



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

**EFFECTO DE ARGININA Y VITAMINA E EN LA RESPUESTA
INMUNITARIA DE POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS E
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Eimeria* spp.**

CARLOS PÉREZ CARBAJAL

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

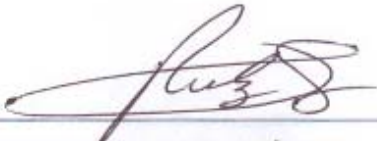
2010

La presente tesis, titulada: **Efecto de arginina y vitamina E en la respuesta inmunitaria de pollos de engorda vacunados e infectados experimentalmente con *Eimeria* spp.**, realizada por el alumno: **Carlos Pérez Carbajal**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

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

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



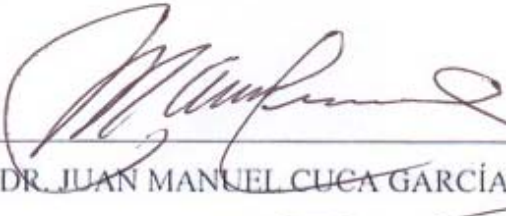
DR. ARTURO PRO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:



DR. CIRO ABEL RUÍZ FERIA

ASESOR:



DR. JUAN MANUEL CUA GARCÍA

ASESOR:



DR. JAIME GALLEGOS SÁNCHEZ

Montecillo, Texcoco, México, Marzo de 2010

**EFFECTO DE ARGININA Y VITAMINA E EN LA RESPUESTA INMUNITARIA DE
POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS E INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
CON *Eimeria* spp.**

Carlos Pérez Carbajal, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2010

Este experimento se llevó a cabo para analizar los efectos inmunomodulatorios de arginina (ARG) y vitamina E (VE) en pollos de engorda infectados con coccidias. Un total de 300 pollos, vacunados contra coccidiosis (Coccivac[®]-B) al primer día de edad, fueron divididos en seis grupos con la finalidad de evaluar tres niveles de ARG en el alimento (NARG, 1.44%; MARG, 1.74%; HARG, 2.04%) y dos niveles de VE (40 u 80 UI / kg de alimento, VE40 y VE80, respectivamente) en un diseño factorial 3 x 2. Los pollos se criaron en piso y se les proporcionó agua y una dieta a base de maíz y pasta de soya *ad libitum*. Al d 14, todos los pollos se infectaron oralmente con un cultivo de diferentes especies del género *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*). A los 9, 14, 22 y 28 d, se colectaron muestras de suero sanguíneo para medir los niveles de anticuerpos (isotipos IgG, IgA e IgM) por medio de la prueba de ELISA. La producción de óxido nítrico (NO) se midió usando muestras de plasma colectadas a los 14 y 28 d. El estallido oxidativo de heterófilos (HOB) y monocitos (MOB) se midió *in vitro* a los 21 d usando células aisladas de la sangre periférica. Los marcadores de lesiones (LS) se calcularon en el duodeno (UI), yeyuno (MI) y ciego a los 7, 21, 28 y 31 d. Las aves alimentadas con la dieta VE80-MARG mantuvieron altos niveles de IgG en todos los muestreos. La más alta concentración de IgA se obtuvo con la dieta VE40-NARG a los 22 d. Las aves alimentadas con la dieta VE80-MARG mantuvieron altos niveles de IgM a los 9, 14 y 28 d. Al d 21, las aves alimentadas con VE80 incrementaron el HOB y el MOB cuando ésta se combinó con NARG o HARG, mientras que las aves alimentadas con MARG incrementaron el HOB y el MOB cuando ésta se combinó con VE40. Éstos tratamientos tuvieron un efecto contrario en la producción de NO al d 28. Al d 31, las aves alimentadas con HARG tuvieron menores LS en el UI que las aves alimentadas con MARG, y las aves alimentadas con VE80 tuvieron menores LS en el MI que las aves alimentadas con VE40. Éstos resultados muestran que ARG y VE ejercen funciones complementarias en la respuesta inmunitaria de pollos de engorda en contra de infecciones con *Eimeria*.

Palabras clave: pollos de engorda, arginina, vitamina E, respuesta inmunitaria.

**EFFECT OF ARGININE AND VITAMIN E ON THE IMMUNE RESPONSE OF
BROILER CHICKENS VACCINATED AND EXPERIMENTALLY CHALLENGED
WITH *Eimeria* spp.**

Carlos Pérez Carbajal, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2010

This experiment was conducted to analyze the immunomodulatory effects of arginine (ARG) and vitamin E (VE) in broiler chickens against coccidial infections. A total of 300 chicks, vaccinated against coccidiosis (Coccivac[®]-B) at one-d old, were divided into six groups to evaluate three levels of ARG in the feed (NARG, 1.44%; MARG, 1.74%; HARG, 2.04%) and two levels of VE (40 or 80 IU / kg of feed, VE40 y VE80, respectively) in a 3 x 2 factorial design. Birds were reared in floor pens and supplied a corn-soybean basal diet and water *ad libitum*. At d 14, all chickens were infected orally with a mixture of *Eimeria* field isolates (*E. acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella*). At d 9, 14, 22, and 28, serum blood samples were collected to measure antibody levels (IgG, IgA, and IgM isotypes) through ELISA test. Production of nitric oxide (NO) was measured using plasma samples taken at d 14 and 28. *In vitro* heterophil (HOB) and monocyte (MOB) oxidative burst was measured at d 21 from cells isolated from peripheral blood. Lesion scores (LS) were calculated in upper (UI) and middle (MI) small intestine, and ceca at d 7, 21, 28, and 31. Birds fed with the VE80-MARG diet held high levels of IgG in all samplings. The highest IgA concentration was obtained with the VE40-NARG diet at d 22. Birds fed with the VE80-MARG diet held high levels of IgM at d 9, 14, and 28. At d 21, birds fed with VE80 increased both HOB and MOB when combined with NARG or HARG, whereas birds fed with MARG enhanced both HOB and MOB when combined with VE40. These treatments had an opposite effect in NO production at d 28. At d 31, birds fed with HARG diets had lower LS in the UI than birds fed with MARG diets, and birds fed with VE80 diets had lower LS in the MI than birds fed with VE40 diets. These results show that ARG and VE play complementary roles on the immune response of broilers chickens against *Eimeria* infections.

Key words: broilers, arginine, vitamin E, coccidiosis, immune response

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de existir.

A mi madre Luz María Carbajal Dávila (q.e.p.d.), por darme la vida y enseñarme que la herencia más valiosa es una formación profesional, para percatar y afrontar de una mejor perspectiva los acontecimientos de la vida.

A mi abuelo José Encarnación Ignacio Carbajal Aguilar (q.e.p.d.), por desearme lo mejor y tratarme siempre como a un hijo.

A mi esposa Virginia Sánchez Cruz, por todos los momentos maravillosos que hemos compartido y por el apoyo moral que siempre me ha brindado.

A mi abuela Guadalupe Carbajal Dávila, por tratarme siempre como a un hijo y por su apoyo incondicional.

A toda mi familia, que siempre me ha apoyado para conseguir las metas que me he propuesto en la vida.

A todos mis amigos, por su amistad y apoyo otorgado.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, y en especial al Programa de Ganadería, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico que me proporcionó durante mis estudios de Maestría.

A la Universidad *Texas A&M*, por darme la oportunidad de realizar una estancia académica en su Departamento de Avicultura bajo la dirección del Dr. Ciro Abel Ruíz Feria.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT), por proporcionarme el soporte económico para terminar esta tesis.

Al Dr. Arturo Pro Martínez, por su apoyo, consejos, motivación y asesoría brindada en todo el trayecto de mi formación académica en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Ciro Abel Ruíz Feria, por proporcionar la idea de esta investigación y por conseguir los fondos para el financiamiento de la misma. Además, quiero expresarle mi más sincera gratitud por compartir sus conocimientos y por apoyarme, motivarme y enseñarme nuevos caminos en mi vida personal y profesional. Dios bendiga a usted y a su familia.

Al Dr. Juan Manuel Cuca García, por sus valiosas sugerencias y comentarios en el mejoramiento de esta tesis.

Al Dr. Jaime Gallegos Sánchez, por sus oportunos comentarios en la revisión de esta investigación.

A los profesores, alumnos y técnicos del Departamento de Avicultura de la Universidad *Texas A&M* que intervinieron en esta investigación. Gracias por sus asesorías y apoyo.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Perspectiva general del sistema inmunitario.....	4
2.2. Inmunidad innata, natural o inespecífica.....	5
2.2.1. Barreras anatómicas.....	5
2.2.2. Barreras fisiológicas.....	6
2.2.3. Barreras fagocíticas.....	6
2.2.4. Barreras inflamatorias.....	8
2.2.5. Otros mecanismos de defensa del sistema inmunitario.....	9
2.3. Inmunidad adquirida, específica o adaptativa.....	10
2.3.1. Respuesta inmunitaria humoral.....	11
2.3.2. Respuesta inmunitaria celular.....	13
2.4. Colaboración entre la inmunidad innata y la adquirida.....	14
2.5. Perspectiva general del sistema inmunitario aviar.....	15
2.6. Interacciones entre nutrición y el sistema inmunitario aviar.....	17
2.7. Coccidiosis.....	19
3. PROBLEMÁTICA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
3.1. Planteamiento del problema.....	23
3.2. Hipótesis.....	23
3.3. Objetivo general.....	24
3.3.1. Objetivos específicos.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. Localización del ensayo biológico.....	25
4.2. Animales y diseño experimental.....	25
4.3. Vacunación e infección con <i>Eimeria</i> spp.....	27

	Página
4.4. ELISA.....	27
4.5. Aislamiento de heterófilos y monocitos.....	28
4.6. Estallido oxidativo de heterófilos y monocitos.....	28
4.7. Determinación de óxido nítrico.....	29
4.8. Análisis de lesiones en intestino.....	29
4.9. Análisis estadístico.....	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6. CONCLUSIONES.....	42
7. LITERATURA CITADA.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Composición de la dieta basal y análisis calculado en base a aminoácidos digestibles.....	26

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Disección de un pollo mostrando las posiciones de los principales tejidos linfoides.....	16
Figura 2. Estallido oxidativo <i>in vitro</i> de heterófilos y monocitos.....	32
Figura 3. Concentración de óxido nítrico en plasma.....	35
Figura 4. Concentración de inmunoglobulina G en suero sanguíneo.....	39
Figura 5. Concentración de inmunoglobulina M en suero sanguíneo.....	40
Figura 6. Concentración de inmunoglobulina A en suero sanguíneo.....	41

1. INTRODUCCIÓN

La avicultura en México es una actividad que se caracteriza por su dinamismo, eficiencia y productividad. La alimentación de las aves representa más del 60% de los costos de producción y es crítica para el bienestar animal (Ávila y Cortés, 2005). De hecho, una adecuada nutrición ayuda a minimizar la incidencia de enfermedades a través del mejoramiento en la respuesta inmunitaria (Klasing, 2007), por ejemplo, nutrientes como las vitaminas (Leeson, 2007) y los aminoácidos (Kidd, 2004) han mostrado tener un efecto benéfico en el desafío contra enfermedades avícolas a través de la modulación inmunológica que ejercen en el huésped.

La coccidiosis aviar, causada por protozoarios pertenecientes al género *Eimeria*, es una de las enfermedades más importantes en la producción avícola (Chapman, 2001; McDougald, 2003; Marien y de Gussem, 2007). En los pollos se han descrito nueve especies de *Eimeria* (Charlton *et al.*, 2000); sin embargo, McDougald (2003) reportó que solo siete especies de éste género son patógenas para los pollos: *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. brunetti*. Cada especie produce síntomas diferentes y reconocibles, pero en general, los parásitos proliferan en el intestino donde provocan lesiones de diferentes grados. Éstos parásitos producen destrucción de las células epiteliales y trauma en la mucosa y submucosa intestinal, lo cual altera la absorción de nutrientes, deshidratación, pérdida de sangre e incrementa la susceptibilidad para la proliferación de otros agentes patógenos. La morbilidad y mortalidad debido a infecciones por coccidiosis son usualmente proporcionales al número de oocistos esporulados de coccidia ingeridos y al estado inmunológico de las aves (Charlton *et al.*, 2000; McDougald, 2003).

Un método común para controlar la coccidiosis en la industria avícola es el uso de coccidiostatos agregados al alimento (Chapman, 2001), pero la aparición de cepas de *Eimeria* resistentes a los coccidiostatos (Peek y Landman, 2003) ha incrementado el uso de vacunas comerciales (Vermeulen *et al.*, 2001). De hecho, la única alternativa para evitar el uso de coccidiostatos en explotaciones avícolas es la utilización de vacunas vivas (Chapman *et al.*, 2002). Sin embargo, la administración de vacunas con oocistos vivos contra coccidiosis con

tres a cuatro especies no puede proteger la parvada en contra de otras especies. Por otro lado, las vacunas con más especies pueden introducir nuevos patógenos. Por lo tanto, la limitada eficacia en los procedimientos de vacunación contra coccidiosis a nivel comercial, ha generado que el control de esta enfermedad dependa en gran medida del uso de coccidiostatos (Dalloul y Lillehoj, 2005).

La nutrición ejerce un papel muy importante en el mejoramiento de la función inmune de las aves. Arginina (ARG), aminoácido esencial en las aves, y vitamina E (VE) han sido reportados que mejoran y regulan la función inmune bajo diversos desafíos a enfermedades, incluyendo coccidiosis. Allen (1999) reportó que la dosis oral de ARG (500 mg kg⁻¹ de peso vivo) administrada una o dos veces al día a pollos redujo la excreción de oocistos de *E. tenella* en las heces, sin afectar la ganancia de peso, los niveles plasmáticos de NO₂⁻ + NO₃⁻ y los marcadores de lesiones. En otro estudio, los pollos se inocularon experimentalmente con diferentes dosis de *E. acervulina* y se alimentaron con una dieta que contenía el 1.64% de ARG; las aves infectadas con las dosis más altas tuvieron las ganancias más bajas de peso y las concentraciones plasmáticas más bajas de ARG y carotenoides, pero mostraron los niveles más altos de NO₂⁻ + NO₃⁻ y marcadores de lesiones (Allen y Fetterer, 2000). Estos resultados sugieren que dosis altas de *E. acervulina* reducen la ganancia de peso debido a los altos niveles plasmáticos de NO₂⁻ + NO₃⁻ relacionados con procesos inflamatorios durante la respuesta inmunitaria; además, los altos marcadores de lesiones y las bajas concentraciones plasmáticas de ARG y carotenoides podrían estar asociadas con una mala absorción debido al daño de la mucosa epitelial. Los efectos de VE después de desafíos con *Eimeria* han sido controversiales. Colnago *et al.* (1984) reportaron que pollos inmunizados con oocistos esporulados de *E. tenella* tuvieron mejores ganancias de peso después de un desafío con *E. tenella* cuando a los pollos se les suplementó 100 UI de VE kg⁻¹ de alimento comparados con pollos alimentados con una dieta a base de maíz y pasta de soya sin suplementación de VE, sugiriendo que VE ejerce un efecto positivo en la respuesta productiva de pollos inmunizados con *Eimeria*. Sin embargo, Allen y Fetterer (2002a) reportaron que infecciones moderadas con *E. maxima* en pollos alimentados con 153 UI de VE kg⁻¹ de alimento no mejoraron la ganancia de peso ni la conversión alimenticia, pero aumentaron la concentración plasmática de α -tocopherol y la excreción de oocistos en las heces comparados con pollos alimentados con

13.2 UI de VE kg^{-1} de alimento; además, infecciones severas con *E. maxima* en pollos alimentados con 200 UI de VE kg^{-1} de alimento disminuyeron las ganancias de peso, sin afectar la conversión alimenticia ni la excreción de oocistos en las heces comparados con pollos alimentados con 13 UI de VE kg^{-1} de alimento.

Los reportes previos sugieren que ARG y VE, usados por separado, podrían mejorar la respuesta inmunitaria y la salud de las aves cuando son expuestas a infecciones con *Eimeria*, aunque los resultados no son muy consistentes. Abdukalykova *et al.* (2008) encontraron que la combinación de niveles altos de ARG (2.2% en el alimento) y VE (80 UI kg^{-1} de alimento) incrementaron la cantidad de células T y B, y las subpoblaciones de células T (CD4^+ y CD8^+) en pollos de engorda después de ser vacunados contra la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio (IBDV), sugiriendo un efecto sinérgico entre ARG y VE que mejora la respuesta inmunitaria de las aves. Por consiguiente, en este estudio se hipotetizó que el uso de ARG y VE podría aumentar la repuesta inmunitaria de pollos de engorda vacunados e infectados con *Eimeria* spp. y reducir los problemas asociados con infecciones de coccidia usando dietas libres de coccidiostatos y antibióticos. Con base a lo anterior, los objetivos de este experimento fueron: analizar los efectos de la suplementación de diferentes niveles de ARG y VE en la respuesta inmunitaria innata (*in vitro* estallido oxidativo de heterófilos y monocitos) y humoral (niveles serológicos sanguíneos de inmunoglobulinas: IgG, IgA e IgM), y los niveles plasmáticos de óxido nítrico (NO) en pollos de engorda después de ser vacunados con oocistos vivos (Coccivac[®]-B) y después de ser desafiados experimentalmente con un cultivo de diferentes especies del género *Eimeria*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. PERSPECTIVA GENERAL DEL SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario es un mecanismo esencial de defensa de los seres humanos, animales y plantas contra la constante exposición a microorganismos patógenos como bacterias, hongos, protozoarios, virus, entre otros, que circulan en el ambiente. Ésta capacidad de defensa se adquiere antes de nacer y evoluciona en el transcurso de la vida.

La *inmunidad* se define como la resistencia a las enfermedades, específicamente a enfermedades infecciosas. El *sistema inmunitario* es el conjunto de células, tejidos y moléculas que median la resistencia a infecciones, y la *respuesta inmunitaria* es la reacción coordinada de esas células, tejidos y moléculas en contra de microorganismos infecciosos. Con base a lo anterior, la *inmunología* se define como el estudio del sistema inmunitario y sus respuestas contra la invasión de patógenos (Abbas y Lichtman, 2004).

El sistema inmunitario tiene dos divisiones funcionales: la innata o natural, y la adquirida (conocida también como específica o adaptativa; Calder, 2007). Por lo tanto, los mecanismos de defensa del hospedero consisten de una *inmunidad innata*, que media la protección inicial contra infecciones, y una *inmunidad adaptativa*, que se desarrolla más lentamente y media a la inmunidad innata. Además, el sistema inmunitario innato responde de la misma manera cuando se vuelve a encontrar con el mismo agente patógeno, mientras que el sistema inmunitario adaptativo responde más eficientemente en cada encuentro sucesivo con el mismo patógeno (Abbas y Lichtman, 2004).

Funcionalmente, una respuesta inmunitaria puede dividirse en dos actividades relacionadas: *reconocimiento* y *respuesta*. El reconocimiento inmunitario se caracteriza por su especificidad. El sistema inmunitario es capaz de reconocer las diferencias químicas que distinguen a un patógeno extraño de otro; además, éste sistema también puede discriminar entre moléculas exteriores y las propias células y proteínas del cuerpo. Cuando el organismo extraño es reconocido, el sistema inmunitario enlista la participación de una variedad de

células y moléculas para generar una respuesta apropiada (conocida como *respuesta efectora*), que tiene la función de eliminar o neutralizar el organismo extraño. La exposición posterior al mismo organismo extraño induce una *respuesta de memoria*, caracterizada por una reacción inmunitaria más rápida e intensificada, la cual elimina al patógeno y previene la enfermedad (Goldsby *et al.*, 2000).

2.2. INMUNIDAD INNATA, NATURAL O INESPECÍFICA

La inmunidad innata es la primera línea de defensa en contra de agentes infecciosos. Ésta se encuentra presente antes de la exposición a patógenos y ejerce una importante función protegiendo al cuerpo contra la entrada de agentes infecciosos, y si éstos llegan a entrar, con su rápida eliminación (Calder, 2007).

Los componentes de la inmunidad innata forman el sistema inmunitario innato, el cual no reacciona contra el hospedero. Por consiguiente, los componentes de la inmunidad innata son capaces de reconocer estructuras que son compartidas por varias clases de microbios y no están presentes en las células del hospedero (Abbas y Lichtman, 2004). La inmunidad innata no tiene memoria, por lo tanto, no es influenciada por la exposición previa a un organismo, (Calder, 2007) y está formada por cuatro tipos de barreras defensivas: anatómicas, fisiológicas, fagocíticas e inflamatorias (Goldsby *et al.*, 2000).

2.2.1. Barreras Anatómicas

La primera línea de defensa en contra de una infección la efectúan las barreras físicas y anatómicas que tienden a prevenir la entrada de patógenos. La piel y la superficie de las membranas de la mucosa son barreras efectivas para evitar la entrada de muchos microorganismos (Goldsby *et al.*, 2000). Por lo tanto, la piel, el sistema digestivo, respiratorio y urogenital forman las principales interfaces entre el cuerpo y el ambiente (Abbas y Lichtman, 2004).

La piel es una barrera mecánica que retarda la entrada de microorganismos. Ésta genera un ambiente ácido (pH 3-5) que retrasa el crecimiento de microbios. En lo referente a las membranas de la mucosa, los principales mecanismos de acción en contra de patógenos es a través de flora normal, que compite con esos agentes infecciosos mediante la ocupación de sitios y disponibilidad de nutrientes; además, el moco atrapa microorganismos extraños y los cilios expulsan microorganismos fuera del cuerpo (Goldsby *et al.*, 2000). Las células epiteliales también producen antibióticos peptídicos que destruyen a las bacterias (Abbas y Lichtman, 2004). Sin embargo, varios organismos han evolucionado y han desarrollado diversos mecanismos para escapar de estos sistemas de defensas, por ejemplo, el virus de la influenza (el agente que causa la gripa) tiene una molécula superficial que le permite unirse con firmeza a células localizadas en las membranas de la mucosa, impidiendo de esta manera que el virus sea arrastrado por las células epiteliales ciliadas (Goldsby *et al.*, 2000).

2.2.2. Barreras Fisiológicas

La temperatura, el pH y varios factores solubles (como son las proteínas solubles: lisozima, interferon y complemento) forman parte de las barreras fisiológicas del cuerpo. Muchas especies no son susceptibles a ciertas enfermedades debido a que su temperatura corporal inhibe el crecimiento de los patógenos que causan esas enfermedades. El pH ácido estomacal inhibe el crecimiento de algunos patógenos, por ejemplo, en el caso de los recién nacidos, éstos llegan a ser susceptibles a algunas enfermedades que no afectan a los adultos debido a que sus contenidos estomacales son menos ácidos. Diversos factores solubles contribuyen con la inmunidad no específica: la lisozima es capaz de romper la capa peptidoglucana de la pared celular bacterial, el interferon induce un estado antiviral en células no infectadas y el complemento (grupo de proteínas del suero que circulan en estado inactivo) es capaz de destruir microorganismos o facilitar la fagocitosis (Goldsby *et al.*, 2000).

2.2.3. Barreras Fagocíticas

La fagocitosis es un importante mecanismo de defensa de la inmunidad innata que consiste en un proceso por medio del cual ciertas células del sistema inmunitario (incluidos los

macrófagos y neutrófilos) envuelven y destruyen partículas grandes ($>0.5 \mu\text{m}$ de diámetro), por ejemplo, los microbios intactos (Abbas y Lichtman, 2004).

Existen varias células con capacidad de ingerir partículas, sin embargo, sólo los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) o neutrófilos y los macrófagos lo hacen de manera profesional debido a que es su función principal. Éstas células se originan en la médula ósea a partir de un precursor común (el blasto), el cuál da origen a los precursores específicos: a) el mieloblasto, que da origen a la línea granulocítica, y b) el monoblasto, que da origen al sistema fagocítico mononuclear (Rojas-Espinosa y Arce-Paredes, 2003).

Durante la hematopoyesis, el mieloblasto se convierte en un promielocito, que da lugar a un mielocito, el cual se transforma en un metamielocito, que posteriormente se diferencia en un polimorfonuclear (PMN) juvenil o “en banda” y finalmente en un PMN maduro (caracterizado por poseer un núcleo multilobulado y citoplasma que contiene principalmente glucógeno y gránulos). Los PMNs maduros que son liberados al flujo sanguíneo (donde permanecen aproximadamente 10 h) migran a los tejidos para ejercer su función como fagocitos móviles (Bainton *et al.*, 1971).

El sistema fagocítico mononuclear esta compuesto por monocitos, que se encuentran circulando en la sangre, y macrófagos, que se localizan en diversos tejidos. En la hematopoyesis, los monoblastos se diferencian en promonocitos, que salen de la médula ósea para entrar a la sangre, donde se diferencian en monocitos maduros. Los monocitos circulan en la sangre alrededor de 8 h, posteriormente migran a diversos tejidos específicos para convertirse en macrófagos (Goldsby *et al.*, 2000).

A pesar de las diferencias específicas que existen entre la función fagocítica de los macrófagos y neutrófilos, el proceso de fagocitosis está compuesto de varias etapas secuenciales que son similares para ambas células y que comprenden la quimiotaxis, la adhesión, la endocitosis (la cual se optimiza por la opsonización de las partículas) y los cambios físicos y bioquímicos intracelulares que habilitan a las células fagocíticas para endocitar, destruir y digerir a los microorganismos (Rojas-Espinosa y Arce-Paredes, 2003).

La *quimiotaxis* se define como el movimiento de una célula dirigida por un gradiente de concentración. La *opsonización* es el proceso de unión de *opsoninas* (macromoléculas como la IgG y fragmentos de proteínas del complemento capaces de juntarse a la superficie de un microorganismo patógeno y de ser reconocidas por los receptores de superficie de los neutrófilos y macrófagos) a superficies microbianas para incrementar la eficiencia de fagocitosis del microbio (Abbas y Lichtman, 2004).

El proceso de fagocitosis consiste en lo siguiente: la célula fagocítica reconoce y se adhiere al agente extraño, ésta adherencia activa a la membrana, que emite pseudópodos que encapsulan al agente extraño en un fagosoma (vesícula fagocítica). Cuando el fagosoma llega al citoplasma celular, se fusiona con los lisosomas dando origen a un fagolisosoma, el cual genera una serie de mecanismos (reacciones dependientes de oxígeno, independientes de oxígeno o dependientes de óxido nítrico, así como la activación de enzimas lisosomales) para destruir al material ingerido, y finalmente, después de efectuarse los mecanismos de digestión, la vesícula se fusiona nuevamente con la membrana celular para eliminar el material digerido al exterior, o dependiendo del tipo de célula, lo presenta a otras células de la inmunidad adquirida (Collado *et al.*, 2008).

Los neutrófilos y macrófagos son capaces de reconocer agentes patógenos en la sangre y en tejidos extravasculares a través de los receptores de superficie que son específicos para productos microbiales. Una vez reconocidos éstos patógenos, los neutrófilos y macrófagos se encargan de destruirlos intracelularmente; además, ambas células son capaces de secretar citocinas y de responder en otras formas que contribuyen a la eliminación de microorganismos infecciosos y a la reparación de tejidos infectados (Abbas y Lichtman, 2004).

2.2.4. Barreras Inflamatorias

La inflamación se define como una reacción compleja del sistema inmunitario innato en tejidos vascularizados que implica la acumulación y activación de leucocitos y proteínas del plasma a los sitios de infección, exposición a toxinas o daño celular (Abbas y Lichtman, 2004). Los signos cardinales de la inflamación son: *rubor, tumor, calor, dolor y functio laesa*

(pérdida de función) que reflejan los eventos de gran importancia en una respuesta inflamatoria. Una infección bacteriana provoca daño de tejido con la liberación de varios factores vasoactivos y quimiotácticos que inducen un incremento del flujo sanguíneo al área de infección, incrementan la permeabilidad capilar y afluencia de las células blancas sanguíneas (incluidos los fagocitos y linfocitos) del torrente circulatorio hacia los tejidos. Las proteínas séricas contenidas en el exudado poseen propiedades antibacteriales, mientras que los fagocitos se encargan de eliminar las bacterias por fagocitosis, sin embargo, éstos liberan enzimas líticas que pueden dañar células saludables cercanas. La acumulación de células muertas, material digerido y fluidos forman una sustancia conocida como pus (Goldsby *et al.*, 2000). Por lo tanto, aunque la inflamación ejerce una función protectora en el control de infecciones y promueve la reparación de tejido, ésta también puede causar daño al tejido y enfermedad (Abbas y Lichtman, 2004).

2.2.5. Otros Mecanismos de Defensa del Sistema Inmunitario Innato

Las células “asesinas” naturales (NK) son una clase de linfocitos que responden a microbios intracelulares como los virus a través de la destrucción de células infectadas y por la activación de la citosina activadora de macrófagos (IFN- γ). Las células NK y los macrófagos funcionan cooperativamente en la eliminación de microbios intracelulares: los macrófagos ingieren los microbios y producen IL-12, la IL-12 activa a las células NK para secretar IFN- γ , y el IFN- γ activa a los macrófagos para eliminar los microbios ingeridos (Abbas y Lichtman, 2004).

El sistema del complemento está presente en el suero y está integrado por unas 30 proteínas que interaccionan entre sí de una manera regulada para dar lugar a una cascada enzimática que estimula las respuestas de defensa del organismo. El complemento se puede activar por tres rutas diferentes: la alternativa y la de las lectinas (componentes de la inmunidad innata) y la clásica (componente de la inmunidad adaptativa). En la activación del complemento se liberan moléculas que, aparte de producir la lisis de los agentes patógenos, ejercen otras funciones como la opsonización de microorganismos y el reclutamiento de células inflamatorias, lo cual contribuye a amplificar el proceso (Collado *et al.*, 2008).

En respuesta a los microorganismos infecciosos, los macrófagos y otras células secretan citocinas que median muchas reacciones celulares de la inmunidad innata. Las citocinas son proteínas solubles que median las reacciones inmunitarias e inflamatorias, además, ejercen una función importante en las comunicaciones entre leucocitos y entre leucocitos con otras células. En general, las citocinas de la inmunidad innata estimulan la inflamación (TNF, IL-1, quimiocinas), activan a las células NK (IL-12) y a los macrófagos (IFN- γ), y previenen las infecciones virales (IFN tipo 1; Abbas y Lichtman, 2004).

2.3. INMUNIDAD ADQUIRIDA, ESPECÍFICA O ADAPTATIVA

La inmunidad adaptativa es mediada por linfocitos y se lleva a cabo cuando microorganismos patógenos resisten los mecanismos de defensa de la inmunidad innata (Abbas y Lichtman, 2004). La inmunidad adquirida es muy específica porque cada linfocito lleva receptores de superficie para un sólo antígeno y se vuelve efectiva varios días después de la activación inicial, pero solo persiste por cierto período después de la eliminación del antígeno inicial. Ésta persistencia da origen a la memoria inmunológica, que es la base para una mejor respuesta inmunitaria a la reexposición a un antígeno, por ejemplo, reinfección con el mismo microorganismo patógeno (Calder, 2007).

A diferencia de las respuestas inmunitarias innatas, las respuestas inmunitarias adaptativas son reacciones contra el combate de antígenos específicos y exhiben de manera normal cuatro atributos característicos: especificidad antigénica, diversidad, memoria inmunológica y no reactividad contra sí misma. La *especificidad antigénica* permite distinguir sutiles diferencias entre los antígenos, por ejemplo, los anticuerpos pueden distinguir entre dos moléculas de proteínas que difieren en un solo aminoácido. El sistema inmunitario es capaz de generar una gran *diversidad* de moléculas de reconocimiento que le permiten reconocer millones de estructuras diferentes únicas en antígenos extraños. La *memoria inmunológica* se genera una vez que el sistema inmunitario ha reconocido y generado una respuesta en contra de un antígeno; de esta manera, cuando el sistema inmunitario se vuelve a encontrar frente a un segundo ataque del mismo antígeno, éste responderá con mayor rapidez y eficiencia. La

capacidad de no *auto-reactividad* le permite al sistema inmunitario responder normalmente solo a antígenos extraños, de lo contrario, sus respuestas serían fatales (Goldsby *et al.*, 2000).

La respuesta inmunitaria adquirida, por razones de estudio, se puede dividir en dos tipos: humoral y celular. La *inmunidad humoral* involucra a anticuerpos (producidos por los linfocitos B), los cuales atacan patógenos extracelulares. Sin embargo, ciertos patógenos como los virus y algunas bacterias infectan el interior de células escapando de la inmunidad humoral. Éstos patógenos son atacados por la *inmunidad celular*, que es generada por los linfocitos T (Calder, 2007). Las células del sistema inmunitario no interactúan o reconocen a una molécula inmunogénica completa, en vez de eso, los linfocitos reconocen sitios específicos en la macromolécula llamados *epítopes* o *determinantes antigénicos* (Goldsby *et al.*, 2000).

2.3.1. Respuesta Inmunitaria Humoral

En los seres humanos, las células B maduran en la médula ósea (Goldsby *et al.*, 2000). Cuando las células B activadas proliferan, se diferencian en células plasmáticas y producen anticuerpos (Kubena y McMurray, 1996), los cuales forman la unidad funcional de la inmunidad humoral. Un anticuerpo es un tipo de glucoproteína, también llamada inmunoglobulina (Ig), que está compuesta de cuatro cadenas polipeptídicas que incluyen dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas; cada cadena contiene una región variable y una región constante. Las regiones variables con amino-terminal de las cadenas pesadas y ligeras forman los sitios de unión al antígeno, mientras que las regiones constantes carboxi-terminal de las cadenas pesadas interactúan funcionalmente con otras moléculas en el sistema inmunitario (Abbas y Lichtman, 2004). La estructura de una molécula de Ig es determinada por la organización primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la proteína. En los seres humanos, los isotipos de cadena pesada determinan las cinco clases de anticuerpos (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD) y las funciones efectoras de la molécula. Estas cinco clases de anticuerpos difieren en su habilidad para llevar a cabo diversas funciones efectoras, en sus concentraciones promedio en suero y en su vida media (Goldsby *et al.*, 2000).

Los anticuerpos, secretados en la circulación y en los fluidos de la mucosa (Abbas y Lichtman, 2004), trabajan de diferentes maneras para atacar a un antígeno. Estos son capaces de neutralizar microorganismos mediante la unión a ellos y en la prevención de su acoplamiento a las células del hospedero, además pueden activar proteínas del complemento en el plasma y promover la destrucción de bacterias por fagocitosis (Calder, 2007).

La opsonización es el proceso de unión de opsoninas a superficies microbianas que promueve una mejor eficiencia en el reconocimiento y fagocitosis de microorganismos patógenos por parte de células fagocíticas. Las opsoninas incluyen IgG, que son reconocidas por receptores Fc γ en células fagocíticas, y fragmentos de proteínas del complemento, que son reconocidas por el receptor del complemento tipo 1 (CR1, CD35) y por el leucocito integrina Mac-1 (Abbas y Lichtman, 2004). Las células cubiertas por anticuerpos que llevan antígenos extraños (por ejemplo, células infectadas con virus) pueden ser destruidas por otros linfocitos o fagocitos en un proceso conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC; Kubena y McMurray, 1996).

Los anticuerpos protectores son producidos en pequeñas cantidades durante la respuesta primaria a un patógeno y en grandes cantidades durante la respuesta secundaria al mismo patógeno. La producción de anticuerpos se genera durante la primera semana después de una infección o vacunación. Algunas de las células plasmáticas que producen anticuerpos migran a la médula espinal y permanecen allí, secretando pequeñas cantidades de anticuerpos por meses o años. Cuando el patógeno trata de infectar de nuevo al hospedero, esos anticuerpos producidos continuamente proveen protección inmediata. Algunos linfocitos B que son estimulados por el antígeno se convierten en células de memoria, las cuales no secretan anticuerpos, pero permanecen en espera del antígeno. Cuando el antígeno vuelve a aparecer, estas células de memoria se diferencian rápidamente en células productoras de anticuerpos, para generar una defensa más efectiva en contra del antígeno. Una meta de la vacunación es estimular el desarrollo y tiempo de vida de las células que producen anticuerpos y de las células de memoria (Abbas y Lichtman, 2004).

Muchas de las respuestas de las células B requieren de la ayuda de las células colaboradoras o auxiliares (T_H). Estas células T_H producen citocinas (IL-4, IL-5), que conducen a las células B activadas por antígeno a su proliferación y diferenciación. Las células T_H son reconocidas por un marcador de superficie fenotípico (CD4) y son capaces de constituir una subpoblación de células T CD4+ denominadas células T_H2 (Kubena y McMurray, 1996).

2.3.2. Respuesta Inmunitaria Celular

La función principal de la inmunidad celular es combatir infecciones ocasionadas por patógenos intracelulares (Abbas y Lichtman, 2004). Las células clave en la respuesta inmunitaria celular son los linfocitos T. Existen dos poblaciones principales de células T: a) las células T colaboradoras o auxiliares (T_H), que poseen la glucoproteína de membrana denominada CD4 y b) las células T citotóxicas (T_C) que tienen la glucoproteína de membrana llamada CD8. Cuando las células T_H son activadas, éstas células producen numerosas proteínas de peso molecular ligero llamadas citocinas, que ejercen varios efectos en otras células del sistema inmunitario. Por otro lado, cuando las células T_C son activadas, éstas células se diferencian en efectores celulares, que pueden destruir células propias alteradas, incluyendo células infectadas por virus y células tumorales (Goldsby *et al.*, 2000).

A diferencia de las células B que maduran en la médula ósea, las células T migran al timo para madurar. Durante su maduración, las células T expresan en su membrana la molécula única de unión a antígeno llamada receptor celular T (TCR; Goldsby *et al.*, 2000). Una característica distintiva entre la inmunidad humoral y celular es que, a diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T son capaces de reconocer solo aquellos antígenos que son presentados a ellos en una superficie celular por las células presentadoras de antígeno (APC). Por consiguiente, la infección de una célula por un patógeno intracelular crea una señal para los linfocitos T por medio de la expresión de superficie celular de los fragmentos peptídicos derivados del patógeno. Éstos fragmentos son transportados a la superficie de la célula infectada y son expresados allí en conjunción con proteínas expresadas en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; Calder, 2007). Existen dos tipos principales de moléculas del MHC: moléculas del MHC clase I y moléculas del MHC clase II. Cuando una célula T nativa

encuentra a un antígeno combinado con una molécula en una célula, la célula T prolifera y se diferencia en células T de memoria y en varias células T efectoras (Goldsby *et al.*, 2000). En breve, las respuestas de los linfocitos T se llevan a cabo por medio de fases secuenciales: reconocimiento de microbios asociados a células por las células T nativas, expansión de los clones específicos a antígenos por proliferación, y diferenciación de algunos de la progenie en células efectoras y células de memoria (Abbas y Lichtman, 2004).

Una vez que la célula T_H reconoce e interactúa con un complejo antígeno-molécula clase II del MHC, la célula es activada y se convierte en una célula efectora que produce varios factores de crecimiento conocidos colectivamente como citocinas. Las citocinas liberadas ejercen una función importante en la activación de células B, células T_C , macrófagos y otras células que participan en la respuesta inmunitaria. Las diferencias en la tendencia de las citocinas producidas por las células activadas T_H generan diversos tipos de respuestas inmunitarias (Goldsby *et al.*, 2000). Las células T_{H1} , que producen $IFN-\gamma$, activan a los fagocitos para destruir los patógenos ingeridos y estimular la producción de anticuerpos unidos al complemento y la opsonización. Las células T_{H2} , que producen IL-4 e IL-5, estimulan la producción de la IgE y la activación de eosinófilos (Abbas y Lichtman, 2004).

2.4. Colaboración entre la Inmunidad Innata y la Adquirida

La primera línea de defensa en contra de patógenos se efectúa por la inmunidad innata, mientras que la inmunidad adquirida actúa como la segunda línea de defensa (Collado *et al.*, 2008). La inmunidad innata y la adquirida no actúan en total independencia, en vez de eso, éstas cooperan en diversas formas para producir una inmunidad más efectiva (Goldsby *et al.*, 2000). La comunicación dentro del sistema inmunitario adquirido y entre los sistemas inmunitarios adquirido e innato es generada por el contacto directo de célula a célula, que implica proteínas de superficie celular (por ejemplo, adhesión de moléculas), y por la producción de mensajeros químicos, que envían señales de una célula a otra. Las citocinas son los principales mensajeros químicos que pueden actuar para regular la actividad de la célula que produce la citocina o de otras células. Las citocinas ejercen diversas actividades en diferentes tipos de células. El factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la IL-1 e IL-6 son unas de

las citocinas más importantes producidas por los monocitos y macrófagos debido a que éstos tipos de citocinas son capaces de activar neutrófilos, monocitos y macrófagos para iniciar la destrucción bacterial y tumoral, incrementar la expresión de adhesión molecular en la superficie de neutrófilos y células endoteliales, estimular la proliferación de linfocitos B y T e iniciar la producción de otras citocinas proinflamatorias. Por consiguiente, el TNF, la IL-1 y la IL-6 desempeñan una función importante como mediadores de la inmunidad adquirida e innata, y forman una importante conexión entre ambas (Calder, 2007).

Los anticuerpos que reaccionan con los patógenos contribuyen a que la inmunidad innata mejore significativamente debido a que los complejos patógeno-anticuerpo se adhieren a las células mediante receptores para la fracción constante de las inmunoglobulinas, por ejemplo, los macrófagos y neutrófilos; de esta manera, se mejora el proceso de fagocitosis. Además, éstos complejos activan al complemento, que es una molécula de la inmunidad natural. Lo anterior da como resultado una lisis del patógeno, inflamación por la acumulación de otras células y la extravasación celular, y estimulación de la fagocitosis u opsonización (Collado *et al.*, 2008).

2.5. PERSPECTIVA GENERAL DEL SISTEMA INMUNITARIO AVIAR

El sistema inmunitario aviar funciona con los mismos principios generales como el sistema inmunitario de los mamíferos (Sharma, 1991; Korver, 2006). Está constituido por una inmunidad innata y una adaptativa. Ésta última involucra respuestas inmunitarias humorales y celulares (Erf, 2004). Entre las diferentes especies de aves que existen, el sistema inmunitario de los pollos ha sido el más estudiado. A pesar de las muchas similitudes entre los mecanismos inmunes de los mamíferos y los pollos, existen importantes diferencias (Sharma, 1997; Davison *et al.*, 2008).

Los tejidos linfomiéloides se desarrollan de los *primordiums* epiteliales (bolsa de Fabricio y timo) o mesenquimales [bazo, nódulos linfáticos (ganglios linfáticos) y médula ósea] que son colonizados por las células hematopoyéticas llevadas por la sangre. Las células maduras inmunológicamente entran a la circulación y colonizan los órganos linfoides periféricos: bazo,

nódulos linfáticos y tejidos linfoides asociados al intestino, bronquios y piel (Davison *et al.*, 2008). En la *Figura 1* se muestra la disección de un pollo que muestra las posiciones de los principales tejidos linfoides.

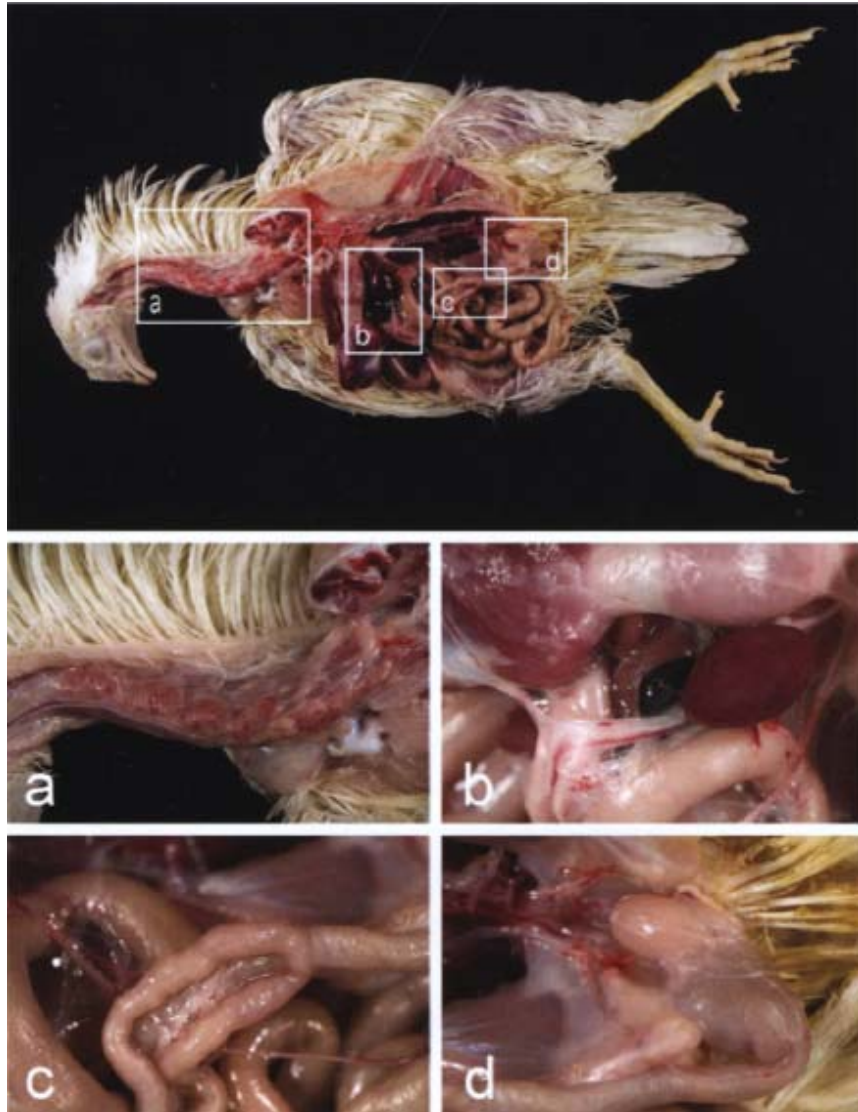


Figura 1: Disección de un pollo mostrando las posiciones de los principales tejidos linfoides: a) los siete lóbulos del timo se encuentran junto a la vena yugular del lado izquierdo con el buche yaciendo debajo; b) el bazo puede verse debajo del proventrículo, la vesícula biliar de color oscuro yace junto a él; c) las tonsilas cecales se localizan en las terminaciones proximales de los dos ciegos, cerca de la unión ileo-cecal y d) la bolsa de Fabricio se encuentra dentro la cintura pélvica, inmediatamente al lado dorsal de la cloaca (Davison *et al.*, 2008).

La inmunidad humoral, caracterizada por la producción de anticuerpos por los linfocitos B, se lleva a cabo por la bolsa de Fabricio, que es un órgano linfoide primario único para las aves. Los mamíferos carecen de esta estructura anatómica. El descubrimiento de este órgano y su asociación con la respuesta humoral fue de gran importancia para el entendimiento de la dualidad del sistema inmunitario en componentes humorales y celulares (Sharma, 1991). En la ausencia de la bolsa de Fabricio, no se puede generar el repertorio de anticuerpos; por consiguiente, una de las principales armas del sistema inmunitario se convierte en no funcional (Davison *et al.*, 2008). En las aves existen tres clases principales de anticuerpos: IgM, IgG (también llamado IgY) e IgA (Sharma, 1997), mientras que en los humanos se localizan cinco clases de anticuerpos: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

En el sistema inmunitario celular, el timo es el órgano esencial para la maduración de linfocitos T, las células principales de la inmunidad celular (Sharma, 1991). Como en el caso de los mamíferos, las células T aviares comprenden funciones de colaboración y citotóxicas que son restringidas por el MHC (Sharma, 1997). Otras células importantes para la respuesta inmunitaria celular incluyen macrófagos, células dendríticas, células NK y células efectoras de citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos (Sharma, 1991).

2.6. INTERACCIONES ENTRE NUTRICIÓN Y EL SISTEMA INMUNITARIO AVIAR

Existen interacciones, sinergismos y antagonismos muy importantes entre nutrición e inmunidad que tienen un efecto significativo en la productividad. Hay dos clases de interacciones: a) la nutrición puede influir en inmunocompetencia de las aves y consecuentemente en su resistencia a las enfermedades y b) el crecimiento, metabolismo y necesidades de nutrientes son afectados por las respuestas del sistema inmunitario a los procesos de infección. Además, los patógenos pueden afectar la absorción de nutrientes (Klasing *et al.*, 1995).

La composición de la dieta ejerce una función importante en la susceptibilidad de las aves a los desafíos infecciosos. Por lo tanto, se pueden considerar diversos mecanismos para la modulación nutricional en la resistencia a enfermedades infecciosas en aves: a) la nutrición puede impactar el desarrollo del sistema inmunitario *in ovo* y en las primeras semanas después del nacimiento de las aves, b) el suministro de un sustrato de nutrientes (por ejemplo, aminoácidos, energía, co-factores enzimáticos) es necesario para la respuesta inmunitaria, de tal manera que las células puedan dividirse y sintetizarse en moléculas efectoras, c) las bajas concentraciones de algunos nutrientes (por ejemplo, Fe) en fluidos corporales hacen de ellos los sustratos restrictivos para la proliferación de patógenos invasores, d) algunos nutrientes (por ejemplo, las vitaminas A, D y E) tienen acciones regulatorias directas en los leucocitos a través de la unión a receptores intracelulares o por la modificación en la liberación de segundos mensajeros, e) la dieta puede generar efectos regulatorios indirectos que son mediados por el sistema endócrino clásico y f) los aspectos químicos y físicos de la dieta pueden alterar el sistema digestivo mediante la modificación de las poblaciones microbiológicas, la capacidad de los microorganismos patógenos de adherirse a los enterocitos y la integridad del epitelio intestinal (Klasing, 1998).

La malnutrición aumenta la incidencia, duración y mortalidad asociada a las enfermedades infecciosas; por otro lado, las infecciones causan anorexia y malnutrición. Por consiguiente, con una mala alimentación, el estado nutricional y el sistema inmunitario pueden deteriorarse dando lugar a una baja productividad y a una mayor probabilidad de infecciones. Afortunadamente, debido a la formulación científica de las dietas, las deficiencias severas de nutrientes son raras en la producción animal moderna (Klasing *et al.*, 1995).

La formulación de dietas para pollos de engorda se realiza con la elección de ingredientes que permitan cubrir los requerimientos de los nutrientes deseados al mínimo costo. El perfil de nutrientes usado está basado en la investigación o en observaciones de campo evaluando variables productivas de importancia económica como: ganancia de peso, conversión alimenticia o tamaño de la pechuga, inmunidad o resistencia a enfermedades. Debido a que diversos estudios han mostrado que la composición de la dieta ejerce una función importante en la función inmunológica de los pollos, existe un gran interés en el área de inmunología

nutricional. Sin embargo, varias investigaciones han señalado que las necesidades nutricionales para inmunidad no coinciden con aquellas para la ganancia de peso o formación del tejido esquelético. Además, las deficiencias nutricionales, así como los excesos, debilitan la habilidad de las aves para desarrollar una respuesta inmunitaria efectiva (Kidd, 2004). Por consiguiente, es de gran importancia para los nutricionistas conocer los efectos y las dosificaciones de los diversos nutrientes que se pueden implementar en las dietas para pollos de engorda, de tal manera, que se puedan obtener parámetros económicos deseables en la producción y que mejoren la inmunidad y salud de los pollos.

2.7. COCCIDIOSIS

La mayoría de las coccidias que afectan a las aves de corral pertenecen al género *Eimeria*, pero otros géneros (*Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Isospora* y *Sarcocystis*) también son incluidos (McDougald, 1998). Sin embargo, debido a la patogenicidad y distribución del género *Eimeria*, este genera las coccidias de mayor importancia económica en la industria avícola a nivel mundial. Por lo tanto, en este estudio, el término “coccidias” será referido esencialmente a parásitos protozoarios pertenecientes al género *Eimeria*, y el término “coccidiosis” se asignará a la enfermedad causada en el hospedero por la infección intracelular de una o varias especies de *Eimeria*.

El control de las coccidias aviares es muy importante en la industria avícola debido a la morbilidad y mortalidad que causa la coccidiosis, la cual sigue siendo una de las enfermedades más frecuentes y costosas en la producción avícola a pesar de los avances en quimioterapia, manejo, nutrición y genética. El medio más común de dispersión de las coccidias es el mecánico; por el personal que se introduce en los corrales, naves o granjas, por diversos animales, insectos, equipo contaminado, aves silvestres y el polvo (McDougald, 2003). Además, la alta transmisión, replicación y acumulación de *Eimeria* spp. se debe en gran parte a que la mayoría de los pollos son criados en piso y en grandes parvadas con temperaturas controladas que ofrecen un ambiente moderadamente cálido (Shirley *et al.*, 2005).

Los brotes de coccidiosis pueden ser generados por diversos factores como: a) falla del agente coccidial, que puede deberse a la resistencia de las coccidias a la droga o a un inadecuado espectro de actividad del medicamento, b) mala administración del agente coccidial, por ejemplo, la inclusión de niveles bajos, errores en el reparto de alimento, un mal mezclado, o pocas veces, a una baja calidad del medicamento, c) una enfermedad simultánea que podría destruir el sistema inmunitario de las aves o interferir con el consumo de coccidiostatos a través de la reducción en el consumo de alimento o agua, y d) a los diagnósticos erróneos de coccidiosis cuando otras enfermedades causan el mismo tipo de lesiones (McDougald, 1998).

Las enfermedades causadas por infecciones y agentes parasitarios son comúnmente complejas y dependen de las características del hospedero, agente y las condiciones ambientales en la granja (McDougald, 2003). Las coccidias del género *Eimeria* pertenecen al phylum Apicomplexa y a la familia Eimeriidae (Cox, 1998). El ciclo biológico de éstas coccidias es complicado debido a que experimentan etapas fuera y dentro del hospedero, etapas intra y extracelulares, y además se reproducen asexual y sexualmente. Un ciclo de vida común exhibe tres fases: esporogonia, merogonia (esquizogonia) y gametogonia (Lillehoj y Trout, 1993).

Las especies de *Eimeria* son transmitidas de forma natural entre los hospederos por la ruta fecal-oral (Shirley *et al.*, 2005). Los oocistos (estados exógenos de *Eimeria* spp.) son excretados en las heces de los pollos infectados y experimentan esporogonia, que es un proceso meiótico llevado a cabo en el ambiente externo. Durante este proceso, los oocistos esporulan para formar un oocisto con cuatro esporocistos, cada uno conteniendo dos esporozoitos (Allen y Fetterer, 2002b). Sólo los oocistos esporulados, aquellos que contienen esporozoitos formados completamente son infecciosos para los pollos. Cuando el hospedero susceptible los ingiere, estos oocistos esporulados experimentan un proceso conocido como excistación, que libera los esporozoitos infecciosos. En este proceso, la pared del oocisto es destruida por la molleja, ocasionando la liberación de los esporocistos. Las enzimas pancreáticas y las sales biliares causan la liberación de los esporozoitos (Jeurissen *et al.*, 1996), que invaden la mucosa para convertirse en trofozoitos. En una fase preclínica de desarrollo, los parásitos experimentan una fisión llamada esquizogonia (reproducción asexual), en la cual se producen cientos de células hijas. Éstas nuevas células (merozoitos)

entran más a las células de la mucosa y crecen dentro de una segunda y algunas veces en una tercera generación de esquizontes. Los signos clínicos son asociados con la destrucción de tejido cuando estas formas maduran (McDougald, 1998).

En la gametogonia (reproducción sexual), los merozoitos invaden células y se desarrollan en microgamontes o macrogamontes. Los primeros sufren divisiones múltiples, resultando en la formación de numerosos microgametas, que son flageladas y móviles. Los segundos dan lugar a una sola macrogameta (Lillehoj y Trout, 1996). La fertilización de macrogametas (hembras) por microgametas (machos) resulta en la formación de un cigote cubierto completamente por una gruesa pared externa (oocisto) que lo protege de las condiciones del ambiente y subsecuentemente es excretado. Una vez fuera del hospedero, los oocistos permanecen viables por largos períodos de tiempo antes de ser ingeridos e iniciar un nuevo ciclo de vida (Lillehoj y Okamura, 2003). La máxima producción de oocistos oscila entre los 6 a 9 días post-infección (Allen y Fetterer, 2002b).

La infección coccidial varía con las especies de *Eimeria* y el hospedero, pero algunas características son comunes para todas las infecciones (Lillehoj y Trout, 1996). Las especies de *Eimeria* son altamente específicas a un hospedero, y pocas veces una especie de *Eimeria* completa un ciclo infeccioso en más de una especie de hospedero (Yun *et al.*, 2000). En adición a esta especificidad, una sola especie de *Eimeria* infecta tipos celulares particulares, tejidos y órganos dentro de un hospedero específico (Lillehoj y Okamura, 2003). En los pollos, estas ubicaciones son utilizadas frecuentemente para el diagnóstico de las características individuales de cada especie: *E. acervulina* parasita el duodeno y el yeyuno proximal; *E. brunetti* el íleon distal, colon y el ciego proximal; *E. maxima* el duodeno distal, yeyuno e íleon proximal; *E. mitis* el íleon; *E. necatrix* el duodeno distal, yeyuno e íleon proximal (los oocistos se desarrollan en el ciego); *E. praecox* el duodeno y yeyuno proximal; *E. tenella* el ciego (Lillehoj y Trout, 1996).

En la coccidiosis aviar, el daño intestinal es proporcional al número de oocistos esporulados que son ingeridos por el hospedero (Charlton *et al.*, 2000). Los signos clínicos generales incluyen letargia, depresión, disminución en el consumo de alimento y agua, aumento en el

contenido de agua, moco y sangre en las heces. En las lesiones patológicas se puede observar nódulos blancos o grises, o marcas corrugadas en el lumen del intestino, en casos serios se puede observar enteritis hemorrágica, sin embargo, estos signos de infección difieren con cada especie (Lillehoj y Trout, 1996).

3. PROBLEMÁTICA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Planteamiento del Problema

Se sabe que la suplementación de ARG y VE estimulan el sistema inmunológico de las aves y ejercen una función importante en el control de enfermedades. Sin embargo, debido a los diferentes mecanismos de acción, no se han establecido niveles de suplementación óptimos de VE + ARG para combatir la coccidiosis, la cual, sigue siendo una de las enfermedades más importantes a nivel mundial que genera enormes pérdidas monetarias a la industria avícola.

Las nuevas tendencias mundiales en la avicultura están encaminadas a la producción de carne y huevo sin la utilización de antibióticos o coccidiostatos en la alimentación. Por consiguiente, es muy importante encontrar alternativas para lograr ese propósito. En lo referente al control de la coccidiosis aviar, el uso de vacunas es una buena alternativa; sin embargo, los procedimientos de vacunación a escala comercial no han mostrado una alta efectividad. Por lo tanto, el uso de alternativas nutricionales para estimular una mejor respuesta inmunológica y mejorar la efectividad de las vacunas es de gran importancia para el control de esa enfermedad.

3.2. Hipótesis

Con base a la problemática mencionada y a la información científica disponible en relación a los efectos de ARG y VE en la respuesta inmunitaria de las aves se planteó lo siguiente: los efectos sinérgicos o complementarios de estos dos nutrientes en la estimulación del sistema inmunológico y la salud de pollos de engorda vacunados contra coccidiosis e infectados experimentalmente con *Eimeria* spp. dependen de los niveles de suplementación de ARG + VE debido a sus diferentes mecanismos de acción.

3.3. Objetivo General

Evaluar los efectos de ARG + VE a diferentes niveles de suplementación en la respuesta inmunitaria de pollos de engorda vacunados contra coccidiosis y desafiados experimentalmente con un cultivo vivo de *Eimeria* spp.

3.3.1 Objetivos Específicos

- a) Evaluar la inmunidad innata mediante el estallido oxidativo *in vitro* de células blancas sanguíneas (heterófilos y monocitos).
- b) Evaluar los efectos de ARG + VE en la inmunidad humoral a través de las concentraciones serológicas sanguíneas de IgG, IgA e IgM.
- c) Evaluar los niveles de NO en plasma.
- d) Determinar el grado de infección que causa la coccidiosis a través de la medición de marcadores de lesiones en intestino.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del Ensayo Biológico

Esta investigación se llevó a cabo en las instalaciones avícolas del Departamento de Avicultura de la Universidad *Texas A&M*, ubicada en College Station, Texas, Estados Unidos de América. Este lugar se localiza entre los 30° 35' 18'' de latitud norte y 096° 21' 49'' de longitud oeste, y a una altitud de 95.71 msnm (<http://www.climate-charts.com/USA-Stations/TX/TX411889.php>). La temperatura promedio anual es de 20.33°C, siendo el mes más caliente agosto con una temperatura máxima promedio de 35.67°C mientras que el mes más frío es enero con una temperatura mínima promedio de 4.33°C. La precipitación promedio anual es de 1,007 mm (<http://www.idcide.com/weather/tx/college-station.htm>).

4.2. Animales y Diseño Experimental

Se utilizaron 300 pollitos de engorda de un día de edad de la línea Cobb 500, alojados en piso y distribuidos al azar en seis tratamientos con 50 aves cada uno. Los pollos fueron criados en cama de aserrín usando niveles convencionales de calor y luz. Todas las aves se alimentaron con una dieta a base de maíz y pasta de soya (*Cuadro 1*), libre de antibióticos como promotores de crecimiento y coccidiostatos, formulada a partir de los requerimientos estimados para pollos de engorda por el NRC (1994). Los tratamientos se definieron con base a la suplementación de ARG y VE a la dieta basal. Se evaluaron tres niveles de ARG: un nivel normal (NARG, no suplementada), un nivel medio (MARG, 0.3% de ARG suplementada) y un nivel alto (HARG, 0.6% de ARG suplementada); y dos niveles de VE: un nivel comercial (VE40, no suplementada) y un nivel alto (VE80, suplementada para alcanzar las 80 UI de VE kg⁻¹ de alimento), resultando en un arreglo factorial 3 x 2. Todas las suplementaciones de ARG a la dieta basal fueron en la forma de L-arginina HCl (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, EUA) y de VE en la forma de acetato de DL- α -tocoferilo (Animal Science Products Inc., Nacogdoches TX 75963, EUA). El agua y el alimento se proporcionaron *ad libitum*.

Cuadro 1. Composición de la dieta basal y análisis calculado en base a aminoácidos digestibles¹

Ingredientes	(%)
Maíz	48.11
Pasta de soya	39.65
Grasa mezclada	8.08
Fosfato monocálcico	1.57
Carbonato de calcio	1.55
Sal	0.49
Premezcla de vitaminas	0.25
Premezcla mineral	0.05
L-lisina	0.02
DL-metionina	0.23
Total	100.00
Análisis Calculado	
EM (Mcal kg ⁻¹)	3.20
PC (%)	23.0
Arginina (%)	1.44
Lisina (%)	1.16
Metionina (%)	0.54
Aminoácidos azufrados (%)	0.84
Treonina (%)	0.76
Ácido linoleico (%)	2.82
Ca (%)	0.94
Fósforo disponible (%)	0.45

¹La dieta basal representó el 99% del total para todas las dietas del experimento. El resto (1%) fue adicionado con arena, L-arginina HCl y acetato de DL- α -tocoferilo, de acuerdo a cada tratamiento. Ésta dieta se formuló con base al mínimo costo y proveía por kg: vitamina A, 10,276 UI; vitamina D₃, 3,820 UI; vitamina E, 40 UI; vitamina K₃, 1.97 mg; tiamina, 4.85 mg; riboflavina, 8.21 mg; ácido pantoténico, 18.6 mg; niacina, 64.06 mg; biotina, 0.26 mg; ácido fólico, 1.78 mg; vitamina B₁₂, 21.78 mg; vitamina B₆, 9.17 mg; colina, 1843.57 mg; Na, 210 mg; K, 920 mg; Cl, 340 mg; Mg, 0.18 mg; S, 0.23 mg; Fe, 113.41 mg; Cu, 11.60 mg; Zn, 84.31 mg; Mn, 87.53 mg; Se, 0.15 mg; Mo, 1.81 mg.

4.3. Vacunación e Infección con *Eimeria* spp.

Al primer día de edad, todos los pollitos fueron vacunados con una vacuna comercial de oocistos vivos de *Eimeria* (Coccivac-B; Schering-Plough Animal Health Corp., Millsboro, DE, EUA); la aplicación fue en “spray”. A los 14 días de edad, todas las aves se infectaron con *Eimeria* spp. por medio del alimento. Antes del desafío, las diluciones de los inóculos se prepararon para alcanzar los siguientes niveles de oocistos por ave: 1×10^5 *E. acervulina*; 6×10^4 *E. máxima* y 4×10^4 *E. tenella*. La infección se realizó retirando el alimento por 5 h, posteriormente a los pollos se les suministraron las diluciones de inóculos mezcladas en 500 g de alimento / grupo de aves, esperando que cada ave consumiera una cantidad de 2×10^5 oocistos del cultivo de *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. máxima* y *E. tenella*).

4.3. ELISA

Se utilizaron ocho muestras serológicas sanguíneas por tratamiento a los 8 y 14 días post-vacunación (PV), y a los 8 y 14 días post-infección (PI) para medir la inmunidad humoral mediante las concentraciones de IgG, IgA e IgM. Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción de la vena y se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 2 h, después se centrifugaron a $400 \times g$ por 8 min a 4°C , enseguida los sueros se colectaron y almacenaron a 4°C por 4 h, y finalmente se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis. Las muestras serológicas se descongelaron a 4°C para calcular las concentraciones de anticuerpos (IgG, IgA e IgM) a través de la prueba de inmunoensayo con enzimas asociadas (ELISA). Ésta prueba se realizó mediante el uso de kits para ELISA IgG, IgA e IgM (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, EUA), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Todas las muestras serológicas se evaluaron a una dilución de 1:1000, y la absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de microplatos (Wallac Victor-2 1420 Multilabel Counter). Los resultados obtenidos se utilizaron para calcular la concentración de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) a través de su ajuste en una curva de cuatro parámetros logísticos.

4.4. Aislamiento de Heterófilos y Monocitos

A los 7 días PI se tomaron muestras de sangre de la vena yugular de los pollos usando EDTA como anticoagulante. Se mezcló la sangre de 10 aves por tratamiento para aislar los heterófilos y monocitos de acuerdo al procedimiento descrito por Kogut *et al.* (1995). Brevemente se describe el procedimiento: las muestras sanguíneas de cada grupo de aves se mezclaron con una solución que contenía 1% de metilcelulosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) disuelta en una solución de Rosewell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Mediatech Inc., Herdon, VA, EUA) en una proporción de 1:1.5, después se centrifugaron a 250 x g por 15 min. La capa superior se removió y posteriormente se mezcló con volúmenes iguales de una solución salina y balanceada de Hank libre de Ca y Mg (Mediatech Inc.). Ésta suspensión se colocó en capas de gradiente de Histopaque 1.077 / 1.199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y se centrifugó a 500 x g por 60 min. Después de centrifugada, las interfaces conteniendo monocitos y heterófilos se colectaron, lavaron y resuspendieron con RPMI. La concentración de heterófilos y monocitos se calculó usando una cámara de Neubauer, posteriormente se ajustó a 4×10^6 heterófilos / mL y 1×10^7 monocitos / mL. Enseguida, las células se conservaron en hielo hasta su posterior uso. La viabilidad celular (>95%) se determinó mediante el uso de una solución de azul trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

4.5. Estallido Oxidativo de Heterófilos y Monocitos

El estallido oxidativo de heterófilos y monocitos se calculó mediante la medición oxidativa del 2'7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA; Sigma-Aldrich) a DCF fluorescente (Rosenkranz *et al.*, 1992). Los heterófilos y monocitos (1 mL) se preincubaron por 30 min con 125 μ L de forbol-12-miristato-13 acetato (PMA; 20 μ g mL⁻¹ de células; Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) a 42°C. Un volumen equivalente de RPMI-1640 completo se añadió para el control negativo de los tratamientos. Enseguida del período de preincubación, 125 μ L de DCFH-DA (0.2 mg / mL) se adicionaron a los heterófilos y monocitos, posteriormente se mezclaron vigorosamente y se hicieron alícuotas (8 repeticiones por muestra) en platos claros

de 96 pozos con fondo plano. El estallido oxidativo se midió a través de un lector fluorescente de platos Wallac (excitación – 485 / emisión – 535 nm; Perkin Elmer, Boston, MA, EUA).

4.6. Determinación de Óxido Nítrico

Se colectaron ocho muestras de plasma por tratamiento, a los 14 d PV y 14 d PI para determinar la concentración total de NO. Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción de la vena usando EDTA como anticoagulante (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), después se centrifugaron a 550 x g por 10 min a 4°C y el plasma se colectó y almacenó a -80°C hasta su posterior análisis. Las muestras se descongelaron a 4°C para calcular los niveles plasmáticos de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$. Se utilizó un kit para calcular las concentraciones totales de NO (Assay Designs, Ann Arbor, MI, EUA). El kit permitió hacer la conversión enzimática de NO_3^- a NO_2^- , seguida por la detección calorimétrica de NO_2^- como un producto teñido de la reacción de Griess. El producto final se midió a una absorbancia de 585 nm usando un lector de microplatos (Wallac Victor-2 1420 Multilabel Counter).

4.7. Análisis de Lesiones en Intestino

A los 6 días PV y a los 7, 14 y 17 días PI, se sacrificaron 10 pollos por tratamiento por medio de la dislocación cervical para medir las lesiones ocasionadas por coccidias en los intestinos (duodeno, yeyuno y ciego). Después del sacrificio de los pollos, los intestinos se evaluaron usando una escala de 0 a 4 descrita por Johnson y Reid (1970), en la que la lesión de escala 0 indica que no se encontraron lesiones, mientras que una lesión de escala 4 indica el grado máximo de daño. Las lesiones causadas por *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* se analizaron juntas en lugar de analizarse individualmente; por consiguiente, el intervalo de la escala se ajustó por área específica de los intestinos.

4.8. Análisis Estadístico

El análisis estadístico del experimento que se realizó, se basa en un modelo completamente al azar con diseño factorial de tratamientos:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable de respuesta correspondiente al i-ésimo nivel de arginina en el j-ésimo nivel de vitamina E de la k-ésima repetición.

μ = Media general.

A_i = Efecto del factor A (arginina) al nivel $i = 1, 2, 3$.

B_j = Efecto del factor B (vitamina E) al nivel $j = 1, 2$.

$(AB)_{ij}$ = Efecto de la interacción.

ε_{ijk} = Error experimental. $\varepsilon_{ijk} \sim NI(0, \sigma^2)$

Los datos se analizaron por medio de un ANOVA de dos entradas, con ARG y VE como los efectos principales, usando el software SigmaStat[®] (San Jose, California, EUA). Las diferencias entre las medias de los tratamientos se separaron a través de la prueba de comparación múltiple Tukey, y éstas se consideraron estadísticamente diferentes cuando $P < 0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La ARG es un aminoácido esencial en las aves porque ellas no lo pueden sintetizar en el ciclo de la urea (Tamir y Ratner, 1963), y se ha demostrado que este aminoácido posee propiedades importantes en la estimulación del sistema inmunitario (Potenza, *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007). Por otro lado, la VE tiene propiedades antioxidantes (Packer, 1991; Traber, 2007) y genera importantes efectos en la modulación inmunológica (Meydani y Beharka, 1998; Erf *et al.*, 1998; Boa-Amponsem *et al.*, 2000). Sin embargo, los efectos de diferentes niveles de suplementación de VE o ARG en la respuesta inmunitaria y la progresión patológica de pollos después de un desafío con coccidiosis han sido inconsistentes (Colnago *et al.*, 1984; Allen, 1999; Allen y Fetterer, 2000; Allen y Fetterer, 2002a).

En esta investigación se midió *in vitro* el estallido oxidativo de heterófilos (HOB) y monocitos (MOB) como un indicador de la función de éstas células a los 7 d después de la infección con coccidias (*Figura 2*). Los heterófilos, considerados los homólogos de los neutrófilos de mamíferos (Powell, 1987), son los leucocitos granulados predominantes en la respuesta inflamatoria aguda en las aves, poseen una alta capacidad fagocítica y son capaces de producir actividad antimicrobiana (Harmon, 1998). De la misma manera, los monocitos, que son macrófagos inmaduros, y los macrófagos tienen propiedades fagocíticas para destruir microorganismos patógenos (Powell, 1987); además, ellos son capaces de producir citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 y IL-6 para generar la activación de neutrófilos, monocitos y macrófagos e iniciar la destrucción de bacterias y tumores, elevar la expresión molecular de adhesión en la superficie de neutrófilos y células endoteliales, estimular la proliferación de linfocitos B y T, e iniciar la producción de otras citocinas proinflamatorias (Calder, 2007). A los 7 d PI, el valor más bajo del HOB se encontró en las aves alimentadas con las dietas que incluyeron VE40, pero éste incrementó con la combinación de MARG o HARG, mientras que los pollos alimentados con VE80 presentaron los niveles más altos del HOB cuando ésta se combinó con NARG o HARG. De la misma manera, los niveles más altos del MOB se obtuvieron con la combinación de VE80 con NARG o HARG, mientras que las aves alimentadas con las dietas que contenían VE40 tuvieron los niveles más bajos del MOB, excepto por las aves alimentadas con la dieta

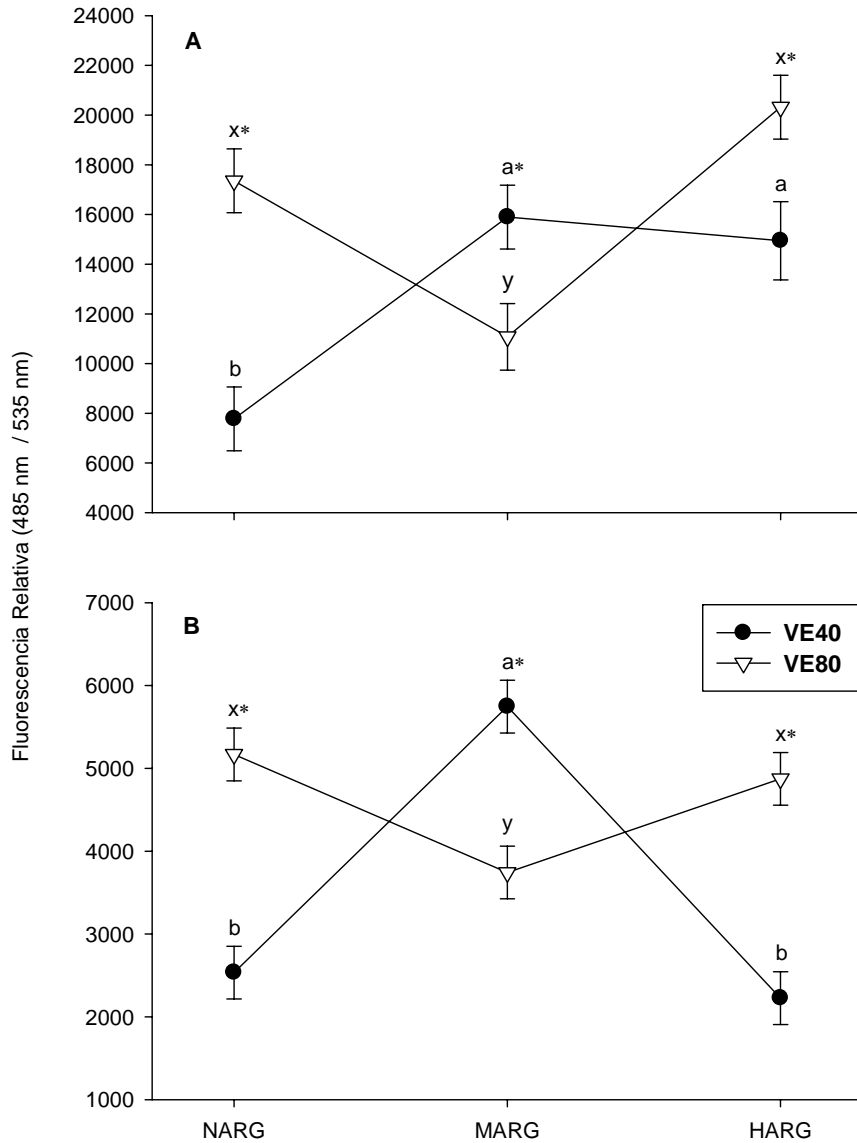


Figura 2: Estallido oxidativo *in vitro* de heterófilos (A) y monocitos (B; 24 repeticiones por tratamiento) aislados de la sangre periférica de pollos de engorda (n = 10 por tratamiento) a los 7 d post-infección (PI) con un cultivo vivo de *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*). Los pollos se alimentaron con una dieta a base de maíz y pasta de soya formulada a partir de los requerimientos estimados por el NRC (1994) con 40 u 80 UI de vitamina E kg⁻¹ de alimento (VE40 y VE80), y suplementada con L-arginina HCl a 0, 0.3 o 0.6% (NARG, MARG, o HARG, respectivamente) en un arreglo factorial de tratamientos. Los valores son las medias ± el error estándar de la media (SEM). *Los asteriscos indican diferencias (P < 0.05) entre los niveles de VE a un mismo nivel de ARG. ^{x,y}Indican diferencias (P < 0.05) entre los niveles de ARG a un mismo nivel de VE (VE80), mientras que ^{a,b}indican diferencias (P < 0.05) entre los niveles de ARG a un mismo nivel de VE (VE40).

VE40-MARG (Figura 2). Por lo tanto, éstos resultados muestran que altos niveles de VE son capaces de mejorar el HOB y el MOB cuando niveles normales de ARG son proporcionados en el alimento, pero también muestran que el HOB y el MOB puede ser mejorado significativamente mediante la administración de la dieta que contiene niveles normales de VE con la adición de cantidades moderadas de ARG. Rose *et al.* (1984) reportó un período de leucocitosis, principalmente heterófilos y linfocitos, después de un desafío con *Eimeria maxima*; además, respuestas inflamatorias locales son muy importantes en la protección temprana en contra de infecciones coccidiales. De la misma manera, reportes recientes resaltan la importancia de monocitos inflamatorios como la primera línea de defensa en el control de patógenos intestinales (Dunay *et al.*, 2008), mostrando que animales con carencia de monocitos inflamatorios son incapaces de controlar infecciones parasitarias. Los mismos autores reportaron que estos monocitos inflamatorios regulan la óxido nítrico sintasa (iNOS), producen IL-12 y secretan TNF- α en respuesta a la infección. Por consiguiente, a través del mejoramiento en el funcionamiento de heterófilos y monocitos, altos niveles de VE o ARG, o su combinación, pueden mejorar la habilidad de los pollos para combatir infecciones coccidiales y mejorar la inmunidad adquirida.

Los efectos de interacción entre ARG y VE en el estallido oxidativo de heterófilos y monocitos pueden ser explicados por las interacciones entre las especies reactivas de oxígeno (ROS), el NO y la VE. Los fagocitos regulan su respuesta inmunológica innata mediante la liberación de sustancias que causan daño a los microorganismos invasores. Estas sustancias incluyen proteínas, por ejemplo, lizosimas, peroxidasas y elastasas; además, ROS como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno, el ácido hipohaluro y el radical hidroxilo (Rosen, *et al.*, 1995). En monocitos humanos activados (Cachia *et al.*, 1998) y PMNs (Nauseef *et al.*, 1991), la conversión molecular de oxígeno a $O_2^{\bullet-}$ es producida por el sistema de la NADPH-oxidasa en un proceso conocido como el estallido respiratorio. El sistema NADPH-oxidasa está compuesto de proteínas citosólicas (p47phox, p67phox, p70phox y rac 1/2) y proteínas de membrana (p22phox y gp91phox, que forman el citocromo b558) que se unen en los sitios de membrana en la activación celular. La NADPH-oxidasa activada utiliza NADPH citosólico para reducir el oxígeno (El-Benna *et al.*, 2005). El $O_2^{\bullet-}$ formado por esta enzima es usado para la producción de una gran variedad de oxidantes reactivos, incluyendo

halógenos oxidados, radicales libres y el “singlet” de oxígeno (Babior, 1999). La VE es un potente antioxidante con propiedades anti-inflamatorias (Singh *et al.*, 2005). Cachia *et al.* (1998) mostraron que el α -tocoferol inhibe la producción del O_2^{\bullet} por los monocitos adherentes humanos a través del debilitamiento en el ensamble de la NADPH-oxidasa. Fujii *et al.* (1997) encontraron que el NO suprime la actividad generadora de O_2^{\bullet} de los neutrófilos de cerdos mediante la inhibición del proceso de ensamblamiento de la NADPH-oxidasa.

El NO es un importante mediador de la inmunidad innata y adquirida (Lillehoj y Li, 2004), que se sintetiza a partir de ARG por la iNOS (Wu y Meininger, 2002). En este estudio se encontró que los efectos de ARG y VE en la producción de NO a los 14 d después de la infección con coccidias (*Figura 3*) fueron opuestos a los resultados obtenidos en el HOB y el MOB. El incremento en la concentración de NO después de la infección con *Eimeria* ha sido reportado. Allen (1997a) mostró que pollos infectados con una dosis alta de *E. tenella* presentaron concentraciones plasmáticas más altas de $NO_2^- + NO_3^-$ que pollos no infectados o infectados con dosis bajas o moderadas. De la misma manera, Lillehoj y Li (2004) encontraron niveles altos de NO en pollos infectados con *E. tenella* comparados con pollos no infectados. Allen (1997b) realizó una comparación de cepas de *E. maxima* (una cepa ligeramente virulenta y otra más virulenta, 68 y SS, respectivamente), y encontró que los niveles de $NO_2^- + NO_3^-$ en plasma de los pollos no infectados fueron más bajos que en pollos infectados con las cepas 68 o SS; sin embargo, no encontró respuesta significativa ($P > 0.05$) en la concentración de $NO_2^- + NO_3^-$ en pollos infectados con la cepa 68. Estos datos sugieren que la concentración de $NO_2^- + NO_3^-$ está influenciada por la cantidad y virulencia de las especies de *Eimeria*.

En relación a la concentración de $NO_2^- + NO_3^-$ en plasma, en esta investigación no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) a los 14 d PV (datos no publicados). Sin embargo, a los 14 d PI, los niveles de $NO_2^- + NO_3^-$ fueron más altos en las aves alimentadas con la dieta VE80-MARG que en las aves alimentadas con la dieta VE40-MARG ($P < 0.05$). Las aves alimentadas con la dieta VE40-NARG mostraron niveles más altos de $NO_2^- + NO_3^-$ comparadas con las aves alimentadas con la dieta V80-NARG ($P < 0.05$). La suplementación de HARG tuvo el mismo efecto cuando se combinó con VE40 o VE80 (*Figura 3*).

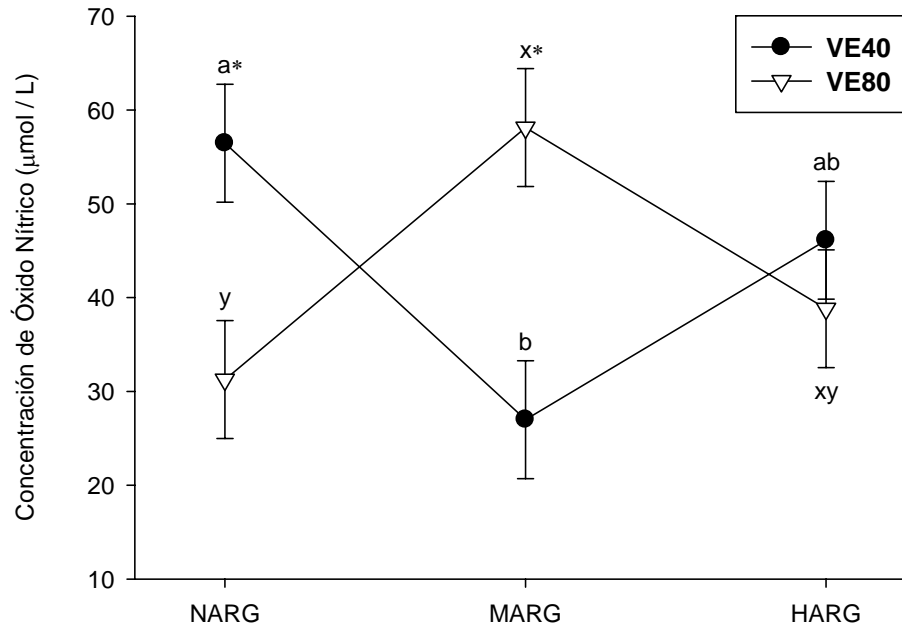


Figura 3: Efectos de arginina (ARG) y vitamina E (VE) en la concentración de óxido nítrico (NO) en plasma ($n = 8$ muestras por tratamiento) de pollos de engorda a los 14 d post-infección (PI) con un cultivo vivo de *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*). Los pollos se alimentaron con una dieta a base de maíz y pasta de soya formulada a partir de los requerimientos estimados por el NRC (1994) con 40 u 80 UI de vitamina E kg^{-1} de alimento (VE40 y VE80), y suplementada con L-arginina HCl a 0, 0.3 o 0.6% (NARG, MARG, o HARG, respectivamente) en un arreglo factorial de tratamientos. Los valores son las medias \pm el error estándar de la media (SEM). *Los asteriscos indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de VE a un mismo nivel de ARG. ^{x,y}Indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de ARG a un mismo nivel de VE (VE80), mientras que ^{a,b} indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de ARG a un mismo nivel de VE (VE40).

Los resultados obtenidos en la concentración de NO indican una clara interacción entre ARG y VE, ya que la suplementación de MARG tendió a incrementar los niveles de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ sólo cuando se combinó con VE80, mientras que NARG y HARG tendieron a incrementar la concentración de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ cuando se combinaron con VE40. Aunque ARG se usa como sustrato en la producción de NO, los efectos de suplementación de este aminoácido en infecciones con *Eimeria* han sido inconsistentes. Allen (1999) reportó que pollos infectados con *E. maxima*, *E. tenella*, o *E. acervulina* incrementaron los niveles de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ en plasma comparados con pollos no infectados, pero la concentración de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ en plasma no se afectó por la suplementación de ARG. En otro estudio, los pollos fueron infectados con varias dosis de *E. acervulina* y alimentados con una dieta que contenía 1.64% de ARG; las

aves infectadas con las dosis más altas de oocistos tuvieron los niveles más altos de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ en plasma (Allen y Fetterer, 2000). En lo referente a la suplementación de VE, los mismos autores reportaron que altos niveles de VE incrementaron los niveles plasmáticos de NO en pollos desafiados con una infección leve de *E. tenella*, pero la suplementación de VE no afectó los niveles plasmáticos de NO cuando los pollos se expusieron a una infección severa de *E. tenella* (Allen y Fetterer, 2002a). Sin embargo, en todos los casos, altos niveles de NO fueron asociados con una fuerte infección. De esta manera, los datos obtenidos en esta investigación sugieren que los pollos vacunados contra coccidiosis y desafiados después con un cultivo vivo de *Eimeria* spp. experimentaron una infección menos severa cuando los pollos se alimentaron con las dietas VE40-MARG o VE80-NARG comparados con los pollos alimentados con las dietas VE40-NARG o VE80-MARG.

La inmunidad humoral se estimula por la infección con *Eimeria* (Abu Ali *et al.*, 1976; Trees *et al.*, 1985; Lillehoj y Trout, 1996) y ha sido mostrado que los niveles de anticuerpos están relacionados con la severidad de la infección (Onaga *et al.*, 1986) y el tiempo de exposición al parásito (Gilbert *et al.*, 1988). Por lo tanto, en esta investigación se midieron los niveles de anticuerpos (isotipos IgG, IgM e IgA) en el suero sanguíneo a través de la prueba de ELISA (Figuras 4, 5 y 6). Las células B y las células plasmáticas ejercen una importante función en el sistema inmunitario a través de la síntesis y liberación de inmunoglobulinas (Glick, 2000). Las inmunoglobulinas son glucoproteínas que actúan como anticuerpos. En aves, hay tres clases de inmunoglobulinas que han sido reconocidas como los homólogos de los mamíferos: IgM, IgA y IgG (Davison *et al.*, 2008). Los anticuerpos se presentan como respuesta a la exposición de antígenos específicos, excepto los anticuerpos derivados maternalmente. La IgG es transferida de la yema, y no existe transferencia de la IgM o IgA al pollito, por lo que la presencia de estas dos inmunoglobulinas en el suero resulta de la síntesis activa. Por consiguiente, los pollitos son más susceptibles a la colonización temprana de patógenos en el intestino (Powell, 1987). El modo de acción de los anticuerpos para prevenir la proliferación de patógenos es por medio de la combinación con el patógeno y la neutralización de éste, facilitando el ingreso y la digestión del patógeno por las células fagocíticas, y facilitando la lisis y muerte celular (Glick, 2000).

Con respecto a la concentración de IgG (*Figura 4*), las aves alimentadas con la dieta VE80-MARG a los 9 d PV incrementaron los niveles de IgG ($P < 0.05$) comparados con las aves alimentadas con las otras dietas, pero las aves alimentadas con la dieta VE40-HARG tuvieron la más alta concentración de IgG ($P < 0.05$) a los 14 d PV. Después del desafío, las aves alimentadas con VE80 combinada con MARG o HARG aumentaron los niveles de IgG ($P < 0.05$) a los 9 d PI comparadas con las aves alimentadas con la dieta testigo (VE40-NARG), pero sólo las aves alimentadas con la dieta VE80-MARG mantuvieron elevada la concentración de IgG a los 14 d PI. Los niveles de IgG a los 14 d PI fueron mayores que los niveles de IgG a los 9 y 14 d PV, lo cual coincide con los descubrimientos de Smith *et al.* (1993), quienes reportaron que los niveles de IgG incrementaron ligeramente después de una primera exposición a *Eimeria*, pero incrementaron significativamente después de un desafío ($P < 0.05$). Aunque se ha reportado que las respuestas mediadas por los anticuerpos ejercen una menor función en la protección contra coccidiosis (Lillehoj y Trout, 1996; Allen y Fetterer, 2002b), Guzman *et al.* (2003) reportaron una relación entre altos niveles de IgG y bajos niveles de excreción de oocistos usando una vacuna virulenta. El isotipo aviar IgG es la forma predominante en suero, producido después de IgM en la respuesta primaria de anticuerpos y es el principal isotipo generado en la respuesta secundaria; de hecho, IgG es el principal anticuerpo sistémico aviar activo en infecciones (Davison *et al.*, 2008).

La IgM de los pollos es estructural y funcionalmente homóloga a su equivalente en los mamíferos. Esta inmunoglobulina es el predominante receptor antígeno celular B, y durante el desarrollo embrionario es el primer isotipo en ser expresado; de hecho, la IgM es el isotipo predominante producido después de la exposición inicial a un antígeno (Davison *et al.*, 2008). En lo referente a la concentración de IgM (*Figura 5*), los niveles más altos de IgM a los 9 d PV se obtuvieron con las aves alimentadas con la dieta VE80-MARG ($P < 0.05$). A los 14 d PV, las aves alimentadas con la dieta VE40-NARG tuvieron una concentración más alta de IgM comparadas con las aves alimentadas con la dieta VE80-NARG, pero las aves alimentadas con la dieta VE80-HARG mostraron niveles más altos de IgM comparadas con las aves alimentadas con la dieta VE40-HARG. Por otra parte, las aves alimentadas con la dieta VE40-HARG o con la combinación de VE80 con MARG o HARG produjeron los niveles más altos de IgM ($P < 0.05$) a los 14 d PI. Se ha reportado que los niveles específicos

de IgM incrementan después de una infección primaria, con bajas respuestas después de exposiciones secundarias (Mocket y Rose, 1986; Smith *et al.*, 1993), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación.

En relación a la concentración de IgA (*Figura 6*), ésta se incrementó a los 9 d PV con el tratamiento VE80-HARG ($P < 0.05$); por otro lado, el mismo nivel de ARG tuvo un efecto opuesto cuando se combinó con VE40. Los niveles más altos de IgA ($P < 0.05$) a los 9 d PI se observaron en las aves alimentadas con la dieta testigo. La forma predominante de la actividad de anticuerpos en las secreciones corporales es la IgA. Esta inmunoglobulina secretora proporciona la primera línea de defensa en contra de diversos patógenos (Davison *et al.*, 2008). Por lo tanto, la IgA está involucrada en la resistencia a parásitos que infectan la mucosa intestinal (Powell, 1987). Sin embargo, Yun *et al.*, (2000) mencionaron que aunque la identificación de la IgA en la bilis o suero es un método común para evaluar la infección de *Eimeria*, no ha sido perspicaz su poder debido a la baja concentración relativa de la IgA específica al parásito en la presencia de una alta concentración de anticuerpo no específico.

Se ha mencionado que los anticuerpos reducen la invasión de algunas especies de *Eimeria* si los parásitos están en contacto cercano con anticuerpos locales antes de que éstos entre a su hospedero (Lillehoj y Trout, 1996). En este aspecto, los pollos alimentados con niveles altos de VE y niveles medios de ARG podrían estar mejor preparados para responder a la infección de *Eimeria* después de la vacunación.

No hubo diferencias ($P > 0.05$) en los marcadores de lesiones (LS) a los 7 d PV ni a los 7 y 14 d PI, pero a los 17 d PI, las aves alimentadas con HARG tuvieron menores LS en el UI que las aves alimentadas con MARG ($P < 0.05$), mientras que las aves alimentadas con VE80 tuvieron menores LS en el MI que las aves alimentadas con VE40 ($P < 0.05$; datos no presentados). Esta carencia de diferencias podría ser atribuida al hecho de que todas las aves se vacunaron, así que el desafío no fue bastante fuerte.

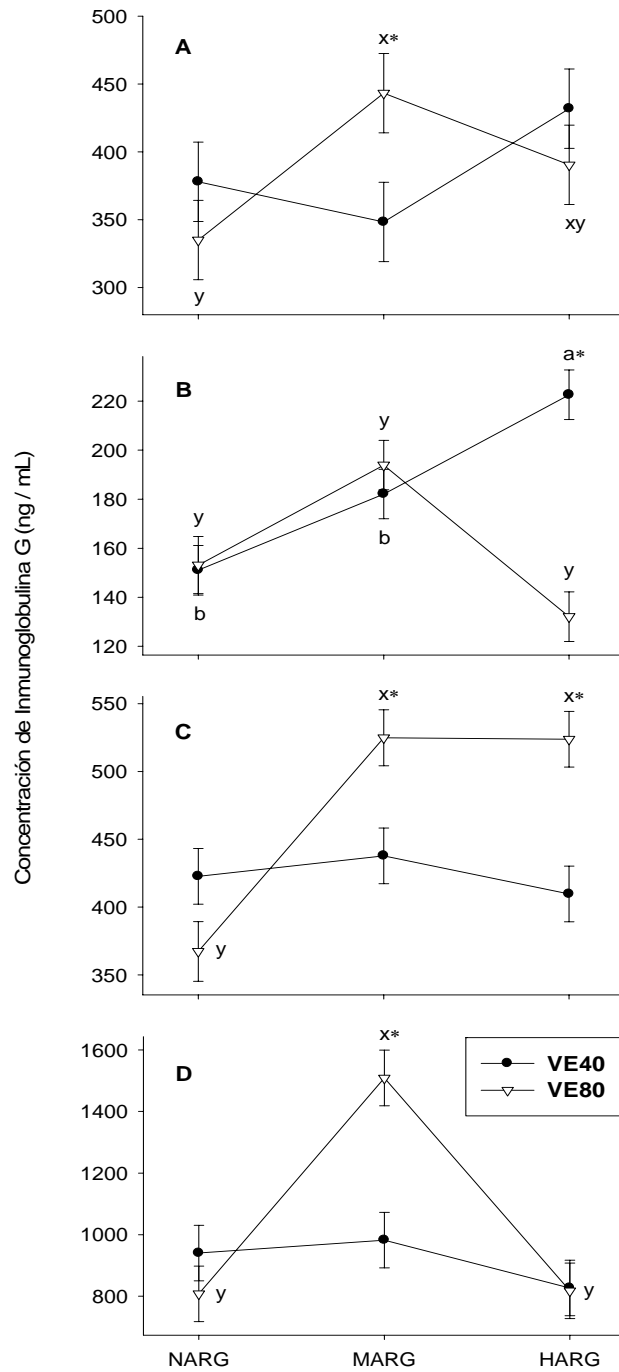


Figura 4: Efectos de arginina (ARG) y vitamina E (VE) en la concentración de inmunoglobulina G (IgG) en el suero sanguíneo ($n = 8$ muestras por tratamiento) de pollos de engorda a los 9 y 14 d post-vacunación (PV; A y B, respectivamente) contra coccidiosis, y a los 9 y 14 d post-infección (PI; C y D, respectivamente) con un cultivo vivo de *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*). Los pollos se alimentaron con una dieta a base de maíz y pasta de soya formulada a partir de los requerimientos estimados por el NRC (1994) con 40 u 80 UI de vitamina E kg^{-1} de alimento (VE40 y VE80), y suplementada con L-arginina HCl a 0, 0.3 o 0.6% (NARG, MARG, o HARG, respectivamente) en un arreglo factorial de tratamientos. Los valores son las medias \pm el error estándar de la media (SEM). *Los asteriscos indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de VE a un mismo nivel de ARG. ^{x,y}Indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de ARG a un mismo nivel de VE (VE80), mientras que ^{a,b}indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de ARG a un mismo nivel de VE (VE40).

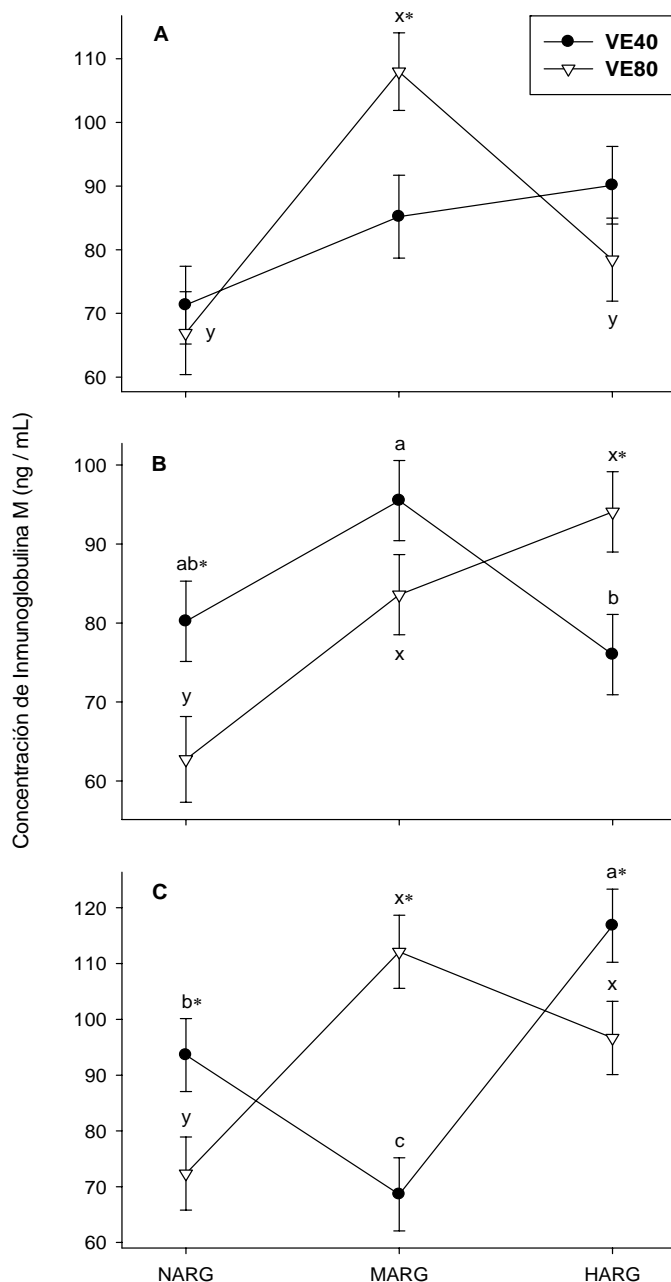


Figura 5: Efectos de arginina (ARG) y vitamina E (VE) en la concentración de inmunoglobulina M (IgM) en el suero sanguíneo ($n = 8$ muestras por tratamiento) de pollos de engorda a los 9 y 14 d post-vacunación (PV; A y B, respectivamente) contra coccidiosis, y a los 14 d post-infección (PI; C) con un cultivo vivo de *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*). Los pollos se alimentaron con una dieta a base de maíz y pasta de soya formulada a partir de los requerimientos estimados por el NRC (1994) con 40 u 80 UI de vitamina E kg^{-1} de alimento (VE40 y VE80), y suplementada con L-arginina HCl a 0, 0.3 o 0.6% (NARG, MARG, o HARG, respectivamente) en un arreglo factorial de tratamientos. Los valores son las medias \pm el error estándar de la media (SEM). *Los asteriscos indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de VE a un mismo nivel de ARG. ^{x,y}Indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de ARG a un mismo nivel de VE (VE80), mientras que ^{a,b}indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de ARG a un mismo nivel de VE (VE40). Los datos correspondientes a los efectos de ARG y VE a los 9 d PI no se presentaron debido a que éstos no mostraron diferencias ($P > 0.05$).

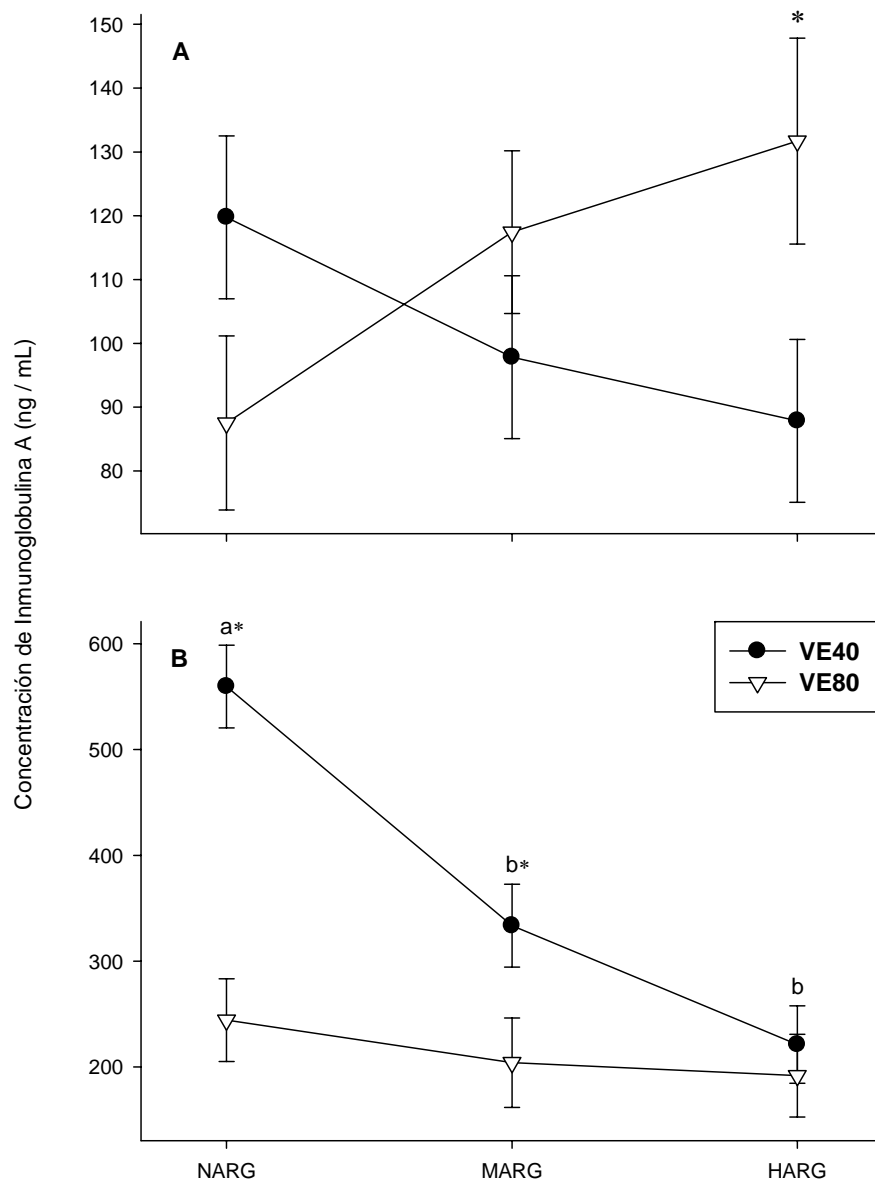


Figura 6: Efectos de arginina (ARG) y vitamina E (VE) en la concentración de inmunoglobulina A (IgA) en el suero sanguíneo (n = 8 muestras por tratamiento) de pollos de engorda a los 9 d post-vacunación (PV; A) contra coccidiosis, y a los 9 d post-infección (PI; B) con un cultivo vivo de *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*). Los pollos se alimentaron con una dieta a base de maíz y pasta de soya formulada a partir de los requerimientos estimados por el NRC (1994) con 40 u 80 UI de vitamina E kg^{-1} de alimento (VE40 y VE80), y suplementada con L-arginina HCl a 0, 0.3 o 0.6% (NARG, MARG, o HARG, respectivamente) en un arreglo factorial de tratamientos. Los valores son las medias \pm el error estándar de la media (SEM). *Los asteriscos indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de VE a un mismo nivel de ARG. ^{x,y}Indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de ARG a un mismo nivel de VE (VE80), mientras que ^{a,b} indican diferencias ($P < 0.05$) entre los niveles de ARG a un mismo nivel de VE (VE40). Los datos correspondientes a los efectos de ARG y VE a los 14 d PV y a los 14 d PI no se presentaron debido a que éstos no mostraron diferencias ($P > 0.05$).

6. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos de los efectos de ARG y VE en la respuesta inmunitaria de pollos de engorda vacunados contra coccidiosis y desafiados experimentalmente con un cultivo vivo de *Eimeria* spp., se puede concluir lo siguiente:

- ❖ Altos niveles de VE son capaces de mejorar el HOB y el MOB cuando la dieta de las aves contiene niveles normales de ARG; además, el HOB y el MOB puede ser mejorado cuando a las aves se les proporcionan dietas con niveles normales de VE con la adición de cantidades moderadas de ARG.
- ❖ Los niveles plasmáticos de NO sugieren que las aves alimentadas con las dietas VE80-NARG o VE40-MARG experimentaron una infección menos severa que las aves alimentadas con las dietas VE40-NARG o VE80-MARG.
- ❖ Las aves alimentadas con la dieta VE80-MARG mantuvieron altos los niveles de IgG e IgM en el suero sanguíneo después de la vacunación y del desafío.
- ❖ Las aves alimentadas con la dieta VE40-NARG tuvieron los niveles más altos de IgA en el suero sanguíneo después del desafío.
- ❖ Las pocas diferencias que se observaron en los LS podrían ser atribuidas al hecho de que todas las aves se vacunaron, así que el desafío no fue bastante fuerte.
- ❖ Los datos previamente mencionados sugieren que el uso de dietas con niveles de ARG y VE superiores a los recomendados por el NRC pueden ejercer funciones complementarias en la estimulación de las respuestas inmunitarias innata y humoral de pollos infectados con *Eimeria* spp., potencialmente mejorando la eficacia de las vacunas vivas contra coccidiosis.

7. LITERATURA CITADA

- Abbas, A. K., and A. H. Lichtman. 2004. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. Elsevier Inc. Philadelphia. 322 p.
- Abdukalykova, S. T., X. Zhao, and C. A. Ruiz-Feria. 2008. Arginine and vitamin E modulate the subpopulations of T lymphocytes in broilers chickens. *Poult. Sci.* 87:50–55.
- Abu Ali, N., M. Movsesijan, A. Sokolić, and Z. Tanielian. 1976. Circulating antibody response to *Eimeria tenella* oral and subcutaneous infections in chickens. *Vet. Parasitol.* 1:309–316.
- Ávila, E. y A. Cortés. 2005. La utilización de enzimas como aditivos en dietas para aves. En: Memorias “La Avicultura y sus Retos Actuales.” Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. pp. 41–47.
- Allen, P. C. 1997a. Nitric oxide production during *Eimeria tenella* infections in chickens. *Poult. Sci.* 76:810–813.
- Allen, P. C. 1997b. Production of free radical species during *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poult. Sci.* 76:814–821.
- Allen P. C. 1999. Effects of daily oral doses of L-arginine on coccidiosis infections in chickens. *Poult. Sci.* 78:1506–1509.
- Allen, P. C., and R. H. Fetterer. 2000. Effect of *Eimeria acervulina* infections on plasma L-arginine. *Poult. Sci.* 79:1414–1417.
- Allen, P. C., and R. H. Fetterer. 2002a. Interaction of dietary vitamin E with *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poult. Sci.* 81:41–48.
- Allen, P. C., and R. H. Fetterer. 2002b. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin. Microbiol.* 15(1):58–65.
- Babior, B. M. 1984. The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.* 73:599–601.
- Babior, B. M. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464–1476.
- Bainton, D. F., J. L. Ulliyot, and M. G. Farquhar. 1971. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.* 134:907–934.
- Boa-Amponsem, K., S. E. H. Price, M. Picard, P. A. Geraert, and P. B. Siegel. 2000. Vitamin E and immune responses of broiler pureline chickens. *Poult. Sci.* 79:466–470.

- Cachia, O., J. El Benna, E. Pedruzzi, B. Descomps, M. A. Gougerot-Pocidalò, and C. L. Leger. 1998. α -tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 273:32801–32805.
- Calder, P. C. 2007. Immunological parameters: what do they mean? *J. Nutr.* 137:773S–780S.
- Chapman, H. D. 2001. Use of anticoccidial drugs in broiler chickens in the USA: Analysis for the years 1995 to 1999. *Poult. Sci.* 80:572–580.
- Chapman, H. D., T. E. Cherry, H. D. Danforth, G. Richards, M. W. Shirley, and R. B. Williams. 2002. Sustainable coccidiosis control in poultry production: The role of live vaccines. *Int. J. Parasitol.* 32:617–629.
- Charlton, B. R., A. J. Bermudez, M. Boulianne, D. A. Halvorson, J. S. Jeffrey, L. J. Newman, J. E. Sander, and P. S. Wakenell. 2000. Avian disease manual. Pages 153-156 in *Parasitic Diseases*. Fifth edition. Ed. American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania.
- Collado, V. M., R. Porras, Ma. T. Cutuli y E. Gómez-Lucía. 2008. El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.* 2(1):1–16.
- Colnago, G. L., L. S. Jensen, and P. L. Long. 1984. Effect of selenium and vitamin E on the development of immunity to coccidiosis in chickens. *Poult. Sci.* 63:1136–1143.
- Cox, F. E. G. 1998. Control of coccidiosis: lessons from other sporozoa. *Int. J. Parasitol.* 28:165–179.
- Dalloul, R. A., and H. S. Lillehoj. 2005. Recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. *Avian Dis.* 49:1–8.
- Davison, F., B. Kaspers, and K. A. Schat. 2008. *Avian immunology*. Ed. Academic Press. 481 pp.
- Dunay, I. R., R. A. Damatta, B. Fux, R. Presti, S. Greco, M. Colonna, and L. D. Sibley. 2008. Grl (+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29:306–317
- El-Benna, J., P. M. Dang, M. Gougerot-Pocidalò, and C. Elbim. 2005. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 53:199–206.
- Erf, G. F. 2004. Cell-mediated immunity in poultry. *Poult. Sci.* 83:580–590.

- Erf, G. F., W. G. Bottje, T. K. Bersi, M. D. Headrick, and C. A. Fritts. 1998. Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. *Poult. Sci.* 77:529–537.
- Fujii, H., K. Ichimori, K. Hoshiai, and H. Nakazawa. 1997. Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process. *J. Biol. Chem.* 272:32773–32778.
- Gilbert, J. M., J. K. Bhanushali, and L. R. McDougald. 1988. An enzyme-linked immunosorbent assay for coccidiosis in chickens: correlation of antibody levels with prior exposure to coccidia in the laboratory and in the field. *Avian Dis.* 32:688–694.
- Glick, B. 2000. Immunophysiology. Pages 657-670 in Sturkie's *Avian Physiology*. Whittow, G. C. 2000. Fifth edition, Ed. Academic Press.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, and B. A. Osborne. 2000. *Kuby immunology*. Ed. W. H. Freeman and Company, NY. pp. 1-111.
- Guzman, V. B., D. A. Silva, U. Kawazoe, and J. R. Mineo. 2003. A comparison between IgG antibodies against *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella* and oocyst shedding in broiler-breeders vaccinated with live anticoccidial vaccines. *Vaccine.* 21:4225–4233.
- Jeurissen, S. H. M., E. M. Janse, and A. N. Vermeulen. 1996. *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite: interaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54:231–238.
- Johnson, J., and W. M. Reid. 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 28:30–36.
- Harmon, B. G. 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poult. Sci.* 77:972–977.
- <http://www.climate-charts.com/USA-Stations/TX/TX411889.php>. Acceso 3 de noviembre de 2009.
- <http://www.idcide.com/weather/tx/college-station.htm>. Acceso 3 de noviembre de 2009.
- Kidd, M. T. 2004. Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poult. Sci.* 83:650–657.
- Klasing, K. C. 1998. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poult. Sci.* 77:1119–1125.

- Klasing, K., E. Roura y D. Korver. 1995. Interacciones entre nutrición y sistema inmune. XI curso de especialización FEDNA. Barcelona, España.
- Klasing, K. C. 2007. Nutrition and the immune system. *Br. Poult. Sci.* 48(5):525–537.
- Kogut, M. H., E. D. McGruder, B. M. Hargis, D. E. Corrier, and J. R. DeLoach. 1995. In vivo activation of heterophil function in chickens following injection with *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines. *J. Leukoc. Biol.* 57:56–62.
- Korver, D. R. 2006. Overview of the immune dynamics of the digestive system. *J. Appl. Poult. Res.* 15:123–135.
- Kubena, K. S., and D. N. McMurray. 1996. Nutrition and the immune system: a review of nutrient–nutrient interactions. *J Am Diet Assoc* 96(11):1156–1164.
- Lee, J.-E., R. E. Austic, S. A. Naqui, K. A. Golemboski, and R. R. Dietert. 2002. Dietary arginine intake alters avian leukocyte population distribution during infectious bronchitis challenge. *Poult. Sci.* 81:793–798.
- Leeson, S. 2007. Vitamin requirements: is there basis for re-evaluating dietary specifications? *Worlds Poult Sci J* doi: 10.1017/S0043933907001444.
- Li, P., Y. Yin, D. Li, S. W. Kim, and G. Wu. 2007. Amino acids and immune function. *Br. J. Nutr.* 98:237–252.
- Lillehoj, H. S., and J. M. Trout. 1993. Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathol.* 22:3–31.
- Lillehoj, H. S., and J. M. Trout. 1996. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 9(3): 349–360.
- Lillehoj, H. S., and G. Li. 2004. Nitric oxide production by macrophages stimulated with coccidia sporozoites, lipopolysaccharide, or interferon- γ , and its dynamic changes in SC and TK strains of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Avian Dis.* 48:244–253.
- Lillehoj, H., and M. Okamura. 2003. Host immunity and vaccine development to coccidia and *Salmonella* infections in chickens. *J Poult Sci* 40:151–193.
- Lowenthal, J. W., T. E. Connick, P. G. McWaters, and J. J. York. 1994. Development of T cell immune responsiveness in the chicken. *Immunol. Cell Biol.* 72:115–122.
- Marien, M., and M. de Gussem. 2007. Time to review coccidiosis treatment. *Poult. World*; 161, 3; ABI/INFORM Trade & Industry. p. 36.
- McDougald, L. R. 1998. Intestinal protozoa important to poultry. *Poult. Sci.* 77:1156–1158.

- McDougald, L. R. 2003. Protozoal Infections. Pages 974-990 in Diseases of poultry. Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, and D. E. Swayne. Ed. Iowa State Press, Ames, IA.
- Meydani, S. N., and A. A. Beharka. 1998. Recent developments in vitamin E and immune response. *Nutr. Rev.* 56:S49–S58.
- Mockett, A. P., and M. E. Rose. 1986. Immune responses to eimeria: quantification of antibody isotypes to *Eimeria tenella* in chicken serum and bile by means of the ELISA. *Parasite Immunol.* 8:481–489.
- National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Nauseef, W. M., B. D. Volpp, S. McCormick, K. G. Leidal, and R. A. Clark. 1991. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 266:5911–5917.
- Onaga, H., H. Saeki, S. Hoshi, and S. Ueda. 1986. An enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of coccidiosis in chickens: use of a single serum dilution. *Avian Dis.* 30:658–661.
- Packer, L. 1991. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:1050S–1055S.
- Peek, H. W., and W. J. M. Landman. 2003. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol.* 32(4):391–401.
- Potenza, M. A., C. Nacci, and D. Mitolo-Chieppa. 2001. Immunoregulatory effects of L-arginine and therapeutical implications. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 1:67–77.
- Powell, P. C. 1987. Immune mechanisms in infections of poultry. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15:87–113.
- Rojas-Espinosa, O. y P. Arce-Paredes, P. 2003. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Primera parte. *Bioquímica* 28(4):19–30.
- Rose, M. E., P. Hesketh, and M. Rennie. 1984. Coccidiosis: rapid depletion of circulating lymphocytes after challenge of immune chickens with parasite antigens. *Infect. Immun.* 45:166–171.

- Rosen, G. M., S. Pou, C. L. Ramos, M. S. Cohen, and B. E. Britigan. 1995. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J.* 9:200–209.
- Rosenkranz, A. R., S. Schmaldienst, K. M. Stuhlmeier, W. Chen, W. Knapp, and G. J. Zlabinger. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *Journal of Immunological Methods. J. Immunol. Meth.* 156:39–45.
- Sharma, J. M. 1991. Overview of the avian immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30:13–17.
- Sharma, J. M. 1997. The structure and function of the avian immune system. *Acta Vet. Hung.* 45(3):229–38.
- Shirley, M. W., A. L. Smith, and F. M. Tomley. 2005. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Adv. Parasitol.* doi: 10.1016/S0065-308X(05)60005-X.
- Singh, U., S. Devaraj, and I. Jialal. 2005. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu. Rev. Nutr.* 25:151–174.
- Smith, N. C., H. Bucklar, E. Muggli, R. K. Hoop, B. Gottstein, and J. Eckert. 1993. Use of IgG- and IgM-specific ELISAs for the assessment of exposure status of chickens to *Eimeria species*. *Vet. Parasitol.* 51:13–25.
- Tamir, H., and S. Ratner. 1963. A study of ornithine, citrulline and arginine synthesis in growing chicks. *Arch. Biochem. Biophys.* 102:259–269.
- Traber, M. G. 2007. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.* 27:347–362.
- Trees, A. J., S. J. Crozier, S. B. McKellar, and T. M. Wachira. 1985. Class-specific circulating antibodies in infections with *Eimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 18:349–357.
- Vermeulen, A. N., D. C. Schaap, and Th. P. M. Schetters. 2001. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Vet. Parasitol.* 100:13–20.
- Wu, G., and C. J. Meininger. 2002. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu. Rev. Nutr.* 22:61–86.
- Yun, C. H., H. S. Lillehoj, and E. P. Lillehoj. 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Dev. Comp. Immunol.* 24:303–324.