



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO DEL HIDROXICOLECALCIFEROL (25-(OH)D₃) EN LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS
E INMUNIDAD DE POLLOS DE ENGORDA

TESIS QUE PARA OPTAR PARA EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA:

JACQUELINE VÁZQUEZ REYES

TUTORA: DR. GABRIELA GÓMEZ VERDUZCO. FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA, UNAM.

COMITÉ TUTORAL

DR. CARLOS LÓPEZ COELLO. FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM.

DR. MARIANO GONZALEZ ALCORTA. PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL.

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme seguir adelante.

A Jesús nuestro señor, por ser la inspiración que me motiva a ser mejor cada día.

A mis padres pues gracias a que ellos decidieron tenerme, cuidarme y darme una educación yo puedo estar aquí y ser lo que soy. Muchas gracias, los amo.

A mí esposo Juan Carlos Paredes Aguíñiga, ya que siempre ha creído en mí y ha hecho de esta vida algo maravilloso, desde el día en que nos conocimos. Gracias amor por ser lo que más me ha gustado de este mundo. Te amo muchísimo.

A mis hermanas y a mí cuñado ya que con el cariño que nos tenemos, toda la vida nos seguiremos ayudando.

A la Doctora Gabriela Gómez Verduzco por alentarme siempre a continuar en todo este largo proceso sin importar los obstáculos que se presentaron. Por ser una gran mentora y sobre todo una excelente persona. Muchísimas gracias Doctora, estoy muy agradecida de haber podido ser su alumna.

Al Doctor Ernesto Ávila González quien me apoyo incondicionalmente desde el principio en todo, por ser una inspiración, al ser un gran maestro; ya que sólo un gran maestro enseña con el corazón. Muchísimas gracias, no tengo palabras para agradecerle tanta dedicación.

A los Doctores miembros del comité académico: Dr. Mariano González Alcorta y Dr. Carlos López Coello.

A los Doctores miembros del jurado: Dr. Antonio Díaz Cruz, Dr. Juan Carlos Del Río García y Dr. Ariel Ortiz Muñiz.

A todas las personas que colaboraron para este trabajo, me enseñaron y me abrieron las puertas de sus laboratorios y oficinas.

A todas las personas que directa o indirectamente participaron en la elaboración de esta tesis.

Muy especialmente a CONACYT ya que gracias al apoyo que me fue brindado, pude realizar este trabajo que me ayudo a crecer como estudiante, profesionista y como persona.

INDICE

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN DE POLLO EN MÉXICO	7
LAS VITAMINAS EN LA AVICULTURA	8
VITAMINA D	9
METABOLISMO DE LA VITAMINA D	10
RELACIÓN DE LA VITAMINA D CON EL CALCIO Y FOSFORO	11
VITAMINA D3 Y SU RELACIÓN CON LA INMUNIDAD	12
VDR	14
SISTEMA INMUNE DE LAS AVES	15
SISTEMA INMUNE INNATO	16
INMUNIDAD ADQUIRIDA	17
INMUNIDAD CELULAR	18
INMUNIDAD HUMORAL	18
RELACIÓN ENTRE LA NUTRICIÓN Y EL SISTEMA INMUNE	19
IMNUNOMODULADORES	20
JUSTIFICACION	22
HIPOTESIS	23
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y METODOS	24
ANALISIS ESTADISTICO	26
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	52
ANEXO 1	53
ANEXO 2	54
ANEXO 3	55
ANEXO 4	56
BIBLIOGRAFIA	57
CUADROS	66

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición en dieta sorgo+soya del metabolito activo de la vitamina D₃ el 25-(OH)D₃ sobre los parámetros productivos y la respuesta inmune de los pollos de engorda a los 21 días de edad. Se emplearon pollos de engorda de 1 día de edad de la estirpe Ross 380 que fueron asignados aleatoriamente a 4 tratamientos con 6 réplicas de 8 aves cada una. Los tratamientos fueron: 1) Dieta con 200,000 UI/Ton, de vitamina D₃ (NRC 1994). 2) Dieta con 200,000 UI/Ton, de vitamina D₃ (NRC 1994) + 69 mg 25-(OH)₂D₃/Ton. 3) Dieta con 5,000,000 UI/Ton, de vitamina D₃ (Ross). 4) Dieta con 5,000,000 UI/Ton, de vitamina D₃ (Ross) + 69 mg 25-(OH)D₃/Ton. Semanalmente se registraron los datos de: ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia. Para el efecto de los tratamientos sobre la respuesta inmune, las aves fueron inmunizadas al día 10 de edad con vacuna contra la enfermedad de Newcastle. Se tomaron 10 muestras de sangre por tratamiento para determinar títulos de anticuerpos a los 21 días utilizando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación y para determinar variables hematológicas. La respuesta inmune celular se valoró al día 21 de vida con 10 muestras de sangre mediante una prueba de citometría de flujo. Se sacrificaron 10 aves por tratamiento de 21 días de edad, se separaron las tibias izquierdas, a las cuales se les determinó el porcentaje de cenizas (AOAC), con las tibias derechas se valoró la resistencia ósea con el equipo Shell Packaging Analyze. Por último se valoró la concentración en suero del 25-(OH)D₃ mediante la técnica de determinación cuantitativa in vitro por Radioinmuno ensayo (RIA) a los 21 días de edad. Los datos obtenidos en 21 días con respecto a los parámetros productivos, no se afectaron por la inclusión de 25 veces más del requerimiento de vitamina D₃ o la adición de 25-(OH)D₃. Sin embargo, los resultados obtenidos para las variables inmunológicas; mostraron (P<0.05) que, para la variable HI se obtuvo un efecto positivo al incluir mayores niveles de vitamina D₃ o 25-(OH)D₃. Para linfocitos la suplementación de 25-(OH)D₃, aumento significativamente la cantidad en sangre. Para las variables eritrocitos, eosinófilos y monocitos la inclusión del 25-(OH)D₃ disminuyó significativamente la cantidad de estos en sangre. De manera contraria se aumentaron las concentraciones de linfocitos CD4+ al incluir 25-(OH)D₃. En el caso de los linfocitos CD8+, se disminuyeron. La concentración de IgA se

aumentó ($P < 0.05$) con la adición de altas dosis de vitamina D_3 o $25-(OH)D_3$ en la dieta. La suplementación $25-(OH)D_3$ aumentó ($P < 0.05$) la resistencia de las tibias y las cenizas. La concentración de $25-(OH)D_3$ en suero fue mayor en las aves tratadas con $25-(OH)D_3$. La adición de $25-(OH)D_3$ en las dietas de pollo de engorda, mejora el estado inmunológico en aves y la resistencia de las tibias y la deposición de minerales en hueso a los 21 días de edad.

Palabras clave: Vitamina D_3 , $25-(OH)D_3$, Inmunidad

INTRODUCCION

SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN DE POLLO EN MÉXICO.

La Industria Avícola Mexicana es la rama del sector pecuario de nuestro país, que presenta los mayores avances tecnológicos en genética, nutrición y equipamiento; situación que se refleja en una alta eficiencia y en costos de producción bajos, lo cual ha favorecido al crecimiento constante de la misma¹.

Entre los elementos que han apoyado el crecimiento de la producción de carne de pollo, se encuentran la diversidad de productos disponibles en el mercado, el aumento en el consumo de esta carne debida a diversos factores como son; precios accesibles, tendencia de consumo hacia carnes con bajo contenido de grasa, productos de alta calidad con puntos de venta cada vez más cerca del consumidor, la confianza en la calidad de los productos (frescura) un incremento de restaurantes de comida rápida y que es una carne que permite diferentes variedades de preparación².

Lo cual contribuye a que la industria avícola sea la principal transformadora de proteína vegetal a proteína animal, colocándose en el cuarto lugar en la producción mundial con un aporte de 2,905,489 toneladas de carne en 2013^{1,3}

Esta industria, está cada vez más especializada y sus integraciones productoras deben estar preparadas para atender los diferentes tipos de demanda del mercado, como obtener un óptimo peso al momento del sacrificio asociado a la mejor conversión alimenticia, la creciente demanda por carnes de alta calidad y de menor costo y la preocupación del consumidor por los procesos de producción, demandando que sean respetuosos con el bienestar animal^{4,5}.

Es necesario desarrollar e implementar las acciones que permitan consolidar la competitividad del sector avícola nacional, promover sus productos a los mercados internacionales y alcanzar la integración plena del mercado avícola aprovechando las ventajas de los 11 Tratados Comerciales de los que México es parte⁶.

Por ello es preciso formular dietas aplicadas a los requerimientos, que permitan aprovechar el potencial genético de las aves, incluyendo elementos como el 25-(OH)D₃, que además de ser necesario para fortalecer el sistema óseo de las aves, favorece el potencial productivo y el fortalecimiento inmune de las mismas⁸.

LAS VITAMINAS EN LA AVICULTURA

Las vitaminas son un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas que son nutrimentos esenciales, de muy alta actividad biológica y que son requeridas en pequeñas cantidades para el mantenimiento y crecimiento de las células y para el funcionamiento de los tejidos.

Se diferencian de los demás macronutrientes orgánicos, en que éstas no son catabolizadas a CO₂ y H₂O para satisfacer parte de los requerimientos energéticos y no son utilizadas para propósitos estructurales, por lo que las vitaminas son requeridas en cantidades mucho más pequeñas que los carbohidratos, proteínas y grasas. Las vitaminas, se distinguen de los minerales por su naturaleza orgánica en lugar de inorgánica.

Tienen diversas funciones las cuales incluyen participación en muchos ciclos metabólicos, función inmunológica de las células y regulación genética. Su carencia o deficiencia ocasiona graves trastornos en el organismo^{9,10}.

Las 13 vitaminas que ahora conocemos; fueron descritas en el siglo XX y se terminaron de describir, aislar y sintetizar en un lapso de 50 años. Las aves de corral (gallinas), fueron el primer objeto del estudio científico sobre las vitaminas.¹¹ Sin embargo aún en nuestros tiempos, se siguen realizando investigaciones sobre vitaminas para determinar sus implicaciones en la salud¹².

Se clasifican de acuerdo a su solubilidad en dos grupos:

El grupo de vitaminas liposolubles, el cual se caracteriza por ser soluble en solventes orgánicos, como el benceno, cloroformo, etc., este grupo comprende a las vitaminas: A, D, E y K.

Grupo de las vitaminas hidrosolubles donde se encuentran las vitaminas: Tiamina (B1), Riboflavina (B2), Piridoxina (B6), Cianocobalabina (B12) Niacina, Colina, Biotina, Acido pantoténico y Acido fólico¹³.

Las vitaminas, funcionan como catalizadores orgánicos y se pueden encontrar presentes en pequeñas cantidades en la mayoría de los ingredientes naturales. Son esenciales para las funciones metabólicas y fisiológicas tales como; el crecimiento, desarrollo, salud y reproducción, lo que refleja un excelente rendimiento productivo. Por esta causa es importante suplementar el alimento con premezclas vitamínicas; ya que las materias primas empleadas para fabricar los alimentos balanceados no las contienen en cantidades suficientes y además las aves no las pueden sintetizar “*de novo*” a excepción de la vitamina C^{14,15}.

Al compararse con otros nutrientes, se hace evidente que se han producido muy pocos estudios llevados a cabo en los últimos años para estimar los niveles óptimos de vitaminas para los pollos de engorda, por lo que existe una enorme variación en los niveles utilizados en el comercio. La mayoría de los niveles recomendados por el NRC, se han basado en estudios antiguos, realizados bajo condiciones controladas y el uso de los niveles mínimos para evitar los signos de deficiencia, sin evaluar el mejor rendimiento en las condiciones de desafío que se encuentran en el campo¹⁶.

VITAMINA D

La estructura química de la vitamina D fue identificada por Adolf Windaus en 1936 y un año después Über F. Schenck obtiene vitamina D₃ cristalizada por la activación del 7-dehidro- colesterol¹⁷.

Es la única prohormona (esteroidea) que se encuentra en la sangre en dos distintas formas químicas: La vitamina D₂ (Ergocalciferol) de origen vegetal y la D₃ (Calciferol) sintetizada en la piel u obtenida en la dieta¹⁸.

La vitamina D es un término genérico, que indica una molécula que muestra una estructura conformada por anillos A, B, C y D con diferentes estructuras de la cadena lateral. La estructura del anillo se deriva del ciclopentanohidrofenantreno.

Técnicamente, la vitamina D se clasifica como un seco-esteroide debido a que los seco-esteroides son aquellos en los que uno de los anillos se ha roto y en el caso de la vitamina D, el enlace esterol en las posiciones del carbono 9, 10 del anillo B se rompe, debido a la radiación ultravioleta (285-315 nm) y se forma una doble ligadura en esta posición¹⁵.

METABOLISMO DE LA VITAMINA D

La principal fuente endógena de la vitamina D es la epidermis mediante la incidencia de los rayos UV. La vitamina D₃ se produce en la piel mediante una reacción fotolítica, que convierte el 7-dehidrocolesterol a provitamina D₃, la cual sufre una posterior conversión por isomerización térmica, cuyo producto final es la vitamina D₃. De la piel, la vitamina D₃ (colecalfiferol) se abre paso a la circulación general^{19,20}. La vitamina D₃ aportada en la dieta se incorpora con los ácidos biliares y otras vitaminas liposolubles a las micelas, absorbiéndose a nivel del duodeno y yeyuno. Una vez alcanzada la vía linfática y en las aves la vía sanguínea, en forma de quilomicrones o portamicrones, penetra en la circulación sanguínea unida a una proteína transportadora específica la alfa globulina DBP o VDBP ("Vitamin D Bindin Protein")^{21,22}. El colecalfiferol sintetizado en la piel también se une a esta DBP para ser transportado, a través de la sangre, hasta el hígado, donde sufrirá junto con la vitamina D proveniente de la dieta una transformación posterior. En el hígado el colecalfiferol, se hidroxila en el carbono 25, mediante la enzima 25 hidroxivitamina D₃-hidroxilasa (25-OH-asa) la cual se sitúa en los microsomas hepáticos, donde al hidroxilar al colecalfiferol da lugar al calcidiol también conocido como (25-hidroxivitamina D₃) o (25 -OHD₃). El calcidiol pasa a la sangre unido a la BDP y es transportado al riñón, donde se hidroxila a nivel del primer carbono, por un mecanismo dependiente del metabolismo fosfocálcico. La hidroxilación en este primer carbono es el paso limitante en la producción de la forma biológicamente activa. La enzima 25 hidroxivitamina D₃-1 α - hidroxilasa (1 α -HOasa), es la encargada de catalizar esta reacción y está situada en las mitocondrias de las células tubulares renales; es activada por la paratohormona (PTH). Aunque la PTH es la molécula que principalmente controla la función de la (1 α -HOasa), las concentraciones séricas de fosfato, de calcio ionizado y de la propia 25-(OH)D₃ también regulan su actividad. Cuando las concentraciones de calcio son adecuadas, se produce la hidroxilación

en el carbono 24 mediante la enzima 25 hidroxivitamina D₃-24R-Hidroxilasa (24-OHasa, para dar un metabolito inactivo)^{21,23,24}.

Aunque el riñón es el principal órgano en donde se encuentran estas hidroxilasas, otros tejidos y células tales como los macrófagos activados, queratinocitos, intestino, son capaces de llevar a cabo la síntesis del calcitriol²⁵.

La vitamina D₃ (colecalfiferol), es la única utilizable en aves. Se almacena en hígado principalmente, pero también se encuentra presente en pulmones, riñones y otros órganos. Promueve el crecimiento, formación de los huesos y el cascarón. Aunque las aves pueden sintetizar la vitamina D₃ a partir del 7- dehidrocolesterol que se encuentra en la piel, esta cantidad no es suficiente para cubrir el requerimiento diario para el crecimiento y la producción en aves domésticas por lo que es necesario añadirla a las dietas. La potencia biológica del 25-(OH)D₃ puede superar de una a casi cuatro veces en eficiencia la vitamina D₃¹⁴.

RELACIÓN DE LA VITAMINA D CON EL CALCIO Y FOSFORO

La vitamina D₃ es una hormona esteroidea liposoluble, que es capaz de modular la homeostasis del calcio de manera directa o a través de sus efectos en la diferenciación y el desarrollo de los diversos sistemas celulares de regulación del calcio²⁶.

La homeostasis del calcio se logra por el equilibrio de la absorción eficiente del calcio intestinal, la excreción renal del calcio y del metabolismo mineral del hueso para llenar las necesidades de este elemento en las aves. Las hormonas principales que controlan este balance son la hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, 25-(OH)D₃ y estrógenos^{14,27}.

La vitamina D se convierte en su forma activa en el túbulo contorneado distal y el segmento conector, donde la vitamina D₃ aumenta el contenido celular de la proteína de unión al Ca²⁺, calbidilina 28k, y por lo tanto contribuye a aumentar la reabsorción de Ca²⁺. La vitamina D₃ también aumenta la expresión del cotransportador de la corteza renal tipo II (NaPi-2) en el túbulo proximal y por lo tanto la reabsorción de fosfato²⁷. En condiciones de bajo consumo de calcio, se produce más

25-(OH)D₃ por el riñón. El esqueleto también responde a la restricción de calcio, aumentando la reabsorción de este mineral y el riñón aumenta la reabsorción tubular del calcio.

La vitamina D₃ aumenta la absorción del calcio, al incrementar la permeabilidad del intestino a las sales cálcicas. La calcemia provoca una disminución de la actividad paratiroidea, desencadenando la excreción de fosfatos por el riñón¹⁴.

El efecto clásico de la 25-(OH)D₃, en el transporte activo de calcio se produce en la célula intestinal. El calcio, entra en la célula mediante proteínas de membrana. En la célula intestinal, la 25-(OH)D₃ se une al receptor de la vitamina D₃ y la proteína de unión del calcio es sintetizada, esto regula el transporte activo a través de la célula. El calcio es transportado al fluido extracelular por un mecanismo dependiente de ATP. También hay transporte pasivo por difusión paracelular de calcio. La vitamina D₃ depende del gradiente de calcio. El 25-(OH)D₃ tiene su efecto en sus objetivos clásicos; los órganos del hueso, el intestino y el riñón, estimula el transporte de calcio a partir de estos órganos a la sangre. La producción de 25-(OH)D₃, es estimulado por la hormona paratiroidea (PTH). Hay una retroalimentación negativa a través de calcio, que disminuye la PTH. Esto tiene una retroalimentación negativa del 25-(OH)D₃ a la PTH. El metabolito activo 25-(OH)D₃, también muestra las acciones rápidas a través de su receptor de membrana²⁸.

VITAMINA D3 Y SU RELACIÓN CON LA INMUNIDAD

A través del tiempo se han escrito muchos artículos sobre las vitaminas, en ellos podemos encontrar un reducido número de trabajos que hablan sobre el efecto que tienen las vitaminas sobre la respuesta inmune, a continuación se describirán los principales efectos que tiene la vitamina D₃ sobre el sistema inmune, las situaciones que aceleran el metabolismo del animal, así como los estados de enfermedad, alta densidad de población, climas extremos, presencia de toxinas en el alimento, producen un estado de estrés en el animal y por lo tanto aumenta la necesidad de vitaminas que coadyuvan a los mecanismos de respuesta. Teniendo como objetivo optimizar el estado de salud, el bienestar y la productividad de los animales, asegurando al mismo tiempo la eficiencia en la producción de alimentos de calidad. Se ha

comenzado ha reconocer, que dependiendo del estado fisiológico del animal, puede haber cuatro requerimientos o necesidades de vitaminas en la dieta para obtener la óptima nutrición relacionados con el grado de respuesta animal ¹⁰.

1. Deficiencia: Los niveles vitamínicos están por debajo del nivel requerido. El animal se encuentra en riesgo de desarrollar síntomas clínicos de la deficiencia como resultado.

2. Sub-óptimo: Los suplementos vitamínicos están en cantidades apropiadas para prevenir deficiencias, si las condiciones ambientales y fisiológicas son favorables (desafío bajo). Sin embargo, cuando los animales sometidos a cualquier tipo de estrés, el nivel aportado de la vitamina no es suficiente para evitar la disminución del crecimiento o del comportamiento reproductivo.

3. Óptimo: Contribuye a la máxima expresión del potencial productivo, de las razas modernas en condiciones de campo.

4. Aplicaciones especiales: Además de su contribución al rendimiento máximo de los animales, estos niveles de suplementación de vitamina mejorar ciertos atributos como la calidad del producto final (carne y huevos) e inmunidad. La vitamina D₃ es un eficiente inmunomodulador y ejerce un efecto positivo en el metabolismo, estado de salud, fertilidad, control de la secreción hormonal e inducción de la diferenciación celular^{16,29}.

Al contrario que otras vitaminas, como la vitamina B6 o la vitamina E, la vitamina D₃ puede jugar numerosos y críticos papeles en el organismo, por su trabajo tipo hormonal activa un regulador epigenético del VDR (receptor de la Vitamina D), el cual está conectado al menos a 900 códigos genéticos diferentes.

El calcidiol actúa por 2 mecanismos:

En la membrana (no geonómica), mediante canales iónicos y en el núcleo (vía genómica), lo cual ocurre cuando la vitamina se une a su receptor intracelular (VDR) en las células diana, donde se dan la mayoría de los efectos biológicos conocidos³⁰.

VDR

El VDR es un factor de transcripción ligando-dependiente, que pertenece a la superfamilia de receptores de esteroides. Es miembro de una súper familia de receptores nucleares, la cual también incluye el receptor para hormonas tiroideas, glucocorticoides, estrógenos, andrógenos, ácido retinóico y receptores activadores de la producción de peroxisomas (PPAR). El gen del VDR se encuentra en el cromosoma 12q, contiene 12 exones con aproximadamente 76 Kb de DNA. Tiene un dominio ligando unido (LBD), que se encuentra en la parte carboxiterminal de la molécula del VDR y es responsable de unirse a la vitamina D₃. En el caso de los eventos genómicos, en la vitamina D₃ en unión con el receptor VDR, forman un complejo activado y entran al núcleo, se unen con el receptor retinoide X (RXR) en forma de heterodímero para unirse a una secuencia específica del DNA llamada elemento de respuesta de la vitamina D₃ (VDRE). El cual es un factor de transcripción, que funciona como activador o represor de genes que estimulan o suprimen la síntesis del RNA y la traducción de proteínas que median la acción hormonal³¹.

La observación de que el VDR está presente en otros tejidos de los huesos, los riñones, intestino, glándulas paratiroides, epidermis, músculo, páncreas y órganos reproductores sugiere un papel de ligandos VDR más allá del metabolismo calcio y fosforo^{32,33,34}.

El VDR se expresa en casi todas las células del sistema inmune; monocitos, linfocitos T y B activados, células presentadoras de antígeno (APC) así como los macrófagos y células dendríticas^{32,35}.

Entre las acciones que tiene la expresión del VDR en estas células están la proliferación y diferenciación de linfocitos (CD4+ y CD8+), inducción de la producción de péptidos antimicrobianos como la catelicidina, la cual estimula la activación de los macrófagos y células dendríticas³⁶.

Tanto el sistema inmune innato como el adaptativo son afectados por el 25-(OH)D₃ y el VDR. Las células inmunes involucradas no sólo expresan el VDR, sino también la 1-alfa hidroxilasa. El receptor y la enzima) pueden ser constitutivos o resultar inducidos por ligandos que

activan las respuestas inmunes celulares, iniciando una cadena que contribuye a regular el proceso inmunológico. Por lo tanto, el 25-(OH)D₃ puede resultar un protector contra varias enfermedades autoinmunes^{37.38}.

Diversos estudios, han demostrado la presencia de 1- α -hidroxilasa en los macrófagos, lo que significa que estas células inmunes no sólo son sensibles a la 25-(OH)D₃, también son capaces de producir la hormona de manera autónoma³⁹.

Además de 1- α -hidroxilasa, monocitos, macrófagos y células dendríticas expresan también la 24 hidroxilasa. Esta co- expresión interviene en la regulación autocrina y paracrina de la función de células dendríticas, estas células son capaces de sintetizar el 25-(OH)D₃ influyendo en la regulación de los linfocitos T⁴⁰.

Los macrófagos también son capaces de sintetizar y secretar el 25-(OH)D₃, el cual es idéntico al que se encuentra en la forma renal, pero su expresión está regulada de una manera completamente diferente. La expresión 1- α -hidroxilasa en los macrófagos es regulada por las señales inmunes como el interferón (IFN)- γ y el lipopolisacárido (LPS)¹⁸.

Pero no tienen la facultad de regular esta función, por lo que en situaciones donde existe una sobre activación de los mismos como es el caso de la sarcoidosis y tuberculosis se observa hipercalcemia³⁹. La presencia de VDR y la expresión regulada de 1- α -hidroxilasa y 24-hidroxilasa en el sistema inmunológico, indica un papel paracrino posible del 25-(OH)D₃ en la función inmune normal. Se ha reportado una asociación entre la deficiencia de vitamina D e importantes defectos inmunes en modelos animales experimentales y en seres humanos. El 25-(OH)D₃ también es capaz de servir contra las infecciones por la inducción de respuestas a los antimicrobianos; el uso de 25-(OH)D₃ puede ser un método muy atractivo para hacer frente al problema de las infecciones resistentes a los medicamentos³⁹.

SISTEMA INMUNE DE LAS AVES

Las funciones básicas de cualquier sistema inmunológico son la diferencia entre el reconocimiento de lo propio y lo no propio. Las aves, al igual que otros animales, tienen mecanismos específicos e inespecíficos, para responder a potenciales amenazas infecciosas de

bacterias, virus, parásitos y otros materiales antigénicos. Los mecanismos generales de la inmunidad son idénticos en los pollos, mamíferos, y la mayoría de otros vertebrados⁴¹.

El sistema inmune es una disposición de múltiples facetas de membranas (piel, mucosa epitelial), células y moléculas cuya función es la de eliminar de un anfitrión los patógenos invasores. Un sistema inmune funcional, es un requisito de una vida saludable en la producción animal moderna ⁴², sus componentes orquestan respuestas complejas y rápidas frente a la invasión por microorganismos patógenos⁴³.

El sistema inmune del polluelo recién nacido, está preparado para combatir los patógenos de una manera no específica a través de los dos brazos de la respuesta inmune, los cuales se componen de la respuesta inmune innata y la inmunidad adquirida. Estos dos tipos de respuesta son generalmente coordinados; los desafíos patógenos son inicialmente procesados por el sistema inmune innato y si es necesario, la respuesta inmune adquirida se activa posteriormente^{41,44}.

SISTEMA INMUNE INNATO

El mecanismo de defensa inicial es el sistema inmune innato, que está presente y funcional al nacimiento, aunque su desarrollo persiste durante la primera semana de vida, el primer aspecto de la inmunidad innata es la exclusión de los patógenos por las barreras de entrada: la piel y de las mucosas, carece de especificidad, lo cual le permite proteger contra muchos tipos de patógenos. Tiene la capacidad de generar una respuesta rápidamente inducida, al reconocer motivos moleculares conservados asociados a patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) a través de los receptores de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptors, PRRs).⁴⁵ Esta es una facultad filogenéticamente conservada, de todos los organismos multicelulares⁴².

Cualquier organismo extraño o antígeno, que cruza la continuidad de las barreras naturales, se encuentra con los leucocitos, macrófagos, células dendríticas, heterófilos, monocitos, células asesinas naturales (NK), linfocitos T, proteínas efectoras circulantes como complemento y citocinas^{41,43}.

Es esencial en los primeros días, o semanas después de la exposición a los patógenos y gradualmente la respuesta inmune adquirida toma un papel más importante en la defensa del huésped⁴¹.

Los microorganismos que logran atravesar estas barreras, inducen un daño en los tejidos activando la quimiotaxis de macrófagos y células dendríticas ubicados en la proximidad para eliminar inmediatamente al patógeno⁴⁶.

Al ser superadas estas barreras, se induce una respuesta inflamatoria caracterizada por la secreción de proteínas de la fase aguda inespecíficas al antígeno y que no generan memoria. Si el proceso inflamatorio inicial no logra eliminar al patógeno, se activa el sistema inmune adaptativo. El evento inicial de la inmunidad adaptativa, es la presentación antigénica, que comienza con una célula dendrítica que internaliza al patógeno, que posteriormente procesa y presenta a los linfocitos T en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)^{48,49}.

El reconocimiento del antígeno por los linfocitos T induce la expresión de moléculas de adhesión, la secreción de citoquinas, tales como IL-12, y la proliferación de subclones de linfocitos T. Las citoquinas liberadas pueden direccionar la respuesta hacia un fenotipo inmune celular, mediante la secreción de Interferón- γ (IFN- γ), o uno humoral, a través de la producción de interleucinas 4, 5 y 10 (IL-4, IL-5 e IL-10)^{49,50}.

INMUNIDAD ADQUIRIDA

Como su propio nombre indica, debe ser desarrollada por el ave. Para responder a un patógeno, al cual el ave no ha sido expuesta, el sistema inmune de ave debe activar primero los mecanismos responsables para hacer frente a ese invasor en particular. La inmunidad adquirida es específica y heterogénea y tiene memoria. Por lo tanto, un patógeno específico será reconocido por el sistema inmune de una manera particular; diferentes patógenos provocan respuestas diferentes, y la reexposición al patógeno a menudo resultará en una más rápida, la respuesta eficaz que se obtuvo en la primera exposición. La inmunidad adquirida implica 2 tipos de respuestas: La respuesta inmune celular y respuesta inmune humoral. En la inmunidad celular, las células infectadas con un patógeno extraño se destruyen mediante la

interacción entre la célula infectada y una célula efectora tal como una célula T activada. La inmunidad humoral, está mediada por los anticuerpos producidos por células B en respuesta a un reto antigénico. Los 2 tipos de linfocitos en estas respuestas son fenotípicamente diferentes; las células T expresan el complejo T receptor en su superficie, mientras que las células B expresan inmunoglobulina en su superficie. La regulación y la eficacia de la inmunidad adaptativa aviar es comparable a la de los mamíferos^{41,44}.

INMUNIDAD CELULAR

Está dirigida por las células del sistema inmune, llamadas linfocitos T (células T). Los linfocitos T citotóxicos (LTC), que reconocen las células infectadas por virus y/o bacterias, se encargan de la lisis de estas y de liberar linfoxinas las cuales causan apoptosis. Linfocitos T colaboradores (células TH) dirigen la respuesta inmune, secretan las linfoquinas que estimulan la secreción de las células LTC y B a crecer y dividirse; atraer heterófilos, y potenciar la inmersión y la destrucción de los microbios por los macrófagos. Las células T supresoras inhiben la actividad y la producción de células T citotóxicas, después de la eliminación con éxito del patógeno, evitando así cualquier daño a los propios tejidos del huésped. Los LTC son los más eficaces contra patógenos intracelulares como virus. El virus utiliza los mecanismos de la célula huésped para replicarse, por lo que la muerte de las células infectadas detiene la replicación viral. El LTC expresa la proteína de superficie celular CD8 en su superficie. La CD8 se utiliza como un correceptor por LTC para identificar las células diana a través de la presentación de antígenos de MHC de clase I dependientes, los LTC al identificar una célula infectada inducen la apoptosis de esta. La células TH. inmunidad adaptativa es depende de la regulación por parte de las Las células TH expresan en la superficie celular proteínas CD4 que están implicadas en la defensa contra patógenos extracelulares. La proteína CD4 actúa como un correceptor para permitir que las células TH sean capaces de reconocer un antígeno presentado por moléculas MHC de clase II^{41,49}.

INMUNIDAD HUMORAL

El segundo tipo de respuesta adaptativa es la inmunidad humoral, esta respuesta es mediada por anticuerpos transportados por la sangre. Los

linfocitos B son las células efectoras de la respuesta humoral. Cuando una célula B vírgen se encuentra con su antígeno específico en la sangre, una inmunoglobulina de superficie actúa como un receptor para permitir que la célula B y antígeno se unan⁴⁹.

La célula TH2 libera citocinas, que preparan a la célula B para selección clonal y reproducción mitótica asexual. La mayoría de los clones se convierten en células plasmáticas, que después de un retraso inicial son capaces de producir un inmenso número de moléculas llamadas anticuerpos. Los anticuerpos (inmunoglobulinas o Ig) inactivan antígenos por varios métodos: Opsonización, neutralización, aglutinación y precipitación⁴¹.

RELACIÓN ENTRE LA NUTRICIÓN Y EL SISTEMA INMUNE

Desde el punto de vista inmunológico, la cantidad de información sobre la nutrición de las aves, es enorme en comparación con el campo de la inmunología aviar, que esta esencialmente en su infancia, numerosos nutrientes esenciales han sido identificados, las concentraciones mínimas y máximas de estos nutrientes para obtener la máxima producción han sido definidas; así como, su disponibilidad para el ave se conocen, sin embargo cuando esta información se aplica a las interacciones de la nutrición (dieta) y el estado inmunitario, el resultado es menos definitivo. Para estar seguros, se ha demostrado que casi todos los nutrientes en la dieta juegan un papel fundamental en el mantenimiento de una respuesta inmune óptima. La interacción que implica la nutrición y la inmunidad así como, las interacciones con agentes infecciosos son un factor estratégico en materia de salud animal. Casi todos los nutrientes en la dieta, juegan un papel fundamental en el mantenimiento de una respuesta inmune óptima, de manera que la ingesta de cualquier nutriente ya sea deficiente o excesiva puede tener consecuencias negativas en el estado inmune y la susceptibilidad a una variedad de patógenos. Los componentes de la dieta pueden regular las funciones fisiológicas del cuerpo; interactuando con la respuesta inmune⁴². Uno de los principales objetivos en el área de producción avícola, es el de proporcionar y mantener las condiciones óptimas de bienestar en los animales para lograr los mejores índices productivos y las mayores rentabilidades. A pesar de todos los esfuerzos realizados por los productores para llevar a cabo este objetivo, situaciones como; el estrés calórico, altas densidades de población,

hipoxia (animales criados a grandes altitudes), contacto con agentes infecciosos o no infecciosos (micotoxinas), prácticas de manejo y empleo de materias primas de menor calidad en las raciones, pueden estar presentes de forma única o combinada en los actuales sistemas de producción. Bajo este escenario, los pollos de engorda criados en condiciones intensivas tienden a sufrir niveles variables de estrés. En un nivel moderado de estrés crónico, el ave sería capaz de adaptarse e incluso podría manifestar un crecimiento aparentemente normal. No obstante, ante situaciones simultáneas de múltiples agentes estresantes el ave no llegaría a adaptarse y reaccionaría de forma adversa, dando como resultado, bajas en la producción y enfermedades. En aves, los cambios metabólicos originados como respuesta al estrés pueden afectar distintos niveles, presentando menor crecimiento y menos absorción de nutrientes reduciendo el estatus de inmunocompetencia del ave y resultar en inmunodepresión. Los problemas de inmunodepresión en las instalaciones avícolas debidos a la presencia de estrés, pueden verse agravados si se considera, que las mejoras genéticas para lograr un rápido crecimiento en las estirpes actuales de pollos de engorde han resultado en un decremento en su estatus de inmunocompetencia. Algunos estudios, han encontrado que la selección para lograr un mayor crecimiento en los pollos de engorda han resultado en una correlación negativa con la respuesta inmune humoral. Las nuevas tendencias en la nutrición moderna, promueven que el alimento destinado a aves comerciales, no solo tiene que proveerle un adecuado nivel de nutrientes de alta disponibilidad, además de esta importante característica, aspectos de seguridad y ausencia de patógenos toman un papel cada vez más importante. Para cumplir con estos objetivos, se deben realizar cambios en la alimentación animal; el empleo de cierto tipo de inmunoestimulantes, debido a sus capacidades de ejercer efectos favorables en la salud del animal, resulta interesante en el área de nutrición de las aves⁵⁰.

IMNUNOMODULADORES

La modulación del sistema inmune del animal, podría adquirir una gran relevancia ante la situación actual donde la producción avícola enfrenta una serie de restricciones graduales en cuanto al uso de medicamentos utilizados para proteger a los animales mantenidos en ambientes con gran presencia de desafíos microbianos. En la industria de la alimentación animal, se han identificado una gran cantidad de moléculas

entre ellas las vitaminas, capaces de ser usadas como sustancia estimulantes utilizados justamente para fortalecer del sistema inmune de los animales. Una de los principales dudas acerca del empleo de inmunoestimulantes en alimentación animal, es la dificultad para predecir hasta dónde puede llegar a ser estimulado el sistema inmune de un animal para mantenerlo activo y capaz de defenderlo ante desafíos medioambientales, sin que este le represente una reducción en su crecimiento o eficiencia alimenticia (inmunomodulación).

Recientemente Cheema *et al*⁵¹, compararon el estatus de inmunocompetencia de pollos de engorde representativos de 1957 contra aves de 2001, los resultados de estos estudios sugirieron que las estirpes actuales de pollos de engorda (2001) presentan una disminución en la capacidad de respuesta inmune de tipo adaptativa, menores pesos relativos de los principales órganos linfoides y mayor susceptibilidad de sufrir inflamación respecto a las aves de 1957. Los problemas relacionados con procesos de inmunodepresión en las parvadas comerciales de pollos pueden incluir; mayor susceptibilidad a enfermedades, deficiente respuesta a programas de vacunación u otros antígenos (pobres niveles de anticuerpos séricos), reacciones post-vacunales severas, complicación con agentes oportunistas, manifestaciones atípicas de algunas enfermedades, interacción entre varios agentes etiológicos, incremento en la conversión alimenticia, mayores mortalidades, pobre crecimiento y desuniformidad en las parvadas. Ante esta situación, se ha sugerido una de las oportunidades para mejorar la eficiencia en la utilización de nutrientes en aves puede encontrarse en el desarrollo y mantenimiento de la salud y la inmunidad de las aves⁵¹.

JUSTIFICACION

Sistemas de producción intensiva y altas densidades de población, que se manejan en las explotaciones avícolas son factores que contribuyen a aumentar el estrés, favoreciendo la presentación de enfermedades, el uso de inmunoestimulantes es una herramienta eficaz para fortalecer el sistema inmune de las aves y de este modo mejorar la producción de estas.

HIPOTESIS

El 25-(OH)D₃ adicionado a la dieta de pollo de engorda en etapa de iniciación promoverá efectos positivos en los parámetros productivos así como una mejor respuesta inmune en comparación con los pollos en cuya dieta no se agrega este metabolito.

OBJETIVOS

Evaluar los parámetros productivos de los pollos de engorda a los 21 días de edad, al adicionar en la dieta 4 diferentes niveles de vitamina D₃ y/o 25-(OH)D₃.

Medir el efecto de la respuesta inmune de los pollos de engorda a los 21 días de edad, al adicionar en su dieta 4 diferentes niveles de vitamina D₃ y/o 25-(OH)D₃ mediante:

Evaluación de la inmunidad celular, al medir el patrón de expresión de células CD4+ y CD8+ en sangre.

Evaluación de la inmunidad humoral mediante la determinación de anticuerpos en suero, por la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación y por la técnica de Elisa para identificar cantidades de IgA en lavados duodenales.

Evaluar la resistencia de las tibias de los pollos de engorda a los 21 días de edad al adicionar en su la dieta 4 diferentes niveles de vitamina D₃ y/o 25-(OH)D₃ mediante:

Deposición de minerales en tibia mediante la determinación de cenizas en base seca.

Cuantificación de calcidiol en suero por medio de la técnica de Radio Inmuno Ensayo (RIA).

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM; localizado en Manuel M. López s/n en el poblado de Santiago Zapotitlán. Tláhuac. D.F a una altura de 2250 m.s.n.m entre los paralelos de 19° 15´ latitud Oeste. Bajo condiciones de clima templado húmedo Cw, siendo el mes más frío enero y el más caluroso mayo. Con una temperatura promedio anual de 16° C y una precipitación pluvial anual media de 747mm. (INEGI.1992)⁵²

Se realizó un experimento con pollitos de la estirpe Ross 308, conforme a un diseño completamente al azar, con duración de 21 días. En el Cuadro 1 se detalla la dieta basal sorgo+pasta de soya, la variación fue en la premezcla únicamente de vitamina D₃ o 25-(OH)D₃. Se emplearon 4 tratamientos, los cuales se describen a continuación.

- 1) Dieta con 200,000 UI/Ton, de vitamina D₃ (NRC 1994).
- 2) Dieta con 200,000 UI/Ton, de vitamina D₃ (NRC 1994).
+ 69 mg 25-(OH)D₃ * /Ton.
- 3) Dieta con 5,000,000 UI/Ton, de vitamina D₃ (Ross).
- 4) Dieta con 5,000,000 UI/Ton, de vitamina D₃ (Ross). + 69 mg 25-(OH)D₃/Ton

*Equivalente a 2,760,000 UI de vitamina D₃. Marca comercial Hy-D® de DSM Nutrition Products de México.

*NRC 1994⁵³

Todos los procedimientos que involucraron el uso de animales, fueron aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de los animales experimentales (CICUAE FMVZ-UNAM). Se utilizaron 192 pollos de engorda de 1 día de edad mixtos (machos y hembras 50% y 50 %), de la estirpe Ross 308, alojados baterías marca Petersime con regulación de temperatura automática. Los pollitos fueron distribuidos en 4 tratamientos con 6 réplicas de 8 pollos cada una (4 hembras y 4

machos) con una distribución al azar. El agua y alimento se suministraron a libre acceso. Semanalmente durante las tres semanas de estudio, se registraron los datos de peso, consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia para obtener un resumen general para la etapa productiva (21 días).

Para verificar el efecto de la adición del 25-(OH)D₃ en la respuesta inmune de los pollos, estos fueron inmunizados contra la enfermedad de Newcastle cepa “La Sota” inactivada en emulsión 0.5ml vía subcutánea (1ml a 2/3 del cuello) y vía ocular, (gota pollo) a los 10 días de edad. Las muestras sanguíneas se tomaron a los 10 días post vacunación, se congelaron a -20°C para su posterior análisis.

Se tomaron 10 muestras de sangre, en 10 machos por cada tratamiento al día 21 de edad, para determinar títulos de anticuerpos contra el virus, utilizando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI). (Técnica Anexo 1)

Se tomaron 10 muestras por tratamiento de lavados con PBS de asas duodenales para determinar IgA mediante la prueba de ELISA (Técnica Anexo 2)

Para determinar la inmunidad celular se analizaron 10 muestras por tratamiento, se realizaron pruebas de citometría de flujo y bioquímica sanguínea. (Técnica Anexo 3)

Para evaluar el comportamiento de los tratamientos en huesos, se sacrificaron a los 21 días de edad 10 pollos por tratamiento; se separaron las tibias derechas se les realizó la prueba de resistencia a la compresión con el equipo QC-SPA™ Shell Strength Packaging Analyser con adaptadores para poder sostener las tibias y se ejerza la presión necesaria para romperlas registrando las lecturas en gramos de presión sobre centímetro cuadrado.

Se determinó la deposición de minerales en hueso mediante análisis de cenizas, utilizando las tibias izquierdas, las muestras se sometieron en un horno de secado a 150°C durante 24 horas, las cenizas obtenidas se trataron en un horno mufla a 600 °C por 6 horas. El porcentaje de ceniza se dispuso de acuerdo a la AOAC**⁵⁴.

Además para establecer las cantidades de 25-(OH)D₃ que se consumieron las aves, se realizó la determinación cuantitativa del 25-(OH)D₃ en suero por el método de Radio Inmuno Ensayo (RIA) de acuerdo a la técnica de DAsource ImmunoAssays S.A (Técnica Anexo 4)

**AOAC. Official Methods of Analysis, 13th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 1990⁵⁴.

ANALISIS ESTADISTICO

Para los resultados obtenidos, se realizaron los análisis conforme a un diseño completamente al azar.

El análisis de los resultados productivos, se realizó conforme a un diseño experimental arreglado en parcelas divididas, con un arreglo factorial completamente al azar (Semanas x tratamiento); cuyo modelo se representa a continuación.

$$Y_{ijk} = \mu_{...} + \rho_{..k} + \alpha_i + \xi_{(\alpha)} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \xi_{(\beta)}$$

Donde:

Y_{ijk} = Valor en el k bloque en la parcela i y la subparcela j .

$\mu_{...}$ = Valor constante similar a la media de la población.

α_i = efecto del i -ésimo nivel del factor "A".

$\xi_{(\alpha)}$ = Error experimental de parcelas grandes.

β_j = Efecto del j - ésimo nivel del factor "B"

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción del i - ésimo nivel del factor A con el bloque j -ésimo nivel del factor B.

$\xi_{(\beta)}$ = Error experimental de sub parcelas.

Los resultados del experimento para las variables inmunológicas, hematológicas y óseas se analizaron con un diseño experimental completamente al azar de 4 tratamientos y 6 repeticiones con el programa SAS Institute, 20. Mediante la prueba estadística One Way ANOVA. Las diferencias entre tratamientos fueron analizadas por la prueba de Tukey's ($P \leq 0.05$).

Y el modelo estadístico se representa mediante la siguiente ecuación.

$$Y_{ij} = \mu_i + T_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = la j-ésima observación del i-ésimo grupo de tratamientos, la variable respuesta.

μ = es la media de la i-ésima población en tratamiento.

T_j = efecto del grupo.

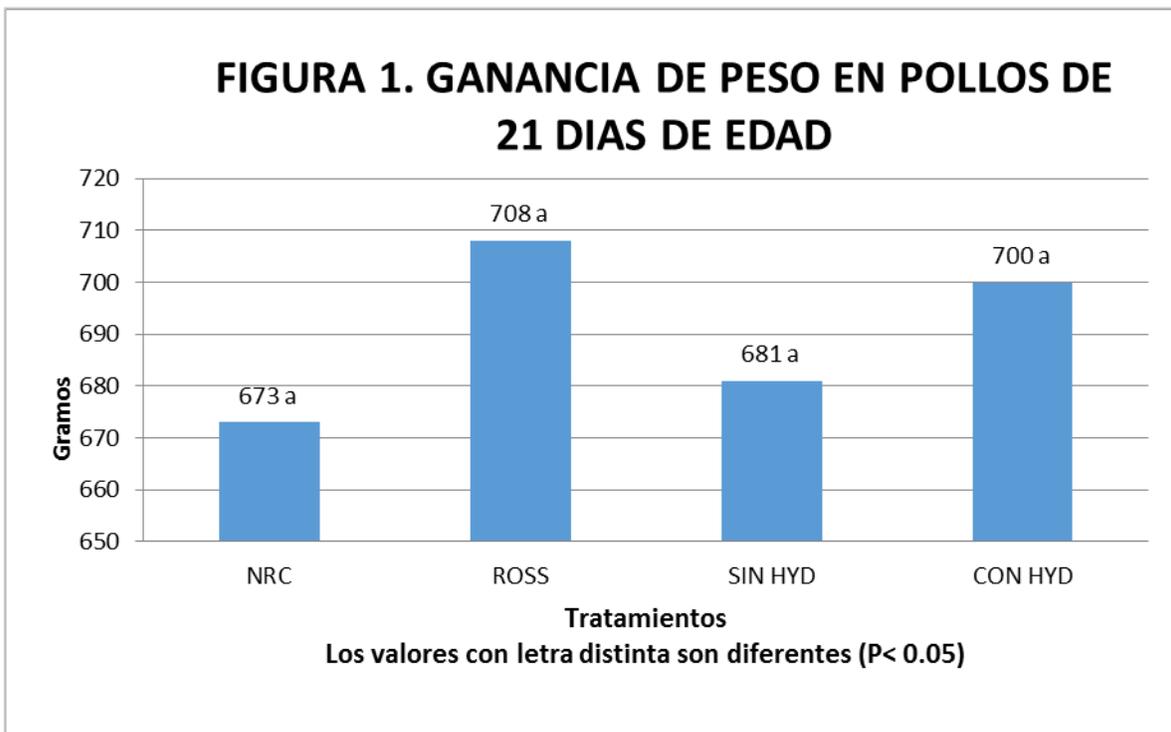
ϵ_{ij} = es el error experimental

*Kuehl RO. Diseño de Experimentos, Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigación. 2ª ed. México. 2000⁵⁴.

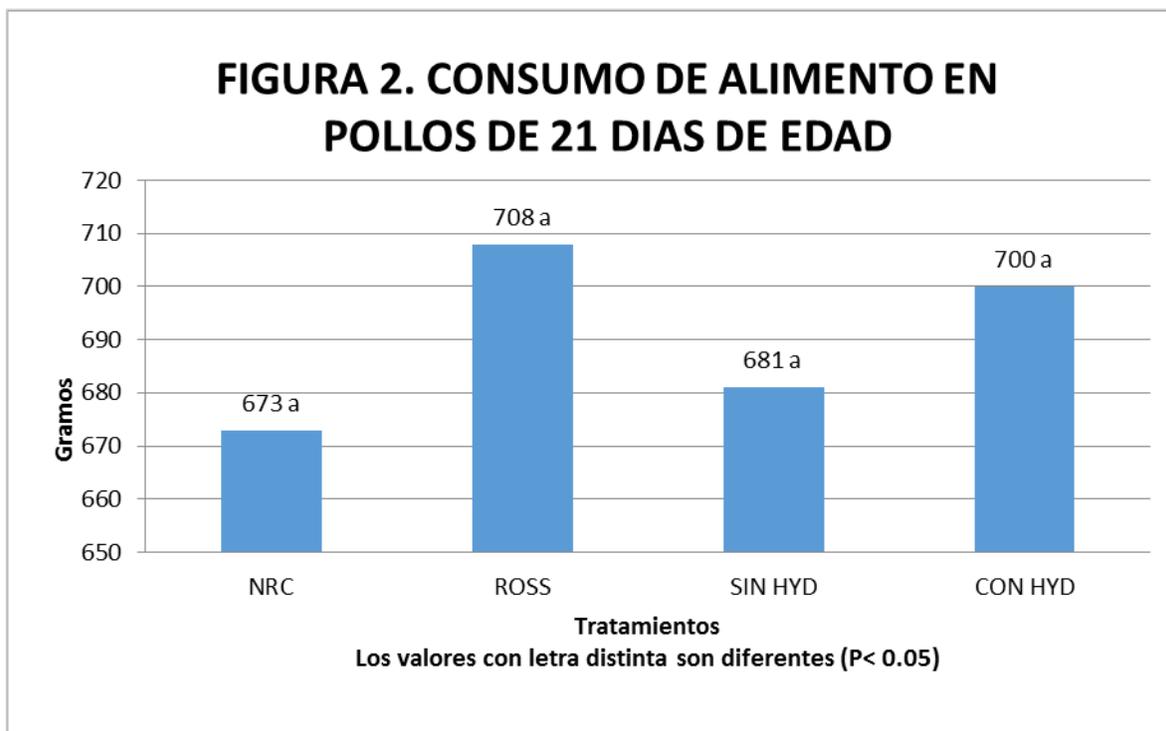
RESULTADOS

Los datos promedio obtenidos para ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia aparecen en el Cuadro 2.

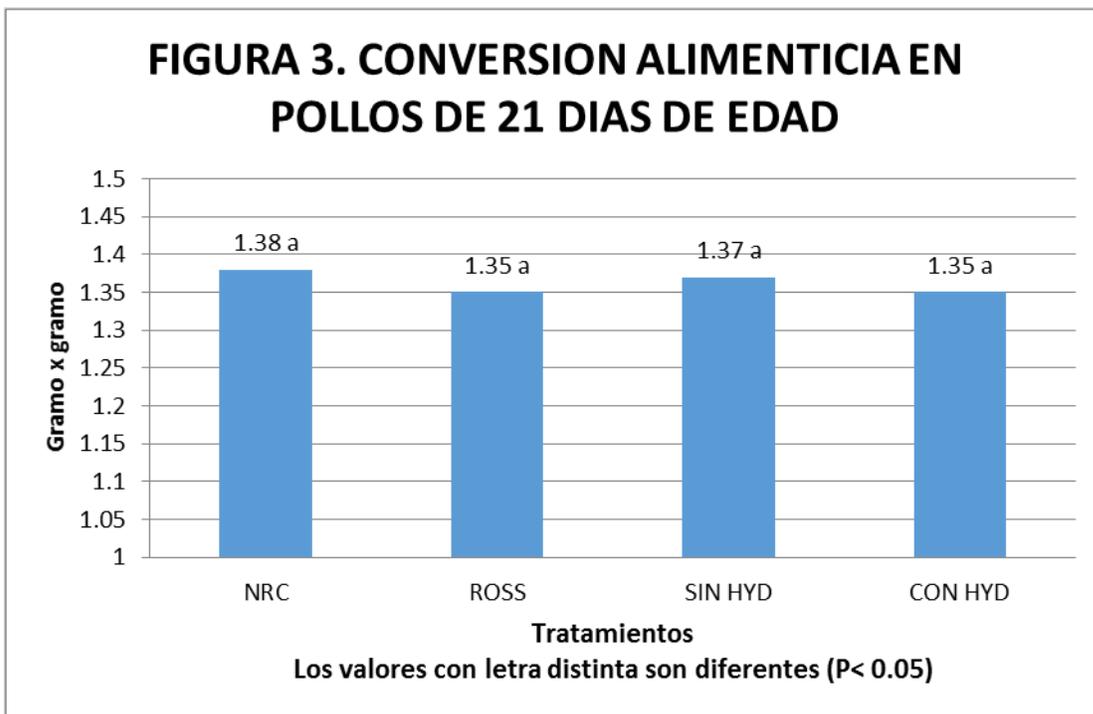
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable ganancia de peso, se pueden apreciar claramente en la Figura 1. No se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D_3 , ni a 25-(OH)D_3 . Sin embargo, se ven valores numéricos mayores cuando las aves recibieron niveles de vitamina D_3 que señala el manual Ross (25 veces más que el requerimiento del NRC) ó 25-(OH)D_3 .



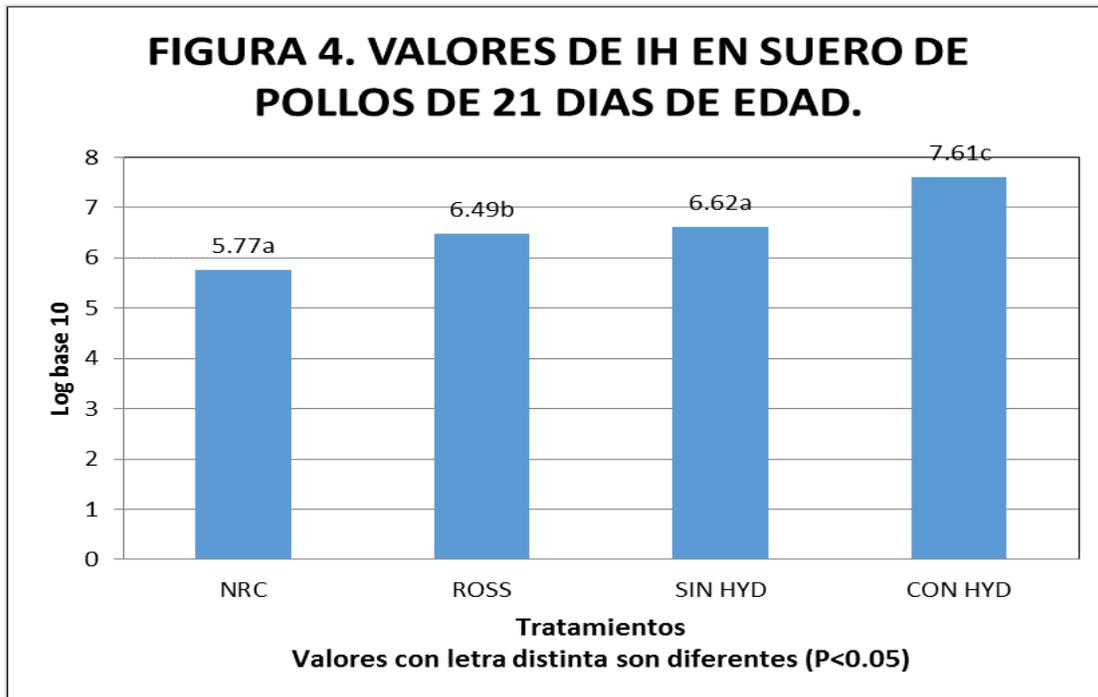
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable consumo de alimento, se pueden apreciar en la Figura 2. No se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D₃, ni al factor 25-(OH)D₃.



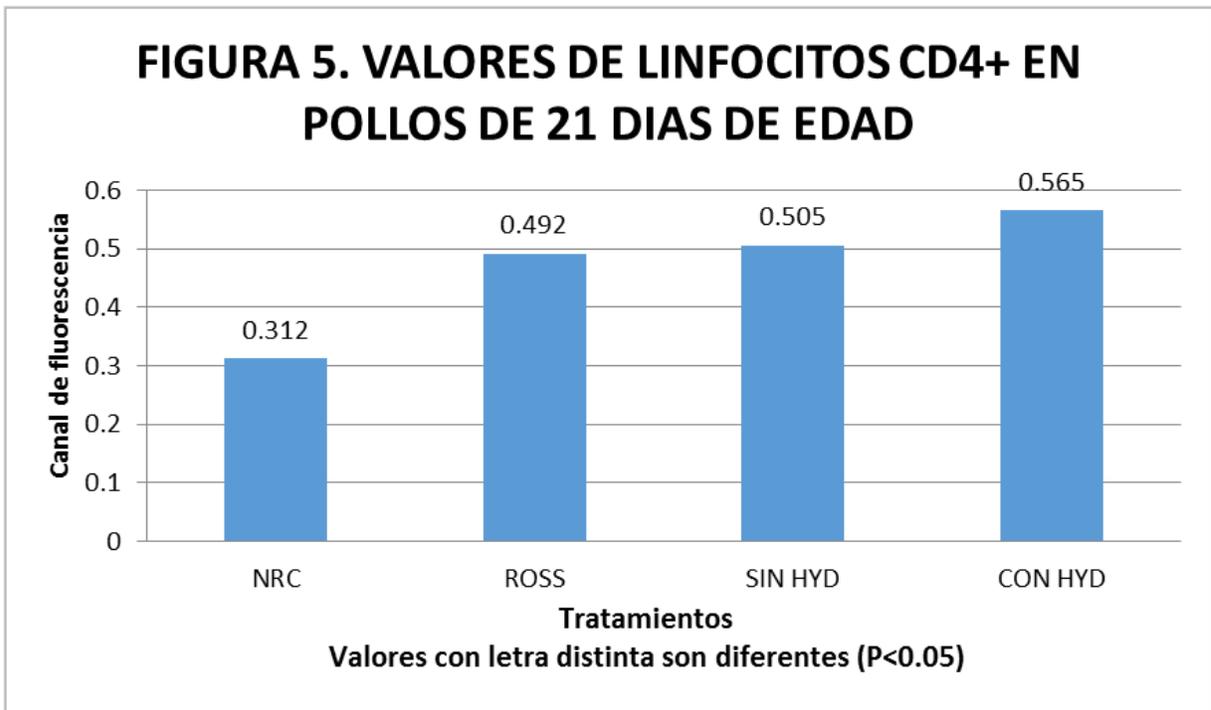
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable conversión alimenticia, se pueden apreciar en la Figura 3. No se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D_3 ni al factor 25-(OH)D_3 .



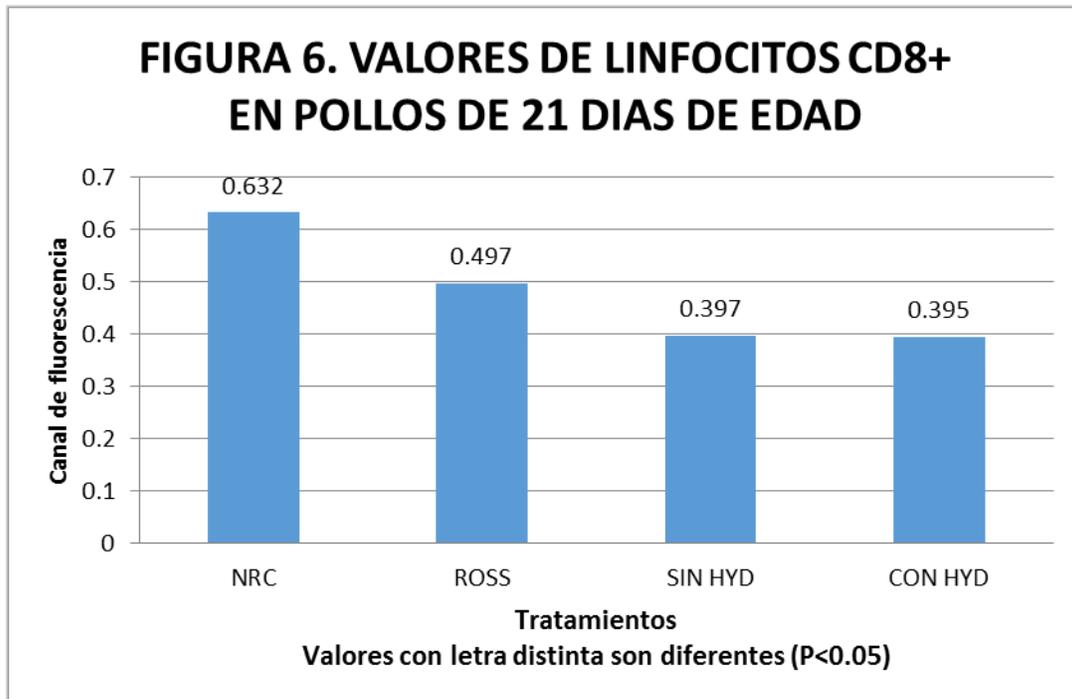
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable de inhibición de la hemoaglutinación (IH), se pueden apreciar en la Figura 4. Se puede apreciar que existe un efecto positivo ($P < 0.05$) al verse aumentados los niveles de vitamina D_3 y $25\text{-(OH)}D_3$ pudiéndose observar un mayor efecto al $25\text{-(OH)}D_3$.



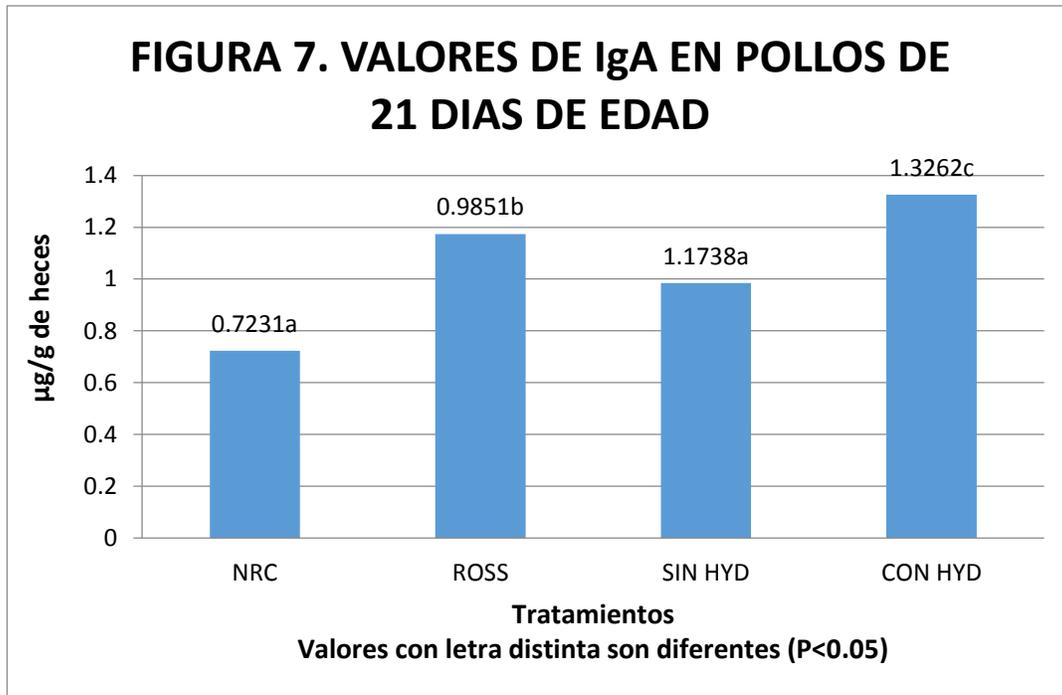
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable CD4+, se pueden apreciar en la Figura 5. Se puede apreciar que existe un efecto positivo ($P < 0.05$) al tener mayores concentraciones de 25-(OH)D₃ en la dieta.



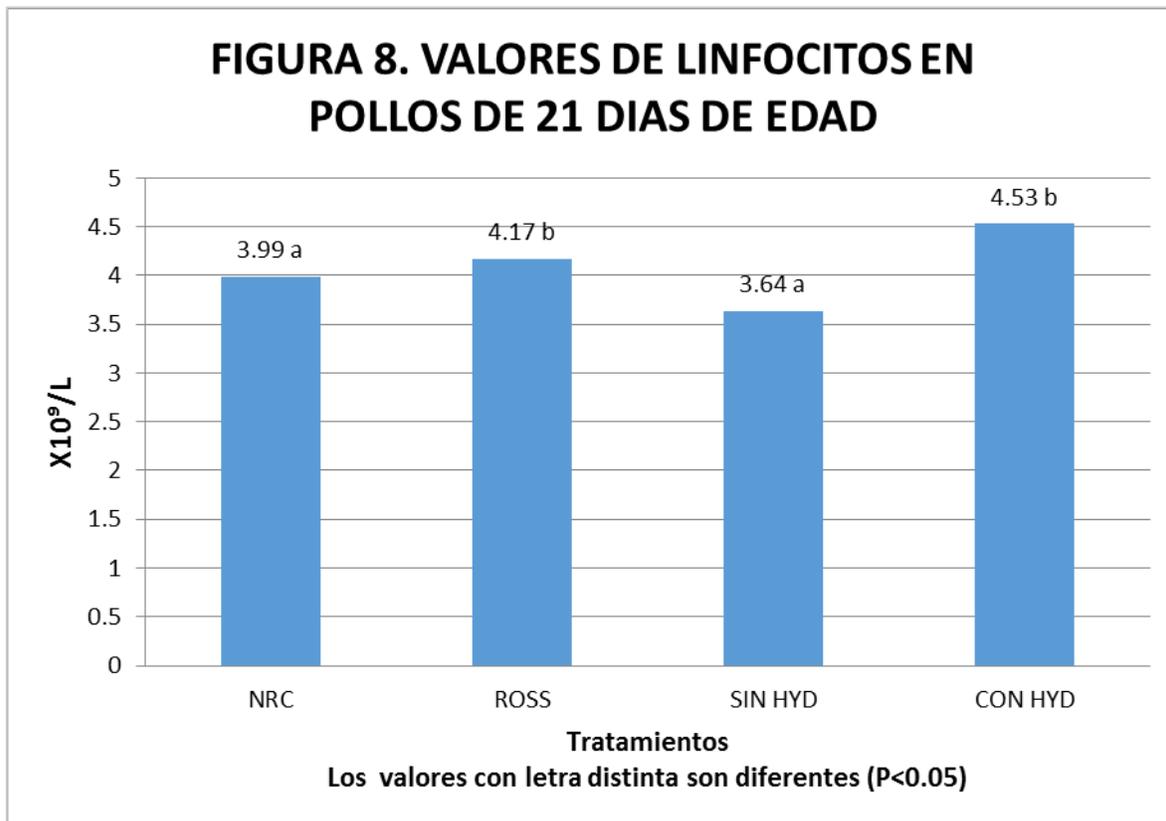
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable CD8+, se pueden apreciar en la Figura 6. Se puede apreciar que existe un efecto negativo ($P < 0.05$) para los niveles de CD8+ en sangre al tener mayores concentraciones de vitamina D₃ y 25-(OH)D₃ en la dieta.



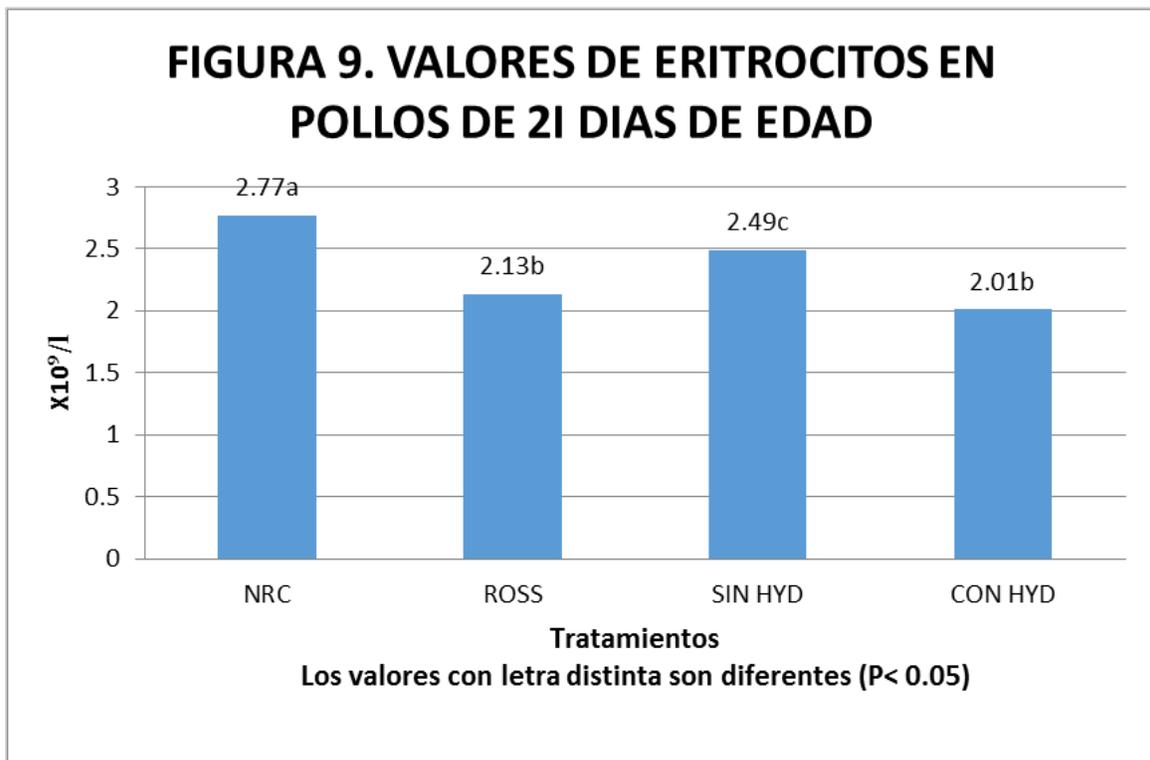
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable IgA, se pueden apreciar en la Figura 7. Existe un efecto positivo ($P < 0.05$) al verse aumentados los niveles de IgA al tener mayores concentraciones de vitamina D_3 y $25\text{-(OH)}D_3$ en la dieta.



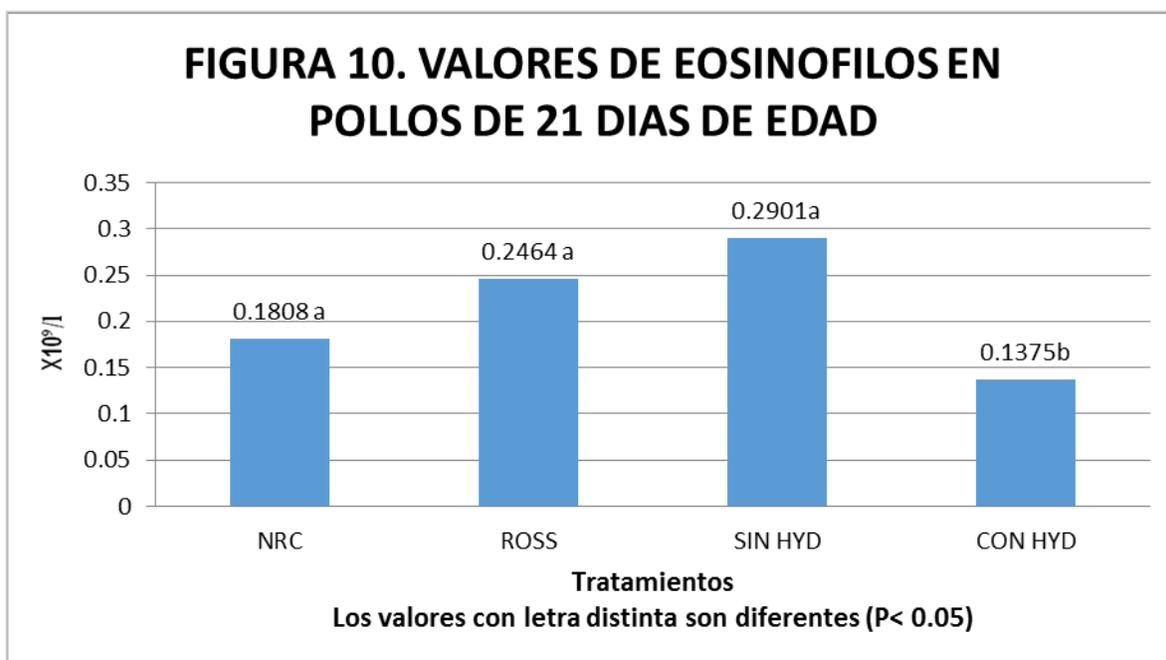
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable linfocitos, se pueden apreciar en la Figura 8. No se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D_3 ; sin embargo existió efecto a 25-(OH) D_3 , se puede apreciar la suplementación de 25-(OH) D_3 en la dieta con el nivel más alto de vitamina D_3 aumentó significativamente la cantidad de linfocitos en sangre.



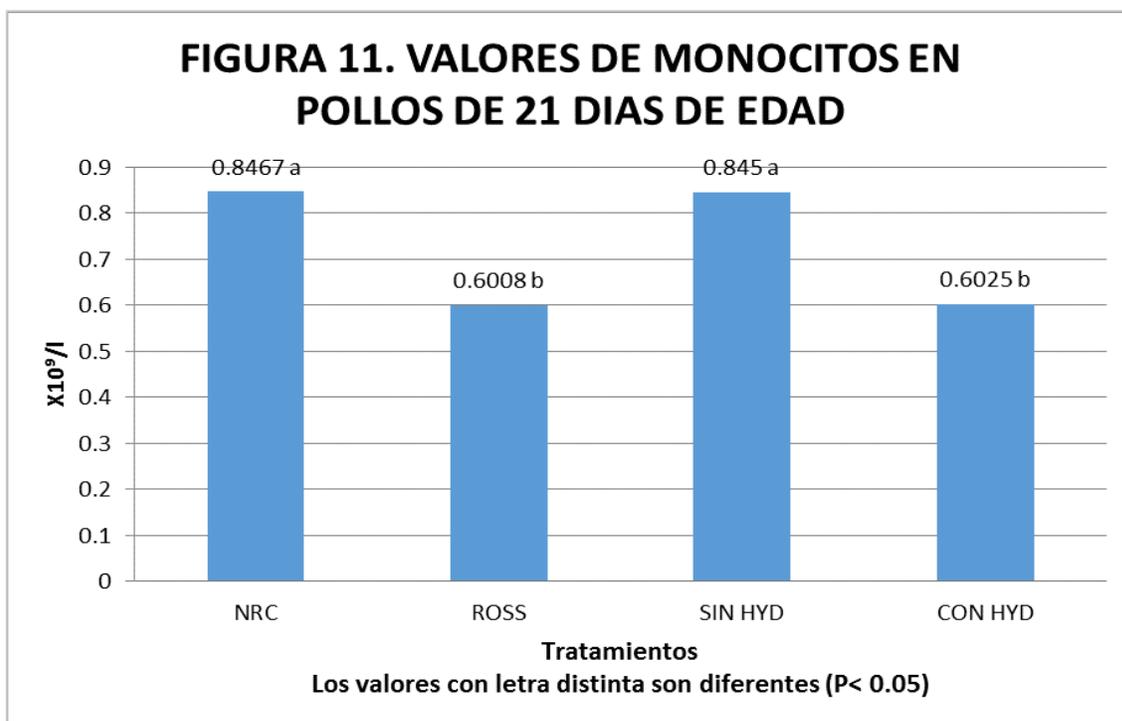
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable eritrocitos, se pueden apreciar en la Figura 9. Se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D_3 y al 25-(OH)D_3 , sobre la cantidad de eritrocitos en sangre, se puede apreciar que con la suplementación de Vitamina D_3 en la dieta con el nivel más alto de inclusión disminuyó significativamente la cantidad de eritrocitos en sangre.



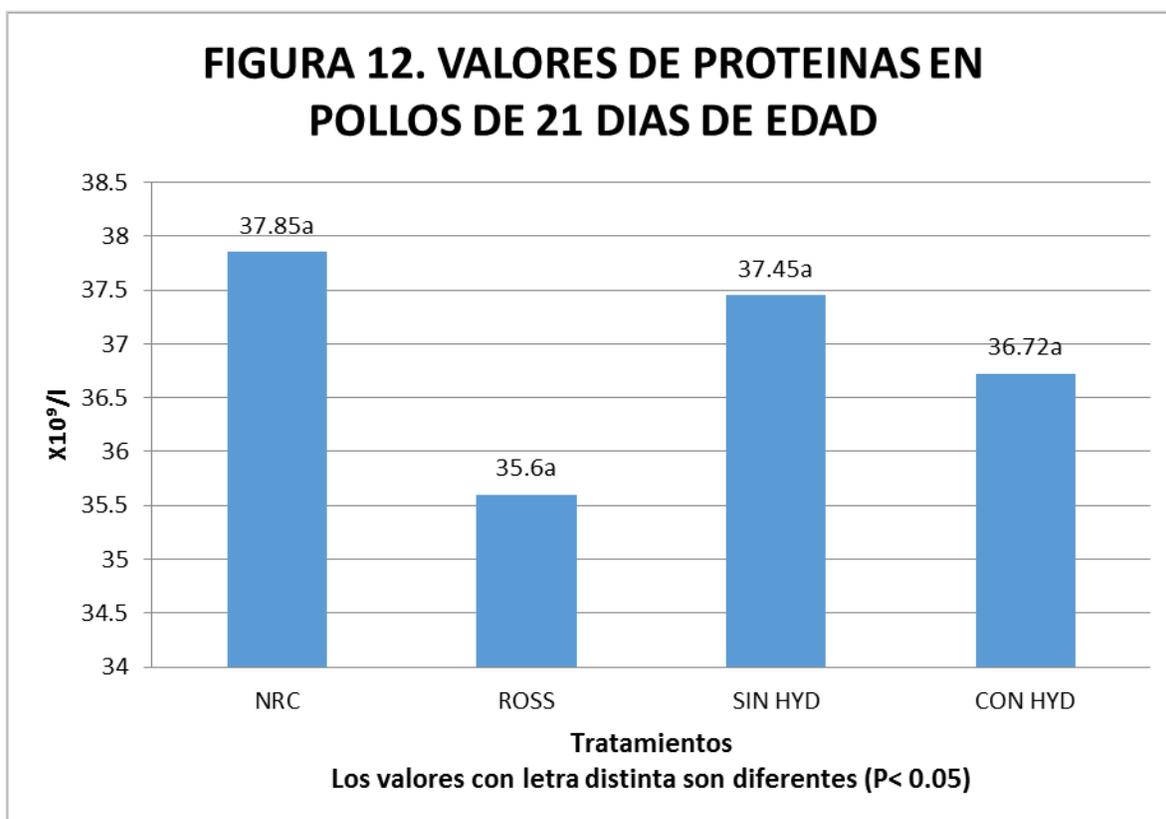
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable eosinófilos, se pueden apreciar en la Figura 10. No se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D₃; sin embargo existió efecto a 25-(OH)D₃, se puede apreciar la suplementación de 25-(OH)D₃ en la dieta con el nivel más alto de vitamina D₃ disminuyó significativamente la cantidad de eosinófilos en sangre.



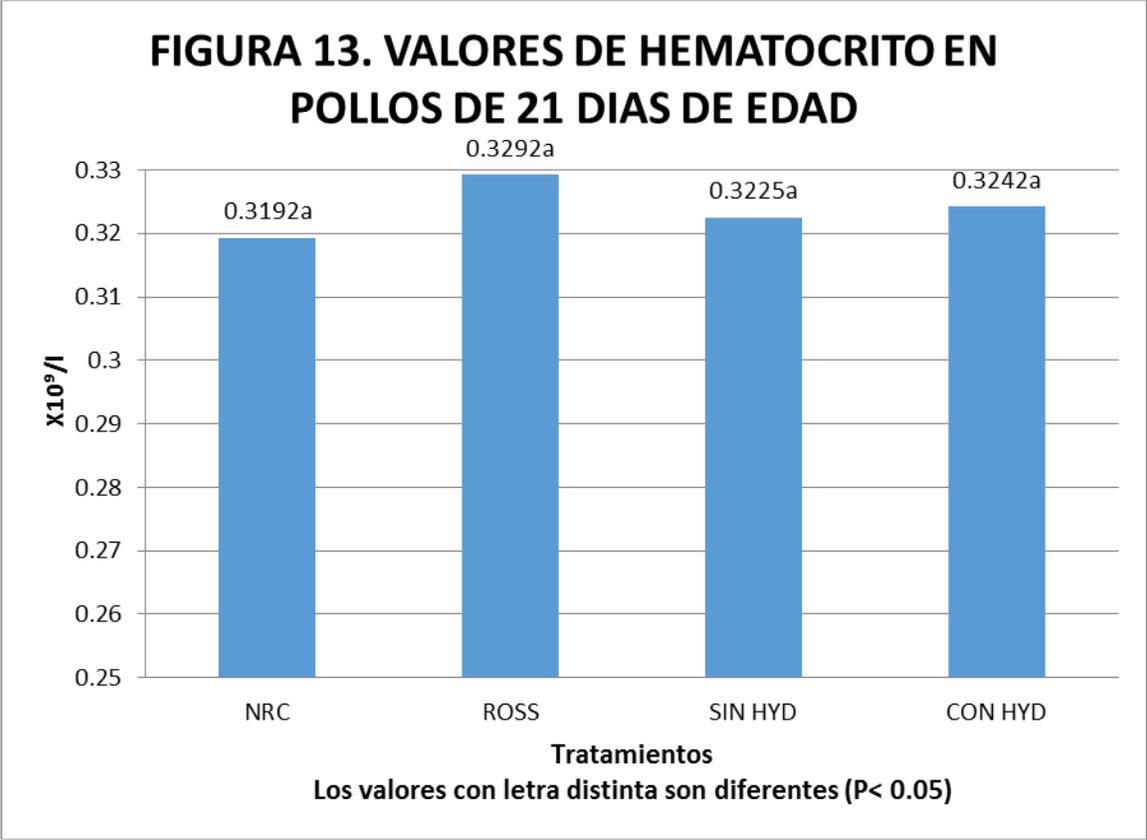
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable monocitos, se pueden apreciar en la Figura 11. Se encontró efecto ($P < 0.10$) al factor Vitamina D₃ y a 25-(OH)D₃, observándose una disminución en la cantidad de monocitos, al incluir en la dieta los niveles más altos de Vitamina D₃ y 25-(OH)D₃.



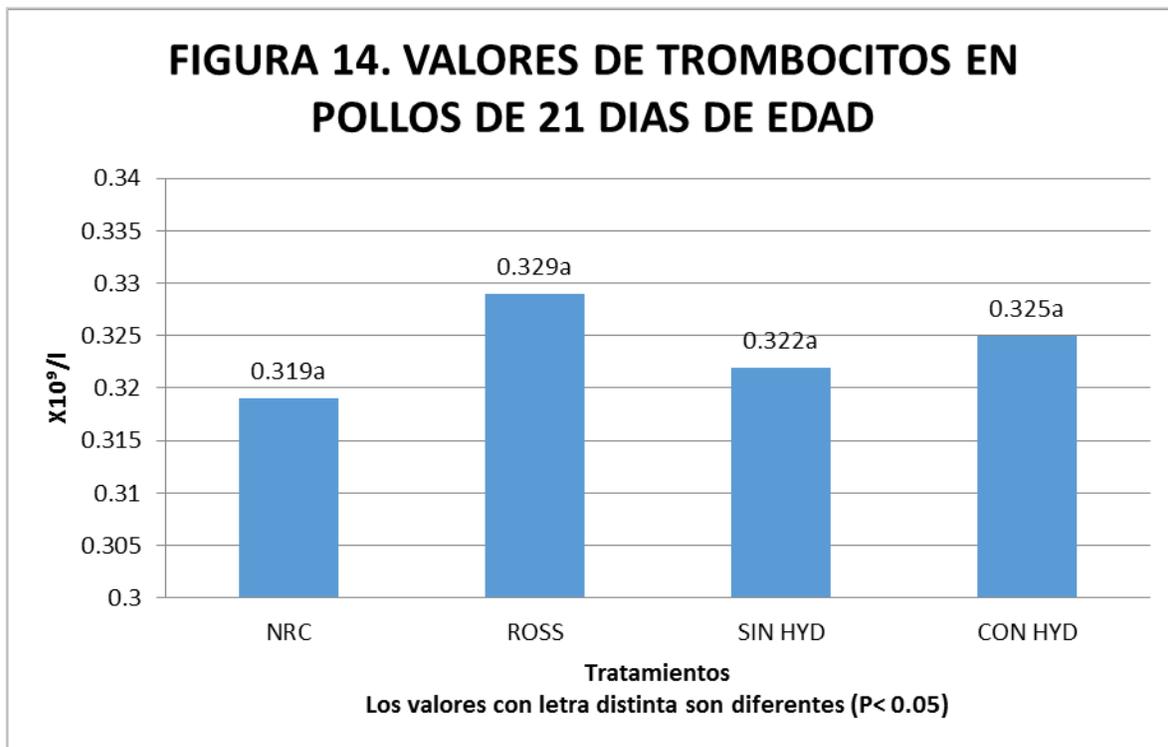
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable proteínas, se pueden apreciar en la Figura 12. No se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D₃ ni al 25-(OH)D₃, sobre la cantidad de proteínas en sangre.



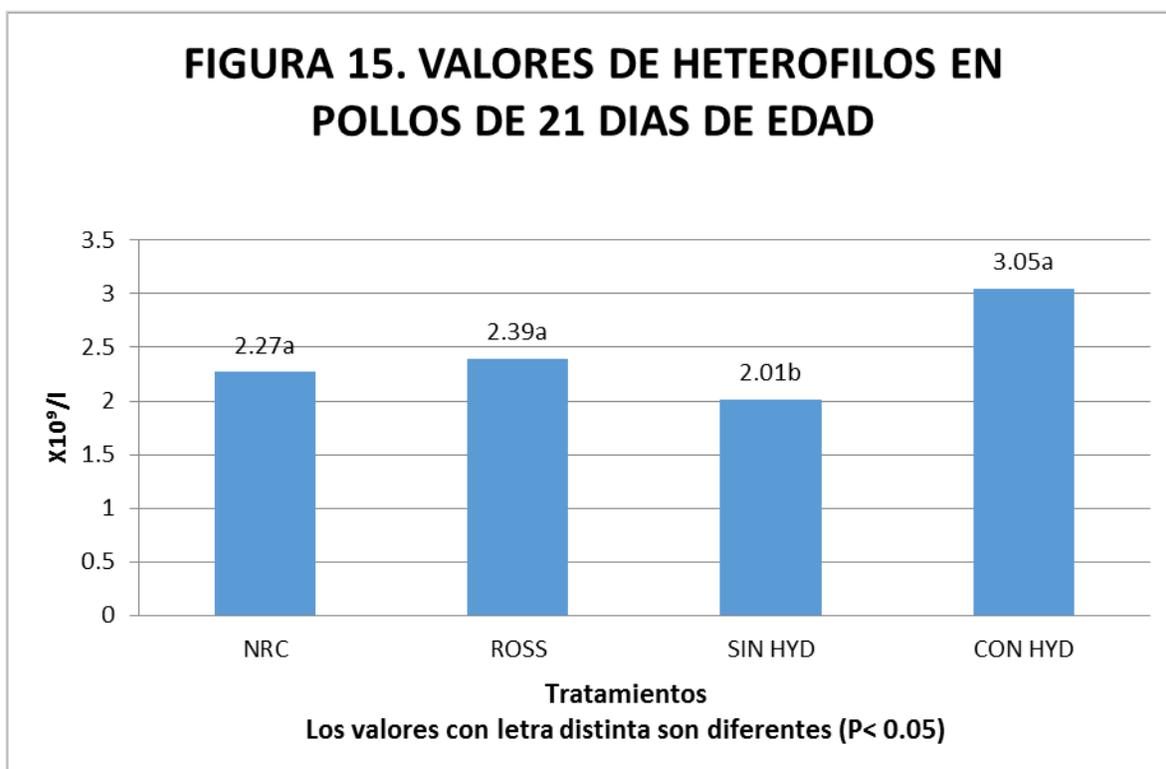
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable hematocrito, se pueden apreciar en la Figura 13. No se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D_3 ni al 25-(OH)D_3 , sobre la cantidad de hematocrito en sangre.



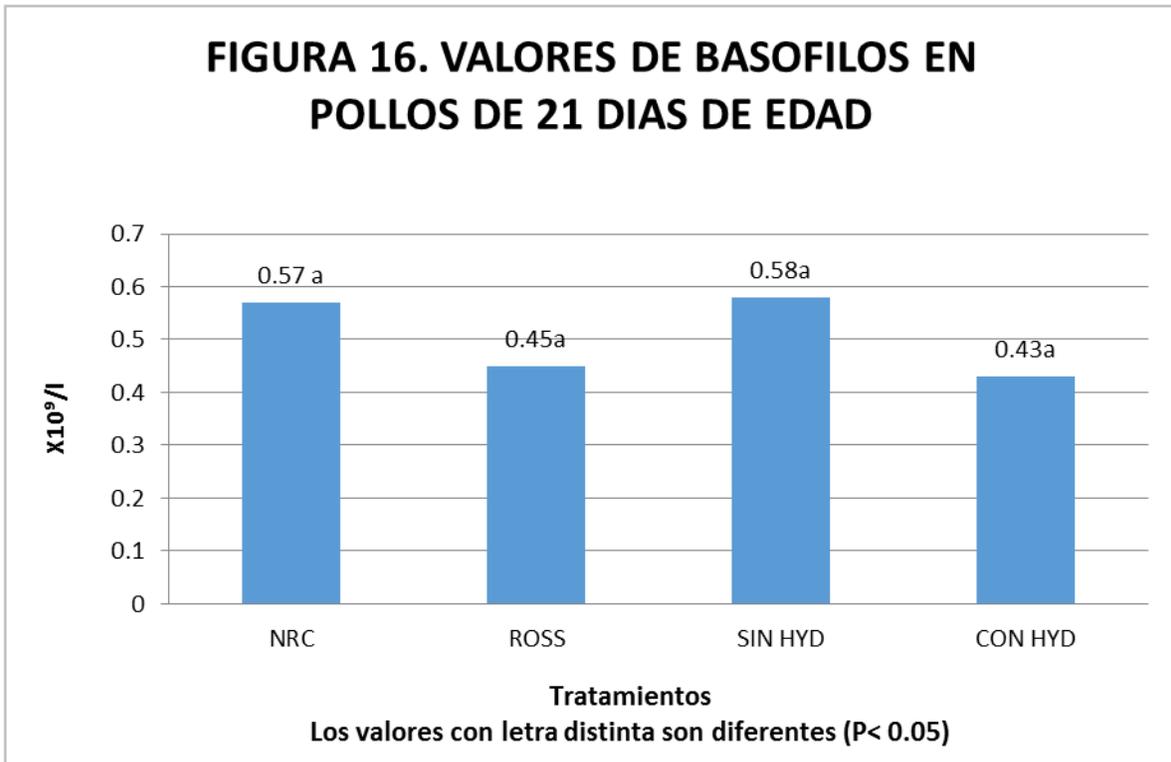
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable trombocitos, se pueden apreciar en la Figura 14. No se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D_3 ni al $25-(OH)D_3$, sobre la cantidad de trombocitos en sangre.



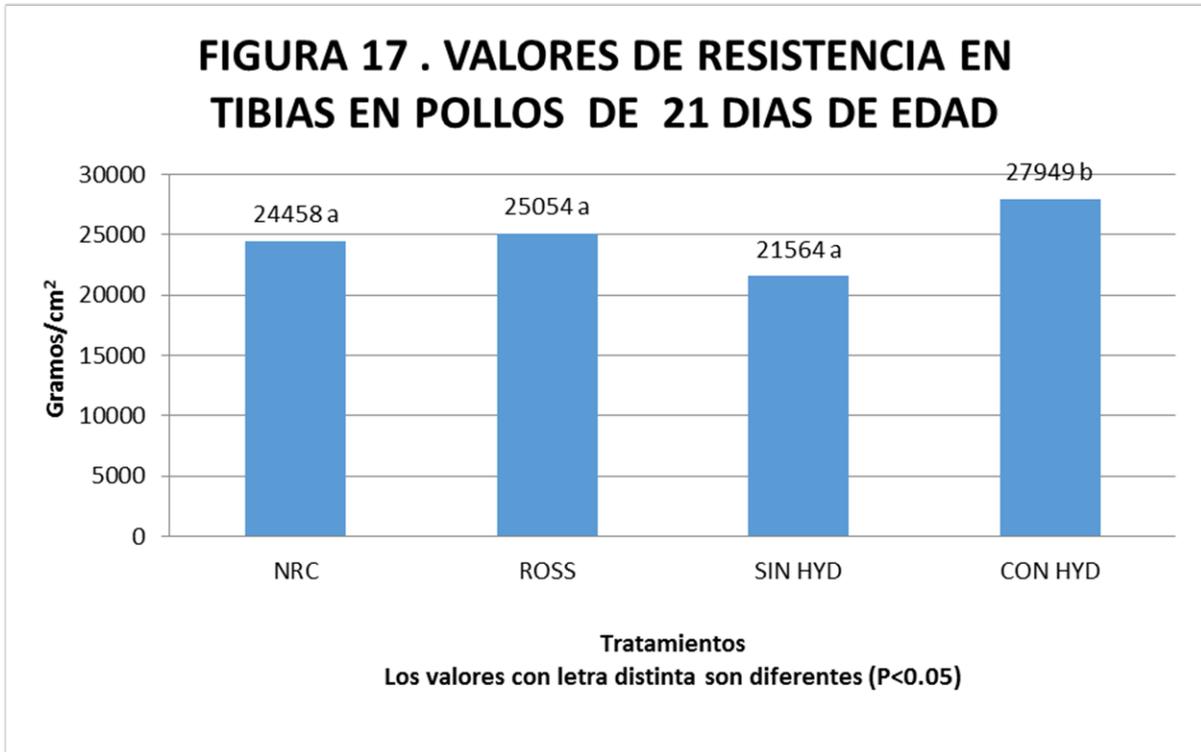
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable heterófilos, se pueden apreciar en la Figura 15. No se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D_3 ; sin embargo existió efecto a 25-(OH)D_3 , se puede apreciar la suplementación de 25-(OH)D_3 en la dieta con el nivel más alto de vitamina D_3 incrementó la cantidad de heterófilos en sangre.



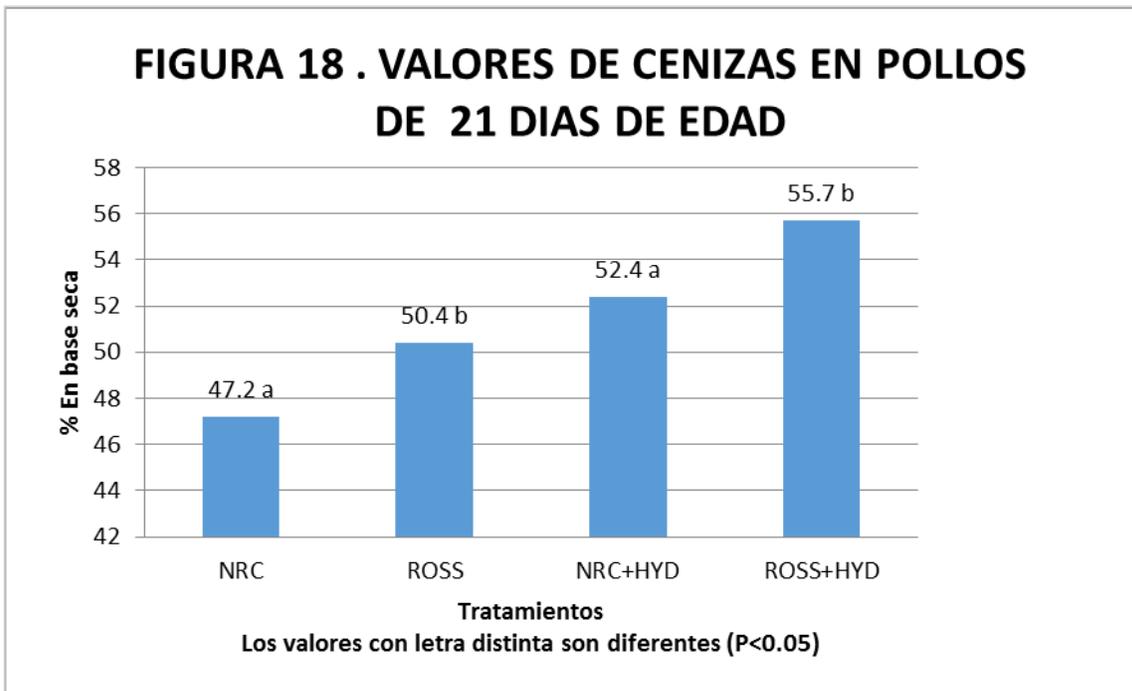
Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable basófilos, se pueden apreciar en la Figura 16. No se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D_3 ni a 25-(OH)D_3 .



Los resultados obtenidos de los efectos principales para la variable resistencia de las tibias, se pueden apreciar en la Figura 17. No se encontró ($P < 0.05$) al factor Vitamina D₃; sin embargo existió efecto a 25-(OH)D₃, se puede apreciar que con el nivel más alto de suplementación en la dieta con 25-(OH)D₃ se aumenta significativamente la resistencia de las tibias.



Los resultados obtenidos de los efectos principales para cenizas, se pueden apreciar en la Figura 18. Se encontró efecto ($P < 0.05$) al factor Vitamina D_3 y efecto al factor $25-(OH)D_3$, se puede apreciar que la suplementación de vitamina D_3 en su nivel más alto y $25-(OH)D_3$ aumentan significativamente el depósito de minerales en tibias.



DISCUSION

La vitamina D₃, se considera una pro-hormona involucrada en un complejo sistema endocrino que regula la homeostasis mineral y protege la integridad del esqueleto. Más allá de la homeostasis del calcio, la vitamina D₃ tiene diferentes funciones en diversos órganos gracias a la acción de su ligando VDR, el cual se expresa en diferentes células, incluyendo, células del sistema inmune de acuerdo a Sakem 2013⁵⁶

Se ha documentado que la vitamina D₃ tiene funciones en la proliferación celular, incluyendo diversas etapas del ciclo celular, diferenciación e incluso la apoptosis. Además, los macrófagos, monocitos y células endoteliales, tienen la capacidad de activar la vitamina D localmente de forma autocrina, en el caso de los humanos. Se han realizado diversos estudios, para especies modelo como los ratones y para los humanos, pero no existen muchos reportes para los pollos de engorde y su efecto en la inmunidad de estos, por lo que en este estudio se intenta profundizar más sobre el tema⁵⁷.

Los resultados en este trabajo por 21 días, de investigación con la adición de la vitamina D₃ y la adición del 25-(OH)D₃ no mostraron diferencias significativas en los parámetros productivos de pollo de engorda; de manera contraria a lo reportado por la literatura^{58,59}, que informa que la adición del 25-OH-D₃, mejoró tanto el aumento de peso como la eficiencia alimenticia en pollos de engorda la etapa de crecimiento. Esta diferencia se puede explicar; debida, a que los autores antes mencionados utilizaron protocolos donde los pollos fueron sometidos a estados de estrés, diferentes a los utilizados en este estudio, en donde las aves respondieron de manera diferente ya que no fueron sometidos a ningún factor estresante. Sin embargo los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los reportados por Browning *et al.* 2012⁶⁰ y Chou *et al.* 2009⁶¹.

Otros autores reportan que no hubo efecto en los parámetros productivos al adicionar vitamina D₃ o 25-(OH)D₃ en la dieta de las aves. Sin embargo tampoco mencionan un efecto negativo en los parámetros productivos^{61,62,63,64}

Se ha publicado que la adición del 25-(OH)D₃, provocó una disminución en el consumo de alimento de las aves en la fase de crecimiento (22 a 39 días de edad), lo que resultó en una mejora del 5% en el parámetro productivo de eficiencia alimenticia^{61,64}.

Del Rio 1998³⁰ al desafiar a las aves con aflatoxinas y administrar 25-(OH)D₃, reporta que, para aquellas aves que no estuvieron sometidas a las aflatoxinas, no hubo diferencias estadísticas significativas en la conversión de alimenticia; sin embargo encontró que para aquellas aves a las que se les administraron aflatoxinas pero tuvieron una dieta suplementada con 25-(OH)D₃ tuvieron una mejor conversión alimenticia. Lo cual pudiera sugerir que las aves que enfrentan estados de inmunodepresión responden de una manera más favorable al estar alimentadas con 25-(OH)D₃.

En lo concerniente a los resultados inmunológicos observados en este experimento, la variable de título de anticuerpos evaluada con el virus de la enfermedad de Newcastle, mostró diferencias estadísticas significativas en los grupos adicionados 25-(OH)D₃ y con la vitamina D₃, estos resultados concuerdan con lo reportado por Gómez *et al* 2013⁸. Este efecto pudiera deberse debido a lo reportado por Chou *et al.* 2009⁶¹ quien plantea que el efecto del 25-(OH)D₃ se realiza sobre el receptor de calcitriol, también conocido como receptor de vitamina D (VDR) y como NR11, es un miembro de la familia de receptores nucleares de los factores de transcripción. Posterior al reconocimiento con su ligando, el receptor de calcitriol forma un heterodímero con el receptor X retinoide y se une al elemento de respuesta a hormonas (HRE) en el ADN, dando lugar a la sobre expresión o la represión de determinados genes.

La evaluación de la respuesta inmune en esta investigación, demostró una diferencia estadística significativa con el aumento en los linfocitos de fenotipo CD4+, lo que pudiera sustentar los resultados obtenidos en la inmunidad humoral; ya que si esta población aumenta se pudiera especular un aumento de células CD4+ TH2, que regulan de forma positiva hacia una respuesta de tipo humoral; estos datos pudieran corresponder a los resultados citados por Chou *et al* 2009⁶¹ pero no coinciden con lo reportado por Gómora 2006⁶⁵ quien reporta que encontró un beneficio a favor de la respuesta inmune celular, pero en este caso se utilizaron gallinas de postura, por lo cual el fondo genético y la edad de esta estirpe pudiera marcar estas diferencias.

Se encontró en los resultados obtenidos que la suplementación de vitamina D₃ y de 25-(OH)D₃ en la dieta en su nivel más alto disminuye significativamente la cantidad de CD8+. Lo cual pudiera corresponder con lo citado por Gilaberte et al 2011⁶⁶ quien menciona que se ha demostrado que la 25-(OH)D₃ inhibe la proliferación de los linfocitos T, a través de su efecto inhibitorio de las células presentadoras de antígenos y las células dendríticas. La vitamina D₃ puede disminuir la secreción de interleucinas (IL) 2 y 12, interferón γ y TNF- α , todas ellas relacionadas con la vía de los linfocitos Th1 (inmunidad celular). Por otro lado, activa algunos promotores de genes relacionados con interleucinas de la vía Th2. Además, la 25-(OH)D₃ influye en la inducción de las células T reguladoras y la expresión de receptores de superficie en células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas. Esta acción inmunológica se produce mediante la unión con receptores celulares que activan factores de transcripción los cuales ponen en marcha las siguientes funciones:

- 1) inhibición de células dendríticas y células presentadoras de antígenos;
- 2) disminución de la producción de IL2, IL12, TNF- α e interferón- γ ;
- 3) activación de TGF- α que suprime acciones proinflamatorias de los linfocitos Th1;
- 4) activación de genes GATA-3 y c-maf los cuales promueven la síntesis de citocinas del sistema Th2 (IL-4, IL-5-IL-13);
- 5) incremento de IL-10, la cual a su vez inhibe los linfocitos Th1.

El resultado es un desequilibrio a favor de la vía Th2, lo que favorece la respuesta de inmunidad humoral, los procesos antiinflamatorios y la inmunosupresión.

Hasta el momento no existen reportes previos en pollos donde se evalúe el fenotipo CD4+ o CD8+ en pollos suplementados con vitamina D₃ o 25-(OH)D₃.

En las variables de hematología evaluadas en este experimento, se encontró que el factor 25-(OH)D₃ aumenta significativamente los linfocitos; lo que pudiera sustentar los hallazgos ya reportados en la inmunidad humoral; así como en la citometría de flujo y esto concuerda con lo descrito por Gilaberte 2011⁶⁶.

Los resultados encontrados para monocitos mostraron una diferencia estadística significativa, mostrando con una disminución de los monocitos al incluir en la dieta los valores más altos de vitamina D₃ y

25-(OH)D₃. Estos resultados pueden corresponder con lo reportado por Chou *et al.* 2009⁶¹ mencionan que existe una diferenciación de monocitos a macrófagos activados por la intervención de 25-(OH)D₃. Por lo cual se supone que no se encontraron las mismas cantidades de monocitos en sangre ya que estos se diferenciaron a macrófagos por acción de la vitamina D y el 25-(OH)D₃. Gómez *et al* 2013⁸ mencionan que el 25-(OH)D₃ juega una importante función en la estimulación del sistema inmune y es capaz de modular la hematopoyesis mediante su acción vía VDR.

Los resultados encontrados para la variable eritrocitos indican que con la suplementación de vitamina D₃ en la dieta con el nivel más bajo de inclusión (nivel NRC) disminuyó significativamente la cantidad de eritrocitos en sangre. Lo cual pudiera corresponder con los resultados Por lo que sugieren los médicos del Centro de los niños de Johns Hopkins quienes refieren la deficiencia de la vitamina D₃ puede desempeñar un papel importante en anemia de acuerdo a lo publicado en <http://www.news-medical.net.2011>⁶⁷.

Jackson *et al.* 2012⁶⁸, refieren una asociación en donde los pacientes con anemia pudieran tener una mayor predisposición a tener deficiencias de vitamina D₃. Perlstein *et al.* 2010⁶⁹. mencionan una relación entre la deficiencia de vitamina D₃ y la anemia pero en adultos mayores.

Zittermann 2011⁷⁰, sugieren que la vitamina D₃ puede estar relacionada con la eritropoyesis, además Sim *et al* 2010⁷¹. Mencionan una asociación de la deficiencia de vitamina D₃ con un mayor riesgo de padecer anemia. Los mecanismos por los que se supone que la vitamina D puede tener ese efecto se refieren a continuación.

La vitamina D₃ parece estar asociada con la anemia, aunque el mecanismo es desconocido; una posibilidad es que la vitamina D₃ modula el nivel de la producción de citoquinas sistémica reduciendo así el medio inflamatorio que conduce a la anemia de enfermedad crónica. Estudios tanto *in vivo* como en *in vitro* han demostrado que el calcitriol reduce la producción de citoquinas.

Otro mecanismo posible es que la vitamina D₃ estimula directamente precursores eritroides. Existen receptores de vitamina D en numerosos tejidos no renales incluyendo la médula ósea. Concentraciones locales

altas de 25-(OH)D₃ en los tejidos hematopoyéticos pueden entonces activar directamente las células precursoras eritroides de una manera paracrina. Estos datos son reportados para humanos, ya que no se encontraron reportes de anemia en pollos con deficiencias de vitamina D₃. El-Shazly 2011⁷² reportan que han demostrado una inhibición significativa de la interleucina 8 (IL-8) por las células natural killer en presencia de la vitamina D₃; siendo la IL-8 un potente activador de la quimiotaxis de eosinófilos *in vitro* e *in vivo*, en el caso de humanos. Lo que pudiera sustentar los resultados obtenidos en el presente trabajo en donde se encontró que al suplementar el 25-(OH)D₃ en la dieta en el nivel más alto, se disminuyó significativamente la cantidad de eosinófilos en sangre.

La Vitamina D₃ representa un papel importante en el mantenimiento de órganos y sistemas a través de múltiples funciones, tales como: la regulación de los niveles de calcio y fósforo en sangre, promoviendo la absorción intestinal de los mismos a partir de los alimentos y la reabsorción de calcio a nivel renal. Con esto contribuye, a la formación y mineralización ósea, siendo esencial para el desarrollo del esqueleto. Al regular el paso de calcio (Ca²⁺) a los huesos, cuando existe una deficiencia de vitamina D₃, los huesos empiezan a debilitarse y a curvarse produciéndose malformaciones irreversibles: como el raquitismo o la osteomalacia. En cuanto a la deposición de minerales en hueso se encontró que, al suplementar en la dieta vitamina D₃ y 25-(OH)D₃ en sus niveles más altos de inclusión, se aumenta significativamente el depósito de minerales en tibias^{73,74}.

La fuerza del hueso se ha asociado principalmente con la formación adecuada y el mantenimiento de la matriz ósea orgánica, la reticulación del colágeno, la orientación de las fibras de colágeno, el modelado y la remodelación ósea^{75,76}. La medición de la fuerza del hueso es necesaria para entender mejor los efectos del 25-(OH)D₃ sobre el desarrollo del hueso y la fuerza, que es importante para evaluar varios parámetros de la biomecánica del hueso y no sólo de mineralización⁷⁸.

Los resultados encontrados para la resistencia del hueso mostraron que con 25-(OH)D₃ suplementado en la dieta, se aumenta significativamente la resistencia de las tibias, en comparación con los tratamientos en los que solo se adicionó vitamina D₃ en la dieta^{75,79,80,81}.

No se encontraron reportes para la respuesta de anticuerpos séricos IgA frente a la administración de 25-(OH)D₃ para pollos; sin embargo de acuerdo a lo reportado por Stede *et al* 2004⁸² en lo que respecta a cerdos, la administración intramuscular del 25-(OH)D₃ mejora la respuesta de anticuerpos séricos IgA. Lemire 1995 *et al*⁸³. reportan que en otros estudios en vacas lecheras, se encuentra también un incremento de IgA al administrar 25-(OH)D₃.

En este estudio los resultados encontrados para la variable IgA mostraron un efecto positivo al incluir los valores más altos de vitamina D₃ y 25-(OH)D₃, encontrando que los niveles mayores de IgA se presentaron con 25-(OH)D₃.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones empleadas en este estudio, se puede concluir que al adicionar de la vitamina D₃ y el 25-(OH)D₃ en dietas para pollos de engorda de la estirpe Ross 380, tendió a mejorar numéricamente el rendimiento productivo, pero se mejoraron las variables inmunológicas; títulos de anticuerpos serológicos, la concentración de linfocitos CD4+ circulantes; así como la concentración de IgA intestinal.

De igual manera, existió un incremento en la resistencia de las tibias; así como, una mejor deposición de minerales en las mismas.

Por tanto, la inclusión de 25 veces más del requerimiento de la vitamina D₃; así como, del metabolito 25-(OH)D₃ en los niveles adicionados en este trabajo en dietas de pollo de engorda mejora el estado inmunológico en estas aves.

ANEXO 1

INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (HI) PARA NEWCASTLE.

Equipo y Material: Microplacas con fondo en “V”. Puntas para micropipeta de 200 µl o pipeta de 5ml con gota de 0.050ml. Micropipeta o microdiluidor. Soluciones y/o medios. PBS Estéril. Suero problema
Reactivos: Antígeno de ENC con 10 UHA (Unidades hemoaglutinantes). Eritrocitos de pollo al 0.5 – 0.7%. Desarrollo del método de prueba: Muestras de suero de ave. Procedimiento. Para esta prueba se emplea un antígeno de ENC con 10 UHA (Unidades hemoaglutinantes). Diluir el antígeno de ENC en PBS basado en la actividad hemoaglutinante de antígeno en relación a las UHA (10 UHA). Depositar 50 µl en cada pozo del antígeno diluido con 10 UHA en cada pozo de la placa con pozo en forma “V”. Agregar 50 µl de suero problema a la primera fila y mezclar con la micropipeta o microdiluidores 4 veces y transferir y mezclar 50 µl a la segunda y así sucesivamente hasta desechar la última dilución de la última fila. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Agregar 50 µl de eritrocitos de pollo al 0.5%. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Leer las placas inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de movimiento en forma de lágrima. Leer y registrar los resultados como hemoaglutinación o inhibición de la hemoaglutinación en cada uno de los casos.

02-28-95 NORMA Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle presentación velogénica⁸⁴.

SENACSA, IICA. Manual de técnicas de laboratorio para el diagnóstico en salud animal. Tomo I. 2001⁸⁵.

ANEXO 2

ELISA

Colocar en la placa 100 µl de solución de carbonatos en cada pozo. Incubar tapado y en refrigeración durante toda la noche. Colocar en cada pozo 200 µl de solución de bloqueo. Incubar a 37° C 30 minutos. Lavar 3 veces con 200 µl cada pozo con solución de lavado. Colocar el anticuerpo a una dilución (1:10,) 100 µl en cada pozo. Incubar a 37° C por 1 hora. Lavar 3 veces con 200 µl cada pozo con solución de lavado. Colocar el conjugado a una dilución de (1:10,000) 100 µl en cada pozo. Incubar a 37° C por 45 minutos. Lavar 3 veces con 200 µl cada pozo con solución de lavado. Colocar 100 µl de ABTS Peroxidasa. Incubar 10 minutos. Leer a 405 nm. Solución de lavado: TRIS: 6.057 g/L. Cloruro: 8.1816 g/L. Twen 20 al 0.5%: .05ml/L Solución de bloqueo al 5%: Leche deslactosada Svelty: 50 ml/L PBS: 950 ml/L. Conjugado: Conjugado 1 µl. PBS 9999 µl Las muestras de las asas duodenales se lavaron 3 veces con PBS y la solución obtenida del lavado se utilizó como anticuerpo.

ANEXO 3

CITOMETRIA DE FLUJO

Tomar 25 µl de sangre y llevarlos a 975 µl de PBS. Mezclar. Centrifugar a 1200 rpm 7 minutos a 4° C. Eliminar el sobrenadante. Agregar el anticuerpo con CD4+ 100 µl en cada muestra. Incubar 30 minutos. Centrifugar a 1200 rpm 7 minutos a 4° C. Lavar con 200 µl de PBS. Centrifugar 1200 rpm 7 minutos a 4° C.

Eliminar el sobrenadante. Re suspender en 500 µl de Buffer se lisis tibio. Incubar 7 minutos. Centrifugar a 1200 rpm 7 minutos a 4° C. Lavar con 200 µl de PBS. Centrifugar a 1200 rpm 7 minutos a 4° C. Re suspender en 200 µl de solución fijadora. Cubrir con aluminio y mantener en refrigeración hasta la lectura. Testigos: Muestra sin anticuerpo. Muestra con solo CD4+. Muestra con solo CD8+. Diluciones: Solución CD4+: 5µl de CD4+ en 495 µl de PBS. Solución CD8+: 5µl de CD8+ en 495 µl de PBS. Solución fijadora al 2.5%. 2000 µl de formaldehido. 10, 0000 PBS.

ANEXO 4

RADIOINMUNO ENSAYO (RIA) PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA IN VITRO DEL 25-(OH)D₃ EN SUERO.

Fase de extracción: Marcar los tubos de vidrio (12x75 mm) para extracción: 6 calibradores, 2 controles y hasta 40 muestras en duplicado. Dispensar 100 µl de cada calibrador, control o muestra en sus respectivos tubos. Añadir 0,5 ml de acetonitrilo a cada tubo. Mezclar durante 7 segundos con un vortex. Centrifugar 5 minutos a temperatura ambiente (a 800-1500 g). Fase de Incubación: Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los calibradores, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales. Añadir 100 µl del sobrenadante obtenido después de la fase de extracción a los tubos respectivos. Las puntas de las pipetas deben ser saturadas del sobrenadante en cuestión antes de la adición al tubo. Dispensar 400 µl del Tampón de Incubación en cada tubo, excepto los de Cuentas Totales. Añadir 50 µl del trazador a cada tubo, incluyendo las Cuentas Totales. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, en un agitador (300-700 RPM). Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido. Lavar los tubos 2 veces con 2 ml de Solución de lavado y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado. Después del lavado, dejar los tubos en posición vertical durante 2 minutos y aspirar el líquido restante. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma. (DIAsource ImmunoAssays S.A.)

BIBLIOGRAFIA:

1. U.N.A. Avicultura mexicana. Monografía. [serial online] 2013.
2. Garduño LA. Evaluación de la Avicultura Mexicana. [serial online] 2012 (Citada 2012-08-10). Available from: (http://www.alimentariaonline.com/imprimir_notas.asp?did=1019).htm
3. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México. México (D.F) SAGARPA. 2009.
4. Dottavio MA y Di Masso JR. Mejoramiento avícola para sistemas productivos semi-intensivos que preservan el bienestar animal. Journal of Basic & Applied Genetics. 2010.
5. Hernández MM del C. Crisis alimentaria y avicultura; un punto de inflexión. La Jornada del campo. 2011.
6. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Programa Nacional Pecuario. México (D.F) SAGARPA, 2007-2012.
7. Arámbula RA, Corona A.E. Tratados Comerciales de México. Servicio de investigación y análisis. Subdirección de Política Exterior. México (D.F). 2008.
8. Gómez VG, Morales LR, Avila GE. Use of 25-hydroxycholecalciferol in diets of broiler chickens: Effects on growth performance, immunity and bone calcification. Japan Poultry Science Association. 2013.
9. Elizondo SJA. Requerimientos nutricionales de cabras lecheras. III. Minerales y vitaminas. Universidad de Costa Rica. Agronomía Mesoamericana. pp. 303-308. 2008.
10. Merino VD, Zamora QMAM. Avicultura.com.mx. Las vitaminas en la producción avícola. 2011.

11. Rossigneux R y Robineau. La utilización de las vitaminas en Avicultura. B. L 'Aviculteur, 1992.
12. Salvadó S J, Lorda PG, Ripollés JSM. La Alimentación y la nutrición a través de la historia. Editorial Glosa. España. Pag 373-375; 2005.
13. Cunningham D L. Vitamins and minerals important to poultry. College of Agricultural and Environmental Sciences / Athens, Georgia. 2008.
14. Kidd MT. Nutritional modulation of immune function in broilers. Poultry Science. 2004.
15. Spitzer V. Vitamin Basics. The Facts about Vitamins in Nutrition. DSM Nutritional Products. 3ª Edición. 2007
16. Maiorka A, Portella FA. Broiler diets demand balanced vitamin supplementation. Federal University of Paraná. World Poultry. 2010.
17. Iglesias GA y Restrepo SJF. Historia de la vitamina D. Revista colombiana de reumatología. 2005.
18. Narváez CEA, Flores JJA. Metabolito de vitamina D3 (25-OH-H3). 2002.
19. Guevara M, Mogollón Gamarra LG, Hernán Y, Bermúdez AJ. Estimación de Vitamina D en mujeres con osteopenia y osteoporosis en Cundinamarca-Colombia, por medio de extracción en fase sólida, cromatografía líquida de alta resolución y análisis multivariado. N OVA. 2003.
20. Adams JS, Hewison M. Update in Vitamin D. J Clin Endocrinol Metab. 2010.
21. Chen TC, Chimeh F, Lu Z, Mathieu J, Person KS, Zhang A, Kohn N, Martinello S, Berkowitz R, Holick MF. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. Arch Biochem Biophys. 2007.

22. Ramos R, Alcázar R, Otero A, De Francisco ALM, Del Pino MD. Impacto económico del tratamiento con vitamina D en pacientes con enfermedad renal crónica. *Nefrología*. 2011.
23. Rapado. Influencia de la exposición solar y la dieta en el estatus nutricional de la vitamina D. Hipovitaminosis D en España. Madrid: FHOEMO. 2000.
24. Van Holde AM. *Bioquímica*. 3ª edición. ORYMU, S. A. Impreso en España. 2010.
25. Ganong FG, M.D. *Fisiología Médica*. Manual Moderno S.A de C.V. 20ª Edición. Impreso en México 2006.
26. Rush JK, Angel CR. Banks K M, Thompson KL and Applegate TJ. Effect of Dietary Calcium and Vitamin D3 on Calcium and Phosphorus Retention in White Pekin Ducklings. *Poultry Science*. 2005.
27. Binkley N, Krueger D, Lensmeyer G. 25- hydroxyvitamin D measurement. A review for clinicians. *J Clin Densitom* 2009.
28. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006.
29. Sánchez A. *Vitamina D: Actualización*. Rev. Méd. Rosario. 2010.
30. Del Río GJC. Efecto del 25 hidroxicolecalciferol en pollos de engorda contaminados por aflatoxinas B1. Tesis de Maestría, FES Cuautitlán, 1988.
31. Gatus S, López S, Pallarés J, Santacana M, Puente S, Fernández, Matias GX. Estudio inmunohistoquímico de la expresión del receptor de vitamina D (VDR) en el endometrio normal y el cáncer de endometrio. XXXII Reunión Anual SEAP 2009.
32. Tizard IR. *Inmunología Veterinaria*. Sexta edición. MacGraw- Hill Interamericana. 2002.
33. Hossein NA, Mahdieh ES, Maghbooli Z, Mirzaei K, Shirzad M, Curletto B, Chen TC. The role of vitamin D deficiency and vitamin D receptor genotypes on the degree of collateralization in patients with

suspected coronary artery disease. Biomed research International. 2014.

34. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. Trends in Biochemical Sciences. 2004.

35. Zhang H, Shih DQ, Zhang X. Mechanisms underlying effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on the Th17 cells. European Journal Microbiology and Immunology. 2013

36. Bikle DD. Vitamin D: newly discovered actions require reconsideration of physiologic requirements. Trends Endocrinol Metab; 2010.

37. González GV, Torrejón CS. Actualizaciones en Vitamina D. Rev. chil. reumatol. 2009.

38. Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med 2007.

39. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D3 analogs as immunomodulatory agents. Trends Mol Med. 2002.

40. Lyakh LA, Sanford M, Chekol S, Young H.A, Roberts A.B. TGF-beta and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells. J Immunol. 2005.

41. Korver DR. Overview of the Immune Dynamics of the Digestive System. The Journal of Applied Poultry Research. 2006

42. Kogut MH, and Klasing K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. The Journal of Applied Poultry Research. 2009.

43. Garfias CRB, Gualito JJM. Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria. Vet. Méx, 2005.

44. Silva VK, Torre da Silva JD, Torres KAA, De Faria FDE, Hirota HF, De Moraes BVM. Humoral immune response of broilers fed diets

containing yeast extract and prebiotics in the prestarter phase and raised at different temperatures The Journal of Applied Poultry Research. 2009

45. Hashimoto C, Hudson KL, and Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. 1988.

46. Kaiserlian DN, Cerf-Bensussan, and Hosmalin A. The mucosal immune system: from control of inflammation to protection against infections. *J Leukoc Biol*. 2005.

47. Jones GE. Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J Leukoc Biol*. 2000.

48. Hermoso MA, and Cidlowski JA. Putting the brake on inflammatory responses: the role of glucocorticoids. *IUBMB Life*. 2003.

49. Mowen K A, and Glimcher LH. Signaling pathways in Th2 development. *Immunol Rev*. 2004.

50. I de Barberà BJ, I Ollé FM. Las paredes celulares de levadura de *Saccharomyces Cerevisiae*: Un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde. Universidad Autónoma de Barcelona Departamento de Ciencia animal y de los alimentos. Barcelona. 2007.

51. Cheema MA, Quereshi MA, and Havesstein GB. A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 random bred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science*. 2003.

52. INEGI Tláhuac: Cuaderno de información básica delegacional. INEGI. México 1992.

53. Nutrient Requirements of Poultry. Ninth Revised Edition, 1994

54. AOAC. Official Methods of Analysis, 13th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 1990.

55. Kuehl RO. Diseño de Experimentos, Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigación. 2ª ed. México: Thomson Learning, 2000.
56. Sakem B, Nock C, Stanga Z, Medina P, Nydegger UE, Risch M, and Risch L. Serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and immunoglobulins in an older Swiss cohort: results of the Senior Labor Study. BMC Medicine. 2013
57. Hossein-Nezhad A, Mahdih ES, Maghbooli Z, Mirzaei K, Shirzad M, Curletto B, Chen TC. The role of vitamin deficiency and Vitamin D receptor genotypes on the degree of collateralization in patients with suspected coronary artery disease. BioMed Research International. 2014.
58. Tenorio LA, Efecto del 25-(OH)D3 en el comportamiento productivo de pollos de engorda, criados por sexos separados. Mexico. DF. UNAM. 2003.
59. Fritts CA, and Waldroup PW. Effects of source and level of vitamin D on live performance and bone development in growing broilers. J. Appl. Poult. Res. 2003
60. Browning LC and Cowieson A. The Interactive effects of vitamin D, phytase, calcium and phosphorus in broiler performance and skeletal integrity. 23rd Australian Poultry Science Symposium. 2012
61. Chou SH, Chung TK, Yu B. Effects of supplemental 25 hydroxycholecalciferol on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broiler chickens. Poultry Science. 2009
62. Angel, R, W. Saylor, S. Dhandu, W. Powers y T. Applegate. Effect of dietary phosphorus, phytase and 25-hydroxycholecalciferol on performance of broiler chickens grown in floor pens. Poult. Sci. 2005.

63. Angel R, Dhandu AS, Applegate TJ, Christman M. Phosphorus sparing effect of phytase, 25-hydroxycholecalciferol, and citric acid when fed to broiler chicks. *Poultry Sci.* 2001.
64. Defas FAL, Puruncajas VDE. Evaluación de vitamina D3 y su metabolito 25-Hidroxi-D3 en la productividad de pollos de engorde. 2006.
65. Gómora OLV, Efecto del 25 hidroxicolecalciferol en los parámetros productivos e inmunidad de gallinas. UNAM. 2006
66. Gilaberte Y, Aguilera J, Carrascosa JM, Figueroa FL, Romaní de Gabriel J, Nagore E. La vitamina D evidencias y controversias. Elsevier. 2011.
67. <http://www.news-medical.net/news/20110502/28/Spanish.aspx>.
68. Jackson TC, Krauss MJ, Debaun MR, Strunk RC, Arbeláez AM. Vitamin D deficiency and comorbidities in children with sickle cell anemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 2012
69. Perlstein TS, Reena P, Berliner N, and. Vanasse GJ. Prevalence of 25-hydroxyvitamin D deficiency in subgroups of elderly persons with anemia: association with anemia of inflammation. *Blood.* 2011.
70. Zittermann A, Jungvogel A, Prokop S, Kuhn J, Dreier J, Fuchs U, Schulz U, Gummert JF, Börgermann J. Vitamin D deficiency is an independent predictor of anemia in end-stage heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2011 (abstract)
71. Sim JJ, Lac PT, Liu IL, Meguerditchian SO, Kumar VA, Kujubu DA, Rasgon SA. Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol.* 2010.
72. El-Shazly AE. and Lefebvre PP. Modulation of NK Cell Autocrine-Induced Eosinophil Chemotaxis by Interleukin-15 and Vitamin D3: A Possible NK-Eosinophil Crosstalk via IL-8 in the Pathophysiology of Allergic Rhinitis. Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation.* 2011.

74. Servín GC. Efecto del 25 hidroxicolecalciferol (25-(OH)D₃) en los parámetros productivos e inmunidad de pollos de engorda. UNAM. FMVZ. 2002.
75. Mojica C y Bachman H. La era moderna de la nutrición de la vitamina D. Industria avícola. 2012.
76. Rath, N. C., J. M. Balog, W. E. Huff, G. R. Huff, G. B. Kulkarni, and J. F. Tierce. Comparative differences in the composition and biomechanical properties of tibiae of seven- and seventytwo- week-old male and female broiler breeder chickens. Poul. Sci. 1999.
77. Rath NC, Huff GR, Huff WE, and Balog JM. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. Poul. Sci. 2000.
78. Oviedo-Rondón EO, Ferket PR, and Havenstein GB. Understanding long bone development in broilers and turkeys. Avian Poul. Biol. Rev. 2006.
79. Lohakare JD, Kim JK, Ryu MH, Hahn TW, Chae BJ. Effects of Vitamin C and Vitamin D; interaction on the performance, immunity, and bone characteristics of commercial broilers. PSA. 2005.
80. Han JC, Yang XD, Zhang T, Li H, Li WL, Zhang ZY, Yao JH. Effects of 1 α hydroxycholecalciferol on growth performance, parameters of tibia and plasma, meat quality, and type II b sodium phosphate cotransporter gene expression of one- to twenty-one-day-old broiler. Poultry Science. 2009.
81. Ferket PR, Oviedo-Rondón EO, Mente PL, Bohórquez DV, Santos Jr AA, Grimes JL, Richards JD, Dibner JJ, Felts V. Organic trace minerals and 25 hydroxycholecalciferol affect performance characteristics, leg abnormalities, and biomechanical properties of leg bones of turkeys. Poultry Science. 2009.
82. Stede YVD, Verfaillie T, Cox E, Verdonck F, Goddeeris M. 1,25(OH)₂ D₃ 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ increases IgA serum antibody responses and IgA antibody-secreting cell numbers in the Peyer's patches of pigs after intramuscular immunization. Clinical & experimental immunology. 2004.

83. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Review Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. J Nutr. 1995.

84. 02-28-95 NORMA Oficial Mexicana NOM-013-ZOO-1994, Campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle presentación velogénica.

85. SENACSA, IICA. Manual de técnicas de laboratorio para el diagnóstico en salud animal. Tomo I. 2001.

86. Michael F. Holick. Vitamin D Supplementation. US Institute of Medicine. 2008

CUADROS

Cuadro 1. Composición de ingredientes (g/kg) y nutrientes calculados de la dieta basal experimental para pollos de engorda de 1-21 días de edad.	
Ingredientes	T
Sorgo	553.0
Pasta de soya	368.0
Carbonato de calcio	19.0
Aceite de soya	29
Fosfato dicálcico	8.7
Cloruro de sodio	4.0
Premezcla vitamínica y mineral ¹	4.2
DL Metionina (99% pureza)	2.2
L- Lisina HCl (78.5% pureza)	0.9
L Treonina (98.5% pureza)	0.2
Cloruro de colina (60% pureza)	0.8
Nutrimento	Análisis calculado
Proteína cruda (%)	22.0
EM en aves (kcal7kg)	2950
Lisina total (%)	1.25
Met + Cys total (%)	0.90
Treonina total (5)	0.84
Ca (%)	1.00
Total (%)	.70
P Disponible (%)	0.45

¹Aporte por kg de alimento: vitamina A 12 000 UI; vitamina E 25 UI; vitamina K 2.5mg; Tiamina 2.0 mg, Riboflavina 5.0 mg; Piridoxina 3.0 mg; Cianocobalamina 20 µg; Biotina 75 20 µg; Acido fólico 0.8 mg; Acido nicotínico 30 mg; Pantotenato de calcio 10 mg, Fe 50mg (Sulfato ferroso, Zn 50mg (óxido de zinc), Mn 110 mg (sulfato de manganeso); Cu 12 mg (sulfato de cobre); I 0.30 mg (yodato de potasio), Se 200 µg (selenito de sodio); Co 0.20 mg (sulfato de cobre); Bacitracina de zinc 50mg; Etoxiquin 200mg; Acido propiónico 500 mg.

Cuadro 2. Resultados promedio de parámetros productivos en 21 días.				
FACTOR	T1	T2	T3	T4
Ganancia de peso (g)	673 a	708 a	681 a	700 a
Consumo de alimento (g)	928 a	951 a	990 a	953 a
Conversión alimenticia (g)	1.38 a	1.35 a	1.37 a	1.35 a

Valores con distinta letra son diferentes (P<0.05)

Cuadro 3. Datos obtenidos promedio de la respuesta en pollos de 21 días de edad.				
FACTOR	T1	T2	T3	T4
Linfocitos(X10 ⁹ /L)	3.99 a	4.17 a	3.64 b	4.57 a
Eritrocitos(X10 ⁹ /L)	2.77 a	2.13 b	2.49 c	2.01 b
Eosinófilos(X10 ⁹ /L)	0.1808 a	0.2467 a	0.29 a	0.1375 b
Monocitos(X10 ⁹ /L)	0.8467 a	0.6008 b	0.8450 a	0.6025 b
Proteínas(X10 ⁹ /L)	37.85 a	35.6 a	37.45 a	36.72 a
Hematocrito(X10 ⁹ /L)	0.3192 a	0.3292 a	0.3225 a	0.3242 a
Trombocitos(X10 ⁹ /L)	0.319 a	0.329 a	0.322 a	0.325 a
Heterofilos(X10 ⁹ /L)	2.27 a	2.79 a	2.01 b	3.05 a
Basófilos(X10 ⁹ /L)	0.57 a	0.45 a	0.58 a	0.43 a
CD4+(cel/ml)	.312a	.492ab	.505ab	.565b
CD8+(cel/ml)	.632a	.497b	.397ab	.395ab
IgA(μg)	.7231a	.9851ab	1.1738ab	1.3262b
IH(Log base 10)	5.77a	6.49ab	6.62ab	7.61b

Valores con distinta letra son diferentes (P<0.05)

Cuadro 4. Resultados promedio de cenizas y resistencia en tibias en pollos de 21 días de edad.				
FACTOR	T1	T2	T3	T4
Resistencia de las tibias g/cm ²	24458 a	25054 ab	21564 ab	27949 b
Cenizas %	47.26 a	51.01 ab	52.05 ab	55.71 b

Valores con distinta letra son diferentes (P<0.05)

Cuadro 5. Valores de determinación de 25(OH) D3 en suero en pollos de 21 días de edad.				
FACTOR	T1	T2	T3	T4
25(OH) D3 en suero (pg/ml)	2795a	3257ab	4223ab	5223b

Valores con distinta letra son diferentes (P<0.05)

