

LA INCLUSIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia origanoides*) MEJORA PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN POLLOS DE ENGORDE

THE INCLUSION OF ORÉGANO ESSENTIAL OIL (*Lippia origanoides*) IMPROVES IMMUNE PARAMETERS IN BROILERS

INCLUSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia origanoides*) MELHORA OS PARÂMETROS IMUNES EM FRANGOS DE CORTE

TOMÁS ANTONIO MADRID-GARCÉS^{1*}, JAIME EDUARDO PARRA-SUESCÚN², ALBEIRO LÓPEZ-HERRERA³

RESUMEN

*Los alimentos balanceados para la industria del pollo de engorde generalmente tienen adición de antimicrobianos, los cuales actúan como promotores de crecimiento. Actualmente estos se estya que se han asociado a resistencias microbianas a antibióticos utilizados en medicina humana. Como alternativa, se propone el uso de extractos de plantas aromáticas como los “aceites esenciales”. Evaluar la funcionalidad del aceite esencial de orégano (AEO) (*Lippia origanoides*) sobre parámetros inmunológicos en pollos de engorde. Se evaluo en 200 pollos machos de la línea Avian Cobb500. Muestras sanguíneas los días 14, 28 y 42 de vida. Los animales fueron aleatorizados a una de cinco dietas: dieta comercial con y sin antibiótico; esta última fue adicionada niveles de AEO (75 ppm, 100 ppm o 200 ppm). Diseño estadístico de bloques al azar en arreglo de parcelas*

Recibido para evaluación: 27 de Junio de 2016. **Aprobado para publicación:** 11 de Mayo de 2017.

- 1 Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Facultad de Ciencias agrarias. Departamento de Producción animal. Grupo de investigación BIOGEM. Ms.C, Ph.D. Medellín, Colombia.
- 2 Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Facultad de Ciencias agrarias. Departamento de Producción animal. Grupo de investigación BIOGEM. Ph.D. Medellín, Colombia.
- 3 Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Facultad de Ciencias agrarias. Departamento de Producción animal. Grupo de investigación BIOGEM. Ph.D. Medellín, Colombia.

Correspondencia: tamadrid@unal.edu.co

dividas. Aumento significativo ($P < 0,05$) en las poblaciones de células inmunes, aumento significativo ($P < 0,05$) de los anticuerpos postvacunales para Newcastle y disminución significativa ($P < 0,05$) del pH intestinal, en animales que consumieron dieta con mayor inclusión de AEO (200 ppm), comparados con la dieta con antibiótico. La adición de 200ppm de AEO estimuló sistema inmune de las aves, demostrando que AEO se puede proyectar como promotor de crecimiento con beneficios inmunológicos en pollos de engorde.

ABSTRACT

*Food for feeding broilers with addition of antibiotics as growth promoters acting. Currently this is prohibited because they can transmit microbial resistance to antibiotics used in human medicine. Alternatively, the use of aromatic plant extracts, "essential oils" is proposed. To evaluate the functionality of the essential oil of oregano (AEO) (*Lippia origanoides*) on immunological parameters in broilers. We experimented with 200 male broilers of Avian Cobb500 line. blood samplings on 14, 28 and 42 of life. The animals were randomized to one of five diets: Commercial diet with and without antibiotic; the latter was added AEO levels (75 ppm, 100 ppm or 200 ppm). Statistical randomized block design in divided plots arrangement. Significant increase ($P < 0,05$) in immune cell populations, significant increase ($P < 0,05$) of post-vaccine antibodies to Newcastle and significant ($P < 0,05$) of intestinal pH in animals fed diet with greater inclusion of AEO (200ppm) compared to the diet with antibiotic. The addition of 200 ppm of AEO stimulated immune system of birds, showing that AEO can be projected as growth promoter with immunological benefits in broilers.*

RESUMO

*Alimentos para a alimentação de frangos de corte com a adição de antimicrobiana como promotores de crescimento de agir. Actualmente estes estão a ser substituídas porque eles têm sido associados com resistência microbiana aos antibióticos utilizados na medicina humana. Alternativamente, a utilização de extractos de plantas aromáticas, "óleos essenciais" é proposta. Avaliar a funcionalidade do óleo essencial de orégano (AEO) (*origanoides Lippia*) em parâmetros imunológicos em frangos de corte. Nós experimentamos com 200 frangos de corte machos da linhagem Avian Cobb500. amostragens de sangue em 14, 28 e 42 de vida. Os animais foram randomizados para um dos cinco dietas: dieta comercial com e sem antibióticos; o último foi adicionado níveis AEO (75 ppm, 100ppm ou 200 ppm). delineamento em blocos casualizados estatística no arranjo parcelas divididas. Aumento significativo ($P < 0,05$) em populações de células imunes, aumento significativo ($P < 0,05$) de anticorpos pós-vacinais para Newcastle e significativa ($P < 0,05$) do pH intestinal em animais alimentados com a dieta com maior inclusão de AEO (200 ppm) em comparação com a dieta com antibiótico. A adição de 200 ppm de AEO estimulada sistema imunitário das aves, mostrando que AEO pode ser projectada como promotor de crescimento com benefícios imunológicos em frangos.*

PALABRAS CLAVE:

Aditivos, Antimicrobianos, Inmunidad, Producción avícola

KEYWORDS:

Antimicrobial, Immunity, Nutritional additives, Poultry production

PALAVRAS-CHAVE:

Aditivos nutricionais, Antimicrobias, Imunidade, Produção de aves.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo y salud del tracto gastrointestinal son la clave de la productividad de todos los animales de granja, incluyendo a las aves de corral [1]. El intestino es un órgano complejo que forma parte del tracto gastrointestinal (TGI) y es el paso obligado de los nutrimentos que sirven de base para el metabolismo, crecimiento y mantenimiento; además, aportan los recursos para el sistema inmunológico, sistema esquelético y nervioso [2].

El lumen intestinal sano es colonizado por una gran población de bacterias, y a su vez es un sitio importante para la entrada de microorganismos patógenos. Por tanto, el reconocimiento de antígenos mediante muestreo de la luz intestinal por células presentadoras de antígeno es importante tanto en el mantenimiento de la homeostasis como en el desarrollo de inmunidad a patógenos [3,4]. La población microbiana colonizadora, como lactobacilos y bifidobacterias, es sensible a cambios que puedan ocurrir en el TGI del hospedero, por lo que en éste deben existir factores adecuados de pH, temperatura, nutrientes y fluidos esenciales. El establecimiento de esta población en el TGI ocurre inmediatamente después del nacimiento, cuando las aves empiezan a consumir alimento [5]. Los antimicrobiales usados como promotores de crecimiento (APC) han permitido mejorar los niveles de producción pero se les atribuye la aparición de cepas multiresistentes a los antimicrobiales. Los aceites esenciales de orégano (AEO) se han propuesto como aditivos naturales para su uso en pollos de engorde, existiendo diferentes quimiotipos con una amplia biodiversidad [6].

Inmunomodulación nutricional puede ser definida como la suplementación dirigida de nutrientes dietéticos específicos para alterar algún aspecto de la función inmune, para llevar a cabo un objetivo previsto. La manipulación de algunos nutrientes en la dieta resulta en consecuencias inmunoregulatoras, debido a la participación de los nutrientes o de sus productos en la comunicación dentro y entre leucocitos [7].

Por lo anterior, este estudio evaluó la funcionalidad del AEO de *Lippia organoides* a tres niveles de inclusión 75, 100 y 200 ppm como sustituto de los Antimicrobiales promotores de crecimiento (APC) en aspectos relacionados con la respuesta inmune en pollos de engorde.

MÉTODO

Consideraciones éticas

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a las guías propuestas por The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals [8]. Esta investigación fue avalada por El Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (CEMED 045 del 10 de junio de 2014).

Localización

El trabajo de campo se realizó en el Centro de producción San Pablo, perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, ubicado en el municipio de Rionegro, paraje "El Tablacito", localizado a 2100 msnm, con una temperatura entre 12 y 18°C, correspondiendo a una zona de vida bosque muy húmedo Montano bajo (bmh-MB).

Animales

Se utilizaron 45 pollos de línea Avian Cobb500 de un día de nacidos, alojados en corrales en piso. El período experimental tuvo una duración de 42 días. La cría se realizó siguiendo procedimientos comerciales en una granja experimental.

Manejo Sanitario

Para el recibimiento de los pollos, se realizó lavado, limpieza y desinfección de galpón, cortinas, comederos y bebederos; además, se hizo el control de roedores e insectos con productos obtenidos en casas comerciales. Las criadoras se encendieron cinco horas antes de la llegada de los animales, para que la temperatura fuera óptima al tiempo de arribo de los pollos. Los pollos fueron vacunados contra Newcastle, Bronquitis y Gumboro en la incubadora, y los días 8 y 15 se realizaron un refuerzo de Gumboro y Newcastle vía ocular.

Dietas

Se elaboró una dieta multietapa que cumplía con los requerimientos mínimos nutricionales de la Guía de manejo Cobb 500 [9]. El alimento utilizado en el estudio estuvo libre de antimicrobiales (excepto la dieta

D2, donde se utilizó Bacitracina de Zinc (ampliamente usada en la industria) como Antimicrobial Promotor de Crecimiento (APC). Para el experimento no fue necesario modificar la dieta, sólo se adicionaron las concentraciones de AEO de *Lippia origanoides* a tres niveles 75, 100 y 200 ppm.

Las dietas utilizadas en la experimentación fueron las siguientes:

Dieta 1 (Control): Alimento comercial sin antimicrobiano (AC), sin adición AEO.

Dieta 2: AC + Bacitracina de Zinc sin adición de AEO.

Dieta 3: AC + 75 ppm de AEO

Dieta 4: AC + 100 ppm de AEO

Dieta 5: AC + 200 ppm de AEO

Los pollos consumieron las dietas que les correspondieron desde el día 1 del experimento, pero la toma de las primeras muestras para determinar diferencias fue a los 14 días de experimentación, después de determinar que el día 1 todos presentaban parámetros inmunológicos idénticos. Los animales tuvieron acceso a agua a voluntad durante todo el tiempo experimental.

Toma de muestras

Sacrificio. Durante la fase de experimentación se realizaron eutanasias escalonadas días 14, 28 y 42, donde se sacrificaron cinco aves por tratamiento. Todas las aves fueron sacrificadas 2,5 horas después de su última comida. Los animales se sedaron por inhalación de Nitrox y posteriormente se les realizó eutanasia humanitaria con dióxido de carbono durante 3 minutos. Posterior a esto, se tomó una muestra de sangre por medio de punción cardíaca. Después del sacrificio, se extrajo completamente el intestino delgado desde la unión pilórica hasta la válvula íleo-cecal [10]. El intestino fue alineado y medido en una mesa sin ningún tipo de tensión; posteriormente éste se dividió en tres regiones (duodeno, yeyuno, e íleon), para la medición del pH del contenido intestinal.

Sangre. Se tomaron 2 mL de sangre por animal en un tubo tapa morada (con anticoagulante (EDTA)) para hemograma y tapa roja (sin anticoagulante) para medición de anticuerpos en suero.

Determinación de las poblaciones de células inmunes en sangre

Luego de la toma de muestras de sangre, estas fueron almacenadas, refrigeradas y transportadas al laboratorio veterinario de la Universidad de Antioquia para su posterior análisis. El portaobjetos fue sometido a tinción con el colorante de Wright [11] y se realizó un conteo diferencial de células para cada muestra. Se realizó un conteo general para observar las poblaciones de eosinófilos, basófilos, heterófilos, monocitos y linfocitos para determinar el porcentaje en que se encontraban. Se contaron cien a doscientas células con ayuda del contador manual de células bajo el lente de 100x y se realizó el cálculo general del porcentaje de cada población de leucocitos [11].

Determinación de los anticuerpos postvacunales

Inmediatamente después de la toma de muestra de sangre, el tubo tapa roja fue centrifugado para separar el suero y almacenado a -70°C hasta la realización del análisis de Inhibición de la hemaglutinación (IH) para detección de anticuerpos postvacunales contra el virus de Newcastle, en el laboratorio de diagnóstico veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

pH intestinal

Para la determinación del pH intestinal se tomó 1 g de muestra de contenido de duodeno, yeyuno, íleon y ciegos, para luego resuspenderse en 12,5 mL de agua destilada desionizada. Esta mezcla se agitó manualmente con agitador de vidrio lavándolo en cada registro con agua destilada. Posteriormente, se insertó en la mezcla un electrodo de pH y se realizaron las lecturas en un potenciómetro con precisión de tres decimales. El pH de la suspensión fue medido dentro de los 45 minutos subsiguientes al sacrificio de las aves [12].

Diseño estadístico

El experimento se realizó según un diseño bloques al azar en un arreglo de parcelas divididas (5 dietas por 3 edades), donde los animales fueron aleatorizados a uno de 15 tratamientos. Cada tratamiento tuvo un total de 5 repeticiones. El análisis estadístico fue desarrollado usando el procedimiento GLM del SAS (2007) se utilizó una prueba de Duncan para detectar significancia ($P < 0,05$) entre las medias. [13].

RESULTADOS

En general las aves que consumieron los diferentes alimentos, presentaron un buen estado de salud, no presentaron ningún síntoma o signo adverso de enfermedad que causara su retiro y/o sacrificio antes de terminar el periodo experimental. Adicionalmente las aves consumieron la ración diaria de alimento ajustada a la guía de manejo de la línea genética.

En este experimento no se encontró interacción estadística entre las diferentes dietas y los días de sacrificio, para ninguna de las variables en estudio, por ello no se hizo necesario desglosar y analizar cada uno de los factores de forma independiente.

Células sanguíneas

El cambio en las poblaciones de células inmunes sanguíneas entre cada una de las dietas y los periodos de exposición se puede ver en la Cuadro 1. Respecto a las

células inmunes sanguíneas, se observó un incremento significativo ($P < 0,01$) entre las diferentes dietas evaluadas, donde D1 reportó los valores más bajos en comparación con D2 y aquellas dietas con adición de AEO, donde los animales que consumieron D5 reportaron los mayores valores para las poblaciones de células inmunes sanguíneas. Para las mismas variables que fueron objeto de estudio, hubo diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes días de muestreo en cada una de las dietas ($P < 0,05$), donde se produjeron los valores más altos en el día 42.

En los resultados de monocitos se encontró para el día 14 diferencia estadística significativa ($P < 0,05$) entre todos los tratamientos, excepto entre D3 y D4. En el día 28 y 42 no hubo diferencia estadística ($P < 0,05$) entre D1 y D2, tampoco hubo diferencia significativa ($P < 0,05$) entre D3 y D4 en día 42. Entre las demás dietas si hubo diferencia estadística significativa ($P < 0,05$) y los valores más altos fueron presentados por las dietas que contenían mayor cantidad de AEO

Cuadro 1. Poblaciones de células sanguíneas en pollos alimentados con AEO (*Lippia origanoides*) durante 42 días.

| Dietas | Día | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | EEM |
|--|-----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------|
| Recuento Leucocitos totales (Cél. X103/ μ L) | 14 | 10,68 ^{AX} | 11,59 ^{BX} | 12,61 ^{CX} | 12,65 ^{CX} | 12,64 ^{CX} | 0,03 |
| | 28 | 12,13 ^{A,Y} | 13,54 ^{B,Y} | 14,14 ^{C,Y} | 14,98 ^{D,Y} | 15,57 ^{E,Y} | |
| | 42 | 13,89 ^{A,Z} | 14,48 ^{B,Z} | 14,91 ^{C,Z} | 15,37 ^{D,Z} | 16,04 ^{E,Z} | |
| Linfocitos (%) | 14 | 32,29 ^{AX} | 33,83 ^{BX} | 35,95 ^{CX} | 38,94 ^{DX} | 39,97 ^{EX} | 0,05 |
| | 28 | 35,8 ^{A,Y} | 37,89 ^{B,Y} | 40,85 ^{C,Y} | 41,59 ^{C,Y} | 43,54 ^{D,Y} | |
| | 42 | 38,43 ^{A,Z} | 43,25 ^{B,Z} | 43,37 ^{B,Z} | 43,74 ^{B,Z} | 47,78 ^{B,Z} | |
| Monocitos (%) | 14 | 1,05 ^{AX} | 1,19 ^{BX} | 1,55 ^{CX} | 1,61 ^{CX} | 1,86 ^{DX} | 0,03 |
| | 28 | 1,51 ^{A,Y} | 1,64 ^{A,Y} | 2,01 ^{B,Y} | 2,37 ^{C,Y} | 2,77 ^{D,Y} | |
| | 42 | 1,97 ^{A,Z} | 2,27 ^{A,Z} | 2,64 ^{C,Z} | 2,94 ^{C,Z} | 3,29 ^{D,Z} | |
| Heterófilos (%) | 14 | 30,15 ^{AX} | 31,04 ^{BX} | 32,64 ^{CX} | 32,69 ^{CX} | 33,99 ^{DX} | 0,03 |
| | 28 | 33,45 ^{A,Y} | 34,58 ^{B,Y} | 35,90 ^{C,Y} | 36,25 ^{D,Y} | 36,87 ^{E,Y} | |
| | 42 | 35,44 ^{A,Z} | 36,38 ^{B,Z} | 38,07 ^{C,Z} | 39,45 ^{D,Z} | 41,54 ^{E,Z} | |
| Eosinófilos (%) | 14 | 0,87 ^{AX} | 1,09 ^{BX} | 1,28 ^{CX} | 1,35 ^{CX} | 1,67 ^{DX} | 0,04 |
| | 28 | 1,17 ^{A,Y} | 1,39 ^{B,Y} | 1,64 ^{C,Y} | 1,95 ^{D,Y} | 2,03 ^{D,Y} | |
| | 42 | 1,64 ^{A,Z} | 2,01 ^{B,Z} | 2,23 ^{C,Z} | 2,47 ^{D,Z} | 2,68 ^{E,Z} | |
| Basófilos (%) | 14 | 0,10 ^{AX} | 0,22 ^{BX} | 0,35 ^{CX} | 0,48 ^{DX} | 0,59 ^X | 0,02 |
| | 28 | 0,28 ^{A,Y} | 0,36 ^{A,Y} | 0,59 ^{B,Y} | 0,64 ^{B,Y} | 0,71 ^{B,Y} | |
| | 42 | 0,47 ^{A,Z} | 0,54 ^{B,Z} | 0,79 ^{C,Z} | 0,84 ^{C,Z} | 1,08 ^{D,Z} | |

D1: Alimento comercial sin antibiótico (AC), sin adición AEO. D2: Alimento comercial con antibiótico, sin adición de AEO. D3: AC + 75ppm de AEO. D4: AC + 100 ppm de AEO. D5: AC + 200 ppm de AEO. EEM: Error estándar de la media. A,B,C,D,E Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$). X,Y,Z Dentro de una misma columna, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ($P < 0,05$). EEM: Error estándar de la media.

Lippia origanoides. Entre edades hubo diferencia estadística significativa ($P < 0,05$) todas las dietas en las tres edades evaluadas.

Para los heterófilos hubo diferencia estadística ($P < 0,05$) entre todas las dietas y todas las edades, excepto D3 y D4 para día 14. Los valores más altos fueron presentados por las dietas D4 y D5 en todas las edades.

En el caso de los eosinófilos, no hubo diferencia estadística significativa ($P < 0,05$) entre D3 y D4 para el día 14, tampoco hubo diferencia estadística ($P < 0,05$) entre D4 y D5 el día 28. Para las demás dietas y para todas las edades hubo diferencia estadísticas significativa ($P < 0,05$). En todas las edades D5 presentó los valores más altos de eosinófilos.

Para basófilos hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre todas las edades. En el día 14 hubo diferencias estadísticas ($P < 0,05$) entre todas las dietas. En el día 28 no hubo diferencia estadística ($P < 0,05$) entre D1 y D2, tampoco hubo diferencia significativa ($P < 0,05$) entre D3, D4 y D5, aunque los mayores resultados los presentó D5. En el día 42 no hubo diferencia estadística ($P < 0,05$) entre D3 y D4, pero si la hubo entre las demás dietas. Los valores más altos fueron presentados por D5 en todas las edades.

Títulos de anticuerpos postvacunales contra Newcastle

Los resultados de anticuerpos postvacunales contra Newcastle en pollos alimentados con AEO (*Lippia origanoides*) se presentan en la Cuadro 2.

En los resultados de la medición de anticuerpos postvacunales contra Newcastle por la prueba de inhibición de hemaglutinación, se observó que en general para todas las dietas el fenómeno de títulos de anti-

cuerpos bajos el día 14, que aumentaron para el día 28 y volvieron a disminuir para el día 42. Esto puede deberse debido al programa de vacunación utilizado.

En general las dietas que contenían mayor cantidad de AEO (*Lippia origanoides*) presentaron los mayores títulos de anticuerpos postvacunales contra Newcastle que las dietas sin o con antibiótico (D1 y D2). En el día 28, no se presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre D4 y D5, tampoco hay diferencia estadística significativa ($P < 0,05$) entre D3 y D4 para día 42, pero sí entre estos con D5 ($P < 0,05$). Entre el día 14 y 42 no hubo diferencia significativa ($P < 0,05$) entre D1 y D2, que si se presentó en el día 28. En el día 14 además no se presenta diferencia estadística ($P < 0,05$) entre D1, D2 y D3, pero sí de estos con D4 y D5 que no presentan diferencia estadística significativa ($P < 0,05$) entre ellos.

pH intestinal

Los resultados de las mediciones del pH intestinal en los tres segmentos del intestino delgado y en el ciego se presentan en la Cuadro 3.

Se observó una disminución significativa ($P < 0,01$) entre las diferentes dietas evaluadas, donde D1 reportó los valores más altos en comparación con D2 y aquellas dietas con adición de AEO, donde los animales que consumieron D5 reportaron los menores valores para el pH intestinal. Para los segmentos intestinales se presentó diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,01$), donde el segmento duodeno mostró los valores más altos en comparación con los otros segmentos (yeyuno, ileon y ciego) respecto al pH intestinal. Para las mismas variables que fueron objeto de estudio, hubo diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes días de muestreo en cada una de las dietas ($P < 0,05$), donde se produjeron los valores más bajos en el día 42.

Cuadro 2. Títulos de anticuerpos postvacunales contra Newcastle en pollos alimentados con AEO (*Lippia origanoides*)

| Variable | Día | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | EEM |
|-------------|-----|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| Anticuerpos | 14 | 2 ^{AX} | 4 ^{AX} | 4 ^{AX} | 16 ^{BX} | 16 ^{BX} | 0,85 |
| | 28 | 32 ^{AY} | 128 ^{BY} | 128 ^{CY} | 258 ^{DY} | 256 ^{DY} | |
| | 42 | 8 ^{AZ} | 9 ^{AZ} | 16 ^{BZ} | 21 ^{BZ} | 27 ^{Cz} | |

D1: Alimento comercial sin antibiótico (AC), sin adición AEO. D2: Alimento comercial con antibiótico, sin adición de AEO. D3: AC + 75ppm de AEO. D4: AC + 100 ppm de AEO. D5: AC + 200 ppm de AEO. EEM: Error estándar de la media. A,B,C,D,E Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($P < 0,05$). X,Y,Z Dentro de una misma columna, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente ($P < 0,05$). EEM: Error estándar de la media.

Cuadro 3. pH en diferentes segmentos del intestino de pollos alimentados con adición de AEO (*Lippia origanoides*)

| Segmento Intestinal | Días | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | EEM |
|----------------------|------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|------|
| Duodeno ¹ | 14 | 7,62 ^{A,X} | 7,47 ^{B,X} | 7,00 ^{C,X} | 6,90 ^{C,X} | 6,77 ^{D,X} | 0,01 |
| | 28 | 7,41 ^{A,Y} | 7,10 ^{B,Y} | 6,92 ^{C,X} | 6,84 ^{D,X} | 6,60 ^{E,Y} | |
| | 42 | 7,04 ^{A,Z} | 6,63 ^{B,Z} | 6,53 ^{C,Y} | 6,49 ^{CD,Y} | 6,43 ^{D,Z} | |
| Yeyuno ² | 14 | 7,31 ^{AX} | 7,23 ^{B,X} | 7,02 ^{C,X} | 6,89 ^{D,X} | 6,67 ^{E,X} | 0,01 |
| | 28 | 7,24 ^{A,X} | 7,03 ^{B,Y} | 6,78 ^{C,Y} | 6,69 ^{C,Y} | 6,42 ^{D,Y} | |
| | 42 | 6,96 ^{A,Y} | 6,58 ^{B,Z} | 6,15 ^{C,Z} | 6,11 ^{C,Z} | 5,93 ^{D,Z} | |
| Íleon ³ | 14 | 6,98 ^{A,X} | 6,92 ^{A,X} | 6,62 ^{B,X} | 6,62 ^{B,X} | 6,36 ^{C,X} | 0,01 |
| | 28 | 6,57 ^{A,Y} | 6,37 ^{B,Y} | 6,34 ^{B,Y} | 6,29 ^{C,Y} | 6,19 ^{D,Y} | |
| | 42 | 6,69 ^{A,Z} | 6,18 ^{B,Z} | 6,09 ^{C,Z} | 6,02 ^{D,Z} | 5,96 ^{D,Z} | |
| Ciego ⁴ | 14 | 6,84 ^{A,X} | 6,55 ^{B,X} | 6,45 ^{C,X} | 6,32 ^{D,X} | 6,25 ^{E,X} | 0,01 |
| | 28 | 6,41 ^{A,Y} | 6,10 ^{B,Y} | 6,02 ^{C,Y} | 5,84 ^{D,Y} | 5,60 ^{E,Y} | |
| | 42 | 6,02 ^{A,Z} | 6,00 ^{A,Z} | 5,84 ^{B,Z} | 5,73 ^{B,Z} | 5,49 ^{C,Z} | |

D1: Alimento comercial sin antibiótico (AC), sin adición AEO. D2: Alimento comercial con antibiótico, sin adición de AEO. D3: AC + 75ppm de AEO. D4: AC + 100 ppm de AEO. D5: AC + 200 ppm de AEO. EEM: Error estándar de la media. A,B,C,D,E Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente diferentes (P<0,05). X,Y,Z Dentro de una misma columna, medias con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente (P<0,05). 1,2,3,4 Dentro de una misma columna con un superíndice común (por variable en estudio) no difieren estadísticamente (P<0,05). EEM: Error estándar de la media.

Los resultados obtenidos en este trabajo para heterófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos son distantes de los obtenidos por Perozo *et al.* (2003) [13], quienes tenían una escala de medición diferente y exponían los pollos a aflatoxina AFB1 y no encontraron diferencia significativa con respecto al grupo control. Los valores de leucocitos, linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos concuerdan con los rangos hematológicos en aves silvestres reportados por Gálvez *et al.* (2009) [14]. Los datos además concuerdan con los valores hematológicos y de leucogramas reportado por Díaz (2012) [15] quien evaluó el efecto de las condiciones climáticas y el estrés calórico sobre las variables hematológicas en 2 líneas de pollos de engorde.

En general los valores hematológicos se asemejan a los reportados en otros estudios [16] [17] y se mantienen en los rangos establecidos para las aves. Existe un efecto notorio del AEO de *Lippia origanoides* sobre el incremento de células inmunológicas, siendo mayor el efecto en D4 y D5 que tienen 100 y 200ppm de AEO respectivamente. En este estudio la adición de AEO de *Lippia origanoides* tiene un efecto positivo sobre la cantidad de células inmunológicas en sangre, lo que

implicaría pollos mejor preparados para contrarrestar retos con patógenos.

Existen un sinnúmero de factores que afectan el control de la enfermedad de Newcastle. Uno de los factores que puede influir en las respuestas vacunales es la nutrición [6]. Los datos obtenidos para anticuerpos vacunales contra Newcastle, permiten observar un aumento en los títulos de anticuerpos a medida que aumenta la adición de AEO (*Lippia origanoides*), lo que se traduce en una mayor protección para las aves contra el agente infeccioso que ocasiona esta enfermedad.

Los resultados obtenidos en pH intestinal presentan valores superiores en duodeno para D1 y D2. En yeyuno, se presentaron valores inferiores a los obtenidos en este trabajo, no obstante en íleon y ciegos, los valores de pH fueron más bajos en nuestra investigación. Jaramillo (2011) [1], comparó dietas que contenían un ácido orgánico, un prebiótico y su combinación, se presentaron datos similares pero superiores si se compara con la dieta D5 que contenía 200ppm de AEO (*Lippia origanoides*). En el estudio reportado por Jaramillo (2011) [1] el pH más

ácido en íleon se presentó con la adición de una mezcla de ácidos orgánicos y Bacitracina de Zn, que fue un pH semejante al del presente trabajo cuando se adicionó a 100 y 200ppm el AEO (*Lippia origanoides*). La dinámica de la variación de pH en respuesta a la suplementación, demuestra como los ingredientes que se incorporan en la dieta pueden afectar positivamente el pH en las diferentes porciones del intestino, siendo ideal un pH ácido para el control de la replicación de agentes patógenos. Por lo anterior, en las cuatro secciones intestinales evaluadas el pH más ácido se obtuvo con la adición de 200ppm de AEO (D5). No obstante, los resultados de pH obtenidos en el intestino de pollos en esta investigación se encuentran dentro de los parámetros fisiológicos normales citados por Van der Klis, et al. (2002) [12] [16] [17].

La población microbiana colonizadora es sensible a cambios que puedan ocurrir en el tracto gastrointestinal (TGI) del hospedero, por lo que en éste deben existir factores adecuados de pH, temperatura, nutrientes y secreciones esenciales. El establecimiento de esta población en TGI ocurre inmediatamente después del nacimiento, cuando las aves empiezan a consumir alimento [5]. Con los resultados obtenidos en la presente investigación se puede inferir que la adición de AEO (*Lippia origanoides*) mejora las condiciones de pH del TGI en lo que tiene que ver con disminución del pH, de esta forma se podría potencializar el establecimiento de cepas bacterianas benéficas, excluir el crecimiento de cepas bacterianas patógenas y mejorar niveles de absorción de nutrientes [12].

CONCLUSIONES

La adición de AEO (*Lippia origanoides*) en pollos de engorde mostró tener un efecto positivo en variables inmunológicas como poblaciones de células de sistema inmune en sangre, pH intestinal y anticuerpos posvacunales contra Newcastle. Con los resultados obtenidos en este estudio, se proyecta el AEO (*Lippia origanoides*) como un promotor nutricional de crecimiento con beneficios inmunológicos en pollos de engorde y como remplazo de los APC.

REFERENCIAS

[1] STANLEY, D., GEIER, M.S., HUGHES, R.J., DENMAN, S.E. and MOORE, R.J. Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. *PLoS One*, 12(8), 2013, e84290.

- [2] AGOSTINHO, T.S.P., CALIXTO, L.F.L., GOMES, A.V.C., TOGASHI, C.K., CURVELLO, F.A. and LIMA, M.F. Development of organs of the gastrointestinal tract and performance of broilers fed in the post-hatch phase. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 13(4), 2012, p.1143-1155
- [3] DONATO, T.C., ANGELITA S.A., BAPTISTA, B.D., SMANIOTTO, C.O.D., GARCIA, A.S., OKAMOTO, J.L. SEQUEIRA e RAPHAEL L.A. Avaliação dos efeitos de 5-hidroxitriptofano e m-hidroxi-benzilhidrazina associados a *Lactobacillus spp.* na morfometria intestinal e imunomarcagem de serotonina em frangos de corte desafiados com *Salmonella Enteridis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(7), 2015, p. 677-684.
- [4] ENCHEVA, V., WAIT, R., BEGUM, S., GHARBIA, S.E. and SHAH, H.N. Protein expression diversity amongst serovars of *Salmonella enterica*. *Microbiology*, 153(12), 2015, p. 4183-4193.
- [5] MORALES-LOPEZ, R. and BRUFAU, J. Immunomodulatory effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* cell wall in broiler chickens inoculated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *British Poultry Science*, 54(2), 2013, p. 247-251.
- [6] BETANCOURT, L. Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales de *Lippia origanoides* kunth en pollos de engorde. *Revista MVZ Córdoba*, 17(2), 2012, p. 3033-3040.
- [7] KORVER, D. Interacción entre la nutrición y la función inmune en pollos de engorde. Edmonton (Canada): University of Alberta, Poultry Research Center, 2012.
- [8] COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES (CIOMS). *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. Geneva (Italy): 2012, p. 28.
- [9] GUÍA DE MANEJO COBB. Suplemento informativo sobre rendimiento y nutrición de pollos de engorde [online]. 2012. Disponible en: http://www.cobb-vantress.com/docs/default-source/cobb-500-guides/cobb500_bpn_supp_spanish.pdf?sfvrsn=2. [Citado el 20 de noviembre del 2015].
- [10] LÓPEZ, N., AFANADOR, G. y ARIZA, C.J. Evaluación del efecto de la suplementación de levaduras sobre la morfometría de vellosidades intestinales y productos de la microflora en pollo. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 55, 2008, p. 63-76.
- [11] YAVARI, M., HAGHKHAH, M., AHMADI, M.R., GHEISARI, H.R. and NAZIFI, S. Comparison of cervical and uterine cytology between different classification of postpartum endometritis and bacterial isolates in Holstein Dairy Cows. *Inter-*

- national Journal of Dairy Science, 4, 2009, p. 19-26.
- [12] AHMADI, M.R., NAZIFI, S. and GHASARI, H.R. Comparison of hormonal changes of estrus cycle with cytology of cervical mucosa and hematological parameters in dairy heifers. *Comparative Clinical Pathology*, 15, 2006, p. 94-97.
- [13] CHÁVEZ-GÓMEZ, L., LÓPEZ-HERRERA, A. and PARRA-SUESCÚN, J.. Inclusion of probiotic strains improves immune parameters in broilers. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), 2015, p. 160-169.
- [14] SAS® INSTITUTE INC. Statistical Analysis Systems Institute. SAS/STAT User's Guide, Version 9.1th Ed. Cary (NC): SAS Institute Inc, 2007.
- [15] PEROZO, F., FERRER, J., ALVARADO, M., RINCON, H., MAVAREZ, Y. y GIL, M. Valores hematólogicos en pollos de engorde expuestos de forma continua a bajas dosis de aflatoxina B1 en el estado de Zulia, Venezuela. *Revista científica, FCV-LUZ*, 13(1), 2003, p. 59-64.
- [16] GÁLVEZ, C., RAMÍREZ, G. y OSORIO, J. El laboratorio clínico en hematología de aves exóticas. *Biosalud*, 8(1), 2009, p. 178-188.
- [17] DÍAZ, E. Efectos del estrés calórico en el piedemonte amazónico colombiano sobre algunos parámetros fisiológicos y zootécnicos en dos estirpes de pollo de engorde [Tesis maestría en estudios amazónicos]. Leticia (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, 2012.
- [18] DÍAZ, E., NARVÁEZ-SOLARTE, W. y GIRALDO, J. Alteraciones Hematológicas y Zootécnicas del Pollo de Engorde bajo Estrés Calórico. *Información tecnológica*, 27(3), 2016, p. 221-230.
- [19] VAN DER KLIS, J.D. and JANSMAN, A.J.M. *Salud Intestinal en Aves. Ajuste de Dietas*, 2002, 21 p.