



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN SUPLEMENTO ALIMENTICIO A BASE DE ÁCIDO
CÍTRICO Y ANETOL EN POLLOS DE ENGORDA DESAFIADOS CON UNA CEPA DE
ESCHERICHIA COLI ENTEROINVASIVA SOBRE VARIABLES HEMATOLÓGICAS Y
RESPUESTA INMUNE CELULAR**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

KARINA PÉREZ MONTOYA

ASESORES:

DR. JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA

M. EN MVZ JACQUELINE URIBE RIVERA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE



ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de tesis y examen profesional.

Evaluación del Efecto de un Suplemento Alimenticio a Base de Ácido Cítrico y Anetol en Pollos de Engorda Desafiados con una Cepa de Escherichia coli Enteroinvasiva Sobre Variables Hematológicas y Respuesta inmune Celular

Que presenta la pasante: Karina Pérez Montoya

Con número de cuenta: 311118050 para obtener el título de: Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de diciembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dr. José Juan Francisco Ortega Sánchez de Tugte</u>	
VOCAL	<u>Dr. Juan Carlos Del Río García</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. José Francisco Morales Álvarez</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dr. Hugo Ramírez Álvarez</u>	
2do. SUPLENTE	<u>Dra. Marcela Autran Martínez</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

LMCF/lmc*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser parte fundamental de mi formación profesional y personal.

Al laboratorio 14 “Alimentos, Micotoxinas y Micotoxicosis” y Bioterio de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria FES Cuautitlán por brindarnos el espacio para llevar a cabo este experimento.

A mi familia, amigos y compañeros que me dieron todo su apoyo durante esta travesía con sus ánimos, palabras de aliento y cariño.

A mis asesores Jacqueline Uribe y Juan Carlos Del Rio por su paciencia, apoyo incondicional y cariño durante este proceso para poder seguir adelante, así como siendo mis ejemplos de perseverancia.

A los animalitos que fueron parte fundamental del experimento.

A Dios por todo lo que ha puesto en mi camino y permitirme poder concluir esta etapa tan importante y poder conocer personas maravillosas a lo largo de esta travesía.

ÍNDICE

I) RESUMEN	1
II) ANTECEDENTES	2
1. Avicultura en México	2
2. Producción de pollo de engorda	4
3. Factores que afectan la producción de pollo de engorda	5
4. Integridad intestinal.....	8
5. Microbiota	9
6. <i>Escherichia coli</i>	15
7. Alimentos funcionales	18
8. Ácidos orgánicos	19
9. Ácido cítrico	23
10. Aceites esenciales	24
11. Anetol	25
III) JUSTIFICACIÓN.....	27
IV) HIPÓTESIS	28
V) OBJETIVOS	28
VI) DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA	29
1. Animales experimentales.....	29
2. Alimento.....	30
3. Inóculo bacteriano	31
4. Respuesta inmune celular	32
5. Hematología	32
a) Hematocrito	33
b) Proteínas plasmáticas.....	33
c) Conteo eritrocitario	33
d) Conteo leucocitario	34
e) Conteo diferencial	34
VII) ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
VIII) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
IX) CONCLUSIONES.....	51
X) REFERENCIAS	52

I) RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un suplemento alimenticio de tipo eubiótico a base de ácido cítrico y anetol (ACA), sobre las variables hematológicas y la respuesta inmune celular en pollos de engorda desafiados con una cepa de *Escherichia coli* enteroinvasiva. Se utilizaron 60 pollos de engorda estirpe Cobb 500 de 1 día de edad, ambos sexos, los cuales se distribuyeron aleatoriamente en 4 tratamientos, de 15 aves por tratamiento. El primer tratamiento fue designado como control, el segundo tratamiento recibió alimento adicionado con el suplemento alimenticio (ACA), utilizado como modulador digestivo comercial a una razón de 0.5 Kg/t de alimento, el tercer tratamiento fue inoculado con *Escherichia coli* cepa enteroinvasiva y el cuarto tratamiento fue inoculado con la misma cepa de *E. coli* y se le proporcionó el alimento con el eubiótico. Las variables hematológicas evaluadas fueron proteínas plasmáticas totales y hemograma; la respuesta inmune celular se evaluó al día 21 de edad de las aves, mediante la prueba de hipersensibilidad cutánea como respuesta a la inoculación intradérmica de fitohemaglutinina (PHA). Las variables hematológicas en las aves desafiadas con *E. coli* como hematocrito (31.5%), proteínas totales (1.6g/dl) y conteo de eritrocitos (1,42 eritrocitos/ μ L), se observaron disminuidas, además de un aumento en los valores para leucocitos (20470,6 leucocitos/ μ L) ($P < 0.05$). Con respecto a la evaluación de la respuesta inmune celular se observó una disminución en el caso de las aves desafiadas con la bacteria notablemente a las 12 y 24 horas (1.0mm y 1.3mm respectivamente) post inoculación. Por el contrario, los resultados favorables fueron observados en las aves a las cuales se le adicionó el suplemento alimenticio eubiótico aun ante el desafío con *E.coli* siendo mayores o similares al grupo control en: hematocrito (31.83%), proteínas totales (2.72g/dl), conteo eritrocitario (2.15 eritrocitos/ μ L) y leucocitario (14323,3 leucocitos/ μ L).

Palabras clave: *aves, ácido cítrico, anetol, hematología, respuesta celular.*

II. ANTECEDENTES

1. Avicultura en México

Durante los últimos años, el sector agropecuario del país ha tenido un desarrollo importante, destacando dentro de este conjunto de actividades la avicultura, la cual de acuerdo con la Unión Nacional de Avicultores (UNA) (2019), actualmente ocupa el 63.3% (Figura1) de la producción pecuaria, con una producción de 3,5 toneladas de carne de pollo.

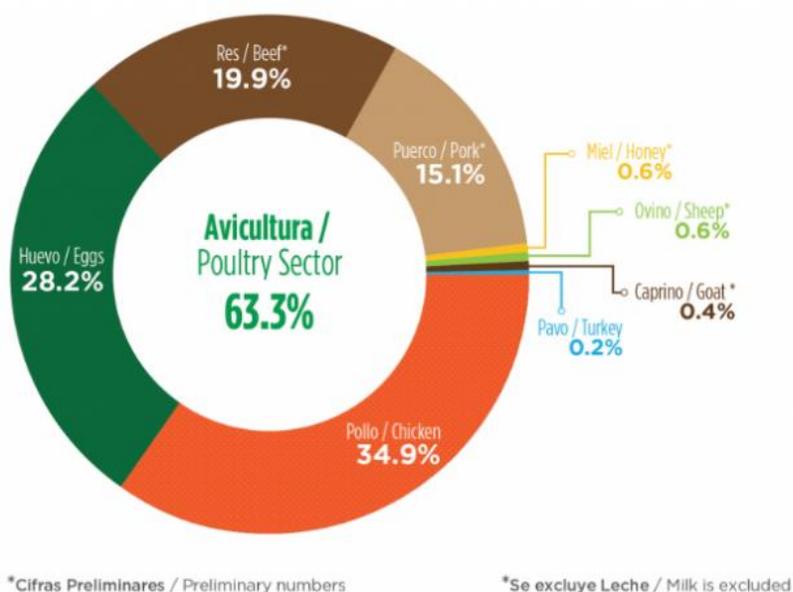


Figura 1.

Lugar de la avicultura dentro de la producción pecuaria en México (UNA, 2019).

Un aumento en el consumo de carne de pollo es el que se encuentra por este crecimiento de la producción (Parrish, 2018), como se ha observado en Latinoamérica los últimos años (Figura 2) (Industria Avícola, 2020).

Según fuentes de la UNA (2019), los mexicanos tuvieron un consumo aparente de 33.12 kilogramos por habitante en 2019. La carne de pollo es una de las fuentes de proteína animal preferida y asequible en México para la población de ingresos bajo y mediano (Cuevas Valdez,

País	Millones de pollos				
	2015	2016	2017	2018	2019
Argentina	880.00	705.00	722.00	711.50	756.95
Bolivia	179.90	179.90	226.89	226.86	228.27
Brasil	6,050.00	5,804.30	6,100.00	5,829.12	6,468.60
Chile	240.00	240.00	286.00	300.00	296.30
Colombia	730.00	711.26	774.00	804.00	836.70
Costa Rica	72.00	72.00	74.00	75.00	80.00
Ecuador	230.00	230.00	250.00	270.00	279.14
El Salvador	52.20	55.00	55.00	55.00	55.00
Guatemala	162.88	162.88	162.88	189.67	189.67
Honduras	92.76	100.00	100.00	100.00	100.00
México	1,612.80	1,667.63	1,727.30	1,836.70	1,832.00
Nicaragua	63.80	63.80	63.80	63.80	63.80
Panamá	104.00	104.40	107.57	107.57	109.85
Paraguay	70.00	65.70	67.21	71.21	73.55
Perú	673.00	689.60	702.70	764.18	793.40
República Dominicana	180.00	180.00	221.00	215.00	215.00
Uruguay	28.00	25.00	32.20	29.84	29.80
Venezuela	351.00	263.00	252.67	105.37	124.40
Totales	11,772.34	11,319.47	11,925.22	11,754.82	12,532.43

© WATT Global Media 2020

Figura 2.

Evolución de la producción nacional de pollos de engorda 2015–2019 (Industria Avícola, 2020).

2019).

El sector avícola es posiblemente el de mayor crecimiento y el más flexible de todos los sectores de la ganadería. Impulsado principalmente por una fuerte demanda, se ha expandido, consolidado y globalizado en los últimos 15 años en países de todos los niveles de ingreso económico.

La ganadería es fundamental para la subsistencia de alrededor de mil millones de personas de las más pobres del mundo (FAO, 2013).

La avicultura por su parte, es la rama de la producción pecuaria nacional que se encuentra en un nivel tecnológico desarrollado y favorable, ya que esta actividad ha incorporado los más recientes avances en genética y alimentación en los últimos 50 años (SAGARPA, 2009). Además, la avicultura permite obtener, en cortos periodos de tiempo, productos alimenticios de gran calidad (huevos y carne) con una elevada retribución de los forrajes consumidos. Así, la producción de pollo de engorda, requiere de importantes volúmenes de granos y pastas de oleaginosas para la alimentación, insumos que además de reunir condiciones de calidad, se busca que tengan precios reducidos, ya que la alimentación representa en su conjunto más del 70% de los costos de producción (SAGARPA, 2001).

2. Producción de pollo de engorda

Las aves de corral, en el mundo rural en particular, son esenciales para la subsistencia de muchos agricultores de escasos recursos, puesto que a menudo es el único activo que poseen y contribuye significativamente a la mejora de la nutrición humana, mediante el suministro de alimentos (carne y huevos) con nutrientes y micronutrientes de alta calidad (FAO, 2013). La producción avícola se caracteriza por su alto rendimiento económico debido a su ciclo de producción corto. Por lo tanto, el ciclo de capital es muy rápido en el caso de la producción avícola en comparación con el ciclo en otros tipos de producción animal. La producción avícola también se caracteriza por una mayor tasa de conversión de alimento a carne en comparación con otros animales, donde la producción de un kilogramo de carne de

ave necesita de 1.8 kg de alimento promedio en un periodo de producción de 42 días (6 semanas), en este caso, su ciclo puede repetirse 8 veces al año (Quintana, 2011).

3. Factores que afectan la producción de pollo de engorda

Existen factores que afectan la producción avícola y que repercuten en el rendimiento productivo de los animales y por ende en el producto final, entre los que se encuentran:

- Calidad del pollito

Ante la necesidad del sector de mejorar el rendimiento, se ha descubierto el impacto de la calidad del pollito que sale de la planta de incubación sobre el desarrollo de la vida productiva del pollo de engorde, siendo el peso a los 7 días y la mortalidad al final de la primera semana, los parámetros más significativos en la etapa inicial, los cuales pueden ser influenciados por varios factores durante el proceso de incubación y que tienen su repercusión en el desarrollo productivo de las aves (Bastidas *et al.*, 2016).

- Genética

La selección genética ha contribuido significativamente a la producción de carne avícola. Diversos estudios comparando pollos de genética moderna con líneas no seleccionadas, han reportado enormes mejoras en la ganancia diaria, eficiencia biológica, rendimiento cárnico, viabilidad y salud esquelética del pollo de engorda (Fleming *et al.*, 2007b, 2007a; Havenstein *et al.*, 2003b, 2003a; Mussini & Waldroup, 2012; Zuidhof *et al.*, 2014).

- Manejo

El objetivo de manejo del pollo de engorda debe ser alcanzar el rendimiento de la parvada en lo que se refiere a peso vivo, conversión alimenticia, uniformidad y rendimiento en

carne. El manejo del pollo durante la crianza y las primeras etapas de su desarrollo es de mayor importancia debido a que las primeras dos semanas de vida de la parvada son críticas y requieren atención particular. La producción de estas aves es un proceso en secuencia y, a la larga, el rendimiento depende del éxito al completar cada paso, por lo tanto, un manejo inadecuado repercutirá en el rendimiento futuro de las aves (Aviagen, 2009).

- Micro ambiente y macro ambiente

La avicultura moderna como cualquier otra industria, tiene como objetivo de su actividad la rentabilidad, y en un mercado tan competido como el que ha impuesto la llamada globalización de la economía, los productores no tienen opción distinta a la de buscar el máximo de eficiencia; por lo tanto, para que los pollos expresen al máximo su potencial productivo contenido en su genética, es imprescindible manejar un entorno adecuado que les proporcione las condiciones ambientales adecuadas. Una de las interacciones entre los componentes del sistema pecuario que más influencia tiene a escala productiva, es la relación entre el entorno y el animal. El entorno en el que el animal se desempeña está compuesto primordialmente por los factores ambientales o climáticos, el cual debe estar estructurado con el objetivo de brindar bienestar (Estrada & Márquez, 2005).

Los animales sobreviven si se desarrollan en un ambiente confortable y adecuado. El ambiente animal es la reunión de las condiciones externas que afectan el desarrollo, la respuesta y el crecimiento animal; los factores que afectan el ambiente se clasifican en factores físicos tales como: el espacio, la luz, el sonido, la presión y el equipo; factores sociales como el

número de animales; y factores técnicos, tales como la temperatura del aire, la humedad relativa, el movimiento del aire, la radiación térmica, entre otros (Estrada & Márquez, 2005).

- Control y profilaxis de enfermedades

La prevención y el control de enfermedades infecciosas es de gran importancia en la avicultura moderna industrial. Las enfermedades en la producción avícola pueden ocasionar pérdidas económicas considerables por la reducción de los ingresos, por un menor volumen o una peor calidad de la carne, así como un aumento de los costos de alimentación y mano de obra. Sin embargo, estas pérdidas pueden reducirse frecuentemente por una serie de intervenciones como: vacunaciones, un mejor manejo de la cama, o la mejora de la nutrición e higiene (Prohealt, 2017).

- Alimentación

El costo del alimento representa el 70 por ciento del costo total de la producción de pollos de engorda. En la producción de pollos de engorda, la eficiencia de la alimentación puede mejorarse con la selección genética de animales para disminuir la edad para alcanzar el peso del mercado. El alimento tiene su impacto no solo en la cantidad de producción avícola sino también en la calidad del ave. El proceso de alimentación adecuado es el que utiliza una menor cantidad de alimento a un precio bajo para obtener la mayor cantidad de producción con la mejor calidad, en otras palabras, el proceso de alimentación económica es el que brinda la mayor rentabilidad (Ali Grepay, 2009).

La conversión eficiente del alimento en sus componentes básicos para la óptima absorción de los nutrientes es vital para los pollos de engorda (Bailey, 2013). El pollo moderno posee un potencial genético muy elevado y, por ello, es absolutamente necesario contar con un aparato digestivo saludable y con su población microbiana asociada bien balanceada (De Franceschi, 2018).

4. Integridad intestinal

La integridad intestinal se puede definir como el mantenimiento de la salud intestinal a través de su estructura y funcionamiento (Briceño & Alfaro, 2013).

Como su nombre lo indica, el término salud intestinal hace referencia al estado de salud en el que se encuentra el intestino para que este pueda desempeñar sus funciones fisiológicas sin problemas, aunque para que esto pueda suceder es necesario que se alineen el sistema inmune, la nutrición y la microbiota (Leyva *et al.*, 2019).

El sistema inmune del intestino evita el contacto directo entre el epitelio intestinal y los microorganismos, los muestrea constantemente para mantenerse entrenado, de tal manera que, cuando sea atacado, pueda eliminar los patógenos que logran penetrar el epitelio intestinal y que, de no ser así, comprometerían la vida del animal (Kogut *et al.*, 2017).

La nutrición es una de las herramientas más efectivas para promover la salud intestinal de las aves, ya que un animal que tiene un intestino funcionando correctamente es capaz de mantener homeostasis entre sus componentes y por lo tanto tendrá un mejor estado de

bienestar, que permite al animal expresar todo su potencial productivo lo que se resume en mayor rentabilidad (Leyva *et al.*, 2019).

Una microbiota intestinal bien equilibrada es crucial para la salud de los animales, especialmente si se espera un alto rendimiento productivo. Una microbiota normal saludable es la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos y, por lo tanto, es extremadamente importante para elevar la capacidad de enfrentar infecciones de patógenos entéricos. Además, también es necesario para el buen funcionamiento y la digestión efectiva de nutrientes, resultando así en un buen desarrollo (Mohnl, 2011).

5. Microbiota

La microbiota intestinal comprende todas las bacterias, protozoos y hongos presentes en el tracto gastrointestinal y consiste en aproximadamente 400 a 500 especies diferentes (Mohnl, 2011). A medida que el animal crece, esta microbiota se vuelve muy diversa hasta que alcanza un estado relativamente estable pero dinámico (Pan & Yu, 2013). La composición de la microbiota dentro del tracto intestinal del pollo no es estática, presenta variaciones temporales relacionadas con la edad del ave y la variación espacial observada dentro de los diferentes compartimentos del tracto intestinal (figura 3) (Pedroso *et al.*, 2012). En los inicios de la vida del ave, la composición parece estar influenciada por los factores del huésped como la edad, la genética y factores externos como la dieta (Lumpkins *et al.*, 2010).

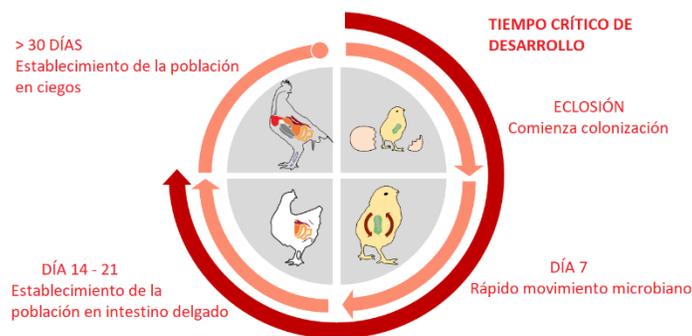


Figura 3.

Proceso del desarrollo de la microbiota intestinal del pollo de engorda (King, 2017).

• F

ase

pre-eclosión

La cáscara de huevo evolucionó para ser una barrera contra los microorganismos (Gast & Holt, 2000). Sin embargo, la cutícula que protege contra la cáscara de huevo puede degradarse, lo que provoca que los microorganismos penetren para llegar a las estructuras internas del mismo (Cook, 2003). Esto puede ocurrir poco después de que se coloca el huevo en el nido, en las jaulas o en la cinta transportadora, por lo tanto, la transmisión vertical de microorganismos también es posible desde la gallina hasta el pollo, aunque de forma diferente a los mamíferos. Los organismos patógenos tales como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma spp.* y *Campylobacter spp.* pueden transmitirse verticalmente (Doyle & Erickson, 2006; Methner *et al.*, 1995; Okamura *et al.*, 2007). Es plausible aceptar la hipótesis de que los microorganismos beneficiosos también pueden transmitirse verticalmente. La anatomía del tracto reproductivo de la gallina sugiere que el embrión probablemente esté colonizado con organismos que se depositan antes de la formación de la cáscara de huevo. Los microorganismos podrían establecerse dentro del intestino de los embriones durante el desarrollo, especialmente cuando

los embriones comienzan a ingerir el líquido amniótico. Además, si hay microorganismos en la yema, podrían internalizarse a medida que se introduce la yema al intestino en el desarrollo embrionario (Abad Guamán *et al.*, 2017).

- Fase inicial

Inmediatamente después de la eclosión, los polluelos tienen contacto con los microbios en su entorno. La incubadora comercial de huevos es una fuente de contaminación microbiana que permite a los pollos obtener microorganismos que pueden no tener efectos necesariamente mutualistas (Cason *et al.*, 2017; Cox *et al.*, 1991).

El consumo de agua y alimentos resulta en una rápida adquisición de microorganismos adicionales y, de hecho, el proceso de manejo, transporte y vacunación contribuye a la evolución de la microbiota intestinal de las aves. En el momento de la entrega a la granja avícola, la cría ya tiene una microbiota estructurada (Pedroso *et al.*, 2005). La organización de la microbiota intestinal ocurre rápidamente, muchos estudios han demostrado que los patógenos transmitidos por los alimentos tienen más éxito en colonizar pollos jóvenes que están expuestos en la primera semana de eclosión (Nurmi *et al.*, 1992; Wagner, 2006) que es cuando el ambiente intestinal cambia rápidamente y la microbiota es menos diversa e inestable.

- Fase de engorda

Muchos informes ahora revelan la composición de la comunidad microbiana del íleon de pollo durante el engorde. Por ejemplo, Nakphaichit *et al.*, (2011) observaron que el organismo

más abundante en el intestino delgado era *Lactobacillus spp.* cuya diversidad aumentó de 21 a 42 días de edad.

Eubiosis

Etimológicamente, este término deriva de la palabra griega “*eubiosis*” -buena vida-. En nuestro contexto se refiere a un equilibrio saludable de la microbiota en el tracto intestinal, que permite al animal expresar su potencial genético (Meuter & Martinez, 2011).

En un animal sano la población de bacterias que viven en el intestino está en "equilibrio" (el número de "bacterias buenas" supera el número de "bacterias malas"). En esta situación diremos que las aves están en eubiosis (Nunes, 2014).

Un estado de eubiosis brinda:

- Protección del intestino.
- Efecto antagonista para microorganismos no deseados.
- Función epitelial.
- Maduración y modulación del sistema inmune del huésped.
- Buena digestión y absorción de nutrientes.
- Síntesis de vitaminas.
- Síntesis de proteínas.

(Nunes, 2014).

Disbiosis

El término de disbiosis, al contrario de eubiosis, nos indica un desequilibrio de la microbiota del intestino.

En un estado de disbiosis encontramos:

- Daño en el epitelio intestinal.
- Producción de metabolitos tóxicos (NH₃, aminas biogénicas).
- Aumento de la producción de gas.
- Debilitamiento del sistema inmune.
- Renovación celular acelerada → aumento de la demanda de energía.

(Nunes, 2014).

En los sistemas productivos modernos, se destaca el problema de la digestibilidad de los alimentos, ya que debe realizarse en tiempos muy reducidos, conllevando a una pobre utilización de las proteínas y otros nutrientes, un exceso de nutrientes no digeridos en el intestino y como consecuencia, el riesgo de desbalances bacterianos (Equipo técnico de Estifar, 2018).

Causas de disbiosis

La nutrición es el factor más importante que puede influir en la composición y metabolismo de la microbiota intestinal (Mohnl, 2011), alteraciones en la alimentación pueden provocar desbalances importantes en la microbiota gastrointestinal, como por ejemplo:

- Cambios sustanciales en la dieta y baja calidad de componentes de los alimentos
(Nunes, 2014).

Los errores alimenticios y cambios dietéticos sustanciales, baja calidad de los ingredientes alimenticios e inadecuada higiene alimenticia comprometen la eubiosis. Por ejemplo, el cambio de una dieta con baja concentración de proteína a una dieta con alta concentración de proteína

favorece el crecimiento de ciertas bacterias como los clostridios y reduce las condiciones apropiadas para los lactobacilos o bifidobacteria (Mohnl, 2011).

- Estrés

Cada tipo de estrés puede tener un impacto directo sobre la microbiota intestinal porque el estrés influye en la liberación de secreciones digestivas así como el tipo y frecuencia de los movimientos intestinales (Mohnl, 2011).

Ejemplos de factores estresantes:

- Higiene alimentaria insuficiente.
- Transporte.
- Sobrepoblación.
- Clima.
- Enfermedad.
- Vacunación. (Nunes, 2014).

Consecuencias de la disbiosis.

La disbiosis puede tener un impacto negativo significativo sobre el hospedante animal. Los eventos de disbiosis aguda pueden dar lugar a la proliferación organismos denominados como oportunistas que son parte de la microbiota, pero en condiciones de disbiosis tienen la capacidad de provocar diversas enfermedades. El desarrollo de patógenos potenciales, los cuales son mantenidos normalmente a un nivel bajo, puede incrementarse dramáticamente (Mohnl, 2011). Las bacterias patógenas pueden producir toxinas y metabolitos que aumentan la motilidad intestinal, la fermentación con producción de gas, cambiar el pH intestinal, irritar las mucosas, causar inflamación y aumentar la

secreción de moco. Este proceso reduce la digestibilidad y absorción de nutrientes y agua aumentando aún más la disbiosis. Los patógenos transmitidos por los alimentos, como *Salmonella spp.* y *E. coli* proliferan más en los intestinos disbióticos y pueden convertirse en residentes persistentes del intestino posterior (Rondón, 2019).

6. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un habitante normal del tracto intestinal de los animales y el hombre.

Coloniza el canal alimenticio durante el primer día de vida y posteriormente permanece como un miembro de la microbiota (López, 1976).

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*. El tamaño promedio de los bacilos es de 0.5 µm de ancho por 3 µm de largo, cuando se utiliza la tinción de Gram se tiñen de rojo (gramnegativas). Algunas especies son móviles (por flagelos), no esporuladas, fermenta la glucosa y la lactosa, son catalasa positiva, oxidasa negativa y reduce nitratos a nitritos. El género *Escherichia* incluye seis especies (*E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* y *E. coli*) (López & Campos, 2015).

Clasificación de patotipos de E. coli

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos (Tabla 1).

Tabla 1*Patotipos de E.coli*

Entero toxigénica (ETEC)	Entero hemorrágica (EHEC)	Entero patogena (EPEC)	Entero agregativa (EAEC)	Adherencia difusa (DAEC)	Enteroinvasiva (EIEC)
Tiene dos principales mecanismos de patogenicidad que son: adherencia y toxinas (López & Campos, 2015).	Conocida como productora de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (López & Campos, 2015).	La adherencia es su principal factor de patogenicidad (López & Campos, 2015).	Su nombre deriva de la forma de adherencia que presenta (López & Campos, 2015).	Su característica principal es que no forma microcolonias cuando se adhieren a células (López & Campos, 2015).	Su mecanismo de patogenicidad es la invasión del epitelio del colon por medio de adhesinas (Rodríguez Angeles, 2002).

Las manifestaciones clínicas asociadas con ésta infección son evacuaciones escasas acompañadas de moco y sangre, dolor abdominal y fiebre (López & Campos, 2015).

Importancia de E. coli en la industria avícola

La colibacilosis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad ocasionando enormes pérdidas a nivel mundial tanto en la industria aviar de producción de carne como la de huevo, se presenta tanto en la época de invierno como en verano y está asociada a mortalidad temprana en granjas como consecuencia de una mala higiene en la incubadora ocasionando bajas durante los primeros días de vida del pollito por onfalitis e infección de saco vitelino (Pérez & Pérez, 2018).

Medidas implementadas

En los últimos años, una de las características más estudiadas en las cepas bacterianas de los animales de abasto es la resistencia a antibióticos. La industria avícola depende del uso profiláctico y terapéutico de antibióticos como medidas para el control de las enfermedades. En lo referente a la colibacilosis aviar, se usan como medida de control primaria para reducir la morbilidad y la mortalidad. Además, los antimicrobianos se utilizan en aves sanas para prevenir enfermedades durante las épocas en que los animales son más susceptibles a las infecciones. Desafortunadamente, las bacterias como *E. coli* han generado resistencia a los antimicrobianos usados comúnmente. Esto ocurre no solamente entre cepas patógenas sino también entre bacterias de la microbiota normal (Martinez & Cortés, 2012).

La resistencia de patógenos microbianos como *E. coli* a dos o más clases de antibióticos se ha vuelto muy común en cepas aisladas de animales y humanos. Los patógenos resistentes plantean un grave problema para la avicultura intensiva, ya que pueden perpetuar la enfermedad en la granja, aumentar costos de producción y medicación; además de incrementar la morbilidad y mortalidad (Martinez & Cortés, 2012).

El aislamiento de cepas resistentes a múltiples agentes antimicrobianos a partir de aves representa en sí mismo, una de las principales preocupaciones en el área de salud pública, ya que estas bacterias representan una fuente potencial de genes de resistencia que pueden transferirse a los miembros de la microbiota intestinal del humano y crear resistencia a los antimicrobianos (Martinez & Cortés, 2012).

A lo largo del tiempo se han ido implementando, por medio de la alimentación, diversos productos que ayuden en el control de contaminantes alimentarios que afecten la salud de los animales, principalmente contaminantes de tipo biológico. Un desafío modernista en la producción avícola es explotar el uso de suplementos dietéticos específicos para impulsar el potencial intrínseco de las aves. Después de la prohibición del uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la nutrición animal, los nutricionistas e investigadores intentaron otras alternativas que afirmaban mejorar el rendimiento del pollo de engorde (Adil *et al.*, 2010); debido a esto, se ha implementado el término de alimento funcional.

7. Alimentos funcionales

Un alimento funcional, se puede definir como un alimento convencional de origen natural que es consumido como parte de una dieta normal, pero que ha sido adaptado o suplementado mediante varias estrategias con uno o varios componentes de tipo biótico (prebióticos, probióticos, simbióticos, ácidos, omega 3, 6, etc.)(Salminen *et al.*, 1998), para proporcionar efectos de tipo benéfico y fisiológico en las funciones normales del organismo del huésped, además de poseer efectos nutricionales (Roberfroid, 1999).

Para que un alimento pueda ser considerado como funcional tiene que cumplir con alguna de las siguientes características:

1. Que en alguno de sus componentes alimenticios (nutrientes o no) genere efectos benéficos en una o varias funciones del organismo.
2. Poder generar, un efecto fisiológico mayor que el efecto generado en la nutrición tradicional (Roberfroid, 1999).

Una de estas alternativas fue el uso de ácidos orgánicos y aceites esenciales como aditivos alimentarios en la producción animal.

8. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos se distinguen de otros ácidos por el grupo funcional COOH que se puede unir a un grupo orgánico o a un átomo de hidrógeno. Los nombres comunes usados para describir este grupo de compuestos orgánicos incluyen ácidos grasos, grasos volátiles, lipofílicos, débiles o carboxílicos. Los ácidos orgánicos se pueden agrupar arbitrariamente según la longitud de la cadena de carbono, es decir ácidos grasos de cadena corta (por sus siglas en inglés , SCFA), ácidos grasos de cadena media (por sus siglas en inglés, MCFA) y ácidos grasos de cadena larga (por sus siglas en inglés, LCFA), que contienen 1-6, 7-10 y 11 o más átomos de carbono, respectivamente (Cherrington *et al.*, 1991).

Funciones

En general, estos compuestos tienen gran variedad de aplicaciones que proporcionan efectos benéficos para las aves, debido a esto han sido introducidos cada vez más en sus dietas, por ejemplo, han sido reportados como método de protección para pollos jóvenes por exclusión competitiva (La Ragione & Woodward, 2003), mejoramiento de la utilización de nutrientes, crecimiento y eficiencia de conversión alimenticia (Denli *et al.*, 2003). Los ácidos orgánicos en forma no disociada (no ionizada, más lipofílico) pueden penetrar la pared celular de las bacterias y alterar la fisiología normal de ciertos tipos de bacterias (Dhawale, 2005). Además de la actividad antimicrobiana, reducen el pH de la digestión, aumentan la secreción pancreática y tienen efectos tróficos sobre la mucosa del tracto gastrointestinal (Dibner &

Buttin, 2002). Se ha informado que la acidificación con diversos ácidos orgánicos reduce la producción de componentes tóxicos por las bacterias y colonización de patógenos en la pared intestinal, y así la prevención del daño a las células epiteliales (Langhout, 2000), también mejoran la digestibilidad de proteínas, calcio, fósforo, magnesio y zinc; y sirven como sustratos en el metabolismo intermediario (Kirchgessner & Roth, 1988). Los ácidos orgánicos han hecho una gran contribución a la rentabilidad en la producción avícola y también han proporcionado a las personas productos avícolas saludables y nutritivos (Moharrery & Mahzonieh, 2005; Patten & Waldroup, 1988; Ricke, 2003).

Mecanismo de acción de los ácidos orgánicos en la dieta

No se ha esclarecido del todo el modo de acción de los ácidos orgánicos en las dietas animales; esta comprensión incompleta ha limitado la aplicación de ácidos orgánicos en las dietas de engorde. Sin embargo, varios mecanismos posibles se han propuesto y la mayor parte de ellos se han asociado a: (1) disminución del pH en dietas y la subsecuente reducción del pH en el tracto gastrointestinal (TGI), (2) mejora en la utilización de nutrientes en las dietas aumentando la retención de éstos, y (3) inhibición del crecimiento bacteriano patógeno (Afsharmanesh & Pourreza, 2005; Mroz, 2005). Se han realizado investigaciones adicionales para dilucidar el modo de acción de los ácidos orgánicos dietéticos en varias especies animales (Kim *et al.*, 2015).

- Efectos sobre el pH del tracto gastrointestinal

El grado de reducción del pH en las dietas y en la digestión por los ácidos orgánicos dietéticos es probablemente dependiente de los valores PKA de los ácidos orgánicos respectivos y las condiciones de pH del TGI (Kim *et al.*, 2005). Como era de esperarse, el pH de las dietas de engorde se redujo claramente con el aumento de los niveles de inclusión de los ácidos orgánicos dietéticos en una forma dependiente de la dosis, como también se observó en las dietas porcinas (Kil *et al.*, 2011). Posteriormente, la adición de ácidos orgánicos a las dietas de pollos de engorda dio lugar a la reducción del pH de digestivo en varias partes del TGI. En general, el grado de reducción de pH generalmente fue mayor en la parte superior de TGI (buche, proventrículo y molleja) en comparación con la parte inferior del TGI (duodeno, yeyuno, íleon y ciego). Se ha informado que sólo pequeñas cantidades de ácidos orgánicos agregados en las dietas pueden llegar a la parte inferior del TGI porque los ácidos orgánicos son muy fácilmente absorbidos en la parte superior del TGI. Esto puede explicar la carencia de la reducción del pH en la parte más inferior del TGI como resultado de los ácidos orgánicos en la dieta. En conjunto, los datos indican que los efectos de los ácidos orgánicos de la dieta en el pH del TGI se pueden limitar a la parte superior en pollos de engorde (Kim *et al.*, 2015).

- Efectos sobre la utilización de nutrientes

El pH reducido en la parte superior del TGI puede aumentar la digestibilidad de nutrientes y, por lo tanto, la utilización de éstos en las dietas. En el estómago, una reducción en

el pH gástrico activa el pepsinógeno y otros zimógenos ajustando la acidez gástrica más cercana a la requerida para la actividad óptima (Jongbloed et al., 2000); esta actividad enzimática aumentada puede mejorar la digestión de proteínas y posiblemente la de otros nutrientes. Además, la digestión ácida puede disminuir el vaciamiento gástrico, y por lo tanto proporcionar más tiempo para la digestión de nutrientes en el TGI (Kidder & Manners, 1978; Mayer, 1994). Varios investigadores han demostrado que la suplementación en la dieta de ácidos orgánicos puede mejorar la retención de proteínas y otros nutrientes (Kim *et al.*, 2015).

- Efectos sobre agentes patógenos

Un aumento de la población de bacterias patógenas en el TGI a menudo resulta en menor rendimiento de crecimiento en los pollos. Por lo tanto, la prevención del crecimiento excesivo bacteriano patógeno en el TGI puede ser una de las estrategias más importantes para mejorar el rendimiento de crecimiento cuando no se utilizan antibióticos promotores del crecimiento (AGPs) suplementados en las dietas animales. Los ácidos orgánicos fácilmente pueden penetrar la pared celular de las bacterias y alterar las funciones celulares normales, incluida la replicación y síntesis de proteínas de las bacterias (Davidson & Matthew, 2012; Denyer & Stewart, 1998). López *et al.*, (2012) han propuesto tres mecanismos secuenciales de acción bactericida de los ácidos orgánicos: (1) forma ácida de los ácidos orgánicos (forma protonada) puede penetrar a través de la pared celular de las bacterias, (2) los ácidos orgánicos introducidos dentro de las células bacterianas se disocian en forma de base conjugada (forma no protonada) con una concomitante reducción en el pH celular, y (3) disminuye el pH y crea un

ambiente estresante que conduce a disfunciones celulares y así evita el crecimiento bacteriano. Tales reacciones suelen ocurrir principalmente con especies bacterianas sensibles al pH, que incluyen una amplia gama de bacterias patógenas. Akyurek *et al.*, (2011) informaron que los pollos alimentados con dietas que contienen mezclas de ácidos orgánicos tenían menos cargas bacterianas patógenas como coliformes y clostridios, pero mayor carga de bacterias beneficiosas tales como lactobacilos en el íleon en comparación con los alimentados con dietas que contenían AGPs. También es probable que el pH disminuido en el TGI inducido por ácidos orgánicos de la dieta puede jugar un papel en la prevención de la transferencia bacteriana de la dieta o del medio ambiente (Kim *et al.*, 2015).

Sin embargo, no todos los ácidos orgánicos se han utilizado como aditivos alimenticios en las dietas avícolas. Los ácidos grasos de cadena corta como el ácido fórmico (C1), acético (C2), propiónico (C3), butírico (C4), y otros ácidos carboxílicos como el ácido láctico, málico, tartárico, fumarico y cítrico han sido los más comúnmente utilizados en la industria avícola porque su producto químico y las propiedades físicas son aplicables a las dietas avícolas (Kim *et al.*, 2015). El ácido cítrico (AC) es uno de los aditivos alimentarios más ampliamente utilizado, comúnmente como conservador, acidulante, agente de control de pH, potenciador del sabor y antioxidante en muchos alimentos. Su producción mundial se estima que está acercándose a 45 toneladas por año (Tránsito *et al.*, 2011).

9. Ácido cítrico

El ácido cítrico (AC, $C_6H_8O_7$) (figura 4) se distribuye ampliamente en tejidos animales y vegetales. Se encuentra en concentraciones altas en frutos cítricos, pero además es un

intermediario en el ciclo de Krebs, por el que hidratos de carbono se oxidan a dióxido de

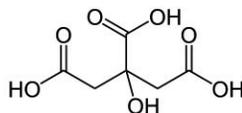


Figura 4.

Molécula de ácido cítrico.

carbono(Wright & Hughes, 1976).

El ácido cítrico ha sido ampliamente utilizado como un suplemento en la dieta para cerdos y pollos. El ácido cítrico muestra actividad antimicrobiana suficiente para preservar el alimento contra el deterioro bacteriano, pero al mismo tiempo reduce los niveles de bacterias indeseables (ej. *E. coli*) en el TGI (Deepa *et al.*, 2011; Eidelsburger & Kirchgessner, 1994; Falkowski & Aherne, 1984).

Kim *et al.*, (2015), analizaron ocho experimentos anteriores con diferentes niveles de inclusión de AC en la dieta. Los datos indicaron que la dieta con ácido cítrico generalmente condujo al aumento de peso corporal y conversión alimenticia, pero menor consumo de alimento en pollos. La mejora promedio en ganancia de peso corporal y la conversión alimenticia fueron 4.7 y 6.0%, respectivamente.

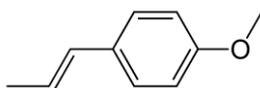
10. Aceites esenciales

Además de los ácidos orgánicos, los aditivos fitogénicos se han utilizado extensamente. Éstos incluyen una amplia gama de plantas (por ejemplo, tomillo, jengibre, cúrcuma, canela, anís) y compuestos derivados de plantas como aceites esenciales y oleorresinas. Investigadores

informaron efectos positivos al complementar dietas para cerdos y aves de corral con ácidos orgánicos y aceites esenciales en la mejora de crecimiento y eficiencia de alimentación (Gheisar *et al.*, 2015).

11. Anetol

El anís (*Pimpinella anisum L.*) es una planta aromática que se utiliza por su efecto estimulante sobre la digestión, su efecto antiparasitario (Cabuk *et al.*, 2003), antibacteriano (Singh *et al.*, 2002; Tabanca *et al.*, 2003), antifúngico (Soliman & Badeaa, 2002), antipirético (Afifi *et al.*, 1994) y laxante. Algunos estudios informaron que la adición de algunas plantas aromáticas y sus componentes en los alimentos o el agua ingerida por los animales, mejoró la ganancia de peso vivo, la ingesta de alimento, la tasa de conversión alimenticia y el rendimiento



de la canal (Alçiçek *et al.*, 2003; Bassett, 2003; Hertrampf, 2001; Tucker, 2002).

Figura 5.

Molécula de anetol.

El aceite de anís se utiliza como sustancia aromatizante en productos de panadería, dulces, helados, chicles y bebidas alcohólicas (Charal, 2014).

El aceite de anís, y su componente principal anetol, han mostrado cierta actividad antimicrobiana contra el crecimiento bacteriano aeróbico y anaeróbico (Gülçin *et al.*, 2003; Kubo & Fujita, 2001; Wang *et al.*, 2011). La ventaja del anetol es su efecto sobre piensos y

alimentos evaluados en cerdos y perros (Wang *et al.*, 2011), que son más sensibles a los sabores y olores que los pollos (Sneddon et al., 1998). Los seres humanos pueden tolerar más de 100 ppm de aceite de anís si se ingieren, lo que lo convierte en un producto seguro para la manipulación humana. Sin embargo, no hay evidencia de toxicidad o el nivel máximo que se puede administrar a los pollos (Charal, 2014).

Cuando se combina el ácido cítrico con el anís (anetol) se logra mantener un control microbiano sinérgico con ventajas en la digestión de nutrientes de la dieta de las aves.

III) JUSTIFICACIÓN

En el tracto digestivo existen una serie de bacterias que conforman a la microbiota intestinal, ejerciendo varias acciones como establecer una competencia contra bacterias patógenas, degradación de alimentos para una mejor absorción de los nutrientes, pH estable, etc. Desde hace ya varios años atrás se han buscado alternativas no antibióticas para mantener una salud e integridad intestinal con base en mantener un microbiota estable. Por lo que desde la década de los 40´s se habla de una serie de alimentos denominados como “funcionales”, actualmente también llamados alimentos “eubióticos”, que tienen la finalidad de mejorar la absorción de los nutrientes que proporcionan los alimentos balanceados. Diversos investigadores han reportado un aumento de la ganancia de peso hasta un 5% con el uso de aditivos eubióticos. La actual legislación nacional, así como, la mundial han implementado una serie de medidas y reglamentos que regulan el uso de antibióticos promotores de crecimiento, con la clara tendencia de dejarlos de usar en la producción agropecuaria, con la finalidad de evitar o minimizar la resistencia a antibióticos en la salud humana. Por lo que los alimentos funcionales o eubióticos son considerados una alternativa y así evitar el uso indiscriminado de antibióticos como promotores de crecimiento (APC). Una alternativa del uso de eubióticos es la utilización en alimento de ácido cítrico y los derivados del anís (anetol). Éste estudio está encaminado en evaluar el efecto de una mezcla de eubióticos a base a cítricos y anetol y evaluar su efecto

sobre las variables hematológicas y respuesta inmune en pollos de engorda, con la finalidad de determinar en primer lugar, que éstos eubióticos no tengan efectos negativos en el pollo de engorda y que tienen un efecto benéfico al estar presente una bacteria patógena.

IV) HIPÓTESIS

La adición de un eubiótico a base de ácido cítrico y anetol en el alimento para pollos de engorda y desafiado con una cepa de *E. coli* enteroinvasiva, mostrará una mejor respuesta de defensa inespecífica y específica.

V) OBJETIVOS

- **Objetivo general**

- ❖ Evaluar el efecto de un eubiótico comercial a base de ácido cítrico y anetol sobre los valores hematológicos y respuesta inmune en pollos de engorda desafiados con una cepa de *Escherichia coli* enteroinvasiva.

- **Objetivos particulares**

- ❖ Evaluar la eficacia de un eubiótico comercial a base de ácido cítrico y anetol sobre variables hematológicas (hematocrito, proteínas totales, conteo eritrocitario y leucocitario), en pollos de engorda desafiados o no con una cepa de *Escherichia coli* enteroinvasiva.
- ❖ Evaluar la eficacia de un eubiótico comercial a base de ácido cítrico y anetol sobre la respuesta inmune celular mediante la prueba de hipersensibilidad

cutánea en pollos de engorda desafiados o no con una cepa de *Escherichia coli* enteroinvasiva.

VI) DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria laboratorio 14 “Alimentos, Micotoxinas y Micotoxicosis” y bioterio perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, ubicada sobre carretera Cuautitlán–Teoloyucan km. 2.5, colonia San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54714.

1. Animales experimentales

Se utilizaron 60 pollos de engorda de un día de edad ambos sexos, estirpe Cobb 500. El diseño experimental consistió en 4 tratamientos de 5 aves con 3 repeticiones (Tabla 2), con un peso inicial promedio de 35 gramos, los cuales fueron adquiridos en una casa criadora comercial. Las aves se mantuvieron en 4 corraletas en piso.

Tabla 2

Distribución de tratamientos.

Tratamiento	Número de aves
Control	15
Ac. cítrico y anetol (ACA)	15
<i>Escherichia coli</i>	15
ACA con <i>Escherichia coli</i>	15

La longitud de cada corraleta fue de 55 x 110 cm, con 5 aves por corraleta. Se utilizó cama de paja de avena con un espesor aproximado de 10 cm. La temperatura se mantuvo con lámparas infrarrojas de luz blanca de acuerdo a la edad de las aves. En la tabla 3 se muestran las temperaturas por semana que se manejaron durante la crianza de las aves.

Tabla 3

Temperatura adecuada por edad de las aves.

Edad	Temperatura en °C
1° - 2° día	32 - 33
3° - 7° día	29 - 30
2 ^a semana	27 - 29
3 ^a semana	25 - 27
4 ^a semana	23 - 25
5 ^a semana en adelante	21 - 23

(Quintana, 2011).

Con excepción del grupo control y el grupo tratado con ácido cítrico y anetol, los dos grupos restantes fueron inoculados al día 18 con una cepa de *Escherichia coli* enteroinvasiva. El experimento tuvo una duración de 35 días.

2. Alimento

El alimento y el agua se proporcionaron ad libitum. El alimento fue adquirido de una casa comercial ubicada en el municipio de Cuautitlán Izcalli. Las etapas de alimentación fueron iniciación desde del día 1 al 21 y de crecimiento del día 21 al 35 de edad de las aves (tabla 4).

La inclusión del suplemento alimenticio a base de ácido cítrico y anetol (ACA) se hizo con base

Tabla 4

Composición del alimento comercial

	Iniciador	Crecimiento
Proteína total %		
Mínimo	21	20
Grasa total %		
Mínimo	5	5
Cenizas %		
Mínimo	6	6
Humedad %		
Mínimo	12	12
Fibra %		
Mínimo	3	3
E. L. N.	53	54

en las recomendaciones del fabricante a 0.5 Kg/Ton de alimento (Tabla 5).

Tabla 5

Fórmula del suplemento alimenticio.

Ácido cítrico	80%
Anetol	3%

3. Inóculo bacteriano

Se utilizó una cepa de *E. coli* enteroinvasiva previamente caracterizada y donada por el Dr. Guillermo Valdivia Anda, laboratorio 3 “Patogénesis Microbiana” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria-FESC-UNAM, obtenida de un caso de campo y clasificada a través de pruebas

bioquímicas, la concentración del inóculo fue a razón de 1×10^8 UFC/ml por ave. Las aves fueron desafiadas vía sondeo esofágico hasta llegar a la ingluvia (Gonzales *et al.*, 2010).

4. Respuesta inmune celular

La evaluación de la respuesta inmune celular se llevó a cabo los días 20 y 21 de edad, empleándose 3 aves por tratamiento. La respuesta inmune celular se evaluó mediante la prueba de hipersensibilidad cutánea como respuesta a la inoculación intradérmica de fitohemaglutinina (PHA).

La evaluación se desarrolló como respuesta a la inoculación intradérmica en la membrana interdigital entre el 3er y 4º dígito de la pata derecha con PHA a una concentración de 0.1 mg/0.1 ml. En la membrana interdigital de la pata izquierda se realiza el mismo procedimiento utilizando PBS (0.1 ml) como control.

La evaluación post-inoculación se realizó a las 6, 12 y 24 horas post-inoculación, determinando el grosor de la membrana interdigital con un vernier digital (digital caliper®).

Posteriormente se realizó el cálculo utilizando la siguiente fórmula:

Incremento de grosor en la membrana = grosor pata derecha - grosor pata izquierda

(Verduzco, 2009).

5. Hematología

Al día 35 del experimento, se tomaron 6 aves por tratamiento para la obtención de las muestras sanguíneas utilizando la técnica de punción cardiaca, recolectando en promedio 5ml de sangre por ave. De los 5ml obtenidos 1 ml se mezcló en tubos para muestras con

anticoagulante (EDTA), para la posterior determinación de hematocrito (porcentaje de glóbulos rojos en las células sanguíneas), de proteínas totales y conteo celular (Noriega, 2003).

a) Hematocrito

Para el cálculo del hematocrito se utilizaron tubos capilares sin anticoagulante para microhematocrito por muestra. Los tubos se llenaron hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad introduciéndolos en la muestra de sangre, posteriormente se limpiaron y sellaron. Una vez sellados se centrifugaron por 5 minutos a 2500rpm, para su posterior lectura en el lector para microhematocrito. Los valores obtenidos se expresaron en porcentaje (Noriega, 2003).

b) Proteínas plasmáticas

La determinación de las proteínas plasmáticas se obtuvo a través del refractómetro de Goldberg que se utilizó para la lectura, se tomó en cuenta la escala izquierda para determinar la concentración total de proteínas en el plasma, el resultado obtenido se expresó en g/dl (Núñez, 2007).

c) Conteo eritrocitario

Para el recuento de eritrocitos se utilizó una pipeta de Thoma para glóbulos rojos la cual se llenó hasta la marca de 0.5 con la muestra sanguínea y posteriormente se rellenó con la solución de Natt y Herrick hasta la marca de 101, se agitó y desechó las primeras 6 gotas. Posteriormente se colocó una gota de la muestra diluida en la cámara de Neubauer y se dejó sedimentar durante uno a cinco minutos antes de realizar el recuento. Para obtener los valores se contaron los cuatro cuadrados de las esquinas y el central de la cuadrícula central de la

cámara. Los valores obtenidos se expresan en número total de eritrocitos/ mm^3 (Silvestre *et al.*, 2011).

d) Conteo leucocitario

El recuento de leucocitos se realizó de la misma manera que para el de glóbulos rojos, en este caso, para obtener los valores se contaron los leucocitos presentes en los 4 campos de la cámara de Neubauer, se sumó el 10 % y se multiplicó el valor por 200. El resultado obtenido se expresa en número de leucocitos/ mm^3 (Silvestre *et al.*, 2011).

e) Conteo diferencial

Para el recuento diferencial leucocitario se realizó un frotis sanguíneo con cada muestra, que posteriormente fue teñido utilizando la tinción de Wright, fijado y montado para su lectura al microscopio a un aumento de 40x y 100x, la cual se realizó en el área de la monocapa del frotis. Para obtener los valores se realizó el conteo de 100 leucocitos que deben de ser diferenciados morfológicamente clasificándolos en heterófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos. El valor obtenido se expresó en porcentaje (Núñez, 2007).

VII) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se evaluaron a través de un ANDEVA completamente al azar. Para los datos expresados en porcentajes, se realizó una transformación a arco-seno para su posterior análisis estadístico. Para la comparación de medias se utilizó la prueba HSD de Tukey con un valor de significancia de $p < 0.05$. Los datos fueron analizados mediante el uso del paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1.

VIII) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

HEMATOLOGÍA

Hematocrito

Tabla 6

Valores promedio (%) de la determinación de hematocrito al día 35 de edad de las aves.

Tratamiento	%
C	31,33 ± 1,40 ^a
ACA	31,67 ± 0,99 ^a
EC	31,5 ± 1,39 ^a
ACA+EC	31,83 ± 0,734 ^a

C: control (sin adición de ácido cítrico+anetol ni EC); **ACA:** ácido cítrico + anetol ([0.5 Kg; ACA/Ton de alimento]); **EC:** concentración de *E. coli* 10⁸ UFC/ave; **ACA+EC:** ácido cítrico + anetol ([0.5 Kg ACA/Ton de alimento]) + concentración de *E. coli* de 10⁸ UFC/ave. Media ± error estándar. Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05).

El análisis sanguíneo que corresponde al hematocrito (tabla 6) mostró que en promedio las aves con el mayor porcentaje de hematocrito por décimas fue el del tratamiento ACA+EC (31.8%) y el menor para C (31.3%). Sin embargo, ninguno de los tratamientos mostró diferencia estadística significativa (p>0.05), siendo en promedio del hematocrito para todos los tratamientos del 31%.

Charles *et al.*, (2003) mencionan que el hematocrito de un ave sana se encuentra en un rango de 29 a 55%, los resultados obtenidos en este estudio están dentro del valor normal descrito. El amplio rango del porcentaje mostrado por éste autor, indica que la aves de este proyecto no fue alterado ni por la presencia del eubiótico y/o de la bacteria, similar a lo reportado por Godbole *et al.*, (2018), Huff *et al.*, (2008) y Sharma *et al.*, (2016), quienes también realizaron desafíos con *E. coli*.

Investigadores como Isaza *et al.*, (2019), Fatttah *et al.*, (2008), Saad *et al.*, (2014) y Flamand *et al.*, (2014) reportaron un mejor porcentaje de eritrocitos al utilizar eubióticos en la dieta de pollos de engorda, explicando que ayudan a disminuir el nivel de peróxido lipídico en la membrana de los glóbulos rojos.

Tampoco se pudo observar en éste estudio un beneficio al utilizar eubióticos sobre el porcentaje de eritrocitos.

Una explicación para no ver afectado el porcentaje de eritrocitos es que los rangos de referencia utilizados son amplios en condiciones normales, además que, la médula ósea tiene una gran capacidad de adaptación a un en condiciones adversar. Es importante mencionar que el porcentaje de eritrocitos no es un valor muy preciso, ya que se puede ver afectado por factores como el volumen de agua en un organismo.

Proteínas totales

Tabla 7

Proteínas plasmáticas totales (g/dl) valores promedio al día 35 de edad de las aves.

Tratamiento	g/dl
C	2,42 ± 0,09 ^a
ACA	2,72 ± 0,02 ^a
EC	1,6 ± 0,09 ^b
ACA+EC	2,43 ± 0,13 ^a

C: control (sin adición de ácido cítrico+anetol ni EC); **ACA:** ácido cítrico + anetol ([0.5 Kg; ACA/Ton de alimento]); **EC:** concentración de *E. coli* 10⁸ UFC/ave; **ACA+EC:** ácido cítrico + anetol ([0.5 Kg ACA/Ton de alimento]) + concentración de *E. coli* de 10⁸ UFC/ave. Media ± error estándar. Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05).

En la tabla 7 se puede observar la concentración promedio por tratamiento de proteínas séricas totales. Las aves del tratamiento (ACA) mostraron una concentración de 2.72 g/dl, seguidos de los grupos (ACA+EC) y (C) con 2.43 y 2.42 g/dl respectivamente, no mostrando diferencia estadística entre ellos (p>0.05). Sin embargo, las aves que no consumieron eubióticos en el alimento, pero que si fueron desafiados con *E. coli* mostraron la concentración más baja de proteínas totales séricas (1.6 g/dl), las aves de este último tratamiento mostraron diferencia estadística significativa (p<0.05) al compararlos con los otros tratamientos.

Noriega, (2003) menciona que los valores normales de proteínas totales son de 2.5 g/dl, que se observa en las aves del grupo control, ACA y ACA+EC ($p < 0.05$). Se ha descrito que las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas intestinales, como las causadas al estar presente *E. coli*, conducen a cambios morfológicos intestinales, daño epitelial y aumento de la permeabilidad de la mucosa y baja capacidad de absorción de nutrientes lo que explica una disminución en las proteínas plasmáticas al no tener materia prima (aminoácidos) disponibles para su síntesis a nivel hepático, lo que se puede apreciar en este estudio el estar presente la bacteria. En un experimento realizado por Yesilbag y Çolpan (2006) reportaron un aumento significativo en los valores de proteínas totales de los grupos de aves a los que se les proporcionó una mezcla de eubióticos a base de ácidos orgánicos en su dieta. Estos investigadores explican que la suplementación con ácidos orgánicos tiene un efecto positivo en el metabolismo y síntesis de las proteínas, ya sea por una mejora de la absorción intestinal de aminoácidos en condiciones ácidas y/o coadyuvando a un buen funcionamiento hepático por los efectos antioxidantes de los eubióticos.

Conteo diferencial

Tabla 8.

Cantidad promedio de eritrocitos y leucocitos al día 35 de edad de las aves (número de células/microlitro).

Tratamiento	Eritrocitos millones/ μ L	Leucocitos/ μ L
C	1,97 \pm 91593,0 ^b	14103,3 \pm 1461,76 ^a
ACA	2,15 \pm 112152,0 ^c	14323,3 \pm 1012,09 ^a
EC	1,42 \pm 68582,6 ^b	20470,6 \pm 2601,88 ^b
ACA+EC	1,95 \pm 209914,0 ^b	15616,7 \pm 1772,99 ^a

C: control (sin adición de ácido cítrico+anetol ni EC); **ACA:** ácido cítrico + anetol ([0.5 Kg; ACA/Ton de alimento]); **EC:** concentración de *E. coli* 10⁸ UFC/ave; **ACA+EC:** ácido cítrico + anetol ([0.5 Kg ACA/Ton de alimento]) + concentración de *E. coli* de 10⁸ UFC/ave. Media \pm error estándar. Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05).

En la tabla 8 se observa que el número de eritrocitos para las aves del tratamiento control fue de 1.97 millones de eritrocitos/mm³ similar al valor obtenido para el grupo ACA+EC que fue de 1,95 millones de eritrocitos/ μ L a pesar de haber sido desafiado con la bacteria; el tratamiento que fue desafiado con *E.coli* sin la adición del eubiótico obtuvo valores de 1.42 millones de eritrocitos/ μ L , mostrando diferencia entre las aves de los tratamientos control y ACA

($p < 0.05$). Cabe destacar que el mayor número de eritrocitos/ mm^3 de sangre se observó en las aves del tratamiento ACA.

Al comparar los resultados correspondientes al conteo eritrocitario de las aves, obtenidos en este estudio con los reportados por Harrison (2006), quien nos indica valores normales desde 1.4 hasta 3.3 millones de eritrocitos/ μL , observamos que se encuentran dentro de rango; sin embargo, a pesar de no observarse diferencia estadística con las aves de los tratamientos C y ACA+EC si se observa una alteración en las aves desafiadas sólo con *E. coli*. Autores como Huff *et al.*, (2008) y Sharma *et al.*, (2016) indican una disminución considerable de este valor en los grupos de aves desafiados con *E. coli*. Esta disminución en la cantidad de eritrocitos podría tener su explicación en que las aves presentan inapetencia y episodios de diarrea, que conducen a deficiencias nutricionales y esto a sí mismo a una disminución en el número de eritrocitos que provocando una disminución en el porcentaje de glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina en los grupos infectados (Sharma *et al.*, 2016). El eritrocito de las aves, como el de mamífero, tiene como principal función el transporte e intercambio de oxígeno y dióxido de carbono. Los pollos de engorda son sometidos a crianza intensiva para obtener una mayor ganancia de peso en corto tiempo, lo que ocasiona una elevación en su metabolismo basal, haciendo que el animal requiera una mayor distribución de oxígeno a sus tejidos para producción de energía (Ocampo *et al.*, 2012). El organismo necesita oxígeno para que las células puedan ejercer su función respiratoria y generar ATP, por lo que una oxigenación deficiente debido a una disminución en la cantidad de eritrocitos provoca hipoxia tisular y alteraciones funcionales en las células. Como consecuencia de este estrés se presentan

modificaciones estructurales y funcionales en prácticamente todos los sistemas celulares y tejidos (Torres *et al.*, 2009). Esto predispone a diversas enfermedades, que afectan la producción teniendo como consecuencia retardo en el crecimiento, aumento de la mortalidad, disminución en las ganancias de peso y aumento en la conversión alimenticia (López *et al.*, 1991). Por lo que, aunque no se muestra diferencia estadística, si hay un efecto negativo en las variables productivas, como se observa en este estudio.

Con respecto al uso de suplementos alimenticios a base de ácidos orgánicos y/o aceites esenciales autores como Abudabos *et al.*, (2015), Ndelekwute, (2018), Nguyen *et al.*, (2018) y Ur Rehman *et al.*, (2016) no reportan diferencias significativas en los valores de eritrocitos de aves suplementadas con ácidos orgánicos. En otros estudios autores como Al Kassie, (2009), Attia *et al.*, (2019) y Toghyani *et al.*, (2010) sí reportan aumentos significativos en el número de eritrocitos de aves suplementadas con aceites esenciales, similar a lo observado en este estudio, ya que, el grupo al que se le proporcionó el suplemento alimenticio comercial sin desafío con *E. coli* obtuvo los valores más altos de los cuatro tratamientos, además de que el grupo al que se le proporcionó el suplemento comercial y fue desafiado con la bacteria no se vio afectado. Se ha estudiado que el efecto antioxidante de los aceites esenciales puede ayudar a disminuir el nivel de peróxido lipídico en la membrana de los glóbulos rojos disminuyendo su destrucción y por lo tanto la hemólisis (Toghyani *et al.*, 2010).

Con respecto al conteo leucocitario las aves de los cuatro tratamientos obtuvieron valores dentro del rango normal (14000–44000/ μ L) según lo descrito por Charles Noriega

(2003) a pesar de ello, se destaca que el grupo desafiado con *E. coli* presenta los valores más altos. Esto concuerda con Godbole et al., (2018) en cuyos resultados se observa un incremento notable en el conteo total de leucocitos de los grupos desafiados con *E. coli* respecto al grupo control. Benjamin, (2003) indica que un aumento en el recuento de leucocitos está asociado a infecciones localizadas o generalizadas, necrosis de tejidos y hemorragias. Esto se asocia a la infección por *E. coli* debido al daño tisular que genera en la invasión de células, principalmente del tracto gastrointestinal, según lo indicado por García et al., (2016) y lo observado en las aves del tratamiento. Es importante resaltar que, en este estudio, el tratamiento de ACA+EC, aunque no se mostró un aumento marginal en comparación con los tratamientos no desafiados con *E. coli* ($p > 0.05$) inferimos que al mantener una integridad y salud intestinal constante la *E. coli* no tiene oportunidad de afectar significativamente a las aves. Autores como Al Saad et al., (2014), Kim et al., (2014), Wang et al., (2010) y Isaza et al., (2019) manifiestan que el tejido linfoide asociado del tracto gastrointestinal es influenciado positivamente por la modulación que ejercen los ácidos orgánicos sobre la microbiota en el tracto digestivo, al observar aumento en el recuento de las células de la línea blanca después de suplementar la dieta de las aves con una mezcla de ácidos orgánicos. Además, los aceites esenciales contienen compuestos que se sabe que poseen fuertes propiedades antiinflamatorias, principalmente terpenoides y flavonoides, que suprimen el metabolismo de las prostaglandinas (Krishan & Narang, 2014).

Tabla 9

Valores promedio del conteo diferencial en el muestreo realizado al día 35 de edad de las aves (%).

Tratamiento	TIPO CELULAR				
	HETERÓFILOS %	LINFOCITOS %	BASÓFILOS %	MONOCITOS %	EOSINÓFILOS %
C	41,8 ± 1,33 ^a	47,4 ± 1,83 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	3,47 ± 0,20 ^a	0,2 ± 0,1 ^a
ACA	41,73 ± 3,43 ^a	48,0 ± 2,46 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	3,53 ± 0,36 ^a	0,07 ± 0,06 ^a
EC	56,6 ± 1,41 ^b	45,47 ± 2,72 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	5,67 ± 0,54 ^b	0,27 ± 0,11 ^b
ACA+EC	41,52 ± 1,75 ^a	53,25 ± 1,20 ^c	0,17 ± 0,11 ^a	3,7 ± 0,23 ^a	0,18 ± 0,11 ^a

C: control (sin adición de ácido cítrico+anetol ni EC); **ACA:** ácido cítrico + anetol ([0.5 Kg; ACA/Ton de alimento]); **EC:** concentración de *E. coli* 10⁸ UFC/ave; **ACA+EC:** ácido cítrico + anetol ([0.5 Kg ACA/Ton de alimento]) + concentración de *E. coli* de 10⁸ UFC/ave. Media ± error estándar. Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05).

El porcentaje de heterófilos fue mayor en las aves desafiadas con *E. coli* exclusivamente (p<0.05). Noriega (2003) reportó que valores superiores a 45% de heterófilos se consideran anormales y Silvestre *et al.*, (2011) refieren que los heterófilos, son principalmente células fagocitarias de la primera línea de defensa y por tanto, un incrementos significativos en su

recuento, se asocian con enfermedades inflamatorias agudas, especialmente infecciosas de tipo bacteriano o que supongan un daño tisular, por lo cual en este estudio en el cual se controló la variable de infección al desafiar con *E.coli* y que las demás aves de los otros tratamientos estuvieron en el mismo lugar físico, el incremento de heterófilos es un reflejo directo de la invasión y respuesta causada por el desafío con la bacteria. Angeles, (2002) explica que el mecanismo de patogenicidad de *E. coli* es la invasión del epitelio intestinal; el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes, lo que indica un daño tisular. En contraste observamos que los tratamientos ACA y ACA+ EC tuvieron los valores más bajos, esto podría indicar una menor respuesta inflamatoria. Autores como Fang *et al.*, (2017), Kroismayr *et al.*, (2008) Wondrak *et al.*, (2010) y Zou *et al.*, (2016) han demostrado que los aceites esenciales manipulan factores de transcripción para suprimir la inflamación. Se ha dado a conocer que las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas intestinales a menudo conducen a cambios morfológicos intestinales, daño y aumento de la permeabilidad de la mucosa, desarrollo comprometido del intestino y baja capacidad de absorción de nutrientes (Nagura *et al.*, 2001; Podolsky, 2011; Strober *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 1999). Aunque la inflamación no cause en algunas ocasiones signos clínicos completos, conduce a una reducción significativa del rendimiento de crecimiento y causa una pérdida económica considerable en la producción. Omonijo *et al.*, (2018) explican que dado que la inflamación intestinal no solo perjudica la

función y la integridad del intestino, sino que también afecta el rendimiento del crecimiento, son necesarias estrategias dietéticas para inhibir el proceso inflamatorio en el intestino.

Los valores de linfocitos de las aves para los cuatro grupos se encuentran dentro del rango normal para aves sanas (35–76%) (Noriega, 2003), sin embargo el grupo que fue desafiado por la bacteria presenta los valores más bajos mostrando diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). Resultados similares se observan en un estudio realizado por Sharma *et al.*, (2016) en el cual los valores de linfocitos obtenidos para el grupo desafiado con *E. coli* fueron menores. El valor más alto presentando diferencia estadística significativa respecto a los demás tratamientos ($P < 0.05$) se obtuvo del grupo al que se le proporcionó el suplemento eubiótico desafiado con la bacteria. De acuerdo con lo reportado por autores como Al Saad *et al.*, (2014), Kim *et al.*, (2014) y Wang *et al.*, (2010) observaron un aumento en el recuento de las células de la línea blanca después de suplementar la dieta de las aves con una mezcla de ácidos orgánicos (Isaza *et al.*, 2019). Por su parte Li *et al.*, (2012) observó que la suplementación con aceites esenciales mejoró la tasa de proliferación de linfocitos séricos.

En el caso de los monocitos podemos observar que los valores se encuentran dentro de rango para los cuatro tratamientos de aves, sin embargo, el grupo desafiado con *E. coli* obtuvo los valores más altos mostrando diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). Con frecuencia, los monocitos en sangre periférica muestran actividad fagocitaria y esto a su vez se puede asociar con la presencia de enfermedades infecciosas. (Tizard, 2019) y Stafford *et al.* (2002) explican que los macrófagos realizan una variedad de funciones además de la fagocitosis;

actúan como células secretoras, producen óxido nítrico que afecta a los microorganismos intracelulares y también secretan muchas proteínas diferentes como enzimas lisosomales y citocinas, que desempeñan un papel clave en la regulación de la inmunidad. De igual manera Sharma *et al.*, (2016) reporta valores incrementados de monocitos en grupos de aves desafiados con *E. coli*. A diferencia del tratamiento desafiado con la bacteria, en el grupo ACA+ EC no se observó una disminución en sus valores. Li *et al.*, (2012) explican que los aceites esenciales pueden potenciar las respuestas inmunitarias, la suplementación con aceites esenciales mejora la tasa de fagocitosis, además de que gracias al efecto antioxidante de los aceites esenciales, mantienen la integridad estructural de las células inmunes protegiendo la membrana celular de los radicales libres (Nockels, 1996).

Los resultados obtenidos para basófilos y eosinófilos en los cuatro grupos coinciden con los valores reportados por Noriega, (2003) en aves sanas, en estudio realizado por Sharma *et al.*, (2016) se observó que los grupos desafiados con *E. coli* no presentan una diferencia significativa en los valores obtenidos para basófilos. En el caso de los eosinófilos se observarán valores más altos en el grupo desafiado con la bacteria presentando diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) respecto a los demás tratamientos. Amin *et al.*, (2020) reportan aumentos significativos de eosinófilos en aves desafiadas con *E. coli*. Silvestre *et al.*, (2011) refieren que el aumento de eosinófilos está más asociado a infecciones de tipo parasitarias, sin embargo, son posibles los roles de los eosinófilos en las defensas del huésped contra la invasión bacteriana. Persson *et al.*, (2001) explican que en un sistema de recuentos bacterianos viables, se investigó la actividad bactericida de los eosinófilos y la contribución de diferentes sistemas

antibacterianos celulares contra *Escherichia coli* en el cual los eosinófilos mostraron una destrucción rápida y eficiente de *E. coli* en condiciones aeróbicas, mientras que en condiciones anaeróbicas la destrucción de bacterias disminuyó drásticamente, según los hallazgos observados se sugiere que los eosinófilos pueden participar en la defensa del huésped contra la invasión de bacterias gramnegativas y que la destrucción dependiente del oxígeno, es decir, el superóxido que actúa junto con la peroxidasa de eosinófilos, puede ser la función efectora bactericida más importante de estas células. Gilani *et al.*, (2018), Khosravi *et al.*, (2010), Attia *et al.*, (2019) y Mirza *et al.*, (2016) no reportan cambios significativos en valores de eosinófilos y basófilos al utilizar ácidos orgánicos o aceites esenciales.

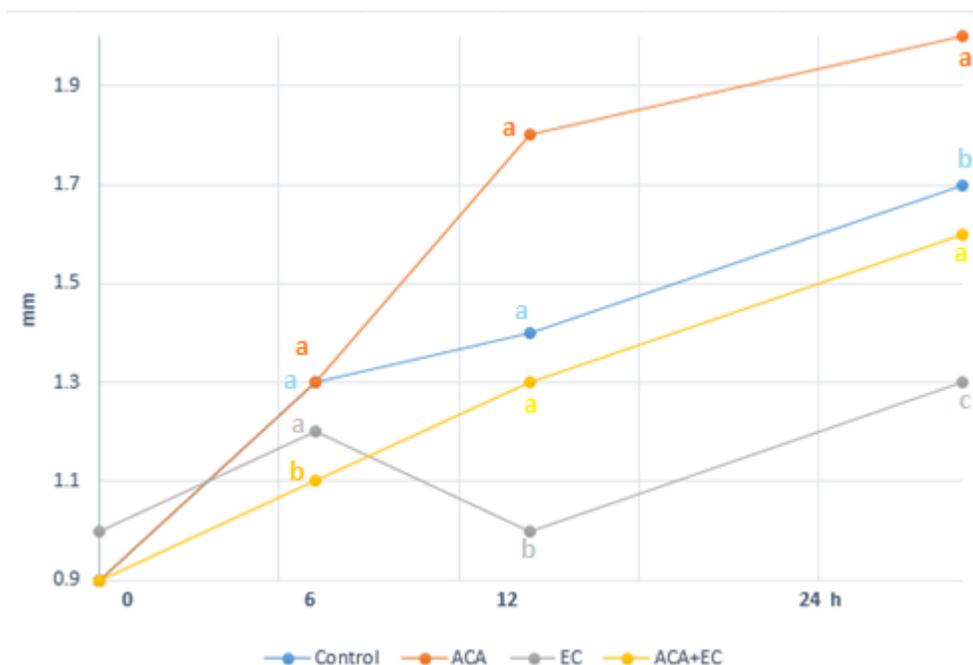


Figura 6.

Evaluación de la respuesta inmune celular, medida en base al grosor en membrana interdigital (mm) a las, 6, 12 y 24 horas al día 21 de edad de las aves.

C: control (sin adición de ácido cítrico+anetol ni EC); **ACA:** ácido cítrico + anetol ([0.5 Kg; ACA/Ton de alimento]); **EC:** concentración de *E. coli* 10⁸ UFC/ave; **ACA+EC:** ácido cítrico + anetol ([0.5 Kg ACA/Ton de alimento]) + concentración de *E. coli* de 10⁸ UFC/ave. Media ± error estándar. Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05).

En la figura 6 se puede observar la evaluación de la respuesta inmune celular, a las 6 horas post inoculación se observa una tendencia a una menor respuesta en los grupos EC y ACA+EC con 1.2mm y 1.1mm respectivamente, éste último presentó diferencia estadística significativa (p<0.05) con respecto a los tratamientos control y ácido cítrico y anetol (ACA) ambos presentando valores de 1.3mm. A las 12 horas post inoculación se observa en el grupo ACA un grosor de 1.8mm a diferencia de los demás tratamientos observándose valores de 1.4mm para el grupo control (C), 1.3mm para el grupo al cual se le adicionó el eubiótico y fue desafiado con la bacteria (ACA+EC) y el grupo *E. coli* (EC) con 1.0mm el cual presentó una menor respuesta inmune al igual que a las 24 horas post inoculación observándose un valor de 1.3mm y diferencia estadística significativa (p<0.05) en comparación de las aves de los tratamientos Control (1.7mm), ACA (2.0mm) y ACA+EC (1.6mm).

En este experimento se observó una menor respuesta celular en las aves que fueron desafiadas con *E. coli*, que se reflejó en un menor incremento en el grosor de la membrana interdigital de las aves éstos resultados concuerdan con Tella *et al.*, (2008) quienes indican que la cuantificación simultanea de linfocitos T y proteínas circulantes del torrente sanguíneo muestra que la inflamación cutánea inducida por la fitohemaglutinina está relacionada con la proliferación de células T, responsables de montar una respuesta inmune celular. Como se mencionó anteriormente, *E. coli* enteroinvasiva entra fácilmente a las células epiteliales del

colon por medio de adhesinas, moviéndose lateralmente para invadir otras células (Angeles, 2002), esto conduce a cambios morfológicos intestinales, daño y aumento de la permeabilidad de la mucosa, desarrollo comprometido del intestino y baja capacidad de absorción de nutrientes (Nagura *et al.*, 2001; Podolsky, 2011; Strober *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 1999). Numerosos trabajos han demostrado que deficiencias severas o crónicas de muchos nutrientes reducen la respuesta inmune teniendo en cuenta la elevada velocidad de división de las células y el gran número de cofactores enzimáticos que son necesarios para que se produzca la respuesta inmune (Klasing, 1995). La mejor respuesta se observó en el grupo de aves a las cuales se les proporcionó el suplemento alimenticio comercial (ACA) y sin desafío con la bacteria, aunque los valores fueron menores en el grupo de ACA+*E. coli*, lo que demuestra que la *E. coli* tiene un efecto sobre la respuesta inmune celular. En un estudio realizado por Lakshmi *et al.*, (2015) donde a las aves se les ofreció una dieta adicionada con ácido cítrico presentaron un aumento relativo del peso del bazo y la bolsa de Fabricio, los dos órganos linfoides primarios responsables de la inmunidad humoral y celular. Éstos mismos investigadores explican que el aumento de la respuesta inmune asociada con la acidificación dietética podría ser debido a sus efectos inhibitorios contra los microorganismos patógenos en todo el tracto gastrointestinal mejorando la absorción de nutrientes; así mismo también se puede atribuir a una mayor eficiencia de nutrientes. Una respuesta inmune favorable en pollos de engorda a los cuales se les administró ácidos orgánicos también fue reportada por Abdel Fattah *et al.*, (2008), Rama Rao *et al.*, (2004) y Lakshmi *et al.*, (2015) asociado a su acción antioxidante sobre las

células de defensa que protege la membrana celular de los oxidantes de radicales libres (Nockels, 1996).

IX) CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este experimento y bajo las condiciones de manejo e instalaciones, se puede concluir que la adición de un suplemento alimenticio de tipo eubiótico a base de ácido cítrico y anetol en el alimento para pollos de engorda estirpe Cobb 500 mostró tener efectos favorables sobre variables hematológicas y respuesta inmune celular, frente a un desafío con *E.coli* enteroinvasiva.

La inclusión de un suplemento alimenticio comercial eubiótico en la dieta causó un efecto benéfico en los valores de hematocrito, proteínas plasmáticas, número de eritrocitos y leucocitos al contrarrestar el efecto negativo de *E. coli* que se vio reflejado en la disminución de proteínas plasmáticas, número de eritrocitos, porcentaje de linfocitos y aumento en el número de leucocitos, así como en porcentaje de heterófilos, monocitos y eosinófilos.

Los efectos de la adición del eubiótico sobre la respuesta inmune celular fueron positivos al igual que con las aves desafiadas con *E. coli*.

Se puede concluir también, que el uso de ácido cítrico y anetol puede ser considerado como un suplemento alimenticio no antibiótico que puede ser utilizado sin repercusiones en la salud humana y con efectos benéficos sobre la producción avícola al tener un efecto positivo en la salud de las aves, debido a su actividad bactericida y antioxidante, que en este estudio puedo evitar los efectos negativos ante un desafío de una cepa de *Escherichia coli* enteroinvasiva.

X) REFERENCIAS

- Abad Guamán, R. M., Capa Morocho, M., Yunga, V. H., Herrera, R. H., & Sanchez, G. E. (2017). Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones prácticas. *Centro de Biotecnología*, 6(1), 98-108.
https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas
- Abdel Fattah, S. A., El Sanhoury, M. H., El Mednay, N. M., & Abdel Azeem, F. (2008). Thyroid activity, some blood constituents, organs morphology and performance of broiler chicks fed supplemental organic acids. *International Journal of Poultry Science*, 7(3), 215-222.
<https://doi.org/10.3923/ijps.2008.215.222>
- Abudabos, A. M., Al-Mufarrej, S. I., & Al-Sagan, A. A. (2015). Effects of commercial organic acid supplementation on serum biochemistry and blood constituents in Salmonella-challenged broiler chickens. *Philippine Agricultural Scientist*, 98(3), 247-252.
- Adil, S., Banday, T., Bhat, G. A., Mir, M. S., & Rehman, M. (2010). Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Veterinary Medicine International*, 2010.
<https://doi.org/10.4061/2010/479485>
- Afifi, N. A., Ramadan, A., El KAshoury, E. A., & El Banna, H. A. (1994). Some pharmacological activities of essential oils of certain umbelliferous fruits. *Veterubary Medical Journal Giza*,

42, 85–92.

- Afsharmanesh, M., & Pourreza, J. (2005). Effects of calcium, citric acid, ascorbic acid, vitamin D3 on the efficacy of microbial phytase in broiler starters fed wheat-based diets I. performance, bone mineralization and ileal digestibility. *International Journal of Poultry Science*, 4(6), 418–424. <https://doi.org/10.3923/ijps.2005.418.424>
- Akyurek, H., Ozduven, M. L., Okur, A. A., Koc, F., & Samli, H. E. (2011). The effects of supplementing an organic acid blend and/or microbial phytase to a corn-soybean based diet fed to broiler chickens. *African Journal of Agricultural Research*, 6(3), 642–649. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.469>
- Al Kassie. (2009). Influence of Two Plant Extracts Derived From Thyme and Cinnamon on Broiler Performance. *Nutrition*, 29(4), 169–173.
- Al Saad, S., Abbod, M., & Abo Yones, A. (2014). Effects of some growth promoters on blood hematology and serum composition of broiler chickens. *International journal of agricultural research*, 9(5), 265–270.
- Ali Grepay, N. (2009). The main factors affecting poultry production in Libya. *Oeconomia*, 8(4), 43–49. https://kenanaonline.com/files/0056/56636/libya_poultry_2.pdf
- Amin, U., Kamil, S. A., Wani, B. M., Qureshi, S., Shah, S. A., Dar, T. A., Adil, S., & Mir, M. S. (2020). Haematological and Biochemical Alterations of Broiler Chicken Affected Naturally with Colibacillosis. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(6), 1906–1913. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.906.236>
- Ángel Isaza, J., Mesa Salgado, N., & Narváez Solarte, W. (2019). Organic acids, an alternative in poultry nutrition: a review. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 14(2), 45–58.
- Attia, Y., Al-Harthi, M., & El-Kelawy, M. (2019). Utilisation of essential oils as a natural growth promoter for broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), 1005–1012. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1607574>
- Aviagen broiler breeders. (2009). *Guía de Manejo del Pollo de Engorde*.
- Aviles Gonzales, D. L., Delgado Espinales, K. R., & Gómez Valenzuela, A. G. (2010). Correlación de suspensiones estandarizadas de microorganismos por el método turbidimetrico vs escala de Macfarland. En *Universidad Autónoma de Nicaragua*. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/895/1/216220.pdf>
- Bailey, R. (2013). *Salud intestinal en las aves: el mundo interior-1*. El Sitio Avícola. <http://www.elsitioavicola.com/articles/2463/salud-intestinal-en-las-aves-el-mundo-interior-1/>
- Bastidas, M., Camacho, S., Castilletti, J., Milano, L., Navas, Y., & Yanes, V. (2016). *Correlación*

entra calidad del pollito de un día y mortalidad de la primera semana. El Sitio Avícola. <https://www.elsitioavicola.com/articulos/2856/correlacion-entra-calidad-del-pollito-de-un-dia-y-mortalidad-de-la-primera-semana/>

- Benjamin, M. M. (1997). *Outline of Veterinary Clinical Pathology*. (3a ed.). Kalyani Publishe.
- Briceño, J. V., & Alfaro, L. E. (2013). *Importancia de la salud intestinal en aves y diseño de programas anticoccidiales*. Engormix. <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/importancia-salud-intestinal-aves-t30275.htm>
- Cabuk, M., Alcicek, A., Bozkurt, M., & Imre, N. (2003). Antimicrobial properties of the essential oils isolated from aromatic plants and using possibility as alternative feed additives. *National Animal Nutrition Congress*, 18(20), 184-187.
- Cason, J. A., Cox, N. A., & Bailey, J. S. (2017). Transmission of Salmonella typhimurium during Hatching of Broiler Chicks. *Avian Diseases*, 38(3), 583-588.
- Charal, J. W. (2014). *Influence of Feeding Anise Oil in Pigs and Broilers*. Louisiana State University.
- Charles Noriega, M. de la L. (2003). *Manual de hematología aviar* (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (ed.)). Universidad Nacional Autonoma de México.
- Cherrington, C. A., Hinton, M., Mead, G. C., & Chopra, I. (1991). Organic Acids: Chemistry, Antibacterial Activity and Practical Applications. *Advances in Microbial Physiology*, 32(C), 87-108. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60006-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60006-5)
- Cook, N. (2003). The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2), 165-174. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00022-8)
- Cox, N. A., Bailey, J. S., Mauldin, J. M., Blankenship, L. C., & Wilson, J. L. (1991). Extent of salmonellae contamination in breeder hatcheries. *Poultry science*, 70(2), 416-418. <https://doi.org/10.3382/ps.0700416>
- Cuevas Valdez, J. (2019). *Carne de pollo, oportunidades de crecimiento en México*. EL Economista. <https://www.economista.com.mx/opinion/Carne-de-pollo-oportunidades-de-crecimiento-en-Mexico-20190303-0025.html>
- Davidson, P., & Matthew, T. (2012). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (R. L. B. Michael P. Doyle (ed.); 4 th). ASM Press.
- De Franceschi, M. (2018). *Composición y manejo de la flora intestinal en aves*. Engormix. <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/composicion-manejo-flora-intestinal-t42208.htm>

- Deepa, C., Jeyanthi, G. P., & Chandrasekaran, D. (2011). Effect of Phytase and Citric Acid Supplementation on the Growth Performance, Phosphorus, Calcium and Nitrogen Retention on Broiler Chicks Fed with Low Level of Available Phosphorus. *Asian Journal of Poultry Science*, 5(1), 28–34.
- Denli, M., Okan, F., & Celik, K. (2003). Effect of Dietary Probiotic, Organic Acid and Antibiotic Supplementation to Diets on Broiler Performance and Carcass Yield. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), 89–91. <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.89.91>
- Denyer, S. P., & Stewart, G. S. A. B. (1998). Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41(3–4), 261–268. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00023-7)
- Dhawale, A. (2005). *Better eggshell quality with a gut acidifier*. Poultry International. http://stocarstvo.com/ishrana/Better_eggshell_quality_with_a_gut_acidifier.htm
- Dibner, J. J., & Buttin, P. (2002). Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. *J. Appl. Poult. Res*, 11, 453–463. <http://japr.oxfordjournals.org/>
- Doyle, M. P., & Erickson, M. C. (2006). Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poultry Science*, 85(6), 960–973. <https://doi.org/10.1093/ps/85.6.960>
- Eidelsburger, U., & Kirchgessner, M. (1994). Effects of organic acids and salts in the feed on fattening performance of broilers. *Archiv für Geflügelkunde*, 58(6), 268–277. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3447101>
- Equipo Técnico de Estifar. (2018). *Integridad Intestinal: Desafíos actuales y futuros*. Engormix. <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/integridad-intestinal-desafios-actuales-t41772.htm>
- Estrada, M., & Márquez, S. (2005). Interacción de los factores ambientales con la respuesta del comportamiento productivo en pollos de engorde. *Rev. colomb. cienc. pecu*, 18(6), 246–257.
- Falkowski, J. F., & Aherne, F. X. (1984). Fumaric and Citric Acid as Feed Additives in Starter Pig Nutrition. *Journal of Animal Science*, 58(4), 935–938. <https://doi.org/10.2527/jas1984.584935x>
- Fang, H. L., Qin, M. L., & Ma., S. (2017). Thymol improves high-fat diet-induced cognitive deficits in mice via ameliorating brain insulin resistance and upregulating NRF2/HO-1 pathway. *Metabolic barin disease*, 32(2), 385–393.
- FAO. (2013). Revisión del Desarrollo Avícola. En *Revisión del desarrollo avícola* (Primera ed). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

<http://www.fao.org/docrep/019/i3531s/i3531s.pdf>

- Farfán García, A. E., Ariza Rojas, S. C., Vargas Cárdenas, F. A., & Vargas Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33(4), 438–450. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182016000400009>
- Fleming, E. C., Fisher, C., & McAdam, J. (2007a). Genetic progress in broiler traits – implications for body composition. *Proceedings of the British Society of Animal Science*, 2007, 67–67. <https://doi.org/10.1017/s1752756200019700>
- Fleming, E. C., Fisher, C., & McAdam, J. (2007b). Genetic progress in broiler traits –implications for welfare. *Proceedings of the British Society of Animal Science*, 2007, 67–67. <https://doi.org/10.1017/s1752756200019700>
- Gallardo Pérez, J., & Pérez, V. (2018). *Control de la colibacilosis aviar*. BM editores. <https://bmeditores.mx/avicultura/control-de-la-colibacilosis-aviar-1532/#:~:text=La colibacilosis es una de,en granjas como consecuencia de>
- Gast, R. K., & Holt, P. S. (2000). Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella enteritidis* at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. *Poultry Science*, 79(4), 559–563. <https://doi.org/10.1093/ps/79.4.559>
- Gilani, S. M. H., Zehra, S., Faiz-Ul-hassan, Galani, S., & Ashraf, A. (2018). Effect of natural growth promoters on immunity, and biochemical and haematological parameters of broiler chickens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17(4), 627–633. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v17i4.9>
- Godbole, P. V., Hajare, S. W., Bhosale, P., Hedau, M., Ingole, R. S., Kuralkar, P., & Bhojane, N. M. (2018). Effect of curcumin on hemato-biochemical alterations after induced *E. coli* infection in broilers. *Journal of pharmacology and phytochemistry*, 7(1), 484–486.
- Gómez Verduzco, G. G. (2009). *Modulación nutricional de la inmunidad en pollo de engorda mediante el empleo de un inmunoestimulante (Paredes de levaduras de Saccharomyces cerevisiae)*.
- Gülçin, I., Oktay, M., Kireççi, E., & Küfrevioğlu, Ö. I. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83(3), 371–382. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00098-0)
- Harrison, G. J. (2006). *Clinical Avian Medicine* (G. J. Harrison & T. L. Lightfoot (eds.); Vol 2). Spix Publishing.
- Havenstein, G. B., Ferket, P. R., & Qureshi, M. A. (2003a). Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science*, 82(10), 1509–1518. <https://doi.org/10.1093/ps/82.10.1509>

- Havenstein, G. B., Ferket, P. R., & Qureshi, M. A. (2003b). Growth, liveability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science*, *82*(10), 1500–1508.
- Huff, G. R., Huff, W. E., Rath, N. C., Anthony, N. B., & Nestor, K. E. (2008). Effects of *Escherichia coli* challenge and transport stress on hematology and serum chemistry values of three genetic lines of turkeys. *Poultry Science*, *87*(11), 2234–2241. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00128>
- Industria Avícola. (2020). Empresas Líderes 2020: Fuerte crecimiento de la avicultura latinoamericana en 2019. *Industria Avícola*, *67*(3), 8,21.
- Jongbloed, A. W., Mroz, Z., Van Der Weij–Jongbloed, R., & Kemme, P. A. (2000). The effects of microbial phytase, organic acids and their interaction in diets for growing pigs. *Livestock Production Science*, *67*(1–2), 113–122. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00179-2)
- Khosravi, A., Boldaji, F., Dastar, B., & Hasani, S. (2010). Immune response and performance of broiler chicks fed protexin and propionic acid. *International Journal of Poultry Science*, *9*(2), 188–191. <https://doi.org/10.3923/ijps.2010.188.191>
- Kidder, D. E., & Manners, M. J. (1978). *Digestion in the pig*. Scientechica Bristol.
- Kil, D. Y., Kwon, W. B., & Kim, B. G. (2011). Artículos originales Dietary acidifiers in weanling pig diets: a review. *Animal Science*, *24*(3), 231–247. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902011000300002
- Kim, D. W., Kim, J. H., Kang, H. K., Akter, N., Kim, M. J., Na, J. C., Hwangbo, J., You, S. W., Choi, H. C., Suh, O. S., & Salim, H. M. (2014). Dietary supplementation of phenyllactic acid on growth performance, immune response, cecal microbial population, and meat quality attributes of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, *23*(4), 661–670. <https://doi.org/10.3382/japr.2014-00974>
- Kim, J. W., Kim, J. H., & Kil, D. Y. (2015). Literature Reviews Original articles Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias Dietary organic acids for broiler chickens : a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *28*(2), 109–123. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v28n2a01.Summary>
- Kirchgessner, M., & Roth, F. X. (1988). Energy value of organic acids in the rearing of piglets and the fattening of pigs. *Tierernährung*, *16*, 93–108.
- Klasing, K. (1995). Interacciones Entre Nutrición Y El Sistema. *XI Curso de especialización FEDNA*, 1–7.
- Kogut, M. H., Yin, X., Yuan, J., & Broom, L. (2017). Gut health in poultry. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, *12*(August). <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201712031>

- Kroismayr, A., Sehm, J., Pfaffl, M. W., Schedle, K., Plitzner, C., & Windisch, W. M. (2008). Effects of avilamycin and essential oils on mRNA expression of apoptotic and inflammatory markers and gut morphology of piglets. *Czech Journal of Animal Science*, *53*(9), 377–387. <https://doi.org/10.17221/338-cjas>
- Kubo, I., & Fujita, K. (2001). Naturally occurring anti-Salmonella agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(12), 5750–5754. <https://doi.org/10.1021/jf010728e>
- La Ragione, R. M., & Woodward, M. J. (2003). Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Veterinary Microbiology*, *94*(3), 245–256. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00077-4)
- Lakshmi, K. V., Reddy, A. R., Sunder, G. S., & Reddy, V. R. (2015). Supplementation of lactic and citric acid in antibiotic free diets and their influence on performance, meat yield and immune response of broiler chickens. *Indian Journal of Poultry Science*, *4*(3), 1007–1011. <https://doi.org/10.5958/0974-8180.2016.00013.1>
- Langhout, P. (2000). New additives for broiler chickens. *World Poultry*, *16*(3), 22–27.
- Leyva, H., Bonilla, C., Casarín, A., Gómez, L. M., & Villar, G. (2019). *El impacto de la nutrición sobre la salud intestinal y el bienestar de las aves*. Grupo Nutec. <https://www.avicultura.mx/destacado/El-impacto-de-la-nutrición-sobre-la-salud-intestinal-y-el-bienestar-de-las-aves>
- Li, P., Piao, X., Ru, Y., Han, X., Xue, L., & Zhang, H. (2012). Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *25*(11), 1617–1626. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12292>
- López, C., Arce, J., Avilla, C., & Vazquez, E. Y. (1991). Investigaciones Sobre El Síndrome Ascítico En Pollos De Engorda. *Ciencia Veterinaria*, *5*, 13–47.
- López, M. (1976). Escherichia Coli Mecanismos de Patogenicidad. *Ciencia Veterinaria*, *1*, 25. <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CV1v1c01.pdf>
- Lumpkins, B. S., Batal, A. B., & Lee, M. D. (2010). Evaluation of the bacterial community and intestinal development of different genetic lines of chickens. *Poultry Science*, *89*(8), 1614–1621. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00747>
- Mani López, E., García, H. S., & López Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International*, *45*(2), 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>
- Martinez, A., & Rosario Cortés, C. (2012). *Resistencia antimicrobiana en cepas de escherichia coli aislada de aves de Importación, traspatio y comerciales*. Engormix.

<https://www.engormix.com/avicultura/articulos/resistencia-antimicrobiana-cepas-escherichia-t29711.htm>

Martínez Silvestre, A., Lavín, S., & Cuenca, R. (2011). Hematology and blood cytology in reptiles. *Clin. Vet. Peq. Anim*, 31(3), 131-141.

Mayer, E. A. (1994). *The physiology of gastric storage and emptying*. In: *physiology of the gastrointestinal Tract* (3a ed.). Raven Press.

Methner, U., Al-Shabibi, S., & Meyer, H. (1995). Infection Model for Hatching Chicks Infected with Salmonella enteritidis. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 42(1-10), 471-480. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1995.tb00738.x>

Meuter, A., & Martinez, R. (2011). Eubioticos: Su influencia en la sanidad intestinal de las aves. *Selecciones avícolas*, 1, 39-42.

Mirza, M. W., Zaib-Ur-Rehman, & and Nasir Mukhtar. (2016). Use of Organic Acids as Potential Feed Additives in Poultry Production. *Journal of World's Poultry Research*, 6(3), 105-116.

Mohammadi Gheisar, M., Hosseindoust, A., & Kim, I. H. (2015). Evaluating the effect of microencapsulated blends of organic acids and essential oils in broiler chickens diet. *Journal of Applied Poultry Research*, 24(4), 511-519. <https://doi.org/10.3382/japr/pfv063>

Moharrery, A., & Mahzonieh, M. (2005). Effect of malic acid on visceral characteristics and coliform counts in small intestine in the broiler and layer chickens. *International Journal of Poultry Science*, 4(10), 761-764. <https://doi.org/10.3923/ijps.2005.761.764>

Mohnl, M. (2011). *Microflora gastrointestinal y su influencia en el hospedante*. Engormix. <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/microflora-gastrointestinal-influencia-hospedante-t28856.htm>

Molina López, J., & Eslava Campos, C. A. (2015). *Escherichia coli Diarreogénica*. Departamento de Microbiología y parasitología UNAM. http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=2919

Mroz, Z. (2005). *Organic Acids as Potential Alternatives to Antibiotic Growth Promoters for Pigs*. 16(2005), 169-182.

Mussini, F. J., & Waldroup, P. (2012). Comparative response of different broiler genotypes to dietary levels. *Poultry Science, PhD*, 132.

Nagura, H., Ohtani, H., Sasano, H., & Matsumoto, T. (2001). The immuno-inflammatory mechanism for tissue injury in inflammatory bowel disease and Helicobacter pylori-infected chronic active gastritis: Roles of the mucosal immune system. *Digestion*, 63(1), 12-21. <https://doi.org/10.1159/000051905>

- Nakphaichit, M., Thanomwongwattana, S., Phraephaisarn, C., Sakamoto, N., Keawsompong, S., Nakayama, J., & Nitisinprasert, S. (2011). The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poultry Science*, *90*(12), 2753–2765. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01637>
- Ndelekwute, E. K. (2018). Effect of Organic Acid Treated Diets Fed During Finisher Phase on Gut Microbiota and Blood Profile of Broiler Chickens. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, *5*(4), 1–6. <https://doi.org/10.19080/jdvs.2018.05.555668>
- Nguyen, D. H., Lee, K. Y., Mohammadigheisar, M., & Kim, I. H. (2018). Evaluation of the blend of organic acids and medium-chain fatty acids in matrix coating as antibiotic growth promoter alternative on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, excreta microflora, and carcass quality in broilers. *Poultry Science*, *97*(12), 4351–4358. <https://doi.org/10.3382/ps/pey339>
- Nockels, C. H. F. (1996). Antioxidants improve cattle immunity following stress. *Animal Feed Science and Technology*, *62*, 59–68.
- Nurmi, E., Nuotio, L., & Schneitz, C. (1992). The competitive exclusion concept: development and future. *International Journal of Food Microbiology*, *15*(3–4), 237–240. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90054-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90054-7)
- Ocampo R., J., Vásquez C., M., Cueva M., S., Ayón S., M., Lira M., B., Rodríguez G., J., & Falcón P., N. (2012). Valores Eritrocíticos, Presión Arterial Pulmonar Y Peso Del Ventrículo Derecho En Pollos Parrilleros De Dos Líneas Comerciales Bajo Crianza Intensiva a Nivel Del Mar. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *23*(4), 406–413. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i4.945>
- Ochoa Núñez, L. (2007). Patología clínica veterinaria. En *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México* (2a ed.). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Okamura, M., Tachizaki, H., Kubo, T., Kikuchi, S., Suzuki, A., Takehara, K., & Nakamura, M. (2007). Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and Gallinarum biovar Pullorum, using 4 different challenge models. *Vaccine*, *25*(25), 4837–4844. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.03.004>
- Omonijo, F. A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., & Yang, C. (2018). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, *4*(2), 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>
- Oviedo Rondón, E. O. (2019). *Dysbacteriosis, its causes and its impact The Gut Ecosystem in Equilibrium*. https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en_US/documents/Dysbacteriosis,%20its%2

Ocauses%20and%20its%20impact.pdf.

https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en_US/documents/Dysbacteriosis_its_causes_and_its_impact.pdf

Pan, D., & Yu, Z. (2013). Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*, 5(1), 37–41. <https://doi.org/10.4161/gmic.26945>

Parrish, M. R. (2018). Mexico poultry and products Annual. A robust poultry sector continues in Mexico. *GAIN Report No. MX8035*, 1–18. [https://gain.fas.usda.gov/Recent GAIN Publications/Poultry and Products Annual_Mexico City_Mexico_7–27–2018.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Poultry%20and%20Products%20Annual_Mexico%20City_Mexico_7-27-2018.pdf)

Patten, J. D., & Waldroup, P. W. (1988). Use of organic acids in broiler diets. *Poultry science*, 67(8), 1178–1182. <https://doi.org/10.3382/ps.0671178>

Pedroso, A. A., Maurer, J., Cheng, Y., & Lee, M. D. (2012). Informal Nutrition Symposium Remodeling the intestinal ecosystem toward better performance and intestinal health. *Journal of Applied Poultry Research*, 21(2), 432–443.

Pedroso, A. A., Menten, J. F. M., & Lambais, M. R. (2005). The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. *Journal of Applied Poultry Research*, 14(2), 232–237. <https://doi.org/10.1093/japr/14.2.232>

Persson, T., Andersson, P., Bodelsson, M., Laurell, M., Malm, J., & Egesten, A. (2001). Bactericidal activity of human eosinophilic granulocytes against *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69(6), 3591–3596. [https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3591–3596.2001](https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3591-3596.2001)

Podolsky, D. K. (2011). Inflammatory Bowel Disease. *The New England Journal of Medicine*, 347(6), 7–19. <https://doi.org/10.2217/EBO.11.37>

Prohealt. (2017). Enfermedades de la producción: costes para los productores. *Selecciones Avícolas*, 12–14.

Quintana, J. A. (2011). *Avitecnia: Manejo de las aves domésticas más comunes* (Segunda Ed). Editorial Trillas.

Rama Rao, S. V., Reddy, M. R., Raju, M. V. L. N., & Panda, A. K. (2004). Growth, nutrient utilization and immune competence in broiler chicken fed probiotic, gut acidifier and antibacterial compounds. *Indian Journal of Poultry Science*, 39(2), 125–130. [https://www.semanticscholar.org/paper/Growth%2C–nutrient–utilization–and–immunocompetence–Ramarao–Reddy/ff634d422c4b3eff73c93028fae00723c429226e](https://www.semanticscholar.org/paper/Growth%2C-nutrient-utilization-and-immunocompetence-Ramarao-Reddy/ff634d422c4b3eff73c93028fae00723c429226e)

Ricke, S. C. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82(4), 632–639. <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.632>

Roberfroid, M. B. (1999). Concepts in functional foods: The case of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, 129(7 SUPPL.), 1398–1401. <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1398s>

- Rodríguez Angeles, M. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, *44*(5), 464–475.
<https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>
- SAGARPA. (2001). *Situación Actual y Perspectiva de la Producción de Carne de Pollo en México* (Primera ed). Gobiernode México.
- SAGARPA. (2009). *Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en Unidades de Producción de Pollo de Engorda* (Primera ed). Gobiernode México.
- Salgado Tránsito, L., Del Río García, J. C., Arjona Román, J. L., Moreno Martínez, E., & Méndez Albores, A. (2011). Effect of citric acid supplemented diets on aflatoxin degradation, growth performance and serum parameters in broiler chickens. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *43*(3), 215–222. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2011000300003>
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron, M.-C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M., & Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, *80*(S1), S147–S171.
<https://doi.org/10.1079/bjn19980108>
- Sharma, V., Jakhar, K. K., & Dahiya, S. (2016). Immuno-pathological studies on broiler chicken experimentally infected with *Escherichia coli* and supplemented with neem (*Azadirachta indica*) leaf extract. *Veterinary World*, *9*(7), 735–741.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.735-741>
- Singh, G., Kapoor, I. P. S., Pandey, S. K., Singh, U. K., & Singh, R. K. (2002). Studies on essential oils: Part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytotherapy Research*, *16*(7), 680–682. <https://doi.org/10.1002/ptr.951>
- Sneddon, H., Hadden, R., & Hepper, P. G. (1998). Chemosensory learning in the chicken embryo. *Physiology and Behavior*, *64*(2), 133–139. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00037-7)
- Soliman, K. M., & Badaea, R. I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, *40*(11), 1669–1675.
[https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00120-5)
- Stefanoviciaus Nunes, M. A. (2014). *Ajustando micro flora intestinal con simbióticos - una herramienta eficiente para controlar la disbiosis en aves*. Engormix.
<https://www.engormix.com/avicultura/articulos/ajustando-micro-flora-intestinal-t31181.htm>
- Strober, W., Fuss, I. J., & Blumberg, R. S. (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *Annual Review of Immunology*, *20*, 495–549.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064816>

- Tabanca, N., Bedir, E., Kirimer, N., Husnu Can Baser, K., Khan, S. I., Jacob, M. R., & Khan, I. A. (2003). Antimicrobial Compounds from Pimpinella Species Growing in Turkey. *Planta Medica*, *69*(10), 933–938. <https://doi.org/10.1055/s-2003-45103>
- Tella, J. L., Lemus, J. A., Carrete, M., & Blanco, G. (2008). The PHA test reflects acquired T-cell mediated immunocompetence in birds. *PLoS ONE*, *3*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003295>
- Tizard, I. (2019). *An Introduction to Veterinary Immunology* (10a ed.). Elsevier.
- Toghyani, M., Toghyani, M., Gheisari, A., Ghalamkari, G., & Mohammadrezaei, M. (2010). Growth performance, serum biochemistry and blood hematology of broiler chicks fed different levels of black seed (*Nigella sativa*) and peppermint (*Mentha piperita*). *Livestock Science*, *129*(1–3), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.01.021>
- Torres, Y., Montoya, A., & Hicks, J. (2009). La disfunción del eritrocito en la hipoxia tisular en pacientes con EPOC y su relación con estrés oxidativo. *Revista del instituto nacional de enfermedades respiratorias*, *22*(4), 1–10. www.iner.salud.gob.mx356www.medigraphic.org.mxwww.medigraphic.org.mx
- Unión Nacional de Avicultores. (2021). *Indicadores económicos*. UNA. <https://una.org.mx/indicadores-economicos/>
- Ur Rehman, Z., Ul Haq, A., Akram, N., Abd El-Hack, M. E., Saeed, M., Ur Rehman, S., Meng, C., Alagawany, M., Sayab, M., Dhama, K., & Ding, C. (2016). Growth performance, intestinal histomorphology, blood hematology and serum metabolites of broilers chickens fed diet supplemented with graded levels of acetic acid. *International Journal of Pharmacology*, *12*(8), 874–883. <https://doi.org/10.3923/ijp.2016.874.883>
- Wagner, R. D. (2006). Efficacy and food safety considerations of poultry competitive exclusion products. *Molecular Nutrition and Food Research*, *50*(11), 1061–1071. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600058>
- Wang, G. W., Hu, W. T., Huang, B. K., & Qin, L. P. (2011). *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, *136*(1), 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.051>
- Wang, J. P., Lee, J. H., Yoo, J. S., Cho, J. H., Kim, H. J., & Kim, I. H. (2010). Effects of phenyllactic acid on growth performance, intestinal microbiota, relative organ weight, blood characteristics, and meat quality of broiler chicks. *Poultry Science*, *89*(7), 1549–1555. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00235>
- Wang, J. P., Yoo, J. S., Jang, H. D., Lee, J. H., Cho, J. H., & Kim, I. H. (2011). Effect of dietary fermented garlic by *Weissella koreensis* powder on growth performance, blood characteristics, and immune response of growing pigs challenged with *Escherichia coli*

- lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science*, *89*(7), 2123–2131.
<https://doi.org/10.2527/jas.2010-3186>
- Waters, W., Sacco, R., Dorn, A., Hontecillas, R., Zuckermann, F., & Wannemuehler, M. (1999). Systemic and mucosal immune responses of pigs to parenteral immunization with a pepsin-digested *Serpulina hyodysenteriae* bacterin. *Veterinary Immunology*, *69*(1), 75–87.
- Wondrak, G. T., Villeneuve, N. F., Lamore, S. D., Bause, A. S., Jiang, T., & Zhang, D. D. (2010). The cinnamon-derived dietary factor cinnamic aldehyde activates the Nrf2-dependent antioxidant response in human epithelial colon cells. *Molecules*, *15*(5), 3338–3355.
<https://doi.org/10.3390/molecules15053338>
- Wright, E., & Hughes, R. E. (1976). Some effects of dietary citric acid in small animals. *Food and Cosmetics Toxicology*, *14*(6), 561–564. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(76\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(76)80009-0)
- Yesilbag, D., & Çolpan, I. (2006). Effects of organic acid supplemented diets on growth performance, egg production and quality and on serum parameters in laying hens. *Revue de Medecine Veterinaire*, *157*(5), 280–284.
- Zou, Y., Wang, J., Peng, J., & Wei, H. (2016). Oregano Essential Oil Induces SOD1 and GSH Expression through Nrf2 Activation and Alleviates Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in IPEC-J2 Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 1–13.
<https://doi.org/10.1155/2016/5987183>
- Zuidhof, M. J., Schneider, B. L., Carney, V. L., Korver, D. R., & Robinson, F. E. (2014). Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poultry Science*, *93*(12), 2970–2982. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04291>