales, o indirectamente a través de la contaminación del suelo usado para cultivos agrícolas con excretas o cama, o ambos, que contengan patógenos resistentes a antibióticos.



## **2. Objetivos**

### **2.1 General**

Evaluar la respuesta inmune de pollos de engorda alimentados con dietas suplementadas con arginina, vitamina E y manano-oligosacáridos (MOS).

### **2.2 Específicos**

- 2.2.1 Evaluar el efecto de dietas suplementadas con arginina, vitamina E o ambos, en la respuesta inmune de pollos de engorda sometidos a un estímulo inmunológico (vacunados el mismo día, 12 días de edad, contra la enfermedad de Newcastle -virus vivo y atenuado-, influenza aviar, bronquitis infecciosa y viruela). Se evaluó la reacción postvacunal, a través, de la presencia de ruidos respiratorios, movimientos bruscos de cabeza y lagrimeo; el título de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle e influenza aviar; el peso de los órganos linfoides y las variables productivas.
- 2.2.2 Determinar el efecto de la suplementación de dietas con arginina y vitamina E (de manera conjunta), o MOS, o ambos, en la respuesta inmune de pollos de engorda no vacunados y vacunados contra coccidiosis, y posteriormente infectados con una combinación de ovoquistes de *Eimeria maxima*, *E. acervulina* y *E. tenella*. Las variables de respuesta evaluadas fueron: las concentraciones plasmáticas de malondialdehído, óxido nítrico y ovotransferrina, la respuesta inmune (peso de los órganos linfoides -bolsa de Fabricio, timo y bazo-, y la concentración plasmática de Inmunoglobulina G) y la severidad de la

coccidiosis (índice de lesiones intestinales y conteo de ovoquistes en heces).

### **3. Hipótesis**

**3.1** La adición de arginina y vitamina E en dietas de pollo de engorda no afecta la respuesta inmunológica de pollos de engorda sometidos a un estímulo inmunológico.

**3.2** La adición de arginina, vitamina E y manano-oligosacáridos en dietas de pollos de engorda no regula la respuesta inmune, durante la presentación de coccidiosis.

## **4. Revisión de literatura**

### **4.1. La inmunidad en las aves**

El sistema inmune de las aves funciona, de manera general, igual que el de los mamíferos, y podría definirse como la resistencia de las aves a agentes potencialmente dañinos (parásitos, bacterias, virus, toxinas), incluso de alguna anormalidad en las propias células (neoplasia). Una característica de la inmunidad es la inmunocompetencia, es decir, la habilidad del organismo para distinguir agentes extraños y neutralizarlos o eliminarlos, a través, de la respuesta inmune. El sistema inmune, puede dividirse en tres componentes: la inmunidad innata, la inmunidad regulada por células y la inmunidad humoral (Sharma, 1991; Grist, 2006).

La respuesta inmune innata, involucra el reconocimiento no específico, enlace, internalización y destrucción del material extraño por células fagocitarias. La respuesta inmune humoral o adaptativa, involucra la producción de anticuerpos específicos (por ejemplo: inmunoglobulinas) por las células B, en contra de antígenos asociados con la infección patogénica, ésta respuesta mejora con la exposición repetida a los patógenos específicos. Finalmente, la respuesta inmune celular, es regulada por los linfocitos T (células T), los cuales, también regulan la función de los linfocitos B (células B) y la fagocitosis, y destruyen las células infectadas a través de interacciones con los antígenos presentes en la superficie de estas células (Salvante, 2006).

En las aves, cuando se reconoce algún agente infeccioso, se inicia una respuesta inmunológica que involucra la cooperación de los tres componentes

de la inmunidad. Por ejemplo, los macrófagos procesan el antígeno y lo presentan a los linfocitos B y T. Los linfocitos B, las principales células que regulan la inmunidad humoral, se transforman en células plasmáticas y producen anticuerpos; mientras que, los linfocitos T, se diferencian en diversas sub-poblaciones funcionales. Entonces, la activación y duración de la respuesta inmune de las aves es completamente dependiente de las interrelaciones entre la inmunidad innata y la adquirida (humoral y celular), y está muy regulada, por lo que, una ruptura en este proceso podría resultar en inmunodepresión (Sharma, 1991; Bayne, 2003 y Grist, 2006).

#### **4.2. Inmunidad innata**

La inmunidad innata es la primera línea de defensa, es un mecanismo no específico inherente en las aves para resistir enfermedades, y es activado inmediatamente al reconocerse algún material como extraño, e incluye, entre otros procesos, fagocitosis y lisis. Además, de comenzar la destrucción de los patógenos, la respuesta inmune innata inicia una serie de eventos; por ejemplo, el reclutamiento de varios componentes inmunes, así como, la inducción y modulación del sistema inmune adaptativo. La inmunidad innata está presente y es funcional desde la eclosión; aunque, su desarrollo continúa hasta la primera semana de vida (Korver, 2006; Juul-Madsen *et al.*, 2008).

La primera acción del sistema inmune innato es la exclusión de patógenos mediante barreras, incluyendo las superficies epiteliales y las moléculas que las recubren, tales como, el moco y componentes químicos antimicrobianos (e.g. lisozima). También, incluye respuestas bioquímicas inducibles, como

alteraciones en la composición del moco e incremento en la secreción de componentes constitutivos; así como, la producción de compuestos antimicrobianos (e.g. defensinas). El sistema de complemento, también, puede ser considerado como una cadena inducible que libera elementos antimicrobianos (e.g. el complejo que ataca la membrana C9 (MAC)) y elementos que atraen y modulan el sistema inmune celular (Korver, 2006; Juul-Madsen *et al.*, 2008).

Los componentes celulares del sistema inmune innato van desde la acción de las células epiteliales especializadas hasta la actividad de las poblaciones celulares inmunes clásicas, tales como: macrófagos, granulocitos (células polimorfonucleares), trombocitos y células asesinas naturales. Las respuestas inmune innatas son consideradas importantes en las fases iniciales de una invasión microbiana, limitando la propagación del patógeno hasta que las respuestas adaptativas (reguladas por células B y T) se movilicen para eliminar la infección. En este sentido, esta es la explicación del porqué las respuestas innatas son más rápidas que las adaptativas; la naturaleza de los elementos de reconocimiento de patógenos son fundamentales (Juul-Madsen *et al.*, 2008).

#### **4.2.1. Barreras físicas o constitutivas**

Las barreras físicas son la primera línea esencial de defensa para proteger al hospedero en contra de la invasión de patógenos. Esto es más notorio después de que se rompen, lo cual puede resultar en lesiones en la piel, las vías aéreas y otras superficies mucosas con un incremento en el riesgo de infección. Otros mecanismos, tales como, los movimientos ciliares en las vías

aéreas, ácidos grasos en la piel, movimientos peristálticos del intestino, el pH gástrico ácido, secreción de moco y péptidos anti microbianos juntos sirven como barreras muy efectivas contra infecciones (Juul-Madsen *et al.*, 2008).

#### **4.2.2. Respuestas químicas**

##### 4.2.2.1 Fase de respuesta aguda a las infecciones

El proceso de inflamación en los vertebrados está acompañado por un gran número de cambios sistémicos y metabólicos colectivamente referidos como fase de respuesta aguda. Entre los cambios en homeostasis durante la fase aguda de respuesta están la fiebre, somnolencia, anorexia, incremento en la síntesis de varias hormonas endocrinas, reducción de la eritropoyesis, trombocitopenia (reducción de trombocitos), alteración en la concentración de cationes en plasma, reducción de los niveles séricos de zinc, hierro y calcio, inhibición de la formación de hueso, balance negativo de nitrógeno y catabolismo de las células musculares con la consecuente gluconeogénesis, alteraciones en el metabolismo de lípidos, y principalmente alteraciones en la concentración de algunas proteínas plasmáticas llamadas proteínas de la fase aguda en el hígado (Chamanza *et al.*, 1999; Gruys *et al.*, 2005; Juul-Madsen *et al.*, 2008).

La fase de respuesta aguda (FRA) es una reacción sistémica del organismo a una alteración local o sistémica de su homeostasis causada por una infección, daño en el tejido, trauma o cirugía, crecimiento neoplásico o desorden inmunológico (Gruys *et al.*, 2005). En el sitio de invasión del microorganismo y en el tejido dañado, se inician diferentes respuestas por el propio tejido. Las

células del sistema inmune liberan un grupo de péptidos llamados citoquinas, los cuales, activan el sistema vascular y a las células inflamatorias (Kaiser y Staheli, 2008). Estas respuestas están asociadas con la producción de más citoquinas y otros reguladores inflamatorios, los cuales, se difunden al fluido extracelular y circulan en la sangre (Gruys *et al.*, 2005).

Las citoquinas pueden actuar en las células que las secretan (acción autocrina), en las células vecinas (acción paracrina) o en algunos casos en células distantes (acción endocrina). Estas citoquinas, el óxido nítrico y los glucocorticoides desencadenan y modulan la reacción sistémica de la fase aguda y la respuesta de las proteínas hepáticas de la fase aguda (Gruys *et al.*, 2005).

#### **4.2.2.2 Proteínas de la fase aguda (PFA)**

Las PFA son sintetizadas casi exclusivamente en el hígado, principalmente como proteínas glucosiladas, y tienen funciones importantes en la restauración de la homeostasis después de una infección o inflamación. Las PFA pueden definirse como el cambio en la concentración de ciertas proteínas específicas en plasma, debido a un incremento o decremento en la síntesis por los hepatocitos. Si el cambio es un incremento en la síntesis se les llama positivas y si el cambio es reducción se les llama negativas (Chamanza *et al.*, 1999).

La mayoría de las PFA positivas son sintetizadas durante la estimulación junto con citoquinas pro-inflamatorias y glucocorticoides, y subsecuentemente liberadas dentro de la circulación sanguínea. Las principales citoquinas pro-inflamatorias involucradas son interleuquinas (IL, 6 y 1), y el factor de necrosis

tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Estas citoquinas, son producidas por los macrófagos en los tejidos y por los monocitos de la circulación sanguínea periférica, son las células más probables que inician la fase de respuesta aguda cuando son activadas durante el encuentro con los organismos extraños. En un periodo de 12 a 24 horas, el hígado responde a la exposición de citoquinas e inicia la producción de PFA positivas; mientras que, reduce la síntesis de las PFA negativas. Ha sido demostrado que el estrés psicológico eleva los niveles de IL-6 y proteínas de la fase aguda. La activación del eje hipotalámico-pituitaria-adrenal puede provocar la producción sistémica o local de citoquinas por señales de estrés, por lo tanto, estimulando la producción de proteínas de la fase aguda (Murata *et al.*, 2004).

### **4.3. Inmunidad adquirida**

Esta defensa inmune es adquirida después de la exposición a una infección, y forma la base de la teoría de la vacunación. Como el nombre lo indica, la inmunidad adquirida tiene que ser desarrollada por el ave, es específica y tiene memoria. En las aves la inmunidad adquirida incluye las respuestas inmunes humoral y celular. La respuesta inmune humoral o regulada por anticuerpos es efectiva contra antígenos extracelulares; mientras que, la respuesta inmune regulada por células son particularmente efectivas contra antígenos extracelulares (Erf, 2004; Korver, 2006).



### **4.3.1 Inmunidad humoral**

La unidad funcional de la respuesta inmune humoral son los anticuerpos. Los anticuerpos, son secretados por las células plasmáticas, un tipo de linfocitos B, antes de ser secretados (cuando están en la superficie de los linfocitos B), a los anticuerpos se les llama inmunoglobulinas. Los anticuerpos, se encuentran en los fluidos corporales y espacios de los tejidos, y son efectivos en la eliminación de patógenos extracelulares.

La inmunidad humoral es controlada por la bolsa de Fabricio (BF), un órgano linfoide primario único en las aves que se caracteriza por contener a los linfocitos B. El descubrimiento de la BF y su asociación con la respuesta humoral originó la comprensión de la dualidad del sistema inmune en componentes humorales y celulares (Sharma, 1991).

Antes de ser activadas, las células B tienen que unirse a un antígeno específico, lo cual, activa a las células T colaboradoras tipo 2 (Th2, por sus siglas en inglés). Las células Th2 liberan citoquinas, éstas inducen a las células B hacia la selección clonal, una reproducción asexual mitótica de la célula particular. Las células B activadas multiplican y estimulan a otras células plasmáticas a producir copias del anticuerpo, produciéndose una gran cantidad de células B clonadas llamadas células efectoras. La mayoría de esos clones se convierten en células plasmáticas, que después de una fase de reposo inicial son capaces de producir un enorme número de moléculas de anticuerpos (Grist, 2006).

Cuando un anticuerpo interactúa con el antígeno, se activan o incrementan mecanismos efectores que ayudan a la eliminación del patógeno. Las moléculas de inmunoglobulinas tienen tres áreas, dos constantes que activan los fagocitos y la respuesta humoral, y una tercera que es clave dentro de los antígenos específicos de los organismos invasores. Entonces, cada microbio es reconocido por un anticuerpo específico que lo ataca, atrae fagocitos y activa los factores humorales (Grist, 2006). Estos anticuerpos inactivan a los antígenos de diversas maneras:

- ✓ Fijación por el sistema complemento. Proteínas plasmáticas se unen a la superficie del antígeno y causan lisis celular.
- ✓ Oponización. Los antígenos son cubiertos con moléculas, tales como, inmunoglobulinas o proteínas complemento, las cuales incrementan la efectividad de la fagocitosis vía endocitosis regulada por receptores.
- ✓ Neutralización. Los sitios de unión de los antígenos son ocupados, previniendo el enlace del antígeno a la célula huésped. Si la unión no puede llevarse a cabo, la infección no se dará.
- ✓ Aglutinación. Los anticuerpos se unen a más de una molécula de antígeno (múltiples organismos patogénicos). Las células patogénicas se agrupan y no son capaces de causar infección al hospedero.
- ✓ Precipitación. El enlace del anticuerpo con el patógeno causa que se convierta en insoluble y salga de la solución.

#### 4.3.1.1 Tipos de inmunoglobulinas

En las aves se encuentran tres clases o isotipos de inmunoglobulinas (Ig): IgM, IgY (IgG) e IgA.

- ✓ IgM. En las aves la IgM es estructuralmente y funcionalmente homóloga a su contraparte en mamíferos. Es el predominante receptor de antígeno de las células B y durante el desarrollo embrionario es el primer isotipo en ser expresado. IgM es el isotipo predominante producido después de la exposición inicial a un nuevo antígeno, esta respuesta es generalmente transitoria, aunque después de una infección bacteriana crónica, tal como *Bordetella avium* en pavos, IgM se reporta que es activa por varias semanas. Investigaciones sobre la biología de IgM aviar ha sido algo limitada debido a una aparente conservación evolutiva de la molécula de IgM y su función temporal en la respuesta inmune protectora.
- ✓ IgG aviar (IgY). Estudios filogenéticos han demostrado que la IgY, es homóloga de la IgG en mamíferos. Este isotipo aviar es la forma predominante en el suero sanguíneo, producido después de IgM en la respuesta de anticuerpos primaria y el principal isotipo producido en la respuesta secundaria. En la literatura es referida como IgY, término propuesto originalmente. Estudios de precipitación salina indican que el bajo peso molecular de esta IgY le confiere propiedades bioquímicas diferentes a las de la IgG de mamíferos. Dado que el isotipo aviar es homólogo en función, otros han sugerido el término de

IgG aviar por lo que ambos nombres IgY o IgG son aceptados en la literatura. El termino apropiado seria IgY porque aparentemente esta Ig es el predecesor evolutivo de la IgG e IgE en mamíferos.

- ✓ IgA aviar. Es la forma predominante de anticuerpo en las secreciones corporales. Como en mamíferos, IgA está presente unido a un receptor sobre el tejido superficial de las células epiteliales. Este receptor se convierte en parte de la molécula de IgA como un componente secretor y el complejo IgA es entonces transportado a través de las células epiteliales y secretadas en el lumen del órgano en cuestión. Los componentes secretores promueven la adhesión de IgA a la superficie epitelial y lo protege de la degradación proteolítica dentro de la célula. IgA ha sido encontrada en mamíferos y basado en las evidencias genético moleculares de los pollos y patos, es probable que esté presente en todas las especies aviares. Se ha encontrado una forma homologa estructural y funcionalmente de IgA mamífera en secreciones de las aves, especialmente bilis. El origen de la Ig secretora precede la divergencia evolutiva de aves y mamíferos.

Una vez que la infección es controlada, algunas de esas células B permanecen viables como células de memoria y se mantienen presentes para futuros encuentros con el agente infeccioso. El tiempo de vida de una célula plasmática es de aproximadamente 4 o 5 días. Los otros clones de células B se convierten en células de memoria y permanecen en el cuerpo por largos periodos de tiempo, permitiendo una rápida respuesta a un anticuerpo

específico la siguiente vez que sea encontrado. Una vez que el antígeno ya no está presente en el cuerpo, las células B específicas al antígeno empiezan a morir. Sin embargo, algunas de estas células B pueden vivir como células de memoria, las cuales están presentes en proporciones de 10 a 100 veces mayores que los niveles iniciales, pero más potentes en su capacidad secretora de anticuerpos (Grist, 2006).

#### **4.3.2 Inmunidad celular**

La respuesta inmune regulada por células o inmunidad celular es el aspecto funcional del sistema inmune de las aves que trabaja para destruir a las células infectadas o para eliminar el antígeno. La respuesta inmune celular está especializada en la eliminación de antígenos intracelulares, incluyendo aquellos que entraron vía endocítica (antígenos exógenos; por ejemplo, bacterias fagocitas) o que fueron producidos dentro de la célula como las proteínas virales y las proteínas que resultan de transformación neoplásica de las células (antígenos endógenos; (Erf, 2004)).

El reconocimiento de antígenos por las células T es un proceso altamente sofisticado y es regulado por los receptores de las células T (TCR, por sus siglas en inglés). Cada célula T tiene aproximadamente 30000 receptores de antígeno (TCR) en su superficie. Debido a que todos los TCR expresados en una célula son idénticos, una célula T puede únicamente responder a péptidos que se unen a ese receptor. Cada TCR es una estructura compleja que consiste de seis glicoproteínas. Dos de estas se unen a antígenos; las otras cuatro

amplifican la señal generada por la unión a antígenos y la transmite a la célula (Grist, 2006).

Los linfocitos T (derivados del timo) son células específicas a antígenos en la respuesta inmune celular, capaces de reconocer un amplio intervalo de patógenos. Los linfocitos T se caracterizan por su función, sus marcadores de membrana y sus receptores. Todas las células T expresan el complejo CD3 “grupo de diferenciación tipo 3” en su membrana, independientemente del receptor presente. Las células T colaboradoras son identificadas por presentar marcadores de membrana CD4, funcionando principalmente como regulador de la inmunidad adaptativa, ambas humoral y celular. Las células T colaboradoras activan a los macrófagos mediante la secreción de citoquinas y estimulan el crecimiento y diferenciación de las células B. Las células B citotóxicas pueden ser identificadas porque tienen marcadores CD8 en la membrana y son importantes para la lisis de células infectadas por virus y células tumorales. Ejemplos de la acción de la respuesta celular incluyen la activación de macrófagos, lisis celular por los linfocitos T citotóxicos y las células asesinas naturales, todas reguladas por citoquinas liberadas por las células T colaboradoras u otras células (Grist, 2006).

La respuesta inmune celular, al igual que la humoral, están reguladas por dos grupos de citoquinas producidas posiblemente por dos tipos diferentes de células T colaboradoras (CD4+): Th1 y Th2, por sus siglas en inglés, la respuesta inmune adaptativa se inicia cuando el antígeno de un patógeno es presentado a las células T por las células presentadoras de antígeno,

particularmente las células dendríticas, las cuales reconocen el péptido antigénico en el contexto del sistema complemento sobre la CPA. Como resultado ya sea las células T CD4+ o CD8+ son estimuladas para proliferar y ser activas. Las células CD8 son citotóxicas y destruyen células infectadas directamente. Las células CD4 son fenotipos efectores o reguladores. Las funciones efectoras incluyen proveer ayuda a las células CD8, a las células asesinas naturales, macrófagos y otras células efectoras de la respuesta inmune celular si las células son Th1, si son Th2 a los eosinófilos y a las células B. La respuesta reguladora está involucrada principalmente en reducir la respuesta inflamatoria de las células Th1. El resultado final es la eliminación del patógeno y el establecimiento de memoria inmunológica (Grist, 2006).

Las células T tienen varias funciones, pero son especializadas para microbios intracelulares. Las células T citotóxicas reconocen el antígeno en células infectadas con virus y matan a la célula antes de que el virus sea liberado, también, producen sustancias químicas que crean resistencia a infecciones en las células vecinas. Las células T supresoras reducen la actividad de otras células T y B. Las células T colaboradoras o inductoras asisten a otras células T para que se conviertan en citotóxicas, ayudan a las células B para que produzcan anticuerpos, reconocen antígenos microbianos durante la fagocitosis y producen sustancias que activan a los macrófagos para destruir microbios (Grist, 2006).

#### 4.4. Inmunodepresión

En los sistemas de producción avícola, las aves están expuestas a factores estresantes que disminuyen su potencial genético y nutricional para una producción eficiente (Hoerr, 2010). Entre estos factores se encuentra el polvo de las casetas, porque acarrear patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP por sus siglas en inglés) como: lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram-negativas, ácido lipoteico de bacterias gram-positivas, y  $\beta$ -glucanos de levaduras; estos PAMP afectan la respuesta inmune, la respuesta a la vacunación y la ganancia de peso (Lai *et al.*, 2009). Otro factor, son las enfermedades inmunosupresoras como la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio, la anemia infecciosa y la enfermedad de Marek, estas enfermedades incrementan la susceptibilidad a enfermedades virales, bacterianas y parasitarias, e interfieren con la inmunidad adquirida mediante la vacunación. Una característica compartida entre los PAMP y las enfermedades infecciosas inmuno-depresoras es su capacidad de deprimir la función inmune humoral y celular (Hoerr, 2010).

Los métodos de control para las enfermedades inmunodepresoras se fundamentan principalmente en minimizar el estrés, reducir la exposición de los agentes infecciosos mediante la bioseguridad, incrementar la resistencia a las enfermedades infecciosas inmunodepresoras mediante la vacunación (Hoerr, 2010), y una adecuada nutrición; aunque, solo la nutrición no puede prevenir enfermedades, la nutrición es importante ya que el sistema inmune tiene prioridad en la partición de nutrientes durante infecciones (Kogut y Klasing,



2009) y también se ha demostrado que algunas vacunas tienen mejor acción para prevenir infecciones cuando los pollos son alimentados con nutrimentos inmuno-moduladores, como la arginina (Tayade *et al.*, 2006).

Durante una estimulación excesiva del sistema inmune, como puede ocurrir durante enfermedades infecciosas o exposición obligada a microbios en un ambiente no higiénico, la respuesta inmune afecta las rutas homeostáticas que regulan el metabolismo, la partición de nutrientes, el comportamiento, la termoregulación y la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (Colditz, 2002). Entre las consecuencias de una excesiva activación del sistema inmune se encuentran: producción de citoquinas pro-inflamatorias, activación de la fase de respuesta aguda, fiebre, inapetencia, reabsorción de aminoácidos del musculo y redirección de los nutrientes para producción hacia la síntesis de proteínas de la fase aguda en el hígado y para la proliferación de linfocitos, y estimulación de la producción de leptina (Colditz, 2002; Le Floc'h *et al.*, 2004). En aves, se ha demostrado que la inflamación (IL-1) y el estrés (corticosterona) reducen la ganancia de peso, el consumo de alimento y la eficiencia alimenticia; aunque, posiblemente mediante mecanismos diferentes ya que mientras IL-1 incrementa la tasa de degradación (+24 % en relación al testigo), la corticosterona reduce la síntesis de proteínas en el músculo (Klasing y Korver, 1997).

Entonces, la resistencia inmunológica a enfermedades tiene un costo metabólico debido a la menor disponibilidad de los nutrientes para producción (Kogut, 2009). Por lo que, estrategias inmuno-nutricionales y terapéuticas para

limitar los costos de producción debido a una excesiva activación del sistema inmune deben ser evaluadas (Colditz, 2002).

#### **4.5. Interrelaciones entre nutrición e inmunidad**

La nutrición influencia la habilidad de los animales para establecer una respuesta inmune y resistir enfermedades infecciosas. Por lo tanto, es importante para los nutriólogos de aves, entender el mecanismo de modulación de los nutrientes sobre el sistema inmune. Comprender estas interrelaciones, daría oportunidad a utilizar programas nutricionales que promuevan la salud animal manteniendo altas tasas de producción. Durante el ciclo de producción en una parvada, deberían de incorporarse, además de las variables típicas (conversión alimenticia, ganancia de peso, mortalidad, etc.), variables bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas. Aunque, es sabido que en la práctica existen fuertes interrelaciones entre nutrición, genética, manejo y enfermedades, la formulación de dietas sigue consistiendo en una serie de arreglos de ingredientes que cubran un perfil deseado de nutrientes a un mínimo costo, buscando como resultado final el beneficio económico basado en objetivos como ganancia de peso, conversión alimenticia o acreción de proteína en la pechuga, pero no en objetivos como inmunidad o resistencia a enfermedades (Humphrey *et al.*, 2002).

El estudio de la relación de la nutrición y la inmunidad se ha enfocado en el uso de nutrientes como moduladores directos y se ha puesto poca atención en las necesidades nutricionales del sistema inmune. Los requerimientos del sistema inmune aún no están establecidos, pero determinarlos sería importante

sobre todo para aquellos procesos del sistema inmune donde, el suministro de nutrientes es crítico. Por ejemplo, durante la respuesta inmune adquirida, un suministro suficiente e ininterrumpido de nutrientes es esencial para el desarrollo de los linfocitos dentro de los tejidos inmunes primarios. Mientras que, en la respuesta inmune innata, el periodo crítico de suministro de nutrientes ocurre una vez que ésta se activa.

Para estos periodos críticos de requerimiento de nutrientes, el sistema inmune tiene mecanismos que aseguran su adquisición, tales como, cambios en cantidad y tipo de transportadores de nutrientes que se expresan. También, el sistema inmune tiene una necesidad por aquellos nutrientes que sus metabolitos tienen una función importante en el proceso inmunológico. Esto es cierto, particularmente, para aminoácidos como arginina y cisteína, que son metabolizados para producir óxido nítrico y glutatión respectivamente (Humphrey *et al.*, 2002). Identificar y determinar los requerimientos nutricionales del sistema inmune es importante ya que permitiría formular dietas que contengan niveles que sean óptimos para la inmunocompetencia.

#### **4.5.1. Formas de regular la inmunidad por los nutrientes**

a) Alterando las rutas de comunicación y el perfil de transcripción de muchos genes involucrados en la coordinación de la respuesta inmune

Los ácidos grasos poli-insaturados, son el mejor ejemplo de nutrientes que directamente regulan la respuesta inmune, ya que alteran la transducción de señales y regulan la expresión genética. Los ácidos grasos localizados en las membranas plasmáticas son usados como sustratos para la generación de

señales moleculares involucradas en direccionar la respuesta celular. Cambiando la composición de ácidos grasos de la membrana plasmática de los leucocitos se puede alterar el tipo de moléculas de comunicación producidas y la habilidad del sistema inmune para eliminar ciertos patógenos.

b) Minimizando la severidad de la enfermedad causada por la síntesis y liberación de compuestos para eliminar patógenos

Como la mayoría de estos compuestos son especies reactivas de oxígeno, los antioxidantes vitamina E, vitamina C y selenio, son importantes para minimizar la patología asociada al daño por radicales libres. Esto podría explicar el aumento en los requerimientos de algunos antioxidantes durante la respuesta inflamatoria.

c) Estimulando el crecimiento de ciertos microorganismos

El sistema digestivo es el tejido linfoide más grande en el cuerpo y, por lo tanto, representa un atractivo blanco para modular la inmunidad. La alimentación con suplementos de microorganismos vivos (probióticos) o carbohidratos que estimulen el crecimiento de microorganismos benéficos (prebióticos) modula el tejido linfoide asociado al intestino (Ewing, 2008).

d) Alterando el perfil hormonal a través del régimen de alimentación o con la densidad de nutrientes en la dieta

Cambios en el perfil hormonal influencia la inmunidad ya que los leucocitos tienen varios receptores de esas hormonas expresadas en la membrana plasmática. Los niveles plasmáticos de glucocorticoides se aumentan en

respuesta a restricción alimenticia o ayuno y esta hormona afecta drásticamente el desarrollo de linfocitos. El glucocorticoide corticosterona incrementa la tasa de apoptosis de los linfocitos B y T en desarrollo y también alteran el perfil de citoquinas que promueven la inmunidad celular sobre la humoral.

e) Algunos nutrientes son substratos limitantes para la sobrevivencia de los patógenos

Por ejemplo, la biotina y el hierro son el primer y segundo limitante, respectivamente para el crecimiento de *Salmonella typhimurium*. Así, la producción de proteínas que se unen al hierro (e.g. ovotransferrina) limitaría el crecimiento de bacterias por competencia de sustrato (Humphrey *et al.*, 2002).

#### **4.5.2 Periodos críticos de requerimientos de nutrientes del sistema inmune**

El sistema inmune requiere nutrientes para cubrir sus necesidades metabólicas. Un inadecuado suministro de nutrientes puede resultar en una falla en la inmunidad e incrementar la susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

Un momento crítico, es durante el desarrollo de linfocitos B y T, se inicia desde la embriogénesis y continúa hasta después de la eclosión. Por ejemplo, en la bolsa de Fabricio, dos a cuatro células progenitoras colonizan cada folículo de la bolsa cerca del día 15 embrionario y proliferan 1000 veces para producir 20 - 40 x 10<sup>6</sup> linfocitos B al día de la eclosión, y después por varias semanas estos linfocitos dentro de la bolsa se duplican cada 10 horas resultando en la producción de 100 a 1000 x 10<sup>6</sup> linfocitos por día. Esta

producción tan grande de linfocitos B se atribuye a que en la bolsa se produce el 95% de los linfocitos B que circulan en la sangre en aves de cuatro semanas de edad. Por la semana seis, el tamaño de la bolsa y la producción de linfocitos B alcanza el máximo.

La mayoría del desarrollo de los linfocitos T ocurre *in ovo*, lo cual sugiere que la nutrición embrionaria puede contribuir más que la nutrición post eclosión al desarrollo de los linfocitos T.

Otro periodo crítico, de necesidad de nutrientes del sistema inmune adaptativo ocurre cuando los linfocitos se encuentran con su antígeno, el linfocito específico al patógeno empieza a proliferar rápidamente dentro de regiones especializadas del tejido inmune secundario para producir células efectoras responsables de la eliminación del patógeno específico. Estos eventos de proliferación duran varios días después del contacto inicial con el antígeno. Los linfocitos de memoria son producidos también durante este proceso y son responsables de la rápida respuesta inmune adaptativa que se observa una vez que se repite la exposición al mismo antígeno. Entonces, la activación de los linfocitos es otro periodo crítico de necesidad de nutrientes una vez que esas células específicas al antígeno expanden su número para eliminar el patógeno invasor.

Necesidades durante la respuesta inmune innata. Una vez activada la inmunidad innata se convierte en anabólica resultando en la síntesis y secreción de proteínas protectoras y compuestos para eliminar patógenos invasores. La síntesis de estas proteínas, tales como, las proteínas de la fase aguda y

compuestos para eliminar patógenos como el óxido nítrico por los macrófagos, requiere nutrientes adicionales. La inmunidad innata no tiene memoria inmunológica a antígenos, por lo que, la exposición al mismo antígeno resulta en una respuesta inmune innata similar en magnitud a la respuesta inicial (Humphrey *et al.*, 2002).

Finalmente, aunque ha sido demostrado que existe un requerimiento nutricional del sistema inmune, el cual generalmente, es más alto que los requerimientos para producción, aun no se formulan dietas para que las aves tengan una mejor respuesta inmune, ya que la cantidad exacta de los nutrimentos inmuno-moduladores y el momento exacto para proporcionarlos aun no están bien definidos. Además, la presión que existe por parte de las autoridades competentes del uso de antibióticos en los sistemas de producción avícola, así como, la demanda de los consumidores de una carne o huevo que provenga de este tipo de sistemas de producción, hace necesario seguir investigando diferentes estrategias nutricionales enfocadas a mejorar la inmunidad de las aves.

### 3. Literatura citada

- Abdukalykova, S.T., Zhao, X. and Ruiz-Feria, C.A. 2008. Arginine and vitamin E modulate the subpopulations of T lymphocytes in broiler chickens. *Poultry Science* 87: 50–55.
- Baurhoo, B., Phillip, L. and Ruiz-Feria, C.A. 2007. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in ceca and litter of broiler chickens. *Poultry Science* 86 (6): 1070-1078.
- Bautista-Ortega, J. and Ruiz-Feria, C.A. 2010. L-Arginine and antioxidant vitamins E and C improve the cardiovascular performance of broiler chickens grown under chronic hypobaric hypoxia. *Poultry Science* 89: 2141–2146.
- Bayne, J.C. 2003. Origins and evolutionary relationships between the innate and adaptive arms of immune systems. *Integrative and Comparative Biology* 43(2): 293-299.
- Chamanza, R., Van Veen, I., Tivapasi, M.T. and Toussaint, M.J.M. 1999. Acute phase proteins in the domestic fowl. *World's Poultry Science Journal* 55: 61-71.
- Colditz, I.G. 2002. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. *Livestock Production Science* 75: 257-268.
- Cuca, G.J.M., Avila, G.E. y Pro, M.A. 2010. La alimentación de las aves. Universidad Autónoma Chapingo. 154 p.
- Erf, G.F. 2004. Cell-Mediated Immunity in Poultry. *Poultry Science* 83:580–590.
- Ewing, W.N. 2008. The living gut. 2<sup>nd</sup> Edition. Nottingham University Press. 192 p.
- Fernandes, M.I.J. and Murakami, A.E. 2010. Arginine metabolism in uricotelic species. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 32(4): 357-366.
- Grist, A. 2006. Poultry inspection: Anatomy, physiology and disease conditions. Nottingham University Press. 276 p.
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.T. and Koopmans, S.J. 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science* 6B (11): 1045-1056.
- Harmon, B.G. 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science* 77:972–977.
- Hoerr, J.F. 2010. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Diseases* 54(1):2-15.
- Humphrey, B.D., Koutsos, E.A. and Klasing, K.C. 2002. Requirements and priorities of the immune system for nutrients. Pages 69-77 in: *Nutrition biotechnology in the feed and food industries: Proceedings of Alltech's 18th annual symposium*. Lyons, T.P. and Jacques, K.A., Eds. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Humphrey, B.D. and Klasing, K.C. 2004. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. *World's Poultry Science Journal*. 60:90-100.



- Juul-Madsen, H., Viertlboeck, B., Smith, A.L. and Göbel, T.W.F. 2008. Avian innate immune responses. In: Davison, F., Kaspers, B. and K.A. Schat. (Eds) Avian immunology, (Boston, MA, Academic Press). 129-158 p.
- Kaiser, P. and Staheli, P. 2008. Avian cytokines and chemokines. In: Davison, F., Kaspers, B. and Schat, K.A. (Eds) Avian immunology, (Boston, MA, Academic Press). 203-222 p.
- Klasing, K.C. and Korver, D.R. 1997. Leukocytic cytokines regulate growth rate and composition activation of the immune system. *Journal of Animal Science* 75(2):58-67.
- Kogut, M.H. and Klasing, K. 2009. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. *Journal of Applied Poultry Research* 18:103–110.
- Korver, D.R. 2006. Overview of the immune dynamics of the digestive system. *Journal of Applied Poultry Research* 15:123–135.
- Lai, H.T.L., Nieuwland, M.G.B., Kemp, B. Aarnink, A.J.A. and Parmentier, H.K. 2009. Effects of dust and airborne dust components on antibody responses, body weight gain, and heart morphology of broilers. *Poultry Science* 88:1838–1849.
- Le Floch, N., Melchior, D. and Obled, C. 2004. Modifications of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. *Livestock Production Science* 87: 37-45.
- Leshchinsky, T.V. and Klasing, K.C. 2003. Profile of chicken cytokines induced by lipopolysaccharide is modulated by dietary  $\alpha$ -tocopheryl acetate. *Poultry Science* 82: 1266–1273.
- Lorenzoni, A.G. and Ruiz-Feria, C.A. 2006. Effects of vitamin E and L-arginine on cardiopulmonary function and ascites parameters in broiler chickens reared under subnormal temperatures. *Poultry Science* 85(12):2241-2250.
- Murata, H., Shimada, N., and Yoshioka, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal* 168: 28–40.
- Pérez-Carbajal, C., Caldwell, D., Farnell, M., Stringfellow, K., Pohl, S., Casco, G., Pro-Martínez, A. and 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. *Poultry Science*. 89: 1870–1877.
- Salvante, K.G. 2006. Techniques for studying integrated immune function in birds. *The Auk* 123(2): 575–586.
- Sharma, J.M. 1991. Overview of the avian immune system. *Veterinary immunology and immunopathology* 30:13-17.
- Tayade, C., Jaiswal, T.N., Mishra, S.C. and Koti, M. 2006. L-Arginine stimulates immune response in chickens immunized with intermediate plus strain of infectious bursal disease vaccine. *Vaccine* 24:552-560.



## **CAPITULO I. EFFECTS OF ARGININE AND VITAMIN E SUPPLEMENTED DIETS ON THE IMMUNOLOGICAL RESPONSE OF BROILERS CHICKENS**

### **Summary**

In order to evaluate the effect of arginine and vitamin E supplementation in broiler chicken diets on the immune response during post-vaccine stress, a trial was conducted with 700 chicks (1 day-old) which were distributed into 28 floor-pens and fed one of four dietary treatments (with 7 replicates) assigned randomly: T1 = control diet (1.31 % of arginine and 10 IU of vitamin E/kg of feed); T2 = T1 + 0.3 % of arginine; T3 = T1 + 70 IU of vitamin E; T4 = T1 + 0.3 % of arginine + 70 IU of vitamin E. At day 12 all birds were vaccinated against Newcastle disease virus (NDV), infectious bronchitis, avian influenza (AI) and fowl pox. The traits evaluated were: post-vaccine reaction at days 14, 16, 18, 21 and 23; antibody titers against NDV and AI, and relative lymphoid organs weight at days 11, 19 and 26; and the performance were recorded weekly. Chickens fed T2, T4 (at day 16), and T3 (at day 21) had lesser ( $p \leq 0.05$ ) post-vaccine reaction than birds fed T1. The antibody titers against NDV (at day 11) was higher ( $p \leq 0.05$ ) in chickens fed T4 (3.1 log<sub>2</sub>), T3 (2.7 log<sub>2</sub>) and T2 (2.7 log<sub>2</sub>) compared to T1 (1.6 log<sub>2</sub>); meanwhile, for AI titers no differences were found. There were no differences, neither for relative immune organs weight, nor for performance. In conclusion, arginine and vitamin E supplementation in broiler chickens diets reduced the post-vaccine stress and improved the immune response without affecting the performance.

**Keywords:** chicken, immunological response, post-vaccine reaction, vitamin E, arginine.

## **EFFECTO DE DIETAS SUPLEMENTADAS CON ARGININA Y VITAMINA E EN LA RESPUESTA INMUNOLOGICA DE POLLOS DE ENGORDA**

### **Resumen**

Para evaluar el efecto de suplementar arginina y vitamina E en la dieta de pollos de engorda en la respuesta inmune durante estrés postvacunal, se realizó este experimento con 700 pollos, de un día de edad, los cuales fueron distribuidos en 28 corrales y alimentados con uno de cuatro dietas experimentales (con 7 repeticiones) asignadas aleatoriamente: T1 = dieta testigo (1.31 % de arginina y 10 UI de vitamina E/kg de alimento); T2 = T1 + 0.3 % de arginina; T3 = T1 + 70 UI de vitamina E; T4 = T1 + 0.3 % de arginina + 70 UI de vitamina E. A los 12 días de edad, los pollos fueron vacunados contra la enfermedad de Newcastle (EN), bronquitis infecciosa, influenza aviar (IA) y viruela. Se evaluaron las variables: reacción postvacunal, a los 14, 16, 18, 21 y 23 días; título de anticuerpos contra EN e IA, y peso relativo de los órganos linfoides, a los 11, 19 y 26 días; y semanalmente se registró la producción. Los pollos alimentados con T2, T4 (16 días), y T3 (21 días) tuvieron menor ( $p \leq 0.05$ ) reacción postvacunal comparados con T1. El título de anticuerpos contra EN (11 días) fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) en pollos alimentados con T4 (3.1 log<sub>2</sub>), T3 (2.7 log<sub>2</sub>), y T2 (2.7 log<sub>2</sub>) contra T1 (1.6 log<sub>2</sub>); el título contra IA no fue diferente. No hubo diferencias en peso de órganos linfoides, ni en producción. En conclusión, la suplementación con arginina y vitamina E en la dieta de pollos reduce el estrés postvacunal y modula la respuesta inmune, sin alterar la producción.

**Palabras clave:** pollos, respuesta inmunológica, reacción postvacunal, arginina, vitamina E.

## 1.1 Introduction

In the poultry production systems in addition to physical Bio-security measures there are also immunological procedures, which are applied through strict vaccination programs, both with the aim to reduce the incidence and consequences of the infectious agents, such as virus, bacteria and molds (Martínez and Sanz, 2006). However, although the objective of the vaccination is to produce an immunological response to avoid the infection (Al-Garib *et al.*, 2003), some vaccines, based on live virus, can cause immunosuppression in poultry with the consequent emergence of postvaccinal reactions such as sneeze, sudden movements of head, tearing and eye inflammation (Perozo *et al.*, 2004), these postvaccinal reactions predispose the chickens to secondary bacterial infections (Butcher and Heskett, 2010).

Because the immune system is mediated by chemical compounds production of protein origin, such as: antibodies, immunoglobulins and cytokines, it is dependent on the availability of nutrients during an excessive stimulation (Li *et al.*, 2007). Therefore, nutritional regimes that increased the immunity, reducing the severity of the diseases must be evaluated (Field *et al.*, 2002; Kidd, 2004).

Arginine and vitamin E are nutrients with potential to modulate the immune system. The vitamin E supplementation in broiler chickens diets, in moderate quantities (25 to 50 IU / kg of feed), increase the production of antibodies against infectious bronchitis, module the free radicals and antioxidants production, and mediate the lymphocyte population dynamics

during an infection with lipopolysaccharides of *Salmonella typhimurium* (Leshchinsky and Klasing, 2001, 2003).

On the other hand, it has been shown that L-arginine supplementation modulates the immune response (Kwak *et al.*, 2001; Jahanian, 2009; Munir *et al.*, 2009), probably through two metabolic ways: first, by the arginase way, where arginine is degraded and favors the polyamines and proline synthesis. Polyamines are related to the lymphocytes proliferation; meanwhile, proline is associated in the collagen synthesis to wound healing damaged tissues (Fernandes and Murakami, 2010). The second way is the nitric oxide synthesis by the action of the inducible nitric oxide synthase; this way is essential to the cytotoxic activity of macrophages and also stimulates the vasodilatation to repair tissues (Le Floc'h *et al.*, 2004).

Also, it has been investigated the effect of the concurrent supplementation of arginine and vitamin E on the immune system of broiler chickens. These results suggest a complementary role on the humoral and cellular immune function (Abdukalykova *et al.*, 2008; Ruiz-Feria and Abdukalykova, 2009; Pérez-Carbajal *et al.*, 2010).

Finally, to produce broiler chickens at least cost it is necessary: to use at maximum the genetic potential and prevent efficiently the diseases, among others. Unfortunately, the nutrient requirements to maximize the body weight gain are not the same for a better immune response (Jahanian, 2009); thus, it is necessary to investigate the nutrient levels that improve the avian immune

system, and, as a result, avoid the reduction in performance due to stress by diseases.

By the reasons mentioned previously, it was evaluated the effects of the supplemental vitamin E, arginine or both, in broiler chicken on: a) the postvaccinal reaction expressed by respiratory noise, sudden movements of head and tearing; b) the lymphoid organs weight (thymus, spleen and bursa of Fabricius); c) the humoral immunity, assessed as the antibody titers against Newcastle disease virus and avian Influenza; d) performance traits, assessed as the body weight gain, feed intake and feed conversion ratio and mortality.

## **1.2 Material and methods**

### **Experimental Diets**

The experimental diets were: T1 = control diet (1.31 % of arginine and 10 IU of vitamin E/ kg of feed); T2 = control diet plus supplemental 0.3 % of arginine (1.61 % of arginine and 10 IU of vitamin E/ kg of feed); T3 = control diet plus supplemental 70 IU of vitamin E (1.31 % of arginine and 80 IU of vitamin E/ kg of feed); T4 = control diet plus supplemental 0.3 % of arginine and 70 IU of vitamin E (1.61% of arginine and 80 IU of vitamin E/ kg of feed). Feed was corn-soybean meal based and formulated free of coccidiostat or antibiotics, and according to the nutrient requirements indicated by Lemme *et al.* (2004; Table 1).

Table 1. Control diet composition and nutrient content<sup>1</sup>

Ingredient	g / kg	Nutrient / kg	Content <sup>5</sup>
Corn	611.5	ME (Kcal)	3035
Soybean meal	323.6	CP (g)	192.0
Soybean oil	21.4	Lysine (g)	12.7
DL-Methionine	3.3	Methionine (g)	9.3
Biolys® (51% L-Lysine) <sup>2</sup>	4.5	Tryptophan (g)	2.5
L-Threonine	0.6	Threonine (g)	8.1
Limestone (38% Ca)	16.3	Arginine (g)	13.1
Dicalcium phosphate (18/21)	14.7	Isoleucine (g)	10.4
Vitamin premix <sup>3</sup>	0.5	Leucine (g)	16.3
Mineral premix <sup>4</sup>	0.6	Calcium (g)	10.0
NaCl	3.0	Available phosphorus (g)	4.5

<sup>1</sup>from 1 to 28 days of age

<sup>2</sup>Also supplied per kg of product: 4 g of Threonine, 1.4 g of Tryptophan, 2 g of Methionine, 1 g of Cystine, 7 g of Leucine, 6 g of Arginine, 4 g of Isoleucine, 7 g of Valine, 1.6 g of phosphorus and 4070 Kcal of ME

<sup>3</sup>Supplied per kg of feed: 12000 IU of vitamin A; 3100 IU of vitamin D<sub>3</sub>; 5 mg of vitamin K<sub>3</sub>; 2 mg of thiamine; 12 mg of riboflavin; 21 mg of pantothenic acid; 2.6 mg of pyridoxine; 1.5 mg of folic acid; 0.018 mg of cyanocobalamin; 0.15 mg of biotin; 78 mg of nicotinic acid. Without vitamin E

<sup>4</sup>Supplied per kg of feed: 0.27 mg of Se; 2 mg of I; 8 mg of Cu; 50 mg of Fe; 80 mg of Zn; 80 mg of Mn; 0.2 mg of Co

<sup>5</sup>Nutrient content per kg of feed

## Animal management

Broiler chickens (n = 700), one day old, of the commercial line Ross 308 were grown in floor pens with oat hulls as litter during four weeks. The four experimental diets, with seven replicates each, were randomly distributed to 28 pens of 25 chicks each one. Chickens were free access to feed and water during the entire trial period.

At 12 days old, all chickens were vaccinated against Newcastle disease virus, avian Influenza, infectious Bronchitis and fowl pox. For Newcastle, the commercial strain La Sota was applied by eye drop vaccination in combination with the Infectious bronchitis vaccine, serotype Massachusetts. The mineral oil



emulsion of avian Influenza subtype H5N2, strain A/chickenMéxico/232/CPA/94 of low patogenicity was applied subcutaneously, and the fowl pox vaccine (Gibbs strain) was applied subcutaneously by wing-web puncture.

### **Postvaccinal reaction**

All chickens of each pen were monitored during three minutes at 14, 16, 18, 21 and 23 days old, and the presence of the following were recorded: respiratory noise, sudden movements of head and tearing. To assess the post vaccine reaction the method described by Torres (1996) was used, with the following modification: the traits respiratory noise, sudden movements of head and tearing were analyzed since the obtained percent (number of chicks by pen with presence of some of the signals mentioned before in three minutes / total number of chicks by pen, then the result was multiplied by 100).

### **Lymphoid organs and humoral immunity**

At 12, 19 and 26 days old, seven chicks per treatment were weighed, bled (by heart puncture), and then sacrificed by cervical dislocation, with the objective to collect the lymphoid organs and the serum for the immunological tests.

The lymphoid organs collected were: The bursa of Fabricius, spleen and thymus, which were individually weighed free of connective and adipose tissues adhered.

The samples of blood were allowed to clot at room temperature for one hour, and then were centrifuged at 1800 g at 4° C for 10 minutes to obtain the

serum, which was stored at -20 °C, and then were sent to the laboratory to determine the antibody titers using the hemagglutination inhibition test. Additionally, were weekly recorded the feed intake and body weight gain; also, the feed conversion ratio was calculated, from the feed intake and body weight gain data.

### **Statistical analyses**

Data obtained were analyzed by a randomly complete design with equal number of replicates per treatment, using the next model:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Where:

$Y_{ij}$  = Response trait measured in the  $j^{\text{th}}$  replicate of the  $i^{\text{th}}$  treatment

$\mu$  = Mean that characterize the population

$T_i$  = Effect of the  $i^{\text{th}}$  treatment,  $i = 1, \dots, 4$

$E_{ij}$  = Random effect of the experimental error associated with the  $j^{\text{th}}$  replicate in the  $i^{\text{th}}$  treatment

The statistics tests were done using the GLM procedure of the statistical package SAS (SAS, 2000), and the mean differences were separated using the least square means (LS means), contrasting each treatment against the control. The post vaccinal reaction results expressed in percent, previously to the analysis, were transformed to the arcsine of the square root of the absolute value function ( $\arcsin \sqrt{Y/100}$ ; Steel *et al.*, 1988).

## **1.3 Results and discussion**

### **Postvaccinal Reaction**

There were differences (Table 2) in the respiratory noise percentage by the effects of the arginine and arginine plus vitamin E supplementation at 16 days old (4 days after the vaccination). When arginine (T1 vs. T2) or arginine plus vitamin E (T1 vs. T4) were supplemented in the diet, the percentage of chickens which presented respiratory noise was reduced ( $p \leq 0.05$ ). And also, the addition of 70 IU of vitamin E (T1 vs. T3) in the diet lessened the percentage of chicks with respiratory noise at 21 days old. In the tearing trait, the number of birds which presented this was lower ( $p \leq 0.05$ ) when were fed with the arginine supplemented diet (T1 vs. T2), at 21 days old. Meanwhile, in the trait sudden movements of head no differences were found in any of the sampling times.

**Table 2.** Percentage of respiratory noise (RN), sudden movements of head (SMH) and tearing (TE)

DIET <sup>1</sup>	RN					SMH					TE				
	Age (days)														
	14	16	18	21	23	14	16	18	21	23	14	16	18	21	23
T1	32	43	29	20	16	16	23	14	9	9	11	27	16	10	7
T2	28	31	29	18	11	13	19	17	8	10	6	21	16	4	7
T3	37	34	25	10	11	17	16	16	5	7	6	24	9	6	7
T4	21	30	32	11	14	14	22	13	8	8	7	19	11	7	3
SEM	7.7	3.7	2.5	2.9	2.6	4.6	4.2	3.5	2.3	2.5	2.5	3.8	3.5	1.6	2.2
<b>Significance value</b>															
T1 vs. T2	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
T1 vs. T3	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
T1 vs. T4	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>1</sup>T1 = control diet (1.31 % of arginine and 10 IU of vitamin E/ kg of feed), T2 = control + 0.3 % of arginine, T3 = control + 70 IU of vitamin E, T4 = control + 0.3 % of arginine + 70 IU of vitamin E.

SEM= Standard error mean of the percentage. \* p≤0.05; ns = not significant.

The results found in this experiment showed the complementary role between arginine and vitamin E on the reduction of the postvaccinal reaction, because both act in different stages of this reaction. It would be because the Newcastle virus presents two stages of replication in the host; the first is during the implantation of the virus in the airways, where it replicates in the mucosal epithelium cells, passes to the blood flow and comes into the visceral organs, where it starts a second replication period, then, again is freed into the blood flow; in some cases, it can reach the central nervous system (Moreno, 1994).

These complementarities of both nutrients to improve the immune response has been reported by Abdukalykova y Ruiz-Feria (2006), who mentioned that increasing in 0.3% of arginine in the broiler chickens diet

augmented the antibody production four days after a sheep's red blood cells (SRBC) injection; meanwhile, the vitamin E at 80 IU remain these antibodies production at 8 and 16 days after the SRBC injection. Also, it has been reported that the concurrent supplementation of arginine (2.2 %) and vitamin E (80 IU/ kg of feed) regulates the cellular and humoral immune responses, due to increments in the quantities of T and B cells, and the subpopulations of lymphocytes CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> in broiler chickens vaccinated against the infectious bursitis virus (Abdukalykova *et al.*, 2008). With the results found in this experiment, it is evident that the arginine and vitamin E supplementation reduce the stress associated to the vaccination and it would benefit the health and welfare of broilers.

### **Humoral immunity**

Arginine at 0.3 % (T1 vs. T2) or 70 IU of vitamin E/kg of feed (T1 vs. T3) supplementation augmented ( $p \leq 0.05$ ) the antibody titers against Newcastle disease before the vaccination (11 days old); but, when were added together (T1 vs. T4) the increment was higher ( $p \leq 0.01$ ), almost twice than the antibody titers of the birds fed the control diet (Table 3).

**Table 3.** Antibody titers (Log<sub>2</sub>) against Newcastle disease (ND) and Avian Influenza (AI)

Diet <sup>1</sup>	ND			AI		
	Age (days)					
	11	19	26	11	19	26
T1	1.6	3.9	7.0	2.6	1.3	1.9
T2	2.7	3.0	6.1	2.1	2.0	2.0
T3	2.7	3.3	7.3	2.1	2.1	2.4
T4	3.1	3.1	6.4	2.6	2.1	2.0
SEM	0.3	0.3	0.8	0.3	0.3	0.4
<b>Significance value</b>						
T1 vs. T2	*	*	ns	ns	ns	ns
T1 vs. T3	*	ns	ns	ns	ns	ns
T1 vs. T4	**	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>1</sup>T1 = control diet (1.31 % of arginine and 10 IU of vitamin E/ kg of feed), T2 = control + 0.3 % of arginine, T3= control + 70 IU of vitamin E, T4= control + 0.3 % of arginine + 70 IU of vitamin E.

SEM= Standard error mean; \*p≤0.05; \*\*p≤0.01; ns = not significant.

Meanwhile, at 19 and 26 days old (7 and 14 days after vaccination), the antibody titers against Newcastle disease of broiler chickens were not different (p>0.05) in the comparisons evaluated, except for the comparison T1 vs. T2 at 19 days old. Regarding the antibody titers against avian Influenza, there were not effects of the treatments on any sampling time (Table 3).

Previous studies suggest that the arginine or vitamin E supplementation of diets for broiler chickens can increase the persistence of the maternal antibodies (Ruiz-Feria and Abdukalykova, 2009). In this trial, the basal level of antibodies against Newcastle disease augmented when the diet was supplemented with arginine or vitamin E, and arginine plus vitamin E, being birds fed the last one diet which showed an antibody increment of almost twice,

showing a synergism of these nutrients in the persistence of the maternal antibodies.

These results coincide with those reported by Friedman *et al.* (1998), Leshchinsky and Klasing (2001), Abdukalykova and Ruiz-Feria (2006) and Singh *et al.* (2006); and overall make evident the modulator effect on the immune system of these two nutrients, and also, their close relationship in the metabolism and function of the immune system.

Thus, chickens fed diets supplemented with arginine, vitamin E or both, presented high levels of maternal antibodies; which indicates, that during the firsts weeks of age these birds can react better to pathogenic challenges compared to birds fed the control diet.

### **Lymphoid organs relative weight**

The relative weight (g/100 g of live weight) of thymus and spleen during the experiment was not affected ( $p>0.05$ ) by the dietary treatments evaluated. However, at 19 days old, the weight of the bursa of Fabricius in chickens fed arginine and vitamin E supplemented diet (T1 vs. T4) was reduced ( $p\leq 0.05$ ); but, when only arginine or vitamin E was included in the diet, there were no effects on the bursa of Fabricius weight (data not shown).

Although, no reports of the effects of concurrent supplementation of arginine and vitamin E on the development of the lymphoid organs were found, it has been demonstrated that the arginine supplementation support the development of the lymphoid organs (avoiding atrophy); however, the bursa of

Fabricius is not sensitive to this amino acid concentration (Kwak *et al.*, 1999). Furthermore, the reported results about the arginine supplementation on the bursa of Fabricius weight had been controversial. For instance, meanwhile Kidd *et al.*, (2001) did not find increments in the bursa of Fabricius weight when they augmented from 1.48 to 1.68 % the arginine levels in the diet; Tayade *et al.*, (2006) in chickens vaccinated and later challenged with the infectious bursitis virus reported that arginine at 2 % diet levels decreased the bursa of Fabricius weight from 5.43 to 2.45 g/kg of body weight.

### **Performance traits**

Arginine, vitamin E or their combination included in diets of broiler chickens did not show any effect ( $p>0.05$ ) on the performance traits: such as, body weight gain, feed intake and feed conversion ratio. Except at 14 days of age, birds fed arginine and vitamin E together had lower body weight (10 g approximately) in relation to those fed the control diet (T1 vs. T4,  $p\leq 0.05$ ). However, there were no other differences in the body weight in the remaining sampling times evaluated (data not shown).

Because of the immune response to the infectious processes affect the body weight gain, the metabolism and the nutrient requirements in chickens (Humphrey and Klasing, 2004), the interrelationships between nutrition and immunity are diverse and important to the animal welfare and the efficiency on performance (Humphrey *et al.*, 2002). For example, while the nutrition mediates the immunocompetence and the resistance to diseases, the pathogens can decrease the absorption of nutrients (Klasing *et al.*, 1995).



## **1.4 Conclusions**

The supplemented levels of arginine and vitamin E evaluated had a complementary role on the immune system. These nutrients lessened the presence of signs of the postvaccinal reaction in different stages. Moreover, it was found a synergism between these nutrients in the persistency of the maternal antibody titers against Newcastle disease virus.

## 1.5 References

- Abdukalykova, S.T., and Ruiz-Feria, C.A. 2006. Arginine and vitamin E improve the cellular and humoral immune response of broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*. 5(2): 121-127.
- Abdukalykova, S.T., Zhao, X. and Ruiz-Feria, C.A. 2008. Arginine and vitamin E modulate the subpopulations of T lymphocytes in broiler chickens. *Poultry Science*. 87:50–55.
- Al-Garib, S.O., Gielkens, A.L., Gruys, E. and Koch, G. 2003. Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *World's Poultry Science Journal*. 59:185-200.
- Butcher, G.D. and Heskett, E.A. 2010. Impact of respiratory diseases on commercial layer performance. 18th Annual ASAIME SE Asian Feed Technology and Nutrition Workshop.
- Fernandes, M.I.J. and Murakami, A.E. 2010. Arginine metabolism in uricotelic species. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. 32(4): 357-366.
- Field, J.C., Johnson, I.R. and Schley, P.D. 2002. Nutrients and their role in host resistance to infection. *Journal of Leukocyte Biology*. 71:16-32.
- Friedman, A., Bartov, I. and Sklan, D. 1998. Humoral immune response impairment following excess vitamin E nutrition in the chick and turkey. *Poultry Science*. 77:956-962.
- Humphrey, B.D. and Klasing, K.C. 2004. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. *World's Poultry Science Journal*. 60:90-100.
- Humphrey, B.D., Koutsos, E.A. and Klasing, K.C. 2002. Requirements and priorities of the immune system for nutrients. Pages 69-77 in: *Nutrition biotechnology in the feed and food industries: Proceedings of Alltech's 18th annual symposium*. T. P. Lyons and K. A. Jacques, Eds. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Jahanian, R. 2009. Immunological responses as affected by dietary protein and arginine concentrations in starting broiler chicks. *Poultry Science*. 88:1818–1824.
- Kidd, M.T. 2004. Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poultry Science*. 83:650-657.
- Kidd, M.T., Peebles, E.D., Whitmarsh, S.K., Yeatman, J.B. and Wideman Jr, R.F. 2001. Growth and immunity of broiler chicks as affected by dietary arginine. *Poultry Science*. 80:1535–1542.
- Klasing, K.C., Roura, E. y Korver, D. 1995. Interacciones entre nutrición y sistema inmune. XI curso de especialización FEDNA. Barcelona, España.
- Kwak, H., Austic, R.E. and Dietert, R.R. 1999. Influence of dietary arginine concentration on lymphoid organ growth in chickens. *Poultry Science*. 78:1536–1541.

- Kwak, H., Austic, R.E. and Dietert, R.R. 2001. Arginine-genotype interactions and immune status. *Nutrition Research* 21: 1035–1044.
- Le Floch, N., Melchior, D. and Obled, C. 2004. Modifications of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. *Livestock Production Science*. 87: 37-45.
- Lemme, A., Ravindran, V. and Bryden, W.L. 2004. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World's Poultry Science Journal*. 60:423-437.
- Leshchinsky, T.V. and Klasing, K.C. 2001. Relationship between the level of dietary vitamin E and the immune response of broiler chickens. *Poultry Science*. 80:1590–1599.
- Leshchinsky, T.V. and Klasing, K.C. 2003. Profile of chicken cytokines induced by lipopolysaccharide is modulated by dietary  $\alpha$ -tocopheryl acetate. *Poultry Science*. 82:1266–1273.
- Li, P., Yu-Long, Y., Li, D., Kim, S.W. and Wu, G. 2007. Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition*. 98: 237-252.
- Martínez, R. y Sanz, A. 2006. Problemas respiratorios en las aves: El complejo respiratorio. *Jornadas profesionales de avicultura de puesta*, Sevilla, España. 9 p.
- Moreno, C.R. 1994. La enfermedad de Newcastle y algunos avances recientes de diagnóstico. *Ciencia veterinaria*. 6: 49-72.
- Munir, K., Muneer, M.A., Masaoud, E., Tiwari, A., Mahmud, A., Chaudhry, R.M. and Rashid, A. 2009. Dietary arginine stimulates humoral and cell-mediated immunity in chickens vaccinated and challenged against hydropericardium syndrome virus. *Poultry Science*. 88:1629–1638.
- Pérez-Carbajal, C., Caldwell, D., Farnell, M., Stringfellow, K., Pohl, S., Casco, G., Pro-Martínez, A. and 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. *Poultry Science*. 89:1870–1877.
- Perozo, M.F., Nava, J., Mavarez, Y., Rivera, S., Aguillon, V. y Pino, V. 2004. Evaluación de dos planes de vacunación contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorde de la línea Ross criados bajo condiciones de campo en el estado Zulia, Venezuela. *Revista científica*. 14(4):331-337.
- Ruiz-Feria, C.A. and Abdukalykova, S.T. 2009. Arginine and vitamin E improve the antibody responses to infectious bursal disease virus (IBDV) and sheep red blood cells in broiler chickens. *British Poultry Science*. 50(3):291-297.
- SAS Institute. 2000. SAS/STAT User's Guide. Release 8.0 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.

- Singh, H., Sodhi, S. and Kaur, R. 2006. Effects of dietary supplements of selenium, vitamin E or combinations of the two on antibody responses of broilers. *British Poultry Science*. 47(6):714-719.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H. y Dickey, D.A. 1988. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. 2a Edición. Ed. McGraw-Hill. México. 622 pág.
- Tayade, C., Jaiswal, T.N., Mishra, S.C. and Koti, M. 2006. L-Arginine stimulates immune response in chickens immunized with intermediate plus strain of infectious bursal disease vaccine. *Vaccine*. 24:552-560.
- Torres, M. 1996. Evaluación de reacciones respiratorias postvacunales. Memorias del curso de actualización sobre técnicas de vacunación y reacciones postvacunales. ANECA. 40-42 p.



## **CAPITULO II. EFFECTS OF ARGININE, VITAMIN E, AND MANNANOLIGOSACCHARIDES ON INFLAMMATION, IMMUNE RESPONSE AND OOCYST SHEDDING AFTER A CHALLENGE WITH EIMERIA SPP**

### **Abstract**

1. One day-old male broiler chicks (Cobb 500; n=200) were assigned to one of eight treatments in a 2 X 4 factorial design: vaccinated (VAC; Coccivac-B®) or non-vaccinated (NOV), and fed a control diet (CTL), a diet with high arginine (ARG) and high vitamin E (VE) (AVE); a diet supplemented with mannanoligosaccharides (MOS), or a diet with high ARG, high VE and MOS (AEM). 2. At d 24, all chickens were challenged (2 x 10<sup>5</sup> oocysts). Plasma levels of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and ovotransferrin (OVT), intestinal lesion score (LS), and oocyst shedding were determined. 3. The VAC birds had lower levels of MDA and OVT than NOV birds, regardless of diet, except at d 28, when birds in the VAC-MOS group had higher levels of MDA than VAC birds fed the other diets, and NOV birds had the lowest levels of MDA regardless of diet. The NO levels were affected by vaccination at all sampling times, but at d 15 the NO levels were higher in NOV-CTL birds compared with the NOV birds fed the other diets, and lower in the VAC-CTL birds compared with the VAC birds fed the other diets. At d 28, NO was higher in birds fed the MOS diet compared with birds fed the other diets. The LS in the middle intestine were lowest in birds fed the MOS diet, and lower in the upper intestine of birds in the VAC-CTL and NOV-AVE compared with birds in the NOV-CTL group. At d 31, the oocyst output was highest in NOV-AVE birds, and lowest in VAC-AVE

and NOV-AEM birds. 4. Our results show that ARG, VE, and MOS modulate the inflammation response and may reduce the effects of coccidiosis, but the response varies with the immune status of the animals.

**Keywords:** Inflammatory response, Eimeria, arginine, vitamin E, mannanoligosaccharides.

## 2.1 Introduction

Coccidiosis is caused by protozoan of the genus *Eimeria*, an obligate intracellular parasite which influence the development of inflammatory disorders associated with the production of cytokines (Kasper and Buzoni-Gatel, 2001; Shirley *et al.*, 2005, 2007). The inflammatory response is a necessary step to clear the infection, but it may also invoke pathologic and potentially destructive changes in the tissue (Soeters and Grimble, 2009). For instance, during chronic inflammation, reactive oxygen and reactive nitrogen species (ROS and RNS, respectively) cause tissue oxidative damage due to an unbalance between the production of free radicals and their elimination (Koinarski *et al.*, 2005; Sorci and Faivre, 2009). Broiler chickens infected with *E. acervulina* or *E. tenella* show oxidative stress and impaired antioxidant status (Koinarski *et al.*, 2005; Georgieva *et al.*, 2006). In the same way, *Eimeria* and other infections induce the secretion of ovotransferrin (OVT), an acute phase response protein in chickens (Rath *et al.*, 2009). Ovotransferrin can modulate macrophage and heterophil functions in chickens by influencing the production of ROS and RNS, which could affect their phagocytic and bactericidal activities (Xie *et al.*, 2001; 2002a,b).

We previously reported that the concurrent supplementation of arginine (ARG) and vitamin E (VE) had additive effects on cellular and humoral immune function and may enhance the resistance of broilers to infectious diseases (Abdukalykova *et al.*, 2008; Ruiz-Feria and Abdukalykova, 2009). We also found that supplementation of ARG and VE above the NRC (1994) recommendations modulates NO plasma levels, heterophil and monocyte oxidative burst, and the



humoral immune response in birds vaccinated against coccidiosis and later challenged with a field mix of *Eimeria* species (Pérez-Carbajal *et al.*, 2010). Other researchers have reported that feeding mannanoligosaccharides (MOS) reduced oocyst excretions, diminished the severity of lesions, reduced the number of schizonts in the caecal lamina propria (Elmusharaf *et al.*, 2006, 2007), and increased IgA levels in the mucosa and intestine of chickens naturally infected with *Eimeria* (Gómez-Verduzco *et al.*, 2009).

Thus, since ARG, VE and MOS modulate the immune response, NO production, and antibody response during coccidiosis we hypothesized that the concurrent supplementation of ARG, VE and MOS will modulate the inflammation process and improve the immune response in broilers chickens exposed to *Eimeria*. The objectives of this experiment were to evaluate the effects of ARG, VE, and MOS on the inflammatory response, assessed through malondialdehyde (MDA), NO and OVT plasma levels, on the immune response assessed through relative immune organ weights (Bursa of Fabricius, thymus and spleen) and IgG, and on the severity of coccidiosis assessed through the intestinal lesion score and oocyst shedding, in chickens vaccinated or non-vaccinated against coccidiosis, and later challenged with a field mix isolate of *Eimeria* oocysts.

## **2.2 Material and Methods**

### ***Animals and Diets***

One day-old male broilers chicks (Cobb 500; n = 200) were allocated to wire starter battery cages from d 1 to d 13, and at d 14 were transferred to grower battery cages. The chicks were assigned to one of eight treatments, in a 2 x 4 factorial arrangement of treatments: vaccinated (VAC) or non-vaccinated (NOV), and fed a control diet (CTL; 13.4 MJ of ME, and 230 g of CP, 14 g of ARG, and 40 mg of VE kg<sup>-1</sup> of feed), or the CTL diet with supplemental ARG and VE (AVE; 3 g and 40 mg kg<sup>-1</sup>, respectively); the CTL diet with supplemental mannanoligosaccharides (MOS, 2 g kg<sup>-1</sup>); or the CTL diet supplemented with ARG, VE and mannanoligosaccharides (AEM; 3 g, 40 mg and 2 g kg<sup>-1</sup>, respectively). Diets were formulated to meet or exceed the NRC (1994) nutrient recommendation, and were free of anticoccidial drugs and antibiotic grow promoters. All ARG additions to the basal diet were in the form of L-arginine HCl (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), VE in the form of DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate (Animal Science Products Inc., Nacogdoches TX 75963), and mannanoligosaccharides from Bio-Mos ® (Alltech, Lexington KY). Feed and water were provided *ad libitum*.

### ***Management and challenge***

Half of the birds (n = 100) were gavaged a vaccine solution (Coccivac-B®, Schering-Plough Animal Health Corp., Millsboro, DE; 0.21 mL chick<sup>-1</sup> at d 1) at the day of arrival, and offered the same vaccine solution (same dose) in the feed at d 8, whereas the other half (n = 100) remained non vaccinated. Previous to

the second vaccination the broilers were fasted via feed removal in order to ensure the intake of the feed plus vaccine. At d 24, all chickens were orally challenged with a mixture of *Eimeria* oocysts; dilutions of coccidial inocula were prepared to reach the following oocyst levels per bird:  $1 \times 10^5$  *E. acervulina*;  $6 \times 10^4$  *E. maxima*, and  $4 \times 10^4$  *E. tenella*. At d 7, 15, 23, 28 and 31, 10 broilers per treatment (80 chickens in total) were randomly selected and used to collect peripheral blood and obtain serum and plasma samples. For serum, blood was allowed to clot for 2 h at room temperature and centrifuged at  $400 \times g$  for 10 minutes at  $4^\circ \text{C}$ , the serum was collected and stored at  $-80^\circ \text{C}$  until analysis. For plasma, blood was collected in tubes with EDTA as anticoagulant (BD, Franklin Lakes, NJ) then centrifuged at  $400 \times g$  for 10 min at  $4^\circ \text{C}$ , the plasma was collected and stored at  $-80^\circ \text{C}$  until analysis.

### ***Inflammation and Oxidative Stress Parameters***

#### ***Malondialdehyde (MDA)***

Plasma samples collected at d 7, 15, 28 and 31 were thawed and used according to the MDA colorimetric assay kit manual (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). This procedure allows to calculate the total amount of the adduct MDA-TBA formed by the reaction of malondialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid (TBA) under high temperature conditions ( $90\text{-}100^\circ \text{C}$ ) and acidic conditions. The MDA is measured by absorbance at 535 nm in a microplate reader (Tecan spectrafluor plus, Magellan4).

### *Nitric Oxide (NO)*

Plasma samples, collected at day 7, 15, 28 and 31, were used to determine total concentration of nitrate + nitrite. The samples were thawed at 4°C, and used according to the Nitrate/Nitrite colorimetric assay kit manual (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). The kit measures the enzymatic conversion of  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{NO}_2^-$ , followed by the colorimetric detection of  $\text{NO}_2^-$  as a colored azo dye product of the Griess reaction, measured by absorbance at 535 nm using a microplate reader (Tecan spectrafluor plus, Magellan4).

### *Ovotransferrin (OVT)*

Plasma samples, collected at d 28, were used to measure the level of OVT present that reacts with the anti-OVT antibodies by ELISA quantitation kits (Immunology Consultants Laboratory, Newberg, OR). Briefly, flat-bottomed microtiter plates previously coated with anti-OVT antibodies were used. To each well, 100  $\mu\text{L}$  of sample (1:25,000 dilution) or standard were added, and allowed to incubate for 30 min at room temperature. Then, plates were washed with PBS-T solution, and 100  $\mu\text{L}$  of detection antibody HRP (Horseradish peroxidase anti-OVT; dilution 1:100) was added to each well and allowed to incubate for 20 min at room temperature in the dark, and rinsed four times with wash solution. Then 100  $\mu\text{L}$  of enzyme substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine peroxidase substrate) was added and incubated for 10 min in the dark at room temperature. Finally, 0.3M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  was used to stop the TMB reaction. A microtiter plate reader (Wallac Victor-2 1420 Multilabel Counter) was used to measure the optical density at 450 nm. To calculate the concentration a four

parameter logistic curve-fit was developed using the chicken OVT calibrator as reference of absorbance.

### ***Immune Parameters***

#### *Immune System Organ Relative Weight*

At day d 30, 10 chicks per treatment were weighed and euthanized by cervical dislocation and used to determine the immune system organ relative weight. Briefly, the Bursa of Fabricius, Spleen and Thymus, were removed, carefully freed for connective tissue and individually weighted (Relative weight = Organ weight x 1,000 / BW).

#### *ELISA ( IgG)*

Serum samples, collected at day 23 and 31, were used to measure antibody levels of immunoglobulin G (IgG) by ELISA quantitation kits (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Briefly, flat-bottomed microtiter plates were coated for 60 min at room temperature with 100  $\mu$ L of coating buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate, pH 9.6) containing 1  $\mu$ L of capture antibody (Goat anti-chicken IgG-Fc affinity purified) and washed 5 times with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T). This step was followed by blocking with PBS-1% BSA for 1h at room temperature, and then plates were washed 5 times with PBS-T. To each well, 100  $\mu$ L of sample (Dilutions were 1:20,000) or standard were added to measure IgG, and allowed to incubate for 60 minutes at room temperature. Then, plates were washed with PBS-T, and 100  $\mu$ L of detection antibody HRP (Goat anti-chicken IgG-Fc; dilutions were 1:50,000) was added to each well and

allowed to incubate for 60 minutes at room temperature and rinsed five times with wash solution. Enzyme substrate (3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine (TMB) peroxidase substrate and peroxidase solution B) was added and incubated for 30 min. Finally, 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was used to stop the TMB reaction. A microtiter plate reader (Wallac Victor-2 1420 Multilabel Counter) was used to measure the optical density at 450 nm. To calculate the concentration a four parameter logistic curve-fit was developed using the chicken reference serum absorbance.

### ***Coccidiosis Traits***

#### *Intestinal Lesion Score*

At day d 30, the chicks euthanatized were also used to determine coccidial lesion scores (LS), following the Johnson and Reid (1970) procedure. The upper (duodenum), middle (jejunum), and lower (ceca) intestinal regions, which are the main infection sites for *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*, respectively, were used to evaluate the LS. Briefly, LS of 0 indicates no gross lesions, whereas LS of 4 indicates the maximum degree of pathogenicity.

#### *Oocysts Output*

At day 24, 6 broilers per treatment were individually caged and from d 29 to d 31, samples of feces were collected and stored at -4 °C until analyses. Briefly, one gram of feces was placed into a 50 mL centrifuge tube (VWR, West Chester, PA), filled with 30 mL of distilled water and mixed vigorously by vortexing. After that, 15 mL of salt oversaturated solution (185.0 g of NaCl in 500 mL of ultra pure H<sub>2</sub>O) was carefully added, and then centrifuged at 2200 x g for

10 minutes at 10 °C. Carefully, the supernatant phase was harvested in a 15 mL centrifuge tube (VWR, West Chester, PA) and used to count the oocyst number. The number of oocysts was counted using a hemocytometer chamber and an Olympus BH2 microscope; no species differentiation was made. The total amount of oocysts was calculated according to the equation oocysts = average number x volume of supernatant x 10,000.

### ***Statistical Analyses***

The data were analyzed as a two-way ANOVA, with diet and vaccine as the main effects, using the GLM procedure from SAS<sup>®</sup> 9.0 statistical software (Cary, NC). When the interaction was significant, differences among means were separated by the Duncan's multiple comparison test using treatments means, and they were considered statistically different when  $P < 0.05$ . Data for OVT were  $\text{Log}_{10}$  transformed, whereas the LS was arcsin transformed previous to be analyzed.

## 2.3 Results

### *Oxidative stress and inflammation parameters*

The MDA plasma levels were not affected by the dietary treatments at any time. On the other hand, vaccinated (VAC) birds had lower levels of MDA than non-vaccinated (NOV) birds at 7, 15, and 31 d (Table 4).

**Table 4.** Effects of diet<sup>1</sup>, vaccination<sup>2</sup>, and their interactions, on plasma concentration of malondialdehyde (MDA,  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ), nitric oxide (NO,  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) and ovotransferrin (OVT,  $\text{Log}_{10} \text{ ng} / \text{mL}$ ) in broilers chickens before and after a challenged with a field mix of *Eimeria* spp.

	MDA				NO				OVT
	7d	15d	28d	31d	7d	15d	28d	31d	28d
Diet									
CTL	20.6	22.7	15.5	18.1	28.2	30.8	14.1 <sup>b</sup>	17.5	2.1
AVE	21.9	22.4	15.8	18.5	28.5	31.5	15.2 <sup>ab</sup>	15.3	2.0
MOS	22.7	22.0	16.8	18.7	28.9	29.9	18.5 <sup>a</sup>	13.6	1.8
AEM	20.1	22.7	16.2	18.2	27.4	29.2	12.6 <sup>b</sup>	14.6	2.0
SEM	1.28	0.69	0.34	0.37	1.93	1.71	1.11	1.08	0.07
Vaccine									
No	23.2 <sup>a</sup>	29.0 <sup>a</sup>	14.7	22.0 <sup>a</sup>	24.4 <sup>b</sup>	37.0	12.9 <sup>a</sup>	20.6 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>
Yes	19.5 <sup>b</sup>	16.0 <sup>b</sup>	17.4	14.8 <sup>b</sup>	32.1 <sup>a</sup>	23.7	17.3 <sup>b</sup>	9.9 <sup>b</sup>	1.9 <sup>b</sup>
SEM	0.90	0.49	0.24	0.26	1.40	1.21	0.79	0.75	0.05
<i>P</i> -value									
Diet	0.451	0.875	0.071	0.708	0.963	0.786	0.005	0.068	0.104
Vaccine	0.006	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Interaction	0.610	0.201	0.031	0.217	0.300	0.001	0.315	0.266	0.500

<sup>1</sup>Birds were fed a control diet (CTL; 13.4 MJ of ME  $\text{kg}^{-1}$ , 230 g of CP, 14 g of Arginine and 40 mg of vitamin E  $\text{kg}^{-1}$ ), or a control diet supplemented with Arginine and Vitamin E (AVE; 17 g and 80 mg  $\text{kg}^{-1}$ ); mannanoligosaccharide (MOS, 2 g  $\text{kg}^{-1}$ ), or AVE and MOS (AEM, similar dose supplementation).

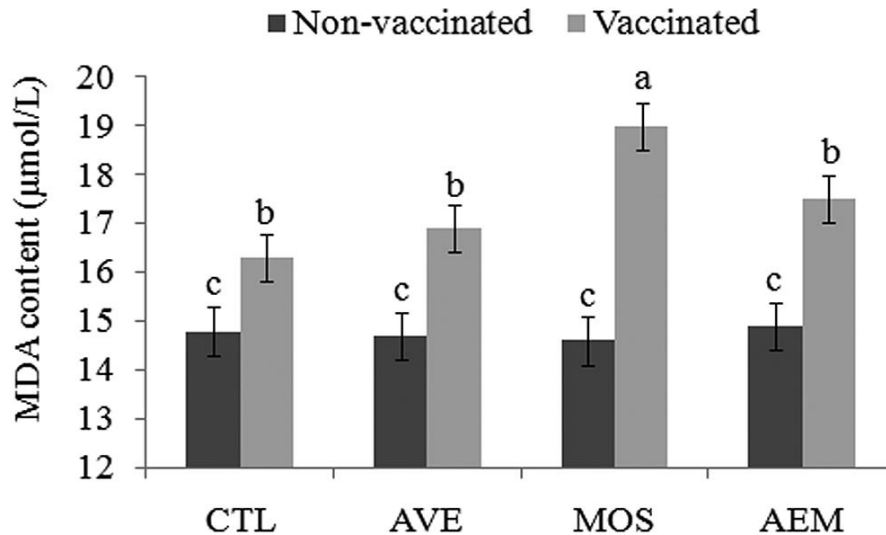
<sup>2</sup>Birds were vaccinated at d 1 and revaccinated at d 8 with 0.21 mL chick<sup>-1</sup> of Coccivac-B® and challenged at 24 d-old with a mix field inoculums  $2 \times 10^5$  oocysts of *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*).

<sup>a-b</sup> Means within a column and within effect without a common superscript differ ( $P < 0.05$ ). Each mean  $\pm$  SE corresponds to 10 observations.

At d 28 (4 d after challenge) there was a vaccination by diet interaction effect on MDA plasma levels; VAC birds fed MOS had the highest level of MDA,



whereas VAC birds fed the other diets had higher levels of MDA levels than NOV birds (Figure 1).

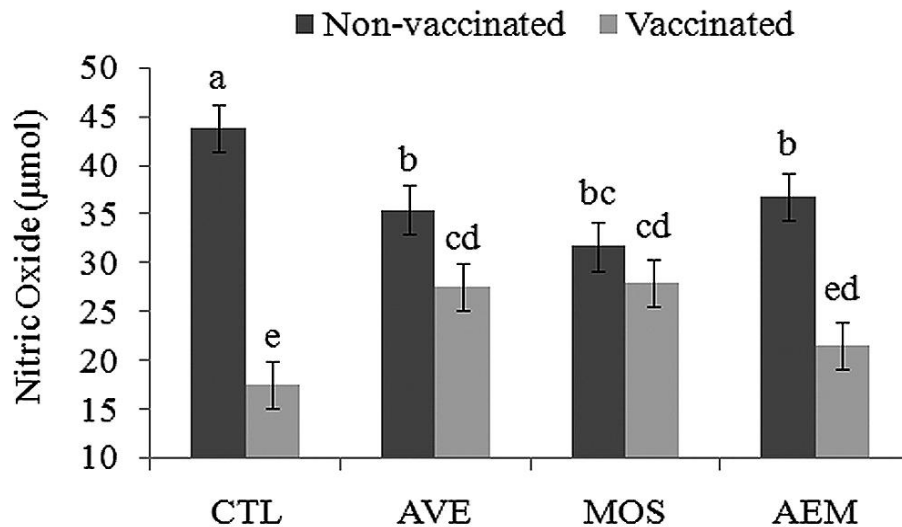


**Figure 1:** Plasma malondialdehyde (MDA) concentration at 28 d-old of broilers chickens challenged at 24 d-old with a mix field inoculums  $2 \times 10^5$  oocysts of *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*). Birds were vaccinated (Coccivac-B<sup>®</sup>; 0.21 mL chick<sup>-1</sup> at d1) or non-vaccinated, and fed a control diet (CTL; corn-soybean meal based and formulated to meet or exceed the NRC, including 14 g of Arginine and 40 mg of vitamin E kg<sup>-1</sup>), the control diet plus arginine and Vitamin E (AVE; 3 g and 40 mg kg<sup>-1</sup>, respectively); the control diet with mannanoligosaccharides (MOS, 2 g kg<sup>-1</sup>), or the control diet plus arginine, vitamin E, and MOS (AEM, similar dose supplementation). Diets were free of coccidiostat or antibiotics.

<sup>a-e</sup> Bars represent the means and SE of 8-10 observations. Bars without a common superscript are different ( $P < 0.05$ ).

The plasma levels of NO were affected by the vaccine at all four sampling times; the NO concentration was higher in VAC birds than in NOV birds at d 7 and d 28, but the opposite occurred at d 15 and d 31 (Table 4). The effect of diet was significant only at d 28 (4 d after challenge); chickens fed the MOS diet had higher levels of NO than those fed the CTL or AEM diet, whereas birds fed the AVE diet showed intermediate levels of NO (Table 4). At d 15 there was an interaction effect between diet and vaccination on NO levels; NOV-CTL birds

had the highest levels of NO, whereas VAC-CTL birds had the lowest levels of NO; however NOV-AVE, NOV-MOS, or NOV-AEM birds had lower levels of NO than the NOV-CTL birds, whereas VAC-AVE or VAC-MOS birds had higher levels of NO than VAC-CTL birds (Figure 2). The dietary treatments did not affect the OVT plasma concentration measured 4 d after the challenge, but OVT levels were lower in VAC-birds than in NOV-birds (Table 4).

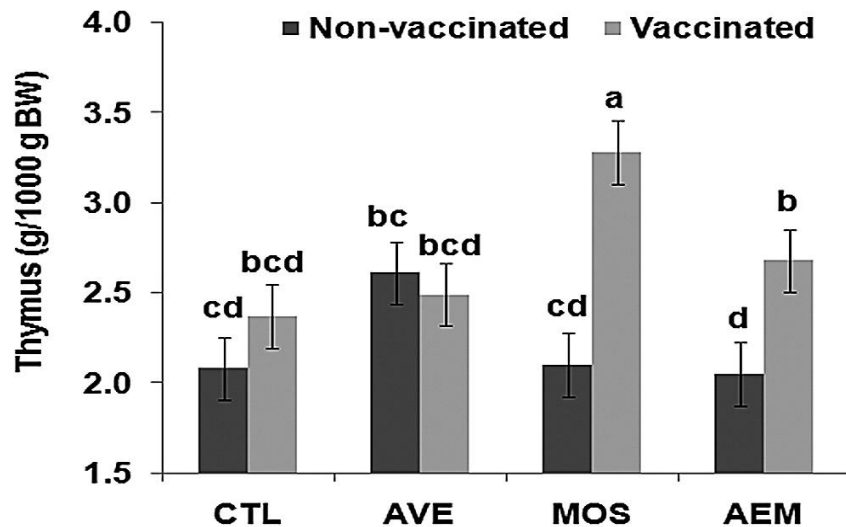


**Figure 2:** Plasma nitric oxide concentration ( $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) in 15 d-old of broiler chickens challenged at 24 d-old with a mix field inoculums  $2 \times 10^5$  oocysts of *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*). Birds were vaccinated (Coccivac-B®; 0.21 mL chick<sup>-1</sup> at d1) or non-vaccinated, and fed a control diet (CTL; corn-soybean based and formulated to meet or exceed the NRC, including 14 g of Arginine and 40 mg of vitamin E kg<sup>-1</sup>), the control diet plus Arginine and Vitamin E (AVE; 3g and 40 mg kg<sup>-1</sup>, respectively); the control diet with mannanoligosaccharide (MOS, 2 g kg<sup>-1</sup>), or the control diet plus arginine, vitamin E and MOS (AEM, similar dose supplementation). Diets were free of coccidiostat or antibiotics. <sup>a-e</sup> Bars represents the means and SE of 8-10 observations. Bars without a common superscript are different ( $P < 0.05$ ).

### ***Immune response***

The dietary treatments or vaccination did not affect the relative size of the spleen or the bursa of Fabricius, but there was an interaction effect between diet and vaccination on thymus weight (Figure 3); VAC-MOS and VAC-AEM birds

had heavier thymus than their NOV counterparts, whereas birds in the CTL or AVE groups had similar thymus weights regardless of vaccination. Also, NOV-AVE birds had heavier thymus than the NOV-AEM birds, and numerically heavier (although not significant) than the NOV-CTL and NOV-MOS birds.

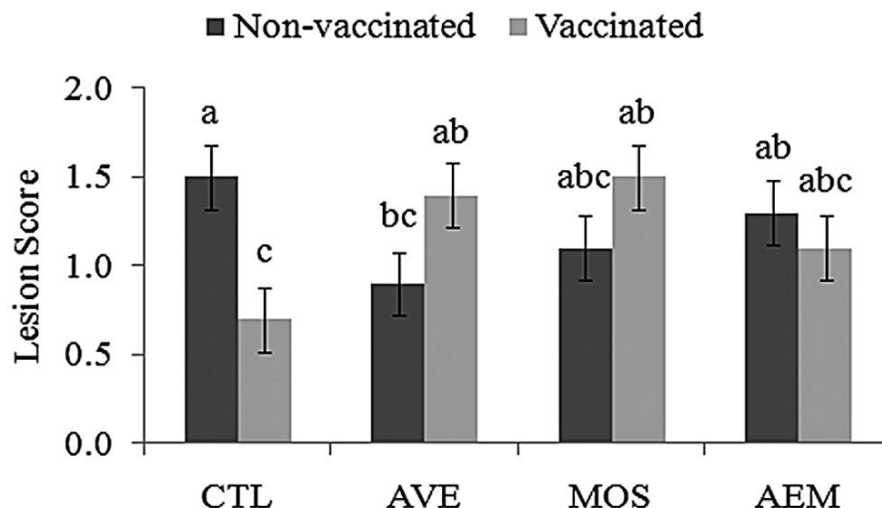


**Figure 3:** Thymus weight at 30 d-old of broiler chickens challenged at 24 d-old with a mix field inoculums  $2 \times 10^5$  oocysts of *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*). Birds were vaccinated (Coccivac-B®; 0.21 mL chick<sup>-1</sup> at d1) or non-vaccinated, and fed a control diet (CTL; corn-soybean based and formulated to meet or exceed the NRC, including 14 g Arginine and 40 mg of vitamin E kg<sup>-1</sup>), the control diet plus Arginine and Vitamin E (AVE; 3 g of Arginine and 40 mg kg<sup>-1</sup>, respectively); the control diet with mannanoligosaccharide (MOS, 2 g kg<sup>-1</sup>), or the control diet plus arginine, vitamin E and MOS (AEM, similar dose supplementation). Diets were free of coccidiostat or antibiotics. <sup>a-e</sup> Bars represents the means and SE of 8-10 observations. Bars without a common superscript are different (P < 0.05).

Neither the dietary treatment nor the vaccination affected the serum concentration of IgG at d 23. However at d 31 (7 days post challenge), VAC birds had higher concentration of IgG ( $1.56 \pm 0.03$ , optical density) than the NOV birds ( $1.30 \pm 0.04$ ), as expected, whereas dietary treatment did not affect the IgG levels at this time (data not shown).

### Coccidiosis traits

The lesion scores (LS) recorded at 6 d post-challenge are shown in Table 5. The LS in the ceca (lower intestine) were affected neither by the dietary treatment nor by the vaccination effect. However, the LS at the middle portion of the small intestine (ileum) were lowest in birds fed the MOS diet ( $P < 0.05$ ), and tended to be lower in the VAC than in the NOV birds ( $P = 0.07$ ). At the upper region of the small intestine (duodenal loop), NOV-CTL birds had higher LS than VAC-CTL birds; also, NOV-AVE birds had lower LS than the NOV-CTL birds. Conversely, VAC-AVE and VAC-MOS birds had higher LS than VAC-CTL birds (Figure 4).



**Figure 4:** Lesion score in the upper intestine area at 30 d-old of broiler chickens challenged at 24 d-old with a mix field inoculums  $2 \times 10^5$  oocysts of *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*). Birds were vaccinated (Coccivac-B®; 0.21 mL chick-1 at d1) or non-vaccinated, and fed a control diet (CTL; corn-soybean based and formulated to meet or exceed the NRC, including 14 g of Arginine and 40 mg of vitamin E  $\text{kg}^{-1}$ ), the control diet plus Arginine and Vitamin E (AVE; 3 g and 40 mg  $\text{kg}^{-1}$ , respectively); the control diet with mannanoligosaccharide (MOS, 2 g  $\text{kg}^{-1}$ ), or the control diet plus arginine, vitamin E and MOS (AEM, similar dose supplementation). Diets were free of coccidiostat or antibiotics. <sup>a-e</sup> Bars represents the means and SE of 8-10 observations. Bars without a common superscript are different ( $P < 0.05$ ).

The oocysts output was not affected by diet or vaccine at d 29 (5 d after challenge); at d 30 diet did not affect oocyst output, but VAC birds shed less oocysts than NOV birds as expected (Table 5).

**Table 5.** Effects of diet<sup>1</sup>, vaccination<sup>2</sup>, and their interactions, on intestinal lesion score<sup>3</sup> and oocyst shedding (Log 10 / g of feces) in broilers chickens challenged at d 24 with a field mix of *Eimeria* spp.

Item	Lesion Score			Oocysts output		
	L	M	U	29d	30d	31d
Diet (D)						
CTL	0.9	1.3 <sup>a</sup>	1.1	4.8	5.8	5.8
AVE	1.0	1.2 <sup>a</sup>	1.2	5.1	5.7	5.9
MOS	0.7	0.9 <sup>b</sup>	1.3	5.2	5.9	5.9
AEM	1.0	1.3 <sup>a</sup>	1.2	5.0	5.7	5.7
SEM	0.15	0.16	0.13	0.22	0.12	0.08
Vaccine (V)						
No	0.9	1.4	1.2	5.1	6.0 <sup>a</sup>	5.9
Yes	0.9	1.0	1.2	4.9	5.7 <sup>b</sup>	5.8
SEM	0.11	0.11	0.09	0.15	0.09	0.05
<i>P</i> -value						
Diet	0.337	0.045	0.678	0.614	0.575	0.376
Vaccine	0.738	0.071	0.703	0.214	0.019	0.334
Interaction	0.271	0.940	0.003	0.495	0.473	0.049

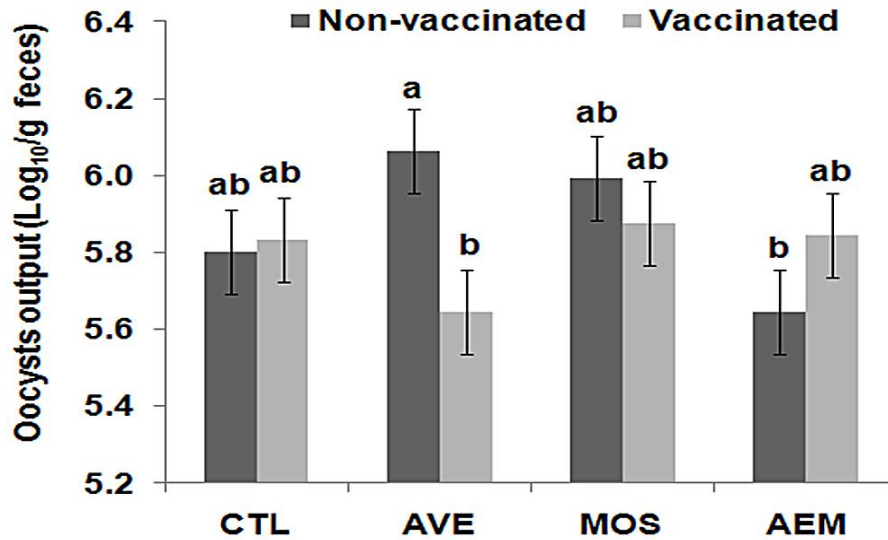
<sup>1</sup>Birds were fed a control diet (CTL; 13.4 MJ of ME kg<sup>-1</sup>, 230 g of CP, 14 g of Arginine and 40 mg of vitamin E kg<sup>-1</sup>), or a control diet supplemented with Arginine and Vitamin E (AVE; 17 g and 80 mg kg<sup>-1</sup>); mannanoligosaccharide (MOS, 2 g kg<sup>-1</sup>), or AVE and MOS (AEM, similar dose supplementation).

<sup>2</sup>Birds were vaccinated at d 1 with 0.21 mL chick<sup>-1</sup> of Coccivac-B® and challenged at 24 d-old with a mix field inoculums 2 x 10<sup>5</sup> oocysts of *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*)

<sup>3</sup>Lesion scores were evaluated according to the scale of Johnson and Reid (1970), at the lower (L, ceca), middle (M, 1 cm distal to the Meckels diverticulum), or upper (U, duodenal loop) intestine.

<sup>a-b</sup> Means ± SE within a column and within effect without a common superscript differ (*P* < 0.05); n = 10 for lesion score, n = 6 for oocyst output .

By d 31, the highest output of oocysts was recorded in the NOV-AVE birds, and the lowest in the VAC-AVE and NOV-AEM birds, with the other treatments having intermediate values in oocyst shedding (Figure 5).



**Figure 5:** Oocysts shedding in the feces at d 31 of broiler chickens challenged at 24 d-old with a mix field inoculums  $2 \times 10^5$  oocysts of *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*). Birds were vaccinated (Coccivac-B®; 0.21 mL chick<sup>-1</sup> at d1) or non-vaccinated, and fed a control diet (CTL; corn-soybean based and formulated to meet or exceed the NRC, including 14 g of Arginine and 40 mg of vitamin E kg<sup>-1</sup>), the control diet plus Arginine and Vitamin E (AVE; 3 g and 40 mg kg<sup>-1</sup>, respectively); the control diet with mannanoligosaccharide (MOS, 2 g kg<sup>-1</sup>), or the control diet plus arginine, vitamin E and MOS (AEM, similar dose supplementation). Diets were free of coccidiostat or antibiotics. <sup>a-b</sup> Bars represents the means and SE of 6 observations. Bars without a common superscript are different (P < 0.05).

## 2.4 Discussion

### ***Oxidative stress and inflammation parameters***

The aim of this study was to determine the effects of the concurrent supplementation of ARG, VE, and MOS on the inflammatory response and immune response after a coccidiosis vaccine and challenge with a field mix of *Eimeria* species. Although the inflammatory response is necessary to clear infections and to elicit the acquired immunological response, the timing of resolution is important in order to avoid pathological and potentially destructive changes in the tissue (Soeters and Grimble, 2009).

We found that VAC chickens, which were less affected by the *Eimeria* challenge, had higher concentration of MDA 4 d after challenge, suggesting that the increase in MDA could be associated with a more rapid response of the immune system; however by d 7 after challenge, VAC birds had lower levels of MDA than NOV birds, indicating a more rapid resolution of the innate immune response in the VAC birds. Increases in MDA plasma levels at 7 or 8 d after *Eimeria* infection have been reported elsewhere, ranging from 8 (Georgieva *et al.*, 2006) to as much as 18 % (Koinarski *et al.*, 2005) compared with basal levels, indicating oxidative stress associated with the immune response. After immune stimulation, the phagocytic cells (macrophages, eosinophils, heterophils) as well as B and T lymphocytes increased their oxygen uptake (respiratory burst), in order to produce ROS (via NADPH oxidase) and RNS (via inducible nitric oxide synthase, iNOS; Fang, 2004; Constantini and Møller, 2009) to kill both, intra and extra cellular stages of *Eimeria* (Ovington *et al.*, 1995).

During *Eimeria* infections NO is produced by macrophages as part of the immune response (Allen and Fetterer, 2002a; Lillehoj and Li, 2004); also high levels of NO are associated with a stronger *Eimeria* infection (Pérez-Carbajal *et al.*, 2010). Thus the higher NO levels in VAC than in NOV birds found in this experiment at d 7 could be due to the fact that VAC birds were immunologically challenged with the vaccine, whereas at d 28 the higher levels of NO in VAC birds could be explained by a more rapid immune response of VAC birds after the field mix challenge as compared with the NOV birds. Also at d 31 (7 d after challenge) NOV-birds had lower levels of NO than VAC-birds. These results show that VAC birds had a lower oxidative stress response after the main

immune response to the vaccine (d 7) passed, but for some reason NOV-birds still maintain a high oxidative stress activity at this time.

The effects of diet on NO were found only at d 28, when birds fed MOS had higher levels of NO than birds fed the CTL or the AEM diet, whereas at d 31 (7 d after challenge) when birds fed AVE, MOS, or AEM tended to have lower levels of NO than birds in the CTL diet ( $P = 0.07$ ). It has been suggested that MOS binds to pattern-recognition receptors on a variety of defense cells of the gut-associated immune system, acting as a non-pathogenic microbial antigen which activates immune defenses such as phagocytosis (Ferket *et al.*, 2002; Shashidhara and Devegowda, 2003), which may explain the higher levels of NO in birds fed MOS 4 d after the challenge. However, after the challenge passed, the dietary treatments reduced the production of NO, which could be associated with a normalization of the immune response.

Those results are further supported by the vaccination by diet interaction at d 15, showing that the supplementation of AVE or MOS, and in lesser extent the combination (AEM), modulated the production of NO compared with the CTL diet, reducing the levels of NO in NOV birds, but increasing the levels of NO in the VAC birds (Figure 2). Allen and Fetterer (2002a,b) reported that during mild or severe *E. maxima* infections, high levels of VE were not effective in modifying immune response events associated with phagocytosis as assessed by plasma NO levels. The same authors reported that during *E. acervulina*, *E. maxima*, or *E. tenella* infections, neither single nor dual daily doses (500 mg/kg) of ARG augmented plasma NO levels or lessened lesion scores in chickens (Allen, 1999). We previously reported a reduction in the NO plasma levels in VAC



chickens fed ARG and VE during mixed *Eimeria sp.* infection (Pérez-Carbajal *et al.*, 2010), which we associated with a better immune response, milder effects of the challenge, and lower oxidative stress compared with birds fed a CTL diet. Thus, it appears that ARG and VE may limit the potential deleterious effects associated with high and sustained levels of ROS elicited by the *Eimeria* challenge in NOV birds.

The dietary treatments did not affect the OVT plasma concentration measured 4 d after the challenge, but OVT levels were lower in VAC-birds than in NOV-birds (Table 4). Ovotransferrin (OVT) is a major acute phase protein produced during the acute phase response caused by injuries or by bacterial, viral or parasitic infections (Koj, 1996; Xie *et al.*, 2002a,b; Gruys *et al.*, 2005). The synthesis of OVT decreases in a manner almost directly correlated with the resolution of the inflammatory response (Chamanza *et al.*, 1999); however, if the stimulating compounds (cytokines, NO, and glucocorticoids) are still active OVT may remain elevated (Gruys *et al.*, 2005).

Thus the immunization modulated the time course of the inflammatory response, so VAC-chickens had a heightened production of MDA and NO soon after the challenge compared with the NOV-birds, but lower levels of MDA, NO, and OVT later, indicating a more rapid resolution of the challenge, as reported elsewhere (Allen, 1997a,b; Allen and Lillejoh, 1998). On the other hand, the effects of diet differed according to the immune status of the bird and according to the time after the challenge occurred. Furthermore, although birds were grown in wire cages and then oocyst cycling was prevented, the vaccine elicited an effective immune response, which is supported by the fact that the earlier

endogenous life cycle stages are the most important for the induction of protective immune responses (Shirley *et al.*, 2005).

### ***Immune response***

A heavier thymus is associated with an improved physiological function of this organ (Guo *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008; Morales-Lopez *et al.*, 2009). We found that VAC-MOS and VAC-AEM birds had heavier thymus than their NOV counterparts, whereas birds in the CTL or AVE groups had similar thymus weights regardless of vaccination. Also, NOV-AVE birds had heavier thymus than the NOV-AEM birds (Figure 3). We previously reported an increased thymus weight when chickens were fed diets with high levels of vitamin E (Abdukalykova and Ruiz-Feria, 2006), and others have reported increases in thymus weight when fed extra ARG (Kwak *et al.*, 1999; Munir *et al.*, 2009). Thus, it appears that the effects of ARG, VE, or MOS on thymus development are affected by the coccidiosis vaccination program.

In this experiment the dietary treatment did not affect the IgG levels after the vaccination. We previously reported that chickens fed diets supplemented with ARG and VE (3 g and 80 mg / kg of feed, respectively) showed a higher serum IgG at 14 d post challenge compared with birds fed a CTL diet (Pérez-Carbajal *et al.*, 2010); the different response could be attributed to the timing of measurement (3 and 7 d after challenge in this study vs. 14 d). Also, although birds in this experiment were raised in cages, avoiding the natural cycling of oocysts, the vaccine had a significant antigenic effect as evidenced by the higher levels of IgG found in vaccinated birds.

### ***Coccidiosis traits***

In general the LS recorded in this study were low, but comparable with the LS reported by others using similar growing conditions and challenge levels (Jordan *et al.*, 2011). We found that the LS at the middle portion of the small intestine (ileum) were lowest in birds fed the MOS diet, whereas at the upper region of the small intestine (duodenal loop), NOV-CTL birds had higher LS than VAC-CTL birds, as expected. Also, NOV-AVE birds had lower LS than the NOV-CTL birds, whereas VAC-AVE and VAC-MOS birds had higher LS than VAC-CTL birds (Figure 4). Thus, although VE can counteract the deleterious effects of free radicals, which are capable of oxidizing lipids in cell membranes causing cellular damage to the mucosal epithelial cells or mucosal sloughing (Allen, 1997b), an increased production of NO associated with the immune response and vasodilation due to the increased amounts of ARG could lead to hemorrhage, increasing the severity of the lesions (Allen, 1997a). We previously reported that birds vaccinated and later challenged with a field mix of *Eimeria* had lower LS in the middle intestine when they were fed high levels of VE (80 mg/kg of feed) and 3 g of ARG compared with regular, non-supplemented diets (Pérez-Carbajal *et al.*, 2010). At d 31 the highest output of oocysts was recorded in the NOV-AVE birds, and the lowest in the VAC-AVE and NOV-AEM birds, with the other treatments having intermediate values in oocyst shedding (Figure 5). These oocyst shedding levels are comparable with the ones reported by Bun *et al.* (2011), which used similar challenge levels in birds grown in battery cages. Our results show that the effects of ARG, VE, or MOS on the LS and oocyst shedding are affected by the immune status of the animals.

In summary our results show that ARG, VE, and MOS modulate the inflammation and immune response against *Eimeria* under these experimental conditions, but it was clear that the effects of the dietary supplements vary with the immune status of the birds. The interaction effects showed that in NOV-birds the supplementation of ARG and VE reduced the amount of NO, increased the thymus weight, and reduced the lesion scores as compared with the NOV-CTL birds, which could be attributed to the immune enhancing capabilities of both ARG and VE (Abdukalykova and Ruiz-Feria, 2006; Abdukalykova *et al.*, 2008, Pérez-Carbajal *et al.*, 2010), but the effects of ARG and VE were not important in VAC birds. Furthermore, we documented that ARG, VE, and MOS do not have additive effects on the inflammation and immune response parameters after the *Eimeria* vaccine or challenge, and in most cases the concurrent supplementation of ARG, VE, and MOS negates the positive effects of ARG and VE, or MOS. More research is warranted to evaluate the response in situations in which natural cycling of the parasite is allowed in non-vaccinated birds.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by Hatch project H70280. David Chan-Diaz is a Ph. D. student at Colegio de Postgraduados, and his academic stay at TAMU was supported by a CONACYT scholarship.

## 2.5 REFERENCES

- ABDUKALYKOVA, S.T. & RUIZ-FERIA, C.A. (2006) Arginine and vitamin E improve the cellular and humoral immune response of broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, **5(2)**: 121-127.
- ABDUKALYKOVA, S.T., ZHAO, X. & RUIZ-FERIA, C.A. (2008) Arginine and vitamin E modulate the subpopulations of T lymphocytes in broiler chickens. *Poultry Science*, **87**: 50-55.
- ALLEN, P.C. (1997a) Nitric oxide production during *Eimeria tenella* infections in chickens. *Poultry Science*, **76**: 810–813.
- ALLEN, P.C. (1997b) Production of free radical species during *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poultry Science*, **76**: 814–821.
- ALLEN, P.C. (1999) Effects of daily oral doses of L-arginine on coccidiosis infections in chickens. *Poultry Science*, **78**: 1506–1509.
- ALLEN, P.C. & FETTERER, R.H. (2002a) Interaction of dietary vitamin E with *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poultry Science*, **81**: 41–48.
- ALLEN, P.C. & FETTERER, R.H. (2002b) Effects of dietary vitamin E on chickens infected with *Eimeria maxima*: observations over time of primary infection. *Avian Diseases*, **46**: 839-846.
- ALLEN, P.C. & LILLEHOJ, H. S. (1998) Genetic influence on nitric oxide production during *Eimeria tenella* infections in chickens. *Avian Diseases*, **42**: 397-403.
- BUN, S. D., GUO, Y. M., GUO, F. C., JI, F. J., & CAO, H. (2011) Influence of organic zinc supplementation on the antioxidante status and immune responses of broilers challenged with *Eimeria tenella*. *Poultry Science*. **90**: 1220-1226.
- CHAMANZA, R., VAN VEEN, L., TIVAPASI, M.T. & TOUSSAINT, M.J.M. (1999) Acute phase proteins in the domestic fowl. *World's Poultry Science Journal*, **55**: 61-71.
- COSTANTINI, D. & MØLLER, A.P. (2009) Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **153(A)**: 339–344.
- ELMUSHARAF, M.A., BAUTISTA, V., NOLLET, L. & BEYNEN, A.C. (2006) Effect of a mannanoligosaccharide preparation on *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, **5(6)**: 583-588.
- ELMUSHARAF, M.A., PEEK, H.W., NOLLET, L. & BEYNEN, A.C. (2007) The effect of an in-feed mannanoligosaccharide preparation (MOS) on a coccidiosis infection in broilers. *Animal Feed Science and Technology*, **134**: 347–354.
- FANG, F.C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*, **2**: 820–832.

- FERKET, P.R., PARKS, C.W. & GRIMS, J.L. (2002) Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. Proceedings of the Multi-State Poultry Feeding and Nutrition Conference, Indianapolis, pp.14-16.
- GEORGIEVA, N.V., KOINARSKI, V. & GADJEVA, V. (2006) Antioxidant status during the course of *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *Veterinary Journal*, **172**: 488–492.
- GÓMEZ-VERDUZCO, G., CORTÉS-CUEVAS, A., LÓPEZ-COELLO, C., ÁVILA-GONZÁLEZ, E. & NAVA, G.M. (2009) Dietary supplementation of mannanoligosaccharide enhances neonatal immune responses in chickens during natural exposure to *Eimeria* spp. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **51**: 11.
- GRUYS, E., TOUSSAINT, M.J.M., NIEWOLD, T.A. & KOOPMANS, S.J. (2005) Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science*, **6B(11)**: 1045-1056.
- GUO, Y., ALI, R. A. & QURESHI, M.A. (2003) The Influence of  $\beta$ -Glucan on immune responses in broiler chicks. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **25(3)**: 461–472.
- JOHNSON, J. & REID, W.M. (1970) Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental Parasitology*, **28**: 30-36.
- JORDAN, A., CALDWELL, D. J., KLEIN, J., COPPEDGE, J., POHL, S., FITZCOY, S., & LEE J. T. (2011) *Eimeria tenella* oocyst shedding and output in cecal or fecal contents following experimental challenge in broilers. *Poultry Science*. **90**: 990-995.
- KASPER, L. H. & BUZONI-GATEL, D. (2001) Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infection and Immunity*, **69**: 1–8.
- KOINARSKI, V., GEORGIEVA, N., GADJEVA, V. & PETKOV, P. (2005) Antioxidant status of broiler chickens, infected with *Eimeria acervulina*. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **156(10)**: 498-502.
- KOJ, A. (1996) Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1317**: 84-94.
- KWAK, H., AUSTIC, R.E. & DIETERT, R. R. (1999) Influence of dietary arginine concentration on lymphoid organ growth in chickens. *Poultry Science*, **78**: 1536–1541.
- LILLEHOJ, H. S. & LI, G. (2004) Nitric oxide production by macrophages stimulated with coccidia sporozoites, lipopolysaccharide, or interferon- $\gamma$ , and its dynamic changes in SC and TK strains of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Avian Diseases*, **48**: 244–253.
- MORALES-LOPEZ, R., AUCLAIR, E., GARCÍA, F., ESTEVE-GARCIA, E. & BRUFAU, J. (2009) Use of yeast cell walls;  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucans; and mannoproteins in broiler chicken diets. *Poultry Science*, **88**: 601–607.

MUNIR, K., MUNEER, M.A., MASAOU, E., TIWARI, A., MAHMUD, A., CHAUDHRY, R.M. & RASHID, A. (2009) Dietary arginine stimulates humoral and cell-mediated immunity in chickens vaccinated and challenged against hydropericardium syndrome virus. *Poultry Science*, **88**: 1629–1638.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (1994) Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

OVINGTON, K.S., ALLEVA, L.M. & KERR, E.A. (1995) Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp. *International Journal of Parasitology*, **25(11)**: 1331-1351.

PÉREZ-CARBAJAL, C., CALDWELL, D., FARNELL, M., STRINGFELLOW, K., POHL, S., CASCO, G., PRO-MARTÍNEZ, 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. *Poultry Science*, **89**: 1870–1877

RATH, N.C., ANTHONY, N.B., KANNAN, L., HUFF, W.E., HUFF, G.R., CHAPMAN, H.D., ERF, G.F. & WAKENELL, P. (2009) Serum ovotransferrin as a biomarker of inflammatory diseases in chickens. *Poultry Science*, **88**: 2069–2074.

RUIZ-FERIA, C.A. & ABDUKALYKOVA, S.T. (2009) Arginine and vitamin E improve the antibody responses to infectious bursal disease virus (IBDV) and sheep red blood cells in broiler chickens. *British Poultry Science*, **50(3)**: 291-297.

SAS INSTITUTE. (2006) SAS/STAT 9.0 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.

SHASHIDHARA, R.G. & DEVEGOWDA, G. (2003) Effect of dietary mannanoligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. *Poultry Science*, **82**: 1319–1325.

SHIRLEY, M.W., SMITH, A.L. & BLAKE, D.P. (2007) Challenges in the successful control of the avian coccidia. *Vaccine*, **25**: 5540–5547.

SHIRLEY, M.W., SMITH, A.L. & TOMLEY, F.M. (2005) The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Advanced Parasitology*, **60**: 286-330.

SOETERS, P.B. & GRIMBLE, R.F. (2009) Dangers and benefits of the cytokine mediated response to injury and infection. *Clinical Nutrition*, **28(6)**: 583-596.

SORCI, G. & FAIVRE, B. (2009) Inflammation and oxidative stress in vertebrate host–parasite systems. *Philosophical Transactions B*. **364**: 71–83

XIE, H., HUFF, G.R., HUFF, W.E., BALOG, J.M. & RATH, N.C. (2002a) Effects of ovotransferrin on chicken macrophages and heterophil-granulocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, **26**: 805–815.

XIE, H., NEWBERRY, L., CLARK, F.D., HUFF, W.E., HUFF, G.R., BALOG, J.M. & RATH, N.C. (2002b) Changes in serum ovotransferrin levels in chickens with

experimentally induced inflammation and diseases. *Avian Diseases*, **46**: 122-131.

XIE, H., RATH, N.C., HUFF, G.R., BALOG, J.M. & HUFF, W.E. (2001) Inflammation-induced changes in serum modulate chicken macrophage function. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **80**: 225-235.

ZHANG, B., GUO, Y. & WANG, Z. (2008) The modulating effect of  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucan supplementation in the diet on performance and immunological responses of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, **21(2)**:237-244.



## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

### 1. Conclusiones

Alimentar a pollos de engorda con dietas suplementadas con arginina y vitamina E (+ 0.3 % y 80 mg/kg de alimento, respectivamente), mejoró la respuesta inmune contra el estrés inmunológico causado mediante la aplicación de varias vacunas de manera simultánea.

La respuesta inmune de pollos de engorda alimentados con dietas suplementadas con arginina y vitamina E, o con MOS, o con ambos, fue mejor cuando estos fueron vacunados con *Eimeria* spp. para el control de coccidiosis

### 2. Recomendaciones

La interrelación entre nutrición e inmunidad, es un área de investigación muy interesante. En este trabajo se estudio la suplementación de arginina, vitamina E y MOS en las dietas para pollos de engorda, y se encontraron resultados interesantes en la regulación de la respuesta inmune tanto en el estrés causado por la aplicación conjunta de diferentes vacunas (reacción postvacunal) como en la coccidiosis, los cuales son problemas comunes en los sistemas de producción avícola en México. Aunque, estas estrategias nutricionales tuvieron resultados alentadores en la inmunidad de las aves, evaluar su función a nivel de campo, sería el paso siguiente y necesario.