

Universitat de Lleida

Evaluación de la alimentación aviar (*Gallus gallus domesticus*) con maíz fortificado en carotenoides

José Antonio Moreno Martínez

Dipòsit Legal: L.237-2015

<http://hdl.handle.net/10803/288367>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Evaluación de la alimentación aviar (*Gallus gallus domesticus*) con maíz fortificado en carotenoides

José Antonio
Moreno Martínez



Universitat de Lleida
Departament de Producció
Animal

Evaluación de la alimentación aviar (*Gallus gallus domesticus*) con maíz fortificado en carotenoides



José Antonio Moreno Martínez
Diciembre, 2014



Universitat de Lleida

Evaluación de la alimentación aviar (*Gallus gallus domesticus*) con maíz fortificado en carotenoides

José Antonio Moreno Martínez

Diciembre 2014



Universitat de Lleida



Departamento de Producción Animal

**TESIS
DOCTORAL**

TITULO

Evaluación de la alimentación aviar (*Gallus gallus domesticus*) con maíz fortificado en carotenoides

Memoria presentada por:

José Antonio Moreno Martínez

Para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Lleida

2014

DIRECTORES:

Eduardo Angulo Asensio

Carmina Nogareda Burch



Universitat de Lleida
Departament de Producció
Animal

Av. Alcalde Rovira Roure, 191
E 25198 LLEIDA (Catalunya)
Tel. +34 973 70 25 57
Fax +34 973 70 28 74
secretaria@prodan.udl.cat
<http://www.etsea.udl.cat/dept/prodan/>

Eduardo Angulo Asensio y Carmen Nogareda Burch, del Departamento de Producción Animal de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria, de la Universidad de Lleida, como Directores de la tesis realizada por el Licenciado en Veterinaria José Antonio Moreno Martínez, "Evaluación de la alimentación aviar (*Gallus gallus domesticus*) con maíz fortificado en carotenoides",

INFORMAMOS:

Que el trabajo de investigación se considera ya finalizado y que cumple las condiciones exigibles en la legislación vigente para optar al grado de Doctor. Como consecuencia autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente en la Universidad de Lleida.

Lleida, 5 de Septiembre de 2014

Fdo: E. Angulo

Fdo: C. Nogareda

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es fruto del esfuerzo y colaboración de muchas personas y quiero dejar constancia de esto y recordar a todos los que en él han participado.

Mi agradecimiento a los Directores, Eduardo, por su paciencia de años, por su disponibilidad, amistad y ánimo en todo momento, a Carmina por su optimismo y por su visión positiva de la realidad.

A los miembros del grupo de Biotecnología Vegetal del Departamento de Producción Vegetal, Paul, Teresa y Changfu por haberme brindado la posibilidad de trabajar en este proyecto que tanto ha entusiasmado a todos, gracias por vuestro apoyo en todo momento y por vuestra cercanía.

Gracias al grupo de alumnos, Xabi, Silvia, Núria y Laura; vuestra ayuda ha sido determinante para llevar a cabo este proyecto, gracias, porque me habéis enseñado mucho. Silvia y Nuria, mucha suerte en Veterinaria, Xabi y Laura, os deseo lo mejor en vuestras empresas, ya sois el presente de la Avicultura y también su futuro. Todo el esfuerzo realizado, las dificultades vencidas, las alegrías y buenos momentos vividos, son para mí un recuerdo inolvidable.

Mi reconocimiento también para todos los benefactores del proyecto, las empresas Sada, Pondex, Agropecuaria de Guissona, Piensos del Segre, Mytidasa por proporcionar siempre con gusto pollitos y gallinas para los ensayos, o por permitirnos utilizar vuestras instalaciones y por la accesibilidad de vuestros directivos y técnicos, muchas gracias. A Mari Carmen de Alguaire (Granja Albana), mi gratitud por permitirnos realizar un ensayo en su granja y a Clemente por mantenerse alerta en el cuidado de los pollos.

Es necesario también hacer una mención de afecto a todo el personal de fuera de España que también ha participado en el proyecto Caro-Maize, Gerard y Jurgen en Frankfurt, Sonia y Matilde en Montpellier, Paul en Londres a vosotros y a las empresas colaboradoras mi más sincera gratitud, he podido aprender mucho de vuestra forma de trabajar y de enfocar la investigación, ha sido una oportunidad única que espero haber aprovechado.

Al resto de empresas e instituciones que también han participado en estos ensayos, Hospital Universitario Arnau de Vilanova, CESAC, Étyca s.l., Echevarne s.l. IRTA Mas de Bover, a todos muchas gracias por vuestra profesionalidad.

A mi familia, los que están y los que se han ido, sois el verdadero motor de esta tesis, permitiendo que os robe horas y atenciones y apoyándome en todo.

A todos los nombrados y no nombrados que habéis estado apoyándome en este cometido, muchas gracias.

La investigación realizada en esta tesis ha sido financiada por los proyectos BIO2011-22525 y PIM2010PKB-00746-CAROMAIZE del Ministerio de Economía y Competitividad (MIMECO) y los proyectos avanzados del Consejo Europeo de Investigación, BIOFORCE N°232933 y ERC N°619161.

Hay mucho que saber, y es poco el
vivir, y no se vive si no se sabe.

(Baltasar Gracián)

A Carmen, David y Oscar

RESUMEN, RESUM, SUMMARY

RESUMEN

La industria de las aves de corral utiliza carotenoides para mejorar la pigmentación de productos, tales como pollos y huevos, en parte, para satisfacer las preferencias del consumidor por la pigmentación de la piel de pollo y de la yema en tonos anaranjados. Las materias primas utilizadas en las formulaciones de alimentos de pollos y gallinas no son capaces de proporcionar cantidades suficientes de carotenoides para alcanzar la pigmentación de la piel y de la yema suficiente para satisfacer las demandas de los consumidores. Por lo tanto, la industria avícola utiliza pigmentos como aditivos para piensos. Estos pueden ser de origen natural o sintético y en las proporciones adecuadas de los ingredientes clave se puede alcanzar el color deseado. A partir del maíz blanco de Sudáfrica M37W carente de carotenoides en la UdL se ha creado por ingeniería genética una variedad (M37W Ph3) que acumula altos niveles de β -caroteno, licopeno, luteína α -criptoxantina y zeaxantina. M37W Ph3 se ha utilizado en este estudio para probar la hipótesis de que el maíz fortificado genéticamente puede suministrar los aditivos de color en la alimentación en una forma biodisponible. [REDACTED]

[REDACTED] En los experimentos descritos en esta tesis hemos observado efectos significativos en términos de pigmentación en la piel, la carne de pechuga y muslo, crestas, patas, grasa y otros órganos en los animales criados con dietas suplementadas con maíz fortificado. No se observaron efectos negativos sobre la salud de los pollos alimentados con cualquiera de las dietas experimentales. Los hígados de las aves alimentadas con la dieta rica en carotenoides acumulan casi el doble de la cantidad de retinol en comparación con los de la dieta control. La bolsa de Fabricio, que normalmente se atrofia a medida que avanza la edad de los animales fue mayor en los animales criados con el maíz M37W-Ph3. También se deseó determinar si los animales criados con una dieta alta en carotenoides podrían ser protegidos en todo o en parte, después de la infección con *Eimeria tenella*, un parásito que causa coccidiosis. Curiosamente se observó una disminución significativa de la excreción de ooquistes de coccidios en las heces. Esto fue concomitante con una disminución en la gravedad de la dermatitis plantar y las lesiones ulcerosas digitales posteriores al desafío de *E. tenella*.

RESUM

La indústria avícola utilitza carotenoides per millorar la pigmentació de productes, com ara pollastres i ous, en part, per satisfer les preferències del consumidor per la pigmentació de la pell de pollastre i del rovell en tons ataronjats. Les matèries primeres utilitzades en les formulacions d'aliments de pollastres i gallines no són capaços de proporcionar quantitats suficients de carotenoides per assolir la pigmentació de la pell i del rovell suficient per satisfer les demandes dels consumidors. Per tant, la indústria avícola utilitza pigments com a additius per a pinsos. Aquests poden ser d'origen natural o sintètic i en les proporcions adequades dels ingredients clau es pot aconseguir el color desitjat. A partir del blat de moro blanc de Sud-àfrica M37W sense carotenoides a la UdL s'ha creat per enginyeria genètica una varietat (M37W Ph3) que acumula alts nivells de β -carotè, licopè, luteïna α -criptoxantina i zeaxantina. M37W Ph3 s'ha utilitzat en aquest estudi per provar la hipòtesi que el blat de moro fortificat genèticament pot subministrar els additius de color a l'alimentació en una forma biodisponible. [REDACTED]

[REDACTED] En els experiments descrits en aquesta tesi hem observat efectes significatius en termes de pigmentació a la pell, la carn de pit i cuixa, crestes, potes, greix i altres òrgans en els animals criats amb dietes suplementades amb blat de moro fortificat. No es van observar efectes negatius sobre la salut dels pollastres alimentats amb qualsevol de les dietes experimentals. Els fetges de les aus alimentades amb la dieta rica en carotenoides acumulen gairebé el doble de la quantitat de retinol en comparació amb els de la dieta control. La borsa de Fabricio, que normalment degenera a mesura que avança l'edat dels animals va ser més gran en els animals criats amb el blat de moro M37W-Ph3. També es va desitjar determinar si els animals criats amb una dieta alta en carotenoides podrien ser protegits en tot o en part, després de la infecció amb *Eimeria tenella*, un paràsit que causa coccidiosi. Curiosament es va observar una disminució significativa de l'excreció d'ooquistes de coccidis en la femta. Aquest va ser concomitant amb una disminució en la gravetat de la dermatitis plantar i les lesions ulceroses digitals posteriors al desafiament d'*E tenella*.

SUMMARY

The poultry industry utilizes carotenoids to enhance the pigmentation of products such as chickens and eggs in part to satisfy consumer preferences for yellow chicken skin and orange yolk pigmentation. The raw materials used in poultry feed formulations are unable to provide sufficient amounts of carotenoids to achieve the skin and yolk pigmentation levels to meet consumers' demands. Therefore, the poultry industry uses pigments as feed additives. These can be of natural origin or synthetic and in the appropriate proportions of key ingredients the desired color can be achieved. The South African white maize inbred M37W is devoid of carotenoids but a genetically engineered derivative, created at the UdL (M37W-Ph3) accumulates high levels of β -carotene, lycopene, lutein α -cryptoxanthin and zeaxanthin. M37W-Ph3 has been used in this study to test the hypothesis that genetically fortified maize can supply the feed color additives in a bioavailable form. [REDACTED]

[REDACTED]. In the experiments described in this thesis we observed dramatic effects in terms of the pigmentation in the skin, breast and thigh meat, crests, shanks, fat and other organs in animals reared on supplemented diets with the biofortified maize. No negative effects on the health of the chickens fed on any of the experimental diets were observed. The livers of birds fed on the high-carotenoid diet accumulated nearly double the amount of retinol compared to those on the control diet. The Bursa of Fabricius which normally degenerates as the animal matures was bigger in animals reared on the biofortified M37W-Ph3 maize. We also wished to ascertain if animals reared on the high carotenoid diet might be protected fully or in part following infection with *Eimeria tenella*, a causal parasite for coccidiosis. Interestingly a significant decrease of coccidia oocysts excretion in the feces was observed. This was concomitant with a decrease in the severity of foot pad dermatitis and digital ulcer lesions following the *E. tenella* challenge.

ÍNDICE	
RESUMEN.....	IX
RESUM.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XXIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XXIX
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 PRODUCCIÓN DE CARNE DE POLLO Y HUEVOS DE GALLINA	3
1.1.1 Producción de carne de pollo	3
1.1.2 Producción de huevo para consumo.....	4
1.2 USO DE MAÍZ EN LA ALIMENTACIÓN AVIAR.....	5
1.3 INGENIERÍA GENÉTICA EN MAÍZ.....	6
1.4 MAÍZ MW37-Ph3 Y BKT	7
1.5 LOS CAROTENOIDES Y SUS FUNCIONES BIOLÓGICAS.....	9
1.5.1 Síntesis y función en las plantas.....	10
1.5.2 Carotenoides en los organismos animales.....	10
1.6 REGULACIÓN LEGISLATIVA.....	12
1.6.1 Uso de productos modificados genéticamente en alimentación humana y animal.....	12
1.6.2 Materias primas y aditivos en alimentación animal	12
1.6.3 Uso de animales en experimentación.....	12
OBJETIVOS GENERALES.....	15
ENSAYO I: EVALUACIÓN DEL MAÍZ PH3 FORTIFICADO CON CAROTENOS EN POLLOS CRIADOS EN CENTRO DE EXPERIMENTACIÓN	19
3.1 INTRODUCCIÓN	21
3.2 OBJETIVOS	23
3.3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
3.3.1 Preparación de la dieta.....	24
3.3.2 Diseño experimental	25
3.3.3 Cría y condiciones ambientales	26
3.3.4 Recogida de datos.....	27
3.3.5 Análisis estadístico.....	29
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
3.4.1 Dieta	30
3.4.2 Crecimiento.....	32
3.4.3 Colorimetría.....	33

3.4.4	Peso de órganos.....	35
3.4.5	Histopatología.....	36
3.4.6	Bioquímica.....	44
3.4.7	Hematología.....	46
3.4.8	Serología.....	48
3.4.9	Análisis de carotenos	49
3.5	CONCLUSIONES.....	57
ENSAYO II: EVOLUCIÓN DEL COLOR, VALORACIÓN PRODUCTIVA Y SANITARIA EN POLLOS CRIADOS EN UNA EXPLOTACIÓN COMERCIAL ALIMENTADOS CON MAÍZ PH-3 FORTIFICADO CON CAROTENOIDES		
4.1	INTRODUCCIÓN	61
4.2	OBJETIVOS	62
4.3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
4.3.1	Preparación de la dieta.....	63
4.3.2	Diseño experimental	64
4.3.3	Cría y condiciones ambientales	64
4.3.4	Recogida de datos.....	66
4.3.5	Análisis estadístico.....	67
4.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
4.4.1	Dieta	69
4.4.2	Crecimiento	70
4.4.3	Colorimetría.....	71
4.4.4	Cuantificación de carotenoides.....	74
4.4.5	Rendimiento de la canal.....	77
4.4.6	Peso de órganos.....	78
4.4.7	Bioquímica.....	79
4.4.8	Hematología.....	81
4.4.9	Histología	83
4.4.10	Serología.....	85
4.5	CONCLUSIONES.....	87
ENSAYO III: EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN EN POLLOS CON MAÍZ FORTIFICADO EN CAROTENOIDES PH-3 EN LA RESPUESTA AL DESAFÍO EXPERIMENTAL CON <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SEROVAR ENTERITIDIS		
5.1	INTRODUCCIÓN	91
5.2	OBJETIVOS	93
5.3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	94

5.3.1	Elaboración de las dietas	94
5.3.2	Diseño experimental	95
5.3.3	Cría y condiciones ambientales	95
5.3.4	Recogida de datos.....	96
5.3.5	Análisis estadístico.....	97
5.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	99
5.4.1	Dieta	99
5.4.2	Consumo y crecimiento.....	99
5.4.3	Peso de las vísceras.....	100
5.4.4	Colorimetría.....	102
5.4.5	Bioquímica.....	105
5.4.6	Recuento microbiológico.....	107
5.4.7	Hematología.....	108
5.5	CONCLUSIONES.....	111
ENSAYO IV: RESPUESTA AL DESAFÍO EXPERIMENTAL CON <i>COCCIDIA</i> EN POLLOS ALIMENTADOS CON MAÍZ PH-3 FORTIFICADO EN CAROTENOIDES PH-3		113
6.1	INTRODUCCIÓN	115
6.2	OBJETIVOS	118
6.3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	119
6.3.1	Elaboración de las dietas	119
6.3.2	Diseño experimental	120
6.3.3	Cría y condiciones ambientales	120
6.3.4	Recogida de datos.....	121
6.3.5	Análisis estadístico.....	123
6.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	124
6.4.1	Dieta	124
6.4.2	Consumo y crecimiento.....	124
6.4.3	Peso de las vísceras.....	126
6.4.4	Colorimetría.....	127
6.4.5	Bioquímica.....	130
6.4.6	Lesiones y recuento de ooquistes.....	133
6.4.7	Lesiones de pododermatitis.....	134
6.4.8	Histología	136
6.5	CONCLUSIONES.....	140

INDICE DE FIGURAS

Fig. 2: Reconstrucción y extensión de la progresión en la biosíntesis de carotenos en el maíz salvaje. A partir de: Zhu et al. 2008.....	8
Fig. 3: Efectos fenotípicos: A, maíz M37W; B, maíz Ph3.....	9
Fig. 4: Representación esquemática del sistema CIE Lab.....	22
Fig. 5: Izquierda, distribución y separación por tratamiento el primer día de vida. Derecha, día 21, el día 9.....	26
Fig. 6: <i>Concentración de carotenoides en los pienso de arranque (a) y de crecimiento (b)....</i>	31
Fig. 7: Izquierda, pienso con maíz M37W; derecha, pienso con maíz Ph3.....	32
Fig. 8: Color de patas; Izquierda dieta M37W, Derecha dieta Ph3.	34
Fig. 9: Izquierda, pollo con dieta M37W. Derecha, pollo alimentado con maíz Ph3.	35
Fig. 10: <i>Muestra de hígado (A) donde se aprecian abundantes hematíes y linfocitosis (B) se aprecia una importante fibrosis y esteatosis.....</i>	38
Fig. 11: <i>Marcada fibrosis pulmonar.....</i>	39
Fig. 12: <i>Folículo de la bolsa de Fabricio</i>	40
Fig. 13: Tonsila cecal.....	44
Fig. 14: <i>Concentración de carotenoides y retinol en suero.....</i>	49
Fig. 15: <i>Muestras de suero obtenido de los pollos.....</i>	50
Fig. 16: <i>Efecto de la dieta Ph3 en los carotenoides en tejido muscular. (a) pechuga, pectoralis mayor; (b) muslo, iliotibial.</i>	51
Fig. 17: <i>Efecto de la dieta Ph3 en los carotenoides en la piel. (a) Piel de pechuga, área del apteridio tronco lateral; (b) Piel de muslo, área iliotibial; (c) Piel de la pata, área tarso lateral.....</i>	52
Fig. 18: <i>Efecto de la dieta Ph3 en los carotenoides de tejidos periféricos. (a) Base de las plumas. (b) Cresta.</i>	53
Fig. 19: Plumas, M37W (izquierda) y Ph3 (derecha).....	53
Fig. 20: <i>Efecto de la dieta Ph3 en la concentración de carotenoides en la grasa abdominal..</i>	54

Fig. 21: Efecto de la dieta Ph3 en la concentración de carotenoides en tejido hepático.....	55
Fig. 22: Concentración total de carotenoides en los tejidos estudiados	56
Fig. 23: Izquierda, dieta M37W, derecha, dieta Ph3. A, cabezas; B, pechugas; C, muslos; D, patas.....	56
Fig. 24: Distribución de los tratamientos en el interior de la nave.....	64
Fig. 25: (A) Variación de la temperatura. (B) Variación de la humedad relativa	65
Fig. 26: Control de color.....	71
Fig. 27: Efecto del consumo de la dieta Ph3 en luminosidad (L^*) rojos (a^*) y amarillos (b^*)	72
Fig. 28: Efecto del consumo de la dieta Ph3 en la concentración de carotenoides en la cresta.....	74
Fig. 29: Efecto del consumo de la dieta Ph3 en la concentración de carotenoides en (a) Musculo pectoralis mayor y (b) Piel de pechuga.	75
Fig. 30: Efecto del consumo de la dieta Ph3 en la concentración de carotenoides en suero....	76
Fig. 31: Efecto de la dieta Ph3 en la concentración total de carotenoides en los tejidos estudiados.....	77
Fig. 32: Vísceras extraídas en el matadero.....	78
Fig. 33: Canales de los pollos.....	78
Fig. 34: Efecto de la dieta con maíz Ph3 en la fórmula leucocitaria	82
Fig. 35: Aplicación del inóculo de Salmonella	95
Fig. 36: Aisladores durante el ensayo.....	96
Fig. 37: Efecto de la infección con Salmonella y de la dieta con maíz Ph3 en el valor cromatográfico.....	104
Fig. 38: Fórmula leucocitaria. (a) , 7 dpi; (b) 14 dpi; T-1, M37W no infectado; T-2, M37W infectado; T-3, Ph3 no infectado; T-4, Ph3 infectado. (n=7).	108
Fig. 39: Aplicación del inóculo de coccidios a los 13 días de vida.....	120
Fig. 40: Ciegos preparados para la valoración externa de lesiones.	122
Fig. 41: Carga de la cámara de McMaster para recuento de ooquistes.....	122

Fig. 42: Evolución del peso de los pollos en los grupos. T-1, M37W no infectado; T-2, M37W infectado; T-3, PH-3 no infectado; T-4, PH-3 infectado	125
Fig. 43: Valores croma durante el ensayo.....	129
Fig. 44: Coccidiosis en ciegos.	134
Fig. 45: Porcentaje de humedad en la yacija de los cuatro aisladores.....	135
Fig. 46: Patas de pollos preparadas para su valoración.	136
Fig. 47: Cortes histológicos de tonsilas cecales	139
Fig. 48: Afectación de la mucosa de ciego por la invasión intracelular de coccidios.....	139
Fig. 49: Biosíntesis de carotenoides e inserciones génicas en los maíces utilizados en el estudio (Zhu et al.2008).....	147
Fig. 50: Muestras de maíz y pienso empleados en el ensayo.....	152
Fig. 51: Panel de yemas procedentes de cada una de las dietas desde que se inicia el tratamiento (día 0) hasta la finalización del mismo (día 20).....	156
Fig. 52: Contrastación con el abanico DSM del valor obtenido automáticamente en el Egg Analyzer.....	156
Fig. 53: Yema de huevo del tratamiento BKT, tras 5 días de tratamiento (día 18 del experimento).....	157
Fig. 54: Retinol y R350 en hígado.....	159
Fig. 55: Matriz de carotenoides en el hígado.....	160
Fig. 56: Egg Analyzer TM	160

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Perfil nutricional del maíz híbrido comercial</i>	5
Tabla 2: <i>Necesidades nutricionales de los pollos, en las etapas de inicio y crecimiento</i>	6
Tabla 3: <i>Contenido de carotenos ($\mu\text{g/g ms}$) en los maíces M37W, Ph3 y Ph-6</i>	9
Tabla 4 <i>Valores del mercado mundial de carotenoides en el año 2009 (millones de €)</i>	22
Tabla 5: <i>Composición de los piensos empleados tratamiento Ph3 y control M37W</i>	25
Tabla 6: <i>Análisis nutricional y de micotoxinas de ambos tipos de maíz</i>	30
Tabla 7: <i>Análisis nutricional según el tratamiento y el tipo de pienso</i>	30
Tabla 8: <i>Efecto del maíz en el peso y la viabilidad semanal de los pollos</i>	32
Tabla 9: <i>Efecto de la dieta en el Índice de Conversión acumulado entre periodos (días) en diferentes etapas del crecimiento de los pollos</i>	33
Tabla 10: <i>Efecto del consumo de la dieta Ph3 en el color medido en el momento del sacrificio, en piel y músculo</i>	34
Tabla 11: <i>Valores medios con error estándar del efecto de la dieta sobre la saturación de color valorado con croma en las diferentes áreas de medición y diferencia absoluta de color ($\Delta E_{M37W-Ph3}$) entre Ph3 y M37W</i>	35
Tabla 12: <i>Efecto del maíz en el peso relativo de algunos órganos (g/kg de peso vivo)</i>	36
Tabla 13: <i>Efecto de la dieta sobre la presentación y gravedad de lesiones hepáticas</i>	38
Tabla 14: <i>Efecto de la dieta sobre las lesiones estudiadas en pulmón</i>	39
Tabla 15: <i>Efecto de la dieta en la presentación de lesiones en tejido de bolsa de Fabricio</i>	40
Tabla 16: <i>Efecto de la dieta Ph3 en la presentación de lesiones en tejido de riñón</i>	41
Tabla 17: <i>Efecto de la dieta Ph3 en la presentación de alteraciones en tejido de bazo</i>	42
Tabla 18: <i>Alteraciones en tejido de timo en respuesta a la dieta con maíz Ph3</i>	43
Tabla 19: <i>Efecto de la dieta Ph3 en la presentación de alteraciones en tejido de tonsilas cecales</i>	44
Tabla 20: <i>Bioquímica sanguínea, efecto de la dieta con maíz Ph3</i>	45

Tabla 21: <i>Efecto de la dieta en los valores de color en el suero.</i>	46
Tabla 22: <i>Efecto de la dieta con maíz en colesterol, triglicéridos y ratio HDL/LDL.</i>	46
Tabla 23: <i>Hemograma, efecto de la dieta con maíz Ph3.</i>	47
Tabla 24: <i>Efecto de la dieta con maíz Ph3 en la fórmula leucocitaria.</i>	47
Tabla 25: <i>Efecto de la dieta Ph3 en los títulos serológicos (IBV, IBD, REO, CAV y NCD¹).</i>	49
Tabla 26: <i>Composición (%) del pienso.</i>	63
Tabla 27: <i>Contenido (mg/g materia seca) de carotenoides del maíz M37W y la variante modificada Ph3.</i>	69
Tabla 28: <i>Análisis nutricional y de micotoxinas del maíz.</i>	69
Tabla 29: <i>Análisis del pienso.</i>	70
Tabla 30. <i>Efecto de la dieta Ph3 en el peso vivo(g) los días 8, 18, 21,28 y 35 de vida</i>	70
Taula 31: <i>Efecto del consumo de la dieta Ph3 en el color medio de las diferentes regiones anatómicas 24 horas post mortem.</i>	73
Tabla 32: <i>Efecto del consumo de la dieta Ph3 en el rendimiento de la canal. Los valores corresponden a las medias y el error estándar (n = 24).</i>	77
Tabla 33: <i>Efecto del tratamiento pH-3 en el peso relativo (g/kgpv) de los órganos;</i>	78
Tabla 34: <i>Bioquímica sanguínea.</i>	80
Tabla 35 <i>Efecto de la dieta con el maíz Ph3 en el colesterol total, LDL y HDL.</i>	81
Tabla 36: <i>Hemograma, efecto de la dieta.</i>	81
Tabla 37: <i>Efecto de la dieta en la intensidad de las lesiones observadas en muestras de pulmón.</i>	83
Tabla 38: <i>Efecto de la dieta en la presentación y gravedad de lesiones hepáticas.</i>	83
Tabla 39: <i>Efecto de la dieta en la presentación de lesiones en bolsa de Fabricio.</i>	84
Tabla 40: <i>Estudio histológico de tejido de bazo, efecto de la dieta.</i>	84
Tabla 41: <i>Características histológicas del tejido de tonsilas cecales</i>	85
Tabla 42: <i>Efecto de la dieta con el maíz Ph3 en los títulos serológicos.</i>	85

Tabla 43: <i>Formula completa de los piensos según el porcentaje de ingredientes</i>	94
Tabla. 44: <i>Análisis nutricional</i>	99
Tabla 45: <i>Resultado del análisis de micotoxinas en el pienso y el maíz</i>	99
Tabla 46: <i>Índice de conversión (IC) y consumo de pienso durante la segunda y tercera semana de vida</i>	100
Tabla 47: <i>Efecto del tipo de maíz y desafío infeccioso sobre el peso de los pollos a 14 y 21 días de edad</i>	100
Tabla 48: <i>Efecto del maíz y la infección con Salmonella en el peso relativo de los órganos a los 14 y 21 días de vida (7 y 14 dpi)</i>	101
Tabla 49: <i>Evolución del color en los tratamientos bajo el efecto del tipo de maíz y de la infección con Salmonella</i>	103
Tabla 50: <i>Efecto de la dieta y de la infección con Salmonella sobre los electrolitos sanguíneos</i>	105
Tabla 51: <i>Bioquímica, efecto de la dieta y de la infección con Salmonella</i>	106
Tabla 52: <i>Número de colonias de Salmonella por órgano en los grupos infectados</i>	108
Tabla 53: <i>Efecto de la dieta y de la infección sobre hematocrito, hemoglobina y leucocitos</i>	109
Tabla 54: <i>Efecto de la dieta y de la infección con salmonela sobre la serie leucocitaria</i>	110
Tabla 55: <i>Formula completa del pienso según el porcentaje de ingredientes</i>	119
Tabla 56. <i>Análisis nutricional</i>	124
Tabla 57. <i>Resultado del análisis de micotoxinas en el pienso y el maíz</i>	124
Tabla 58: <i>Efecto del tipo de maíz y desafío infeccioso sobre el peso de los pollos a 14,19 y 21 días de edad</i>	125
Tabla 59: <i>Consumo e índice de conversión en cada periodo por tratamiento</i>	126
Tabla 60: <i>Peso relativo (g/kgpv) de los órganos</i>	127
Tabla 61. <i>Efecto del tipo de maíz y de la infección con coccidios en el color de la piel</i>	128

Tabla 62: <i>Efecto de la dieta y de la infección con coccidia sobre los electrolitos sanguíneos</i>	130
Tabla 63: <i>Efecto de la dieta y de la infección con coccidia sobre los indicadores bioquímicos.</i>	131
Tabla 64: <i>Evolución de la excreción de ooquistes en heces en los tratamientos infectados.</i>	133
Tabla 65: <i>Graduación de lesiones en intestino</i>	133
Tabla 66: <i>Efecto de la dieta Ph3 en la presentación de úlceras en las patas en grupos infectados o no de coccidia.</i>	134
Tabla 67: <i>Pododermatitis en los pollos sacrificados el día 19 (6 dpi).</i>	135
Tabla 68: <i>Efecto de la dieta Ph3 y de la infección con coccidia en la presentación y gravedad de lesiones hepáticas.</i>	137
Tabla 69: <i>Presencia de agregados linfocitarios en hígado</i>	137
Tabla 70: <i>Efecto de la dieta Ph3 y de la infección con coccidia en la presentación de lesiones de depleción, en bolsa de Fabricio.</i>	137
Tabla 71: <i>Efecto de la dieta Ph3 y la infección por coccidia en el número medio de vacuolas por campo (x40) en bolsa de Fabricio.</i>	138
Tabla 72: <i>Nódulos linfoides activados en tonsilas cecales</i>	138
Tabla 73: <i>Composición de las dietas</i>	147
Tabla 74: <i>Análisis nutricional y de micotoxinas según el tipo de maíz</i>	152
Tabla 75: <i>Análisis nutricional y de micotoxinas de las distintas dietas</i>	153
Tabla 76: <i>Concentración de carotenoides ($\mu\text{g/g}$) en los piensos</i>	153
Tabla 77: <i>Consumo medio de pienso (g/gallina/día).</i>	154
Tabla 78: <i>Evolución del peso (g) de las gallinas durante el experimento</i>	154
Tabla 79: <i>Efecto de los tratamientos sobre el peso (g) del huevo</i>	154
Tabla 80: <i>Efecto de las dietas sobre masa de huevo, número de huevos, puesta media diaria e índice medio de conversión</i>	155

Tabla 81: <i>Efecto de las diferentes dietas en el color de la yema de los huevos, medido con el estándar CIELab, en las distintas fases del experimento.....</i>	155
Tabla 82: <i>Concentración de carotenoides en la yema de los huevos ($\mu\text{g/g ms}$) día 0 de experimento.....</i>	157
Tabla 83: <i>Concentración de carotenoides en la yema de huevo ($\mu\text{g/g}$ de materia seca), día 18 de experimento.....</i>	158
Tabla 84: <i>Concentración de carotenoides en la yema de huevo ($\mu\text{g/g}$ de materia seca), día 31 de experimento.....</i>	159
Tabla 85: <i>Variación en la concentración de carotenoides al final del periodo de tratamiento, (100% día 0 del ensayo).....</i>	159
Tabla 86: <i>Efecto de las dietas en los parámetros de calidad de huevo.....</i>	161
Tabla 87: <i>Concentración de ácidos grasos en la yema de los huevos procedentes de los diferentes tratamientos.....</i>	162

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
a*	Rojos
a. C	Antes de Cristo
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analistas
apo-B	Apolipoproteína B
arctotang	Arcotangente
arcsen	Arcoseno
b*	Amarillos
BCDO2	β -caroteno dioxigenasa 2
BHT	Butilhidroxitolueno
BOE	Boletín Oficial del Estado
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	Croma
χ^2	Test Chi cuadrado
Ca	Calcio
CAV	Virus de la anemia del pollo
CD4	Cúmulo de diferenciación 4
CD8	Cúmulo de diferenciación 8
CE	Comunidad Europea
CEEA	Comité de Etica en Experimentación Animal
CESAC	Centro de Sanidad Avícola de Cataluña
CHM II	Complejo de Histocompatibilidad Mayor de tipo II
CIE	Compañía Internacional de la Iluminación
Cis	Cisteína
ΔE	Incremento de color
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DON	Deoxinivalenol
dpi	Días post infección
EDTA	Etildiaminotetraacético
EFSA	Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria
ELISA	Inmunoabsorción ligada a enzimas
EM	Energía metabolizable
FAL	Fosfatasa alcalina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fig.	Figura
GGPP	Geranil geranil difosfato
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa;
GLM	Modelo lineal generalizado
GMD	Ganancia Media Diaria
GOT	Transaminasa glutámico oxalacética
GPT	Transaminasa glutámico pirúvica
H5N2	Hemoaglutinina 5, Neuraminidasa 2
HDL	Lipoproteínas de alta densidad

HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSC	Células hepáticas estrelladas
HVT	Virus herpes del pavo
IBD	Enfermedad infecciosa de la Bolsa
IBV	Bronquitis infecciosa aviar
IC	Índice de Conversión
Ig	Inmunoglobulina
IH	Inhibición de la Hemoaglutinación
IOM	Organización médica internacional
IPP	Difosfato isopentil
IRTA	Instituto de Investigación y Tecnologías Agroalimentarias
ISO	Organización Internacional para la Estandarización
ITA02	Italia 02
K	Potasio
KOH	Hidróxido de potasio
L*	Luminosidad
L/H	Linfocitos/Heterófilos
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Lut	Luteína
M€	Millones de euro
M41	Massachusetts 41
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Met.	Metionina
ms	Materia seca
n	número
Na	Sodio
NAFLD	Enfermedad de hígado graso de origen no alcohólico
NCD	Enfermedad de Newcastle
nd	No detectado
NK	Natural Killer
NMP	Número más probable
P	Fósforo
P dis	Fósforo disponible
PB	Proteína bruta
QX	Qingdao China
RAC	Ácido retinoico conjugado
RAE	Equivalentes de actividad retinol
RD	Real Decreto
REGA	Registro Ganadero
REO	Enfermedad por Reovirus
SL	Sociedad limitada
SA	Sociedad anónima
TCR	Receptores de células T
TRIG	Triglicéridos
Tukey HSD	Test Tukey de la diferencia honestamente significativa
UE	Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonias

UPAC	Comisión para la nomenclatura de química orgánica
USA	Estados Unidos de América
Viol	Violaxantina
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
vs.	<i>Versus</i>
WHO	Organización Mundial de la Salud
<i>wild type</i>	Variedad natural
Zeax	Zeaxantina
Zeax-5,8-epox	Zeaxantina-5,8-epóxido
β -Cry	β -Criptoxantina
α -Cry	α -Criptoxantina
β -Car	β -Caroteno
β -Car-5,8-epox	β -Caroteno-5,8-epóxido.

UNIDADES

μ	Micra
μg	Microgramo
μl	Micro litro
cm	Centímetro
dl	Decilitro
g	Gramo
h°	Ángulo
K	Kelvin
kcal	Kilocaloría
kg	Kilogramo
kgpv	Kilogramos de peso vivo
kW	Kilowatio
L	Litro
m	Metro
m^2	Metro cuadrado
m^3	Metro cúbico
mEq	Miliequivalente
mg	Miligramo
MJ	Megajulio
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
nm	Nanómetro
$^\circ\text{C}$	Grado Centígrado
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
UI	Unidad Internacional
W	Vatio

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 PRODUCCIÓN DE CARNE DE POLLO Y HUEVOS DE GALLINA

La domesticación de las aves por los humanos se inicia con la gallina 6.000 años a.C. en la zona de la actual China (West y Zhou 1989), también se dispone de evidencias de domesticación en el valle de Indo, datadas 2.000 años a.C.. Las culturas Egipcia, Griega, Romana y Árabe hicieron uso de las aves y de su gran capacidad de adaptación para vivir en el entorno doméstico, parte de este conocimiento ha sido transmitido hasta nuestra época, entre otros, en los textos de Plinio, Aristóteles, Columela, Abencenif y Gabriel Alonso de Herrera quien a principios del siglo XVI deja constancia de la práctica de la avicultura en el Capítulo XV del libro 5º del Libro de Agricultura (1513). Se sabe que los españoles llevaron las gallinas a América, aunque se especula con que ya existiesen allí, hecho que se refuerza con la presencia de la gallina Araucana, cuyo origen no es fácil de definir (Crawford 2003).

1.1.1 Producción de carne de pollo

La carne de pollo ha sido consumida a lo largo de la historia por todas las civilizaciones y en la actualidad es la segunda más consumida en todo el mundo (93 millones de toneladas anuales) (FAO 2013). El consumo de pollo como alimento habitual de la población, se inicia a principio del siglo XX, en la zona Este de Estados Unidos consolidándose el uso de la palabra que lo define, “broiler” (Leeson y Summers 2000) a partir del sistema de cocinado conocido en inglés como “broiling”, en el cual la llama incide directamente sobre el producto cocinado (Collins 2014).

Durante la década de 1960 se produjo el verdadero inicio de la avicultura industrial en España, un modelo avícola ejemplar en muchos aspectos, pero dependiente del exterior en dos cuestiones importantes: la genética y la alimentación. Rápidamente el modelo empresarial que se impuso fue la integración vertical¹, sistema que se mantiene en la actualidad (Buxadé 1988).

En 2013 en España, existían 5.034 explotaciones avícolas dedicadas directamente a la cría de pollos, cuya producción fue de 1,12 millones de toneladas de carne. En la clasificación de países de la Unión Europea, ocupa el tercer puesto representando el 11,6% de la producción comunitaria, estos valores se mantienen estables durante la última década, probablemente porque el consumo aparente de carne de pollo, junto con el resto de carnes de ave, se mantiene con ligeras fluctuaciones en 29,4 Kg por persona y año (MAGRAMA 2014b).

La selección de los pollos por velocidad de crecimiento no fue prioritaria hasta la década de 1930, en la que los pollos, en muchos casos machos de raza Leghorn sufrieron elevada mortalidad debido a su especial sensibilidad a la enfermedad de Marek. En la región de Delmarva (USA) se popularizaron los cruces de machos de raza Cornish White y hembras

¹ En el modelo de integración vertical, el ganadero aporta la instalación, mano de obra y experiencia profesional, quedando el resto a cargo de la empresa integradora, normalmente una empresa fabricante de piensos compuestos.

de raza White Plymouth Rock, debido a su mayor resistencia a la enfermedad de Marek, ciclo de vida más corto y crecimiento más rápido (Leeson y Summers 2000).

La reducción del coste de producción de carne de pollo en el periodo 1934-1960, fue del 53,45%, y en el periodo 1960-2004, del 58,33 % (USDA 2006). Los experimentos de Havenstein et al. (2003) demostraron que el avance genético ha sido el responsable de entre el 85 y el 90% del incremento del crecimiento de los pollos durante el periodo 1956-2003, siendo la nutrición la responsable del 10-15 % restante.

La producción de carne de pollo genera menos emisiones de gases invernadero por unidad de producto que ninguna otra producción ganadera de carne. Durante los últimos 20 años, la reducción de esta emisión derivada del avance en genética, ha sido del 25%, y se espera en los próximos 20 años repetir una reducción similar (Jones et al. 2008).

Esta elevada velocidad de crecimiento y la eficiencia en la producción ha generado algunos débitos biológicos, que se observan en los broilers, como la discondroplasia tibial (DT), la ascitis o la pododermatitis (Cooper y Wrathall 2010). Los programas de selección genética tienen en cuenta el buen estado de las patas en los criterios de selección y aunque se consiguen resultados positivos, es a costa de una correlación negativa con el peso corporal (Kapell et al. 2012).

Dermatitis plantar o pododermatitis, es una lesión de las patas de los pollos, que cursa con inflamación, necrosis y úlceras en la cara plantar de las garras. La prevalencia del problema es elevada, resultando positivos más del 60% de los pollos sacrificados, de los cuales más del 40% tienen lesiones medias o severas (de Jong et al. 2012). Las causas citadas son multifactoriales, pero se pueden resumir en: el entorno, la nutrición y la genética. El problema de la pododermatitis afecta al bienestar de los pollos de engorde, la seguridad alimentaria y el rendimiento económico, esto último agravado por la revalorización de las patas en el mercado asiático (Shepherd y Fairchild 2010).

Todas las culturas contemporáneas aceptan la carne de pollo como producto alimentario, su consumo ha crecido espectacularmente en los últimos años. Actualmente, la industria avícola mundial, es capaz de proporcionar 40 g de carne de ave por persona y día, un aporte que de ser homogéneo en el mundo ayudaría a reducir los déficits nutricionales, el crecimiento de este tipo de producción durante los últimos 50 años ha sido del 1.117% (FAO 2012, 2013; United Nations 2013).

1.1.2 Producción de huevo para consumo

Con una población de 7.000 millones de personas en el mundo, durante el año 2012, se produjeron más de 100.000 millones de docenas de huevos; en consecuencia el abastecimiento mundial de huevo de gallina es aproximadamente de 0,5 huevos por persona y día, el crecimiento mundial de la producción de huevo durante el último medio siglo fue el 453 % (FAO 2012; United Nations 2013).

En el año 2012, las 1.492 explotaciones españolas de gallinas ponedoras, alojaron un censo de 43.643.000 gallinas y produjeron más de 950 millones de docenas de huevos, que de acuerdo con la población existente supone aproximadamente 248 huevos por persona y año, aunque el consumo real es menor, puesto que España es exportador neto de huevo hacia otros países de la Unión Europea y hacia terceros (MAGRAMA 2014a). Los censos y

las producciones reflejadas por los países europeos durante la última década han sido muy variables y desconcertantes, probablemente por la finalización de los plazos de aplicación de la DIRECTIVA 1999/74/CE de 19 de julio de 1999 por la que se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras (CE 1999).

1.2 USO DE MAÍZ EN LA ALIMENTACIÓN AVIAR

Más del 60% de la producción mundial de maíz es destinada a la alimentación animal (FAO 1993), la composición nutritiva del maíz, así como sus características agronómicas, especialmente la posibilidad de almacenarlo como grano, lo convierten en una materia prima de elección en la alimentación de muchas especies animales domésticas, entre ellas las aves.

Los granos de maíz presentan un peso específico de 0.696 kg/L y pueden ser incluidos en el pienso del pollo adulto hasta una concentración máxima del 70%, (Leeson y Summers 2008), esta elevada tasa de inclusión también es debida a la ausencia de factores antinutritivos. Porcentajes superiores generaría problemas de tipo tecnológico en la fabricación.

Tabla 1: *Perfil nutricional del maíz híbrido comercial.*

Materia seca (%)	85,00	Sodio (%)	0,05
Proteína Bruta (%)	8,50	Cloro (%)	0,05
Grasa (%)	3,80	Potasio (%)	0,38
Fibra (%)	2,50	Selenio (ppm)	0,04
Energía Metabolizable (kcal/kg)	3.330	Metionina (%)	0,20
Ácido linoleico (%)	1,90	Metionina + Cisteína (%)	0,31
Calcio (%)	0,01	Lisina (%)	0,20
Fósforo disponible (%)	0,13	Triptófano (%)	0,10
Arginina (%)	0,39	Treonina (%)	0,41

(Leeson y Summers 2000).

En otros ensayos se han diseñado experimentos con dietas en base a maíz, inclusiones entre el 58 y el 68 % son empleadas en pollo de engorde por Brake y Vlachos (1998), entre el 48 y el 68% son empleadas posteriormente por el mismo autor (Brake et al. 2003, 2005). En un experimento con gallina ponedora Liu et al. (2012) introdujeron 60%, de maíz. También con gallinas ponedoras, Jacobs et al. (2008) llegan a valores del 65 al 69 %.

Tabla 2: *Necesidades nutricionales de los pollos, en las etapas de inicio y crecimiento.*

	Inicio			Crecimiento		
	Hubbard	Ross	Cobb	Hubbard	Ross	Cobb
EM (kcal/kg)	3.000	3.040	3.023	3.080	3.140	3.166
PB (%)	22,00	22,00	21,50	20,00	20,00	19,50
Ca (%)	0,95	1,00	0,90	0,90	0,90	0,88
P dis (%)	0,44	0,50	0,45	0,40	0,45	0,42
Na (%)	0,19	0,21	0,20	0,19	0,21	0,17
Metionina (%)	0,50	0,53	0,56	0,45	0,46	0,53
Met. + Cis (%)	0,90	0,97	0,98	0,83	0,85	0,96
Lisina (%)	1,25	1,35	1,33	1,15	1,18	1,25
Treonina (%)	0,81	0,87	0,85	0,75	0,70	0,80

EM, energía metabolizable; PB, proteína bruta; P dis, fósforo disponible; Met.+Cis, metionina más cisteína. (Leeson y Summers 2000).

1.3 INGENIERÍA GENÉTICA EN MAÍZ

El desarrollo de las técnicas de ingeniería genética a partir de los años setenta y su incorporación al sector agrícola posibilitaron la obtención de cultivos genéticamente modificados. El maíz transgénico es aquel al que han realizado modificaciones genéticas, insertando uno o más de un gen con características de interés, mediante el uso de la tecnología de genes o ADN recombinado.

A través de la tecnología de ADN recombinado es posible introducir en el maíz genes exógenos, procedentes de bacterias, plantas o animales.

El cultivo de maíces modificados genéticamente se ha incrementado sustancialmente desde su introducción en el comercio. Los que se encuentran actualmente en el mercado responden a dos características agronómicas: resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas.

En los últimos años, la biotecnología ha producido nuevas variedades de cultivos de plantas con componentes mejorados como los de protección contra infecciones y los que mejoran la calidad o procesado de tratamientos. Muchos transgénicos se generan para potenciar en las plantas la resistencia contra insectos (Christou et al. 2006) o tolerancia a los herbicidas y la mayoría se llevan a cabo en cultivos de gran producción, como pueden ser el maíz, la soja, la patata, el algodón o la colza (Brake et al. 2005).

El maíz constituye el segundo cultivo biotecnológico por número de hectáreas, en 2013, en todo el mundo se sembraron 50,7 millones de hectáreas, que representan el 33% de toda la superficie sembrada con cultivo biotecnológico (<http://www.isaaa.org>).

El ejemplo más notable de este uso, es el maíz con el gen *Bt*; este gen, procedente del *Bacillus thuringiensis* que induce la síntesis de una proteína, Cry1Ab, con propiedades insecticidas, que protege al maíz de las larvas del taladro del maíz y de otros lepidópteros. Sin embargo es inocua para otros insectos, animales y humanos (Koziel et al. 1993).

La primera variedad de maíz modificado genéticamente comercializada fue el maíz resistente a insectos, introducida en 1996 en Estados Unidos (Brake et al. 2005).

Más recientemente se descubrió otro gen, *vip3A*, en el *Bacillus thuringiensis*, que induce la expresión de la proteína VIP3A, con características insecticidas similares, pero más amplias en cuanto a las especies de lepidópteros afectadas: *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda* y *Agrotis ipsilon* entre otras (Estruch et al. 1996).

La seguridad del uso de estas plantas modificadas genéticamente ha sido estudiada por varios autores. La posibilidad de que las construcciones originales de la modificación genética del maíz *Bt* (*Cry1Ab*), sean encontradas en carne de pollo o huevos de gallina quedó descartada por Einspanier et al. (2001), quién a pesar de encontrar ácido desoxirribonucleico (ADN) procedente de los cloroplastos del maíz, no detectó las construcciones originales del citado gen. Similares resultados fueron hallados en músculo pectoral de pollo por Jennings et al. (2003).

Se pueden establecer tres periodos en la evolución de la producción de vegetales modificados genéticamente (Christou et al. 2006) en base a su finalidad: una primera fase donde el objetivo fue fundamentalmente de tipo productivo, resistencia a insectos, herbicidas etc., una segunda fase, en la que el interés está en la producción de vegetales con características nutritivas mejoradas (más aceite, más vitaminas, menos alérgenos etc.), y una tercera fase, en la que directamente se busca la producción de moléculas farmacológicamente activas o deseadas por la industria (Yonekura-Sakakibara y Saito 2006).

El 90% del maíz producido en Estados Unidos es de origen modificado genéticamente, el 0,33% de los pollos producidos y el 1,97% de las gallinas lo hacen bajo la denominación de la producción ecológica, el resto en su mayoría crecen con una alimentación basada en granos modificados genéticamente, fundamentalmente maíz y soja. Las variables de eficiencia en el crecimiento (viabilidad, ganancia media diaria, e índice de conversión) durante el periodo 2000-2011, con un predominio en el mercado de los granos transgénicos ha mantenido y/o mejorado las tendencias previas al uso de estos alimentos (Eenennaam y Young 2014).

1.4 MAÍZ MW37-Ph3 Y BKT

Las variedades de maíz estudiadas han sido generadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal Aplicada, del Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal, Universidad de Lleida (Naqvi et al. 2009).

La transformación nuclear combinatoria es un método genético muy avanzado que permite obtener una rápida producción de variantes transgénicas de plantas (Naqvi et al. 2010). Las variantes Ph3 y BKT se han obtenido, con el objetivo de provocar una expresión genética elevada de carotenoides en la planta del maíz. La compleja regulación enzimática de las rutas metabólicas de los carotenoides, propicia las estrategias multigénicas, de forma que se consigue la introducción simultánea de varios genes y la expresión de sus combinaciones (Zhu et al. 2008). El sistema empleado para la transferencia génica es el bombardeo de la célula con partículas de oro recubiertas con la citada construcción

Como base genética, fue utilizada la variante salvaje blanca Sudafricana del maíz (M37W), que tiene una importante falta de carotenos, debido a la ausencia de la enzima fitoeno sintasa 1 (PSY1) necesaria para la biosíntesis de estos metabolitos (Zhu et al. 2008).

Fueron introducidos 2 genes carotenogénicos: *Zmpsy1* (*Zea mays* fitoeno sintasa 1) y *Pacr1* (*Pantoea ananatis* fitoeno desaturasa). Cada uno de estos genes está controlado por diferentes promotores específicos situados en el endospermo de la semilla del maíz.

Los carotenoides son generados en los plastos de las plantas a partir de geranyl geranyl difosfato (GGPP). Este elemento sigue una serie de transformaciones biológicas catalizadas por enzimas, como la fitoeno sintasa. Se introdujeron los genes mencionados que codifican para expresar las enzimas necesarias en este proceso que acaba en la obtención de los carotenos deseados (Fig. 1).

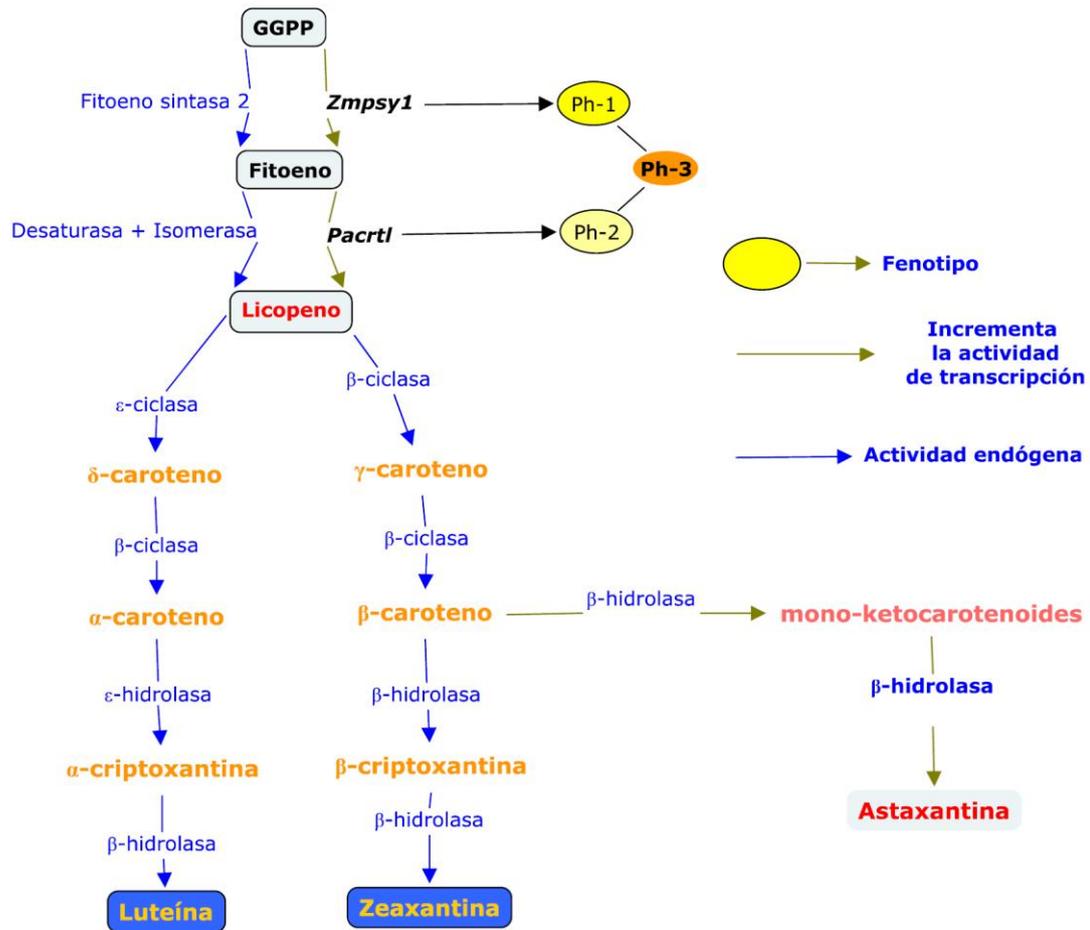


Fig. 1: Reconstrucción y extensión de la progresión en la biosíntesis de carotenos en el maíz salvaje. A partir de: Zhu et al. 2008.

Ambos tipos de maíz, M37W y Ph3 presentan una correlación lógica entre los fenotipos y los transgenes expresados (Fig. 1). El fenotipo Ph3, da unos resultados de coloración naranja-rojizo en el maíz, por lo que se deduce que el efecto de la expresión fenotípica se manifiesta con más intensidad.



Fig. 2: Efectos fenotípicos: A, maíz M37W; B, maíz Ph3.

Tabla 3: Contenido de carotenos ($\mu\text{g/g ms}$) en los maíces M37W, Ph3 y Ph-6.

	M37W	Ph3	Ph-6
Fitoeno ($\mu\text{g/g}$)	-	9,40 \pm 2,42	18,93 \pm 3,86
Licopeno ($\mu\text{g/g}$)	-	26,69 \pm 10,65	12,61 \pm 1,49
γ -Carotenos ($\mu\text{g/g}$)	0,07 \pm 0,03	3,31 \pm 0,19	1,55 \pm 0,14
α -Carotenos ($\mu\text{g/g}$)	0,09 \pm 0,02	6,10 \pm 0,65	5,56 \pm 1,28
β -Carotenos ($\mu\text{g/g}$)	0,14 \pm 0,05	57,35 \pm 5,77	34,81 \pm 4,37
α -Criptoxantina ($\mu\text{g/g}$)	-	12,20 \pm 2,32	12,94 \pm 1,80
β -Criptoxantina ($\mu\text{g/g}$)	-	5,97 \pm 0,65	1,85 \pm 0,38
Luteína ($\mu\text{g/g}$)	0,53 \pm 0,14	9,76 \pm 1,32	9,14 \pm 1,08
Zeaxantina ($\mu\text{g/g}$)	0,27 \pm 0,08	25,36 \pm 3,42	13,71 \pm 1,81
Adonixantina	-	-	22,36 \pm 3,52
Astaxantina	-	-	4,46 \pm 1,29
Otros	-	-	8,83
Total ($\mu\text{g/g}$)	1,1	156,14	146,75

Los valores representan la media \pm el error estándar. (Zhu et al. 2008).

El maíz Ph3 obtiene unos resultados muy elevados en contenido en β -caroteno, zeaxantina y licopeno, dos de los elementos más valorados tanto por el aporte vitamínico como por su efecto pigmentante.

El maíz Ph-6 es el origen del maíz BKT, el aspecto es rojizo y además de las inserciones descritas para el Ph3 se han introducido los genes *lycb*, procedente de la planta genciana (*Genciana lutea*) y el gen *crtW*, (*Paracoccus sp.*) (Fig. 48). En esta variedad se ha potenciado la expresión de cetocarotenoides como adonaxantina o astaxantina.

1.5 LOS CAROTENOIDES Y SUS FUNCIONES BIOLÓGICAS

Los carotenoides son hidrocarburos (carotenos) y sus derivados oxigenados (xantofilas) que tienen ocho isoprenoides unidos de tal manera que la disposición de estas unidades isoprenoides se invierte en el centro de la molécula de modo que los dos grupos metilo centrales están en una relación posicional 1,6 y los grupos metilo no terminales restantes están en una relación posicional 1,5 (UPAC y IUB 1974).

Todos los carotenoides pueden derivar de la estructura acíclica $C_{40}H_{56}$ compuesta por una cadena central larga que contiene dobles enlaces conjugados y que se pueden describir por la fórmula general $C_{40}H_{56}O_n$. Donde n puede estar formada por 0-6 hidrocarburos. Cuando $n=0$ los compuestos resultantes se denominan carotenos, mientras que en los carotenoides oxigenados n está comprendida entre 1 y 6 (Surai 2012).

1.5.1 Síntesis y función en las plantas

Uno de los principales pigmentos de las plantas son los carotenoides y tienen una función primordial evitando que el exceso de energía dañe el proceso de la fotosíntesis y algunos como la zeaxantina y los β -carotenos actúan en reacciones conjuntas para evitar los daños celulares (Nayak et al. 2001). El color presente en las plantas es obtenido mayoritariamente de los pigmentos naturales y ofrece información a los animales y a los humanos sobre la identificación de la planta y de sus partes así como del momento de desarrollo en el que ésta se encuentra. También se considera que son primordiales en el color de las hojas secas, cuando la clorofila ya ha sido destruida (Omayma y Abdel Nasser 2013).

La síntesis de carotenoides en las plantas comienza en los plastos con la condensación del difosfato isopentenil (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP) para generar el geranil geranil difosfato (GGPP). Esta reacción es catalizada por la GGPP sintasa. Este elemento sigue una serie de transformaciones biológicas catalizadas por enzimas necesarias como la fitoenosintasa y luego se genera el cromóforo del carotenoide que, en tejidos no verdes, se convierte todo en trans-licopeno a partir de enzimas y en tejidos verdes la reacción a trans-licopeno es espontánea por la presencia de luz y clorofila. El trans-licopeno es un punto de ramificación de la vía donde a partir de diferentes reacciones derivarán los distintos carotenoides (Farré et al. 2011).

La síntesis y la acumulación de carotenoides está determinada genéticamente, pero la composición y el contenido dependen del ambiente y las condiciones de cultivo (Britton et al. 2009).

Los vegetales verdes son de este color debido a la presencia de clorofila en el cloroplasto, donde también se encuentran los carotenoides. Las frutas inmaduras también contienen los carotenoides en los cloroplastos, pero estos pigmentos pueden permanecer o ser degradados. En la fruta madura, los carotenoides se sintetizan y acumulan en los cromoplastos, orgánulos subcelulares que reemplazan los cloroplastos y pueden derivar de ellos. La síntesis es controlada por genes que se activan durante el proceso de maduración de la fruta (Britton et al. 2009).

En el caso de las raíces, como la batata, los carotenoides también son sintetizados y acumulados en los cromoplastos. En las semillas, la acumulación de los carotenoides se produce en el endospermo (Britton et al. 2009).

1.5.2 Carotenoides en los organismos animales

Los animales y los humanos no pueden sintetizar los carotenoides, por ello deben ser aportados con la dieta, pero sí que son capaces de hacer algunas alteraciones en la estructura química básica como la oxidación o la reducción, entre otras (Surai et al. 2001). Aunque las frutas y las verduras son buenas fuentes de ciertos carotenoides, generalmente

los granos de los cereales no contienen estos compuestos y esto conlleva el desarrollo de enfermedades carenciales en los países donde los cereales son el alimento básico. También, con excepción de la flor *Adonis aestivalis*, la astaxantina y otros cetocarotenoides son escasos en las plantas, aunque son muy abundantes en el pescado y el marisco y se utilizan en la acuicultura para mejorar el aspecto del salmón (Zhu et al. 2008).

La Organización Mundial de la Salud, calcula que 190 millones de niños preescolares y 19,1 millones de mujeres gestantes sufren deficiencias de Vitamina A (concentraciones de retinol en sangre inferiores a 0,7 $\mu\text{mol/L}$) (World Health Organization 2009). La gravedad de este problema ha llevado a esta organización a establecer un programa de suplementación en niños (WHO 2011). El déficit extremo de Vitamina A produce la ceguera nocturna, endémica en poblaciones de África, Asia y América del Sur, afectando a 5,2 millones de niños en edad preescolar y a 10,8 millones de mujeres gestantes.

Algunos carotenoides tienen actividad provitamina A, los más importantes son α y β -carotenos y β -criptoxantina. Las recomendaciones diarias de vitamina A, expresadas en equivalentes de actividad retinol (RAE) están entre 700 y 900 $\mu\text{gRAE/persona/día}$, con un límite máximo de 3.000 $\mu\text{g/persona/día}$. La actividad equivalente de retinol de los carotenos es de 12 μg de β -carotenos o de 24 de α -carotenos o β -criptoxantina (IOM 2000).

En una dieta normal, donde un 30% de la vitamina A es ingerida como provitamina A, es necesario el aporte diario de 9,6 mg/persona/día de β -carotenos. Una ingesta diaria de 144,36 g de maíz Ph3 es suficiente para cubrir las necesidades diarias de vitamina A. Es necesario ingerir más de 541,35 g de maíz Ph3 para superar las recomendaciones del límite máximo diario de vitamina A.

Los β -carotenos son la principal fuente de vitamina A de la humanidad (Burri 1997) y no se ha demostrado que el consumo de β -carotenos procedentes de alimentos naturales, incluso en cantidades elevadas y periodos prolongados, haya producido enfermedad en las personas; sin embargo el consumo de suplementos de 30 mg/día de β -carotenos durante 6 semanas produce carotenodermia, a partir de concentraciones plasmáticas de 4 mg/L (Micozzi et al. 1988). Un caso clínico descrito por Takita et al. (2006) indican que una mala praxis en la administración oral de suplementos de β -carotenos (5,72 mg/día durante 3 meses), produce carotenodermia, hallando concentraciones plasmáticas de 4,41 mg/L , 5 veces superiores a la normal.

Dentro de los efectos del ámbito de la salud que los carotenoides aportan a los animales, destacan los que se producen en el sistema inmunitario. El correcto funcionamiento del sistema inmunitario en el pollo es un factor importante para asegurar su estado de salud y mejorar su grado de resistencia frente a las adversidades ambientales y patológicas (Toomey et al. 2010).

Los pollos pueden absorber la forma activa de vitamina A o retinol en el intestino y almacenarla en el hígado. Estas reservas las aprovecha el animal en cualquier circunstancia en que se dé una deficiencia de esta vitamina. La vitamina A y los compuestos con actividad retinol modulan una amplia diversidad de procesos biológicos y participan en los tejidos en la diferenciación de las células del sistema inmunitario especializadas. La falta de vitamina A, por lo tanto, está muy relacionada con la susceptibilidad a las infecciones (Packer et al. 2005).

Las aves de corral sanas absorben los carotenoides en el intestino, y estos son transportados en la sangre y se depositan en hígado y en los tejidos como la grasa subcutánea y en la piel, donde son almacenados. Este proceso se ve afectado en aves enfermas, especialmente en infecciones intestinales e infestaciones parasitarias (Pérez-Vendrell et al. 2001).

El uso de xantofilas en la alimentación aviar está regulada en la Unión Europea por el reglamento CE 1831/2003 del Parlamento Europeo, estableciendo un máximo de 80 mg por kg de pienso para el conjunto de xantofilas, exceptuando el uso de cantaxantina, que debe ser limitado a un máximo de 8 mg/kg en ponedoras y 25 mg/kg en otras aves. El uso de astaxantina no está permitido en pienso de aves.

1.6 REGULACIÓN LEGISLATIVA

1.6.1 Uso de productos modificados genéticamente en alimentación humana y animal

REGLAMENTO (CE) No 1829/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente.

REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) N o 503/2013 DE LA COMISIÓN de 3 de abril de 2013 relativo a las solicitudes de autorización de alimentos y piensos modificados genéticamente de conformidad con el Reglamento (CE) nº 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo y por el que se modifican el Reglamento (CE) nº 641/2004 y el Reglamento (CE) n o 1981/2006.

1.6.2 Materias primas y aditivos en alimentación animal

REGLAMENTO (CE) No 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal.

REGLAMENTO (CE) No 393/2008 DE LA COMISIÓN de 30 de abril de 2008 relativo a la autorización del dimetildisuccinato de astaxantina como aditivo para la alimentación animal ².

1.6.3 Uso de animales en experimentación

LLEI 5/1995, de 21 de Junio, de protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas.

DECRET 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques.

REAL DECRETO 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

² Autorizada solo para salmón y trucha

LEY 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

DIRECTIVA 609/1986 DEL CONSEJO de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (Derogada).

DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

OBJETIVOS GENERALES

OBJETIVOS GENERALES

A partir de dos variedades de maíz modificado genéticamente para la expresión elevada de carotenoides como dieta básica de pollos y gallinas, se pretende demostrar la liberación de carotenoides y sus metabolitos en tejidos [REDACTED] y la posibilidad de alcanzar el color comercial deseado en pollo [REDACTED]. Así mismo se estudia el impacto que este método natural de aporte de carotenoides pueda tener en la salud, el rendimiento productivo y la concentración final de carotenoides en los diferentes tejidos de los pollos [REDACTED]. Se comprobará también la respuesta frente a desafíos infecciosos con *Salmonella* y coccidios.

Los estudios se enmarcan en tres entornos diferenciados: un centro de experimentación animal (L-9900001), una granja de engorde de pollos (REGA ES250160032931) y en aisladores de seguridad biológica (Centre de Sanitat Avícola de Catalunya, CESAC).

Para alcanzar estos objetivos se diseñan cinco ensayos, cuatro con pollos de engorde y uno con gallinas ponedoras. En los primeros se busca demostrar la liberación de sustancias bioactivas desde el maíz M37W-Ph3, en adelante Ph3 a los tejidos de los pollos en diferentes circunstancias, primero en condiciones de extrema bioseguridad en un centro de experimentación, después en una granja comercial en las condiciones propias de manejo y microbismo de la explotación ganadera y por último desafiando a los pollos con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y con *Eimeria tenella*. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

ENSAYO I

Evaluación del maíz Ph3 fortificado con
carotenoides en pollos criados en un centro de
experimentación

Ensayo I

Evaluación del maíz Ph3 fortificado con carotenos en pollos criados en un centro de experimentación

3.1 INTRODUCCIÓN

El fenotipo “piel amarilla” de los pollos, depende de una mutación del gen identificado como *BCDO2*, localizado entre las posiciones 6,26–6,29 Mbp del cromosoma 24 (Eriksson et al. 2008; Schmid et al. 2000). Genes homólogos han sido descritos en humanos, lobo, rata, ratón, rana, y algunos peces (NCBI 2014). La enzima codificada por el gen *BCDO2*, se denomina formalmente β,β -caroteno-9',10'-dioxigenasa (*BCDO2*) y divide las moléculas de carotenoides de forma asimétrica, generando dos compuestos incoloros distintos (Kiefer et al. 2001).

El pollo de engorde acumula carotenoides de forma visible, debido a que carece de la enzima β -caroteno dioxigenasa 2 (*BCDO2*) que transforma en la piel de los mismos los carotenoides con color en apocarotenoides incoloros (Eriksson et al. 2008). En la piel de los pollos se observan coloraciones anaranjadas en función de la presencia y concentración de diferentes carotenos.

El gen *BCDO2*, se expresa de igual forma en hígado de razas de pollos mutadas o no. Sin embargo, en piel, la expresión en pollo amarillo es solo un 10% en relación al pollo no mutado. Se postula por tanto que la piel amarilla de los pollos es causada por la deposición de carotenoides con color, debido a la ausencia de la enzima *BCDO2* motivada por una mutación específica en tejido periférico en el gen *BCDO2*. La mayor parte de los pollos y gallinas empleados en el mundo para la producción de carne y huevos son homocigotos para el gen *piel amarilla* (*Y/Y*) desplazando el genotipo *piel blanca* (*W/W*). (Eriksson et al. 2008).

La diferenciación comercial de pollos por color de piel, presenta dos variantes: pollo blanco y pollo amarillo y tal como se ha remarcado no se corresponden con diferencias en las características genéticas mencionadas, tanto los pollos comerciales amarillos, como los blancos son genéticamente *pollo amarillo* (*Y/Y*). Dado que genéticamente ambos son iguales, únicamente se puede establecer esta diferencia por la presencia o no de carotenoides en la dieta, es obvio que la dieta comercial de pollos blancos ha de ser carente de carotenoides y que la dieta de pollos con piel amarilla, ha de contener carotenoides.

El maíz transgénico Ph3, ha demostrado poseer una concentración elevada de carotenoides, especialmente, licopeno, luteína, zeaxantina, β -carotenos y α -criptoxantina (Zhu et al. 2008). Se consideró la administración de maíz Ph3 a pollos como única fuente de carotenoides para determinar la eficacia del citado maíz como fuente de carotenoides cromógenos para la producción de este tipo de carne.

En el mercado mundial, el uso de carotenoides en el pienso de animales, fundamentalmente en aves y peces, supone un valor de aproximadamente 381 millones de euros (Tabla 4) y está claramente dominado por el comercio de astaxantina y cantaxantina, ambos son carotenoides que se sitúan en valores cromáticos cercanos al

rojo. La Unión Europea ha regulado específicamente el uso de cantaxantina en avicultura y prohibido el de astaxantina.

Tabla 4 Valores del mercado mundial de carotenoides en el año 2009 (millones de €).

Substancia	Valor M€	%
β-Caroteno	11,25	2,9%
Astaxantina	189,15	49,6%
Cantaxantina	108,75	28,5%
Luteína	61,5	16,1%
Licopeno	0	0,0%
Zeaxantina	0	0,0%
Apo-carotenal	6,825	1,8%
Apo-carotenoato	4,05	1,1%
Total	381,53	

Adaptado de Mortensen (2009).

El sistema CIE Lab de medición de color ha sido adoptado por la Compañía Internacional de la Iluminación (CIE) (<http://cie.co.at/>) y se trata de un modelo cromático que puede describir todos los colores que puede percibir el ojo humano.

Es un sistema espacial, donde las coordenadas (XYZ), son sustituidas por (L*a*b*) y contempla rangos de valores para la variable L* de 0 (negro) a 100 (blanco); para las variables a* y b*, el rango es de 255 unidades, expresadas desde -128 (verde en el eje a* y azul en el eje b*) hasta 127(rojo en el eje a* y amarillo en el eje b*).

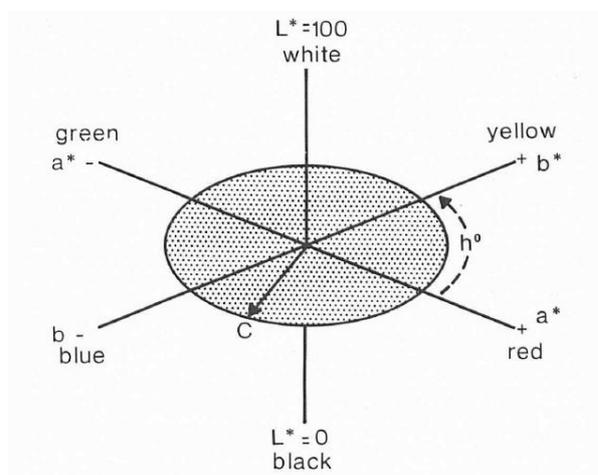


Fig. 3: Representación esquemática del sistema CIE Lab; h° , ángulo "hue"; C, Croma. Adaptado de Weatherall y Coombs (1992).

La posición angular del color medido viene determinada por $h^\circ = \arctan(b^*/a^*)$.

El color visualizado depende de la luz incidente sobre el objeto a iluminar; en el sistema CIE Lab, es posible usar la simulación de la luz natural (iluminante D65, temperatura del color 6.504 K con longitud de onda corta y ángulo 10°) o la simulación a la luz de tungsteno (iluminante A, temperatura del color 2.864 K con longitud de onda larga y ángulo 10°) (Gonnet 1998), es posible comprobar el espectro relativo de cada uno de estos iluminantes en CIE (2009).

3.2 OBJETIVOS

El propósito de este ensayo es evaluar la alimentación de pollos con maíz modificado genéticamente para la expresión de carotenoides (Ph3) frente a la alimentación con una variedad isogénica control (M37W) prácticamente carente de carotenoides; para ello se ha valorado: color, deposición de carotenoides en los tejidos, variables relacionadas con el crecimiento y el estado de salud de los pollos.

Se pretende obtener una vía distinta en la pigmentación del pollo, manteniendo o mejorando sus características productivas. Mediante la mayor acumulación de antioxidantes y vitaminas de maíz, se espera una mejora en la calidad y el aspecto de la carne del pollo sin necesidad de suplementación de pigmentos.

Es necesario determinar con precisión los efectos que el uso de una dieta compuesta mayoritariamente por maíz Ph3, obtenido por ingeniería genética puede tener en la salud de los pollos, para ello se establecen controles hematológicos, bioquímicos, serológicos e histológicos, que en su conjunto determinarán si hay algún efecto diferencial entre los pollos que comen el maíz transgénico Ph3 y los que comen el maíz control M37W.

3.3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1 Preparación de la dieta

Se emplearon dos tipos de maíz, la variedad transgénica Ph3 y la variedad isogénica control M37-W. Todo el maíz empleado en este experimento fue sembrado y recolectado en plantaciones legalmente autorizadas en el estado de Louisiana en Estados Unidos. La siembra se efectuó en invernaderos, y durante los 50 primeros días se mantuvo un fotoperiodo de 10 horas, a una temperatura de 28°C durante el día y 20°C durante la noche y con una humedad relativa del 60 al 90%. Posteriormente y hasta el final de producción se cultivó con un fotoperiodo de 16 horas con 21°C durante el día y 18°C durante la noche.

Una vez finalizado el período de crecimiento y maduración, se cosechó se secó y se envió el maíz a la Universidad de Lleida para realizar las pruebas necesarias y comenzar con el proceso de elaboración de los piensos para la prueba.

La elaboración de las dietas, control y experimental, se realizó según las recomendaciones publicadas por National Research Council (1994) para la alimentación de pollo, actualizadas por fórmulas comerciales recientes (Aviagen 2008) y elaboradas en el centro de investigación IRTA Mas de Bover, de Reus.

Para adecuar la dieta a las necesidades de crecimiento de los pollos, se formularon dos tipos de pienso para cada tratamiento (arranque y crecimiento). Entre tratamientos, las dietas se diferencian únicamente en el tipo de maíz; M37W (variedad isogénica control) o Ph3 (transgénico).

Cada tipo de pienso fue fabricado de una sola vez, almacenado a temperatura de 20°C, en ambiente seco y protegido de la luz, de insectos y roedores.

Para determinar el valor nutricional y proceder al análisis de micotoxinas, se tomaron muestras de ambos tipos de maíz justo antes de molerlo y de los cuatro tipos de pienso el mismo día de inicio del experimento; y se procedió de inmediato a su análisis. Los dos tipos de maíz fueron analizados en laboratorios independientes para determinar la composición nutricional (Covitsa, Lleida) y la detección y cuantificación de micotoxinas (Servicio Científico Técnico de Calidad Microbiológica en el Sector Agroalimentario, Universidad de Lleida).

Se recogieron muestras de pienso de las dos dietas, para enviarlas al laboratorio de análisis químico (laboratorio de Bioquímica molecular J.W. Goethe Universität, Frankfurt, Alemania) y determinar la composición cualitativa y cuantitativa de carotenoides; las muestras una vez recogidas fueron guardadas en congelador a -20°C.

Tabla 5: Composición de los piensos empleados tratamiento Ph3 y control M37W.

Ingrediente (%)	Arranque días 0-9*		Crecimiento días 10-35**	
	M37W	Ph3	M37W	Ph3
Maíz Control	52,241	0	58,209	0
Maíz Modificado	0	52,241	0	58,209
Soja , 47.5%	36,056	36,056	17,861	17,861
Soja integral	0	0	15,835	15,835
Aceite de soja	6,801	6,801	4,167	4,167
Fosfato monocálcico	1,523	1,523	1,228	1,228
Carbonato cálcico	1,455	1,455	1,097	1,097
Sal	0,347	0,347	0,317	0,317
Bicarbonato de sosa	0,233	0,233	0,119	0,119
Colina , 60%	0,051	0,051	0,042	0,042
Lisina en polvo 79%	0,269	0,269	0,277	0,277
Metionina	0,326	0,326	0,333	0,333
Treonina	0,042	0,042	0,047	0,047
Corrector básico ¹	0,303	0,303	0,313	0,313
Complemento premix	0,303	0,303	0,104	0,104
Coccidiostato (Cygro®)	0,051	0,051	0	0
Coccidiostato (salinomicina, 12%)	0	0	0,052	0,052

*, ** El programa de alimentación establece que los pollos coman pienso de arranque desde el inicio hasta el día 9, a partir de este día y hasta el día 35, los pollos comerán pienso de crecimiento.

¹Corrector Arranque: Vitamina A, 10.000 UI/Kg; vitamina D3, 2.000 UI/Kg; vitamina E, 80 UI/kg; vitamina B1, 2 mg/kg, vitamina B2 8 mg/kg; vitamina B6, 4 mg/kg; vitamina B12 0,02 mg/kg; vitamina K; 2,25 mg/kg; ácido fólico, 1 mg/kg; ácido nicotínico, 40 mg/kg; ácido pantoténico 11,7 mg/kg; biotina, 0,1 mg/kg; cobre, 6 mg/kg; zinc 54 mg/kg; hierro, 40 mg/kg; manganeso, 77 mg/kg; cobalto, 0,2 mg/kg; selenio, 0,45 mg/kg; iodo, 2,25 mg/kg; BHT antioxidante, 125 mg/kg.

Corrector Crecimiento: Vitamina A, 8.000 UI/Kg; vitamina D3, 1.600 UI/Kg; vitamina E, 40 UI/kg; vitamina B1, 2 mg/kg, vitamina B2 5,6 mg/kg; vitamina B6, 4 mg/kg; vitamina B12 0,02 mg/kg; vitamina K; 2,25 mg/kg; ácido fólico, 1 mg/kg; ácido nicotínico, 40 mg/kg; ácido pantoténico 11,7 mg/kg; biotina, 0,1 mg/kg; cobre, 6 mg/kg; zinc 54 mg/kg; hierro, 40 mg/kg; manganeso, 77 mg/kg; cobalto, 0,2 mg/kg; selenio, 0,45 mg/kg; iodo, 2,25 mg/kg; BHT antioxidante, 125 mg/kg.

3.3.2 Diseño experimental

Se alojaron 48 pollos de engorde machos Ross 308 que fueron divididos en dos corrales, uno con dieta de maíz Ph3 y otro con dieta control de maíz M37W; el día 9 de vida y hasta la finalización del experimento los pollos de cada tratamiento se realojaron en grupos de 3 animales en 16 corrales, 8 corrales para el tratamiento Ph3 y 8 para el control M37W.

El día 0 de vida, los 48 pollos del estudio se pesaron e identificaron mediante chapas metálicas numeradas, colocadas en la membrana alar y se asignaron al azar a los dos tratamientos (24 pollos por tratamiento). Durante los primeros 9 días y con la finalidad de mantener las costumbres gregarias, los pollos de cada tratamiento permanecieron juntos a una densidad de 16 pollos por m²; a partir del día 9 de vida se realojaron a una densidad de 2 pollos por m² colocando 3 pollos por corral, ocupando 16 corrales (8 réplicas por tratamiento).

La cría de los pollos se realizó desde el día 0 hasta el día 35 de vida en el centro de experimentación animal de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria de la Universidad de Lleida.

El experimento fue previamente aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Lleida.

3.3.3 Cría y condiciones ambientales

Los animales se vacunaron *in ovo* frente a enfermedad de Marek (HVT Pfizer), el día 0 de vida de Bronquitis infecciosa (Bronipra HIPRA) mediante vacunación en spray y el día 16 de vida frente a enfermedad de Gumboro con vacuna viva atenuada (nobilis Gumboro 228E MSD) suministrada vía oral en agua de bebida.



Fig. 4: Izquierda, distribución y separación por tratamiento el primer día de vida. Derecha, día 21, el día 9, los pollos fueron separados en grupos de 3.

Para el alojamiento se dispone de 16 corrales de 1,5m² (1 x 1,5 m.) en los que se colocaron 8 kg/m² de viruta seca de madera de pino como yacija.

El pienso y el agua fueron suministrados *ad libitum* manualmente con comederos y bebederos adecuados a cada momento de crecimiento del pollo. Desde el momento de la entrada hasta los 4 días de vida, los pollos comieron en bandejas planas; a partir de esa edad y hasta el final, lo hicieron en tolvas. El pienso se retiró 4 horas antes del sacrificio.

La iluminación fue mixta, recibiendo luz natural que fue complementada con luz artificial mediante el uso de lámparas fluorescentes. El programa de luz, se inició con 23 horas de luz durante la primera semana, pasando el día 8 a un programa de 18 horas de luz y 6 de oscuridad continua.

La temperatura ambiente se mantuvo dentro del rango de confort de los pollos y se fue modificando de acuerdo con su edad. Para ello se dispuso de dos calefactores eléctricos RPL 3 kW (Munters, Suecia) controlados por termostato y con la misma finalidad se instalan 8 pantallas radiantes eléctricas de una potencia de 500 W cada una.

La ventilación se mantuvo con un ventilador extractor y quedó establecida en 2 m³/hora/kilo de peso vivo y se valoró y modificó semanalmente de acuerdo con el peso de los pollos. La velocidad del aire en la zona de cría, varió entre 0,3 y 0,8 m/s.

Se controló diariamente la salud y el bienestar de los pollos por el Veterinario del centro de experimentación.

A partir del día 9 de vida, los pollos de cada tratamiento se pesaron y se separaron en grupos de 3 pollos, con un total de 8 réplicas por tratamiento; para equilibrar el efecto alojamiento sobre los resultados del experimento, los corrales son asignados a cada tratamiento de forma alternativa.

Al finalizar el experimento los pollos fueron aturdidos en CO₂ y sacrificados por exanguinación.

3.3.4 Recogida de datos

Durante la cría, se controlaron semanalmente los pesos y el consumo de pienso. Se realizó un control extra al día 9 de vida, cuando se produjo el cambio de pienso y la distribución por réplicas.

3.3.4.1 Análisis de carotenoides

Para determinar la presencia y la cantidad de carotenos, se tomaron muestras durante la necropsia, de músculo de pechuga (músculo pectoral) y cara externa del muslo (músculo ilirotibial), piel de la zona de la pechuga, del muslo y de la pata, la cresta y grasa abdominal. Previo al sacrificio se tomaron muestras de sangre. Las muestras fueron inmediatamente congeladas a -80°C para posteriormente ser liofilizadas. Las determinaciones químicas de carotenoides se realizaron por HPLC en el laboratorio de Biosíntesis Molecular, Universidad JW Goethe, Frankfurt, Alemania.

Para el análisis de los carotenoides totales, la extracción se realizó a partir de la muestra liofilizada en 20 ml de metanol conteniendo un 6% de KOH a 60°C y durante 15-20 minutos. Los compuestos lipofílicos, se separaron en una solución con 30% de éter en petróleo y se recogió la fase superior. Los carotenoides totales se determinaron midiendo la absorbancia a 450 nm. Para la separación por HPLC, el disolvente se evaporó bajo una corriente de gas nitrógeno a 37°C, disuelto en 100 µl de metanol/diclorometano (50:50) e inmediatamente se inyectó una alícuota de 20 µl.

Los compuestos fueron separados en una columna de 15 cm Nucleosil C18 3-µ con acetonitril/metanol/2-propanol (85:15:5) v/v/v en fase móvil a 20°C. Las muestras fueron monitorizadas con un Kontron DAD 440 fotodiodo detector, con registro online del espectro. Todos los carotenoides fueron identificados por cromatografía con compuestos auténticos de referencia, los cuales fueron biosintetizados en E.coli como se describe en Sandmann (2002) y sus espectros fueron comparados. Esos estándares también fueron usados para la cuantificación, en combinación con los coeficientes de extinción (Davies 1976). El retinol fue comprado a Sigma Chemicals.

El ácido retinoico conjugado (RAC), derivado del retinol, fue identificado por el espectro típico del ácido retinoico con picos máximos a 328, 350 y 368 nm. Fue cuantificado usando retinol como estándar con corrección por el coeficiente de extinción para el retinol (45,0 para 325 nm) y ácido retinoico (53,5 para 350 nm), respectivamente.

3.3.4.2 Estudio colorimétrico

En las canales frescas, al inicio de la necropsia, se controló el color de la piel y de la carne de los pollos por el sistema tricromático CIE Lab, luminosidad (L*), eje verde-rojo (a*) y eje azul-amarillo (b*) con el espectrofotómetro portátil, Konica Minolta CM-700d (Konica

Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) máscara con un diámetro de 8 mm, iluminante D65 y ángulo de observación de 10°. El estudio colorimétrico fue realizado en las instalaciones del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Lleida.

El color percibido por la vista, queda definido por la saturación y es medido con el término C "Croma", que determina la distancia del punto al eje L* medida en el plano a*b*, el valor del vector C, puede ser calculado por sus coordenadas $C = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$ (Weatherall y Coombs 1992; Gonnet 1998).

El sistema CIE Lab también puede cuantificar numéricamente la diferencia entre dos colores obtenidos por este método, con la fórmula $\Delta E_{ab} = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$ que permite calcular la distancia entre estos dos puntos en el espacio CIE Lab (Hill et al. 1997).

Las regiones anatómicas elegidas para la medición fueron aquellas más representativas en la valoración de color por parte del consumidor, piel de la pata, de la pechuga, carne del muslo y de la pechuga. El color de la piel de la pata, también fue medido con el abanico colorimétrico, escala DSM. (DSM).

3.3.4.3 Datos de producción

El peso individual de los animales fue controlado semanalmente con una báscula (KERN EW Alemania) con una precisión $d=0,01$ g y un error de $\pm 0,02$, también se controló el pienso añadido a cada réplica y el consumido cada semana con la finalidad de calcular la evolución del índice de conversión durante el experimento en cada uno de los tratamientos.

Se controlaron de forma automática los parámetros de ambiente con un registrador de temperatura, (precisión $0,1$ °C y error $\pm 0,5$ °C) y humedad, (precisión $0,1$ % y error $\pm 3\%$) (Testo174H, Alemania); se valoró diariamente la correcta evolución en crecimiento y comportamiento de los pollos.

3.3.4.4 Muestras biológicas

Al final de experimento, se recogieron muestras de sangre, en la vena alar para el estudio bioquímico, serológico y hematológico en dos tubos, las de hematología se recogieron en tubos con EDTA y se enviaron inmediatamente al laboratorio de análisis. El resto de los tubos se centrifugaron 10 minutos a 2.500 rpm para separar el suero de los elementos formes de la sangre; el suero de cada tubo, se dividió en tres tubos Ependorf para envío a los laboratorios de química (carotenoides), bioquímica, hematología y serología. El análisis bioquímico se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Arnau de Vilanova, el análisis serológico, en el Centro de Estudios y Sanidad Avícola de Cataluña y Aragón (CESAC), Reus.

El hígado, el corazón, el bazo y la bolsa de Fabricio se extrajeron enteros y se pesaron. Para el estudio histopatológico se tomaron muestras de hígado, riñón, bazo, bolsa de Fabricio, timo, tonsilas cecales y pulmón y se fijaron en solución de formol al 10%. A las 48 horas se procesaron las muestras en el laboratorio de histología, se tiñeron con hematoxilina-eosina y fueron enviadas para su evaluación a un laboratorio independiente (Etyca, Terrassa). El peso de los órganos se expresó como peso relativo (g órgano/kgpv).

3.3.5 Análisis estadístico

Los datos de peso, índice de conversión, peso relativo de órganos, color, hematología, bioquímica sanguínea, histopatología y química de carotenoides, fueron analizados para determinar las diferencias entre los dos tratamientos. Los datos han sido estudiados mediante comparación de medias con t-Student (JMP® Pro 11 SAS Institute, 2013).

En el estudio de las variables cualitativas, se ha empleado, tablas de contingencia y test χ^2 , las diferencias entre niveles se han determinado por comparación de proporciones de columna (prueba z).

Los datos expresados en porcentaje fueron transformados mediante una función arcsen para lograr una distribución normal (Snedecor y Cochran 1989). Y cuando fue necesario se normalizaron los valores con la función raíz cuadrada más 0,5. Para la significación de los resultados se ha considerado $P < 0,05$.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Dieta

3.4.1.1 Análisis del maíz

El valor nutricional de ambos granos es similar y comparable al maíz de cultivo general, y a los publicados por National Research Council (1994). La concentración de micotoxinas es mínima, incluso inferior a la publicada por Brake (2003) en un estudio similar y en algunas fueron indetectables.

Tabla 6: Análisis nutricional y de micotoxinas de ambos tipos de maíz

Componente	M37W	Ph3
Proteína (%)	10,37	11,11
Fibra (%)	2,88	3,96
Grasa (%)	3,22	3,11
Cenizas (%)	1,49	1,42
Humedad (%)	11,22	11,31
Micotoxinas		
Zearalenona (ppb)	nd*	nd
Deoxynivalenol (ppb)	nd	nd
T-2 toxina (ppb)	6,43	4,26
Total fumonisinas (ppm)	1,45	2,72
Ochratoxina A (ppb)	1,81	1,93
Total Aflatoxinas (ppb)	nd	nd
Aflatoxina B1. (ppb)	nd	nd

*nd No detectado.

3.4.1.2 Análisis del pienso

El resultado de la composición nutricional de los piensos del tratamiento y del control fue muy similar y no se apreciaron diferencias entre ellos.

Tabla 7: Análisis nutricional según el tratamiento y el tipo de pienso

Componente	M37W		Ph3	
	Arranque	Crecimiento	Arranque	Crecimiento
Proteína (%)	20,74	19,95	19,89	19,09
Fibra (%)	3,69	3,66	3,80	5,10
Grasa (%)	9,58	9,25	8,81	9,23
Cenizas (%)	6,13	6,17	5,17	5,63
Humedad (%)	11,49	11,28	11,90	10,80

Ambos piensos fueron analizados para determinar el contenido de carotenos para cada tratamiento (M37W y Ph3) y por cada tipo de pienso (arranque y crecimiento). Las diferencias, son significativas al nivel $P < 0,001$ para todos los carotenoides analizados, violaxantina, luteína, zeaxantina, α -criptoxantina, β -criptoxantina y β -caroteno. En el caso de la α -criptoxantina, no pudo determinarse el valor de significación de la diferencia de las

medias porque no se detectó en el pienso M37W, ni en el tipo de arranque ni en el tipo de crecimiento.

La concentración total de carotenoides para las dietas M37W y Ph3 en el pienso de arranque fue de 1,71 y 13,29 $\mu\text{g/g}$ y en el de crecimiento 1,90 y 13,75 $\mu\text{g/g}$ respectivamente. Los resultados son compatibles con el fenotipo del maíz Ph3 y M37W y con las características genéticas originales de cada uno. En el caso de la dieta Ph3 la concentración total de carotenoides obtenida fue inferior a la que correspondería con la del maíz original, (156,14 $\mu\text{g/g}$) incluso considerando el porcentaje de inclusión del maíz Ph3 en el pienso, 52,24 o 58,21 % para arranque y crecimiento. Probablemente el tiempo transcurrido desde el momento de la recolección del maíz ha provocado la metabolización y desaparición de una parte de estos carotenoides.

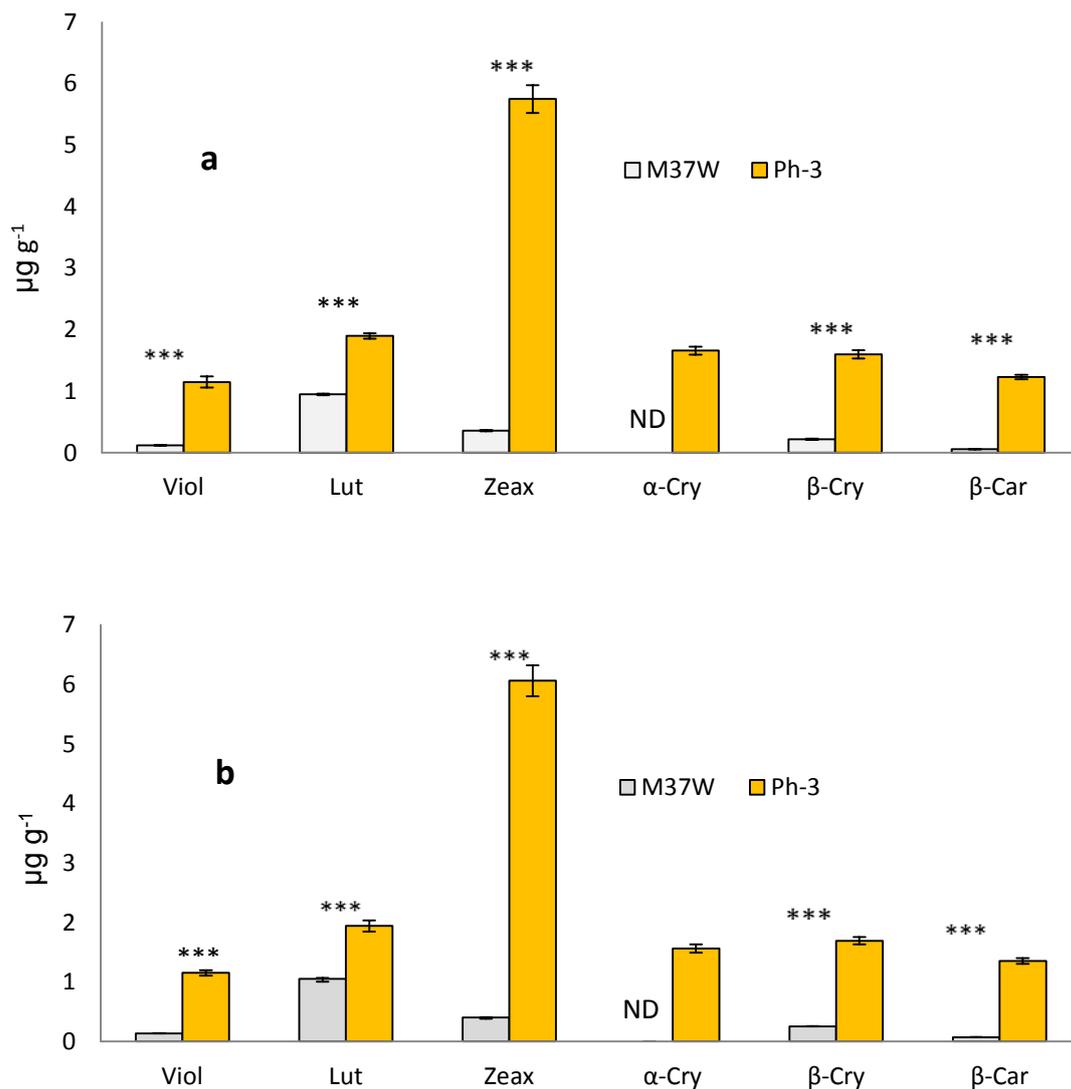


Fig. 5: Concentración de carotenoides en los pienso de arranque (a) y de crecimiento (b) para las dietas M37W y Ph3. (n=5); ***P<0,001; nd= No Detectado; Viol, Violaxantina; Lut, Luteína; Zeax, Zeaxantina; α -Cry, α -Criptoxantina; β -Cry, β -Criptoxantina; β -Car, β -Caroteno



Fig. 6: Izquierda, pienso con maíz M37W; derecha, pienso con maíz Ph3.

3.4.2 Crecimiento

El día 11 de vida, un pollo del tratamiento Ph3 murió por insuficiencia cardíaca no congestiva (infarto cardíaco). El cadáver fue pesado y la causa de muerte, diagnosticada por lesiones observadas en la necropsia y por la valoración clínica del Veterinario del centro. Los datos de consumo de pienso del grupo experimental al que pertenecía fueron recalculados para ese periodo. No se han encontrado diferencias significativas entre tratamientos para la viabilidad ($P>0,05$).

Tabla 8: Efecto del maíz en el peso y la viabilidad semanal de los pollos.

Días	Tratamiento	Peso (g)	Viabilidad (%)
0	M37W (n=24)	42,96±0,53	100
	Ph3 (n=24)	42,33±0,55	100
7	M37W (n=24)	170,96±3,63	100
	Ph3 (n=24)	165,53±3,04	100
14	M37W (n=24)	438,71±9,84	100
	Ph3 (n=23)	420,00±8,94	95.83
21	M37W (n=24)	898,92±17,51	100
	Ph3 (n=23)	878,35±16,51	95.83
28	M37W (n=24)	1452,38±21,49	100
	Ph3 (n=23)	1457,22±21,52	95.83
35	M37W (n=24)	2020,58±28,28	100
	Ph3 (n=23)	2043,78±21,74	95.83

Los valores de peso son la media por tratamiento ± el error estándar. La viabilidad expresa el % de vivos sobre el número de animales iniciales.

En relación al efecto en el crecimiento de los pollos de la dieta con maíz Ph3, (Tabla 8) no se observaron diferencias significativas en las medias de peso de los pollos entre los tratamientos, en ningún momento de la cría (0, 7, 14, 21, 28, 35 días) ($P>0,05$).

Los resultados demuestran que el día 9 de vida, momento en el que se cambia el pienso de arranque por el de crecimiento, no hubo diferencias significativas en las medias de peso de los pollos entre dieta Ph3 y dieta M37W (Ph3=216,92±4,25 g y M37W=221,00±4,82 g) ($P>0,05$).

El índice de conversión calcula las unidades en peso de pienso necesarias para producir una unidad de peso vivo del animal; esta medición se puede realizar por periodos concretos de la vida del animal o como resultado acumulado final. Por su utilidad es empleado rutinariamente en la industria avícola y en muchos estudios experimentales cuando hay que valorar la eficacia del proceso productivo y especialmente para valorar el rendimiento de las dietas.

Tabla 9: *Efecto de la dieta en el Índice de Conversión acumulado entre periodos (días) en diferentes etapas del crecimiento de los pollos.*

Fase	Edad (días)	Tratamiento	Índice de Conversión (g:g)
Arranque ¹	0-9	M37W	1,15
		Ph3	1,11
Crecimiento	10-14	M37W	1,29±0,009
		Ph3	1,28±0,023
	15-21	M37W	1,30±0,007
		Ph3	1,30±0,015
	22-28	M37W	1,31±0,013
		Ph3	1,34±0,015
	29-35	M37W	2,04±0,043
		Ph3	2,04±0,025
Total acumulado fase crecimiento (9-35 días)		M37W	1,53±0,007
		Ph3	1,54±0,011

(n=8) ¹En la fase de arranque no hubo réplicas y el índice de conversión, hace referencia al valor medio global de cada tratamiento.

En la fase de arranque el índice de conversión entre tratamientos fue muy similar; el valor presentado es la media acumulada durante los primeros 9 días de vida de cada uno de los tratamientos, sin réplicas.

En la fase de crecimiento, los pollos que comieron la dieta con maíz Ph3, no presentaron diferencias significativas en el índice de conversión frente a los pollos control que comieron maíz M37-W ni en los periodos parciales estudiados ni en el valor acumulado total de esta fase (P>0,05).

3.4.3 Colorimetría

La piel de la pata de los pollos que han comido dieta con maíz Ph3 presenta valores significativamente más elevados 5,23±0,113 (escala DSM) que los pollos que han comido la dieta M37W (0,00), lo que se traduce en una mayor coloración en la gama amarillo-anaranjada.

Los pollos que han consumido una dieta con maíz Ph3 presentan la piel y el músculo con un color amarillo y rojo (a* y b*) significativamente mayor; a su vez el valor L* significativamente más bajo, indica colores más intensos. Se confirma que una parte sustancial de los carotenos aportados en la dieta no son degradados a apocarotenos y que se acumulan en tejido corporales, siendo visibles en tejidos periféricos.

Tabla 10: Efecto del consumo de la dieta Ph3 en el color medido en el momento del sacrificio, en piel y músculo.

Región anatómica	Color ¹	M37W (n=24)	Ph3 (n=23)
Piel: Tarso lateral	Escala DSM	0,00	5,23±0,113***
	L*	77,62±0,335	72,21±0,640***
	a*	0,99±0,195	11,10±0,408***
	b*	21,27±0,463	45,74±1,125***
Piel: Apteridio tronco lateral	L*	67,30±0,557	63,50±0,523***
	a*	-1,62±0,162	0,27±0,217***
	b*	4,38±0,405	12,08±0,724***
Músculo: Pectoralis major	L*	46,28±0,549	44,45±0,375**
	a*	-1,56±0,077	0,63±0,111***
	b*	3,95±0,355	8,16±0,276***
Músculo: Iliotibial	L*	55,30±0,893	51,82±0,584***
	a*	-0,48±0,163	4,97±1,784***
	b*	4,87±0,612	11,46±0,713***

Medias ± error estándar. En la misma fila **P<0,01 y ***P<0,001 indican diferencias significativas. ¹ L*= Luminosidad; a*=rojos; b*=amarillos

El valor del color amarillo alcanzado en la piel de la pata de los pollos que han comido la dieta Ph3, b*=45,74±1,125 es muy superior al alcanzado en los experimentos de Castañeda et al. (2005) donde se observa valor b*=15,75 a la edad de 49 días, con una dieta de crecimiento y acabado que contenía pigmentos amarillos y rojos de origen natural a concentraciones de 85 ppm de pigmentos amarillos y 3 ppm de pigmentos rojos.



Fig. 7: Color de patas; Izquierda dieta M37W, Derecha dieta Ph3.

Los métodos colorimétricos por espectrofotometría, son un buen indicador de la concentración de carotenoides en el tejido periférico de algunas aves (Peters et al. 2004), en varias ocasiones ha sido empleado para valorar el color de la piel en pollos (Soler et al. 2011) y en otras especies y tejidos (Butler et al. 2010).

En la gama de color rojo, los pollos que han comido dieta con maíz Ph3, alcanzaron un valor a*=11,10±0,408 en la piel de la pata, valor, que es muy superior al encontrado por Castañeda et al. (2005) para el mismo experimento, en el que alcanza valores de a*=1,65.

Se confirma por tanto como válida la estrategia de potenciar el color de la piel, y músculo de los pollos con dietas con maíz Ph3, hasta llegar a valores muy superiores a los habituales en el mercado de pollo de color amarillo.

En todas las áreas de medición, el valor Croma o grado de saturación de color es significativamente mayor ($P < 0,001$) en los pollos que han comido la dieta Ph3; las mayores diferencias de color ($\Delta E_{M37W-Ph3} = 27,02$) se encuentran en la piel del tarso.

Tabla 11: Valores medios con error estándar del efecto de la dieta sobre la saturación de color valorado con cromina en las diferentes áreas de medición y diferencia absoluta de color ($\Delta E_{M37W-Ph3}$) entre Ph3 y M37W

Región anatómica	Croma		$\Delta E_{M37W-Ph3}$
	M37W (n=24)	Ph3 (n=23)	
Piel: Tarso lateral	21,31±0,467	47,14±1,06***	27,02
Piel: Apteridio tronco lateral	4,80±0,369	12,13±0,722***	8,79
Músculo: Pectoralis major	4,38±0,286	8,19±0,278***	5,09
Músculo: Iliotibial	5,25±0,493	13,45±1,583***	9,23

*** $P < 0,001$



Fig. 8: Izquierda, pollo con dieta M37W. Derecha, pollo alimentado con maíz Ph3.

3.4.4 Peso de órganos

Se extrajeron, hígado, bazo, corazón, y bolsa de Fabricio; por sus características son órganos fácilmente resecables y su alteración morfológica indicará algunas modificaciones en el metabolismo y la fisiología de los animales.

Los animales que han comido maíz Ph3 en su dieta, no presentan modificación en el peso relativo de corazón, bazo e hígado ($P > 0,05$) en comparación con los animales que han comido la dieta con maíz control M37W. Sin embargo, sí que presentan diferencias en el peso de la bolsa de Fabricio ($P < 0,05$).

Tabla 12: Efecto del maíz en el peso relativo de algunos órganos (g/kg de peso vivo).

Órganos	M37W	Ph3
Hígado (g/kgpv [†])	17,59±0,437	17,83±0,390
Bazo (g/kgpv)	0,93±0,047	0,97±0,057
Corazón (g/kgpv)	5,62±0,130	5,60±0,181
Bolsa de Fabricio (g/kgpv)	1,22±0,140	1,82±0,190 *

* $P < 0,05$. [†]kgpv = Kilogramo de peso vivo. Los valores son la media \pm el error estándar.

La bolsa de Fabricio es un órgano linfoide, propio de las aves, este órgano de forma globular protruye dorsalmente en la pared de la cloaca con la que está comunicado. Por ser el órgano donde se produce la diferenciación y maduración de los linfocitos B en las aves es determinante en la resistencia a las enfermedades. Esta glándula, involuociona en aves adultas, alcanzando su máximo peso a las 10 semanas de edad (Tabeekh y Mayah 2009).

Algunas enfermedades, el estrés y algunas vacunas vivas atenuadas de enfermedad de Gumboro clasificadas como intermedias plus (Müller et al. 2012) pueden inducir lesión en la bolsa de Fabricio iniciándose la involución prematura y generalmente como consecuencia del proceso inflamatorio (Moraes et al. 2004). El peso más elevado de la bolsa de Fabricio en los pollos que han comido maíz Ph3 indica que la reacción frente a la vacuna intermedia plus para el enfermedad de Gumboro que recibieron a los 14 días de vida (Nobilis Gumboro 228 E, MSD) fue mejor tolerada y que la regeneración folicular ha sido más rápida, presentando una menor atrofia en la bolsa de Fabricio que los animales que comieron la dieta control.

Los pesos relativos para la bolsa de Fabricio hallados por Puvadolpirod y Thaxton (2000) en el grupo control de su experimento utilizando pollos Peterson x Arbor Acres son inferiores (0,96±0,08 g/kg) a los encontrados en el tratamiento Ph3 (1,82±0,19 g/kg). Sin embargo, los pesos relativos de hígado y bazo, son superiores (27,40±1,56 g/kg y 1,23±0,11 g/kg respectivamente) a los del tratamiento Ph3 (hígado, 17,83±0,39 g/kg y bazo, 0,97±0,057 g/kg). En otro experimento, descrito por Tona et al. (2004) los pesos relativos de hígado y corazón para pollos de razas pesadas a los 41 días de edad eran de 1,83±0,04 y 0,30±0,01 g/100g de peso vivo; destacando la similitud de peso del hígado con los pollos del tratamiento Ph3, sin embargo, el peso del corazón en el experimento de Tona et al. (2004) es inferior al del tratamiento Ph3.

3.4.5 Histopatología

Las muestras fueron recogidas durante la necropsia y en el caso de algunos tejidos, después de que el órgano fuese pesado, se perfundieron en solución de formol al 10% y a las 48 horas fueron procesadas, se realizó la inclusión en bloques de parafina, cortado con micrótopo y se tiñeron con Hematoxilina-eosina, se evaluaron todos los pollos del experimento (n=23 para el tratamiento Ph3 y n=24 para el control M37W) y en cada porta se colocaron tres muestras de tejido del mismo animal. Para su valoración se efectuó un envío ciego a un laboratorio independiente (Étyca, Terrassa).

Los pollos fueron examinados durante la necropsia inmediatamente posterior al sacrificio sin que se detectaran lesiones macroscópicas en los órganos estudiados.

3.4.5.1 Hígado

En el estudio del efecto del consumo de dieta con maíz Ph3 rico en carotenos en el hígado de los pollos se valoraron las alteraciones de fibrosis, esteatosis, inflamación y necrosis; para ello se empleó un protocolo reducido a partir del propuesto por Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) Clinical Research Network (Kleiner et al. 2005).

La esteatosis es una alteración morfológica y/o funcional de los hepatocitos, que presentan vesículas de grasa en su citoplasma, fácilmente identificables al microscopio; se clasifica en macrovesicular y microvesicular; en el primer caso suele presentarse una sola vesícula que desplaza lateralmente al núcleo y citoplasma del hepatocito; la esteatosis microvesicular, da un aspecto espumoso, está formada por numerosas vesículas y el núcleo del hepatocito permanece central (Yerian 2011). Ambos tipos de esteatosis han sido englobadas bajo el título común de esteatosis, y los valores totales clasificados de acuerdo con Kleiner et al. (2005). El tamaño de los hepatocitos está relacionado con el grado de esteatosis hepática (Makovický et al. 2011) como consecuencia el peso del órgano puede variar también en el mismo sentido.

El depósito progresivo de matriz extracelular en el parénquima hepático marca diferentes grados de fibrosis (Domínguez et al. 2009); esta matriz extracelular está formada por colágeno que es producido en exceso por la transformación de las células hepáticas estrelladas (HSC) y los fibroblastos perivasculares en miofibroblastos hepáticos, llegando al estadio de cirrosis, en este caso las alteraciones estructurales llegan a impedir la función hepática y se considera la fase final de la enfermedad hepática (Ochiai et al. 2002; Schuppan y Afdhal 2008). Las causas principales para desencadenar el proceso de fibrosis, son la esteatosis hepática no alcohólica, algunos virus y toxinas (Domínguez et al. 2009).

La necrosis hepática se produce por la destrucción de los hepatocitos e inicialmente ocurre como consecuencia de fenómenos inflamatorios agudos (Domínguez et al.2009).

Puesto que la esteatosis hepática es consecuencia de balances energéticos positivos y en los pollos de engorde esto ocurre durante su periodo de crecimiento, es comprensible un elevado grado generalizado de esteatosis; la evolución de este fenómeno de origen alimentario puede ser la causa del resto de alteraciones histológicas del hígado.

En todos los pollos que presentaron esteatosis esta fue de tipo microvesicular, en 5 de ellos, además se observaron áreas de esteatosis macrovesicular. Para esta lesión, no se han encontrado diferencias entre los pollos que comieron la dieta Ph3 y los que comieron la dieta control M37W ($P>0,05$).

Se ha observado diferencias significativas entre los tratamientos para las lesiones de inflamación, ($\chi^2=8,001$; $P=0,046$); el grupo de animales que comió la dieta con maíz Ph3 presenta una incidencia mayor de inflamación leve y una incidencia menor en inflamación moderada en tejido hepático. Los procesos inflamatorios hepáticos son el origen de la necrosis, fibrosis y cirrosis si procede.

Tabla 13: Efecto de la dieta sobre la presentación y gravedad de lesiones hepáticas.

Lesión		M37W nº (%)	Ph3 nº (%)
Esteatosis	Sin lesión	4 (16,60)	5 (21,70)
	Leve [5-33%]	1 (4,20)	3 (13,10)
	Moderada [34-66%]	7 (29,20)	8 (34,80)
	Severa [>66%]	12 (50,0)	7 (30,40)
Inflamación*	Sin lesión	4 (16,70)	7 (30,40)
	Leve [<2 focos]	3 (12,50) ^b	9 (39,10) ^a
	Moderada [2-4 focos]	14 (58,30) ^a	6 (26,10) ^b
	Severa [>4 focos]	3 (12,50)	1 (4,40)
Necrosis	Sin lesión	12 (50,00)	15 (65,20)
	Leve	6 (25,00)	7 (30,40)
	Moderada	4 (16,70)	1 (4,40)
	Severa	2 (8,30)	-
Fibrosis	Sin lesión	12 (50,00)	15 (65,20)
	Leve	6 (25,00)	7 (30,40)
	Moderada	4 (16,70)	1 (4,40)
	Cirrosis	2 (8,30)	-

Los valores expresan el número y el % de casos para cada variable. (M37W n=24; Ph3 n=23), *efecto significativo de la dieta (P<0,05). ^{ab} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (P<0,05).

Los carotenoides son capaces de modular la respuesta inflamatoria en algunos órganos, esto ha sido descrito para el hígado cuando el aporte es a través de la dieta y en respuesta a un desafío inflamatorio, demostrando un menor índice de inflamación, medido en fase aguda como menor incremento de peso del hígado (Meriwether et al. 2010) por otra parte una carencia de carotenoides en la dieta o en el vitelo, potencia la reacción inflamatoria sistémica en pollos (Koutsos et al. 2006).

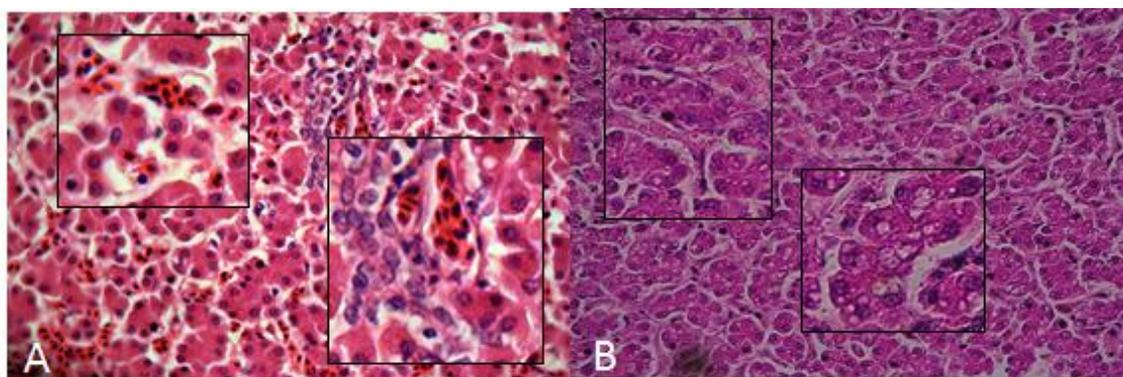


Fig. 9: Muestra de hígado (A) donde se aprecian abundantes hematíes y linfocitosis (B) se aprecia una importante fibrosis y esteatosis (recuadros) (Hematoxilina Eosina x 40).

No se han observado diferencias significativas entre el tratamiento Ph3 y el control M37W para necrosis ($\chi^2=4,191$; $P=0,381$) y fibrosis ($\chi^2=4,332$; $P=0,363$). Los pollos que han comido la dieta Ph3 no presentan ningún caso extremo en las variables mencionadas.

3.4.5.2 Pulmón

El sistema respiratorio de los pollos, presenta algunas diferencias con los mamíferos, el pulmón no se dilata ni se contrae durante la respiración y está diferenciado en dos

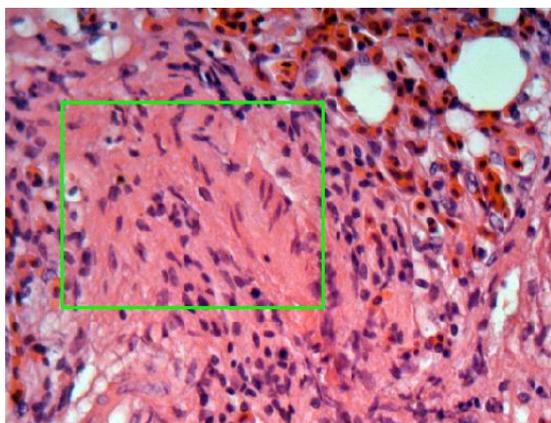


Fig. 10: Marcada fibrosis pulmonar (recuadro) (Hematoxilina Eosina x 40).

paleopulmón y neopulmón (Fede 1980), además disponen de 9 sacos aéreos, distribuidos por el cuerpo, la superficie de la barrera de intercambio aire-sangre, es menor y mucho más delgada que en los mamíferos (Watson et al. 2007), resultando finalmente muy eficaz en su cometido.

El estudio histopatológico de las muestras de pulmón, no evidenciaron diferencias entre los pollos que comieron el maíz Ph3 y los que comieron el maíz M37W ($P>0,05$).

Tabla 14: Efecto de la dieta sobre las lesiones estudiadas en pulmón.

Lesión		M37W nº (%)	Ph3 nº (%)
Inflamación	Sin lesión	7 (29,20)	3 (13,00)
	Leve [$<10\%$]	7 (29,20)	8 (34,80)
	Moderada [11-20%]	8 (33,30)	10 (43,50)
	Severa [$>20\%$]	2 (8,30)	2 (8,70)
Fibrosis	Sin lesión	3 (12,50)	3 (13,10)
	Leve [$<10\%$]	10 (41,70)	7 (30,40)
	Moderada [11-20%]	9 (37,50)	7 (30,40)
	Severa [$>20\%$]	2 (8,30)	6 (26,10)

(M37W n=24, Ph3 n= 23). Los valores expresan el número y el % de animales.

No existen diferencias significativas para la distribución de inflamación $\chi^2=1,868$; $P=0,600$

No existen diferencias significativas para la distribución de fibrosis $\chi^2=2,759$; $P=0,430$.

Los pollos que comieron la dieta con maíz Ph3 no presentaron diferencias en la presentación ni en el perfil de gravedad de las lesiones de fibrosis e inflamación en relación con los pollos que comieron la dieta con maíz M37W.

3.4.5.3 Bolsa de Fabricio

El estudio histopatológico de las muestras de bolsa de Fabricio, no evidenciaron diferencias entre los pollos que comieron el maíz Ph3 y los que comieron el maíz M37W ($P>0,05$).

El número de pollos que aparecen con lesión en ambos tratamientos y para todos los grupos de lesiones (vacuolización cortical y medular y depleción) es elevado (Tabla 15). La mayor parte de las lesiones que se presentan son leves. En ningún caso se observaron lesiones macroscópicas en el tejido de la Bolsa de Fabricio durante la necropsia.

Tabla 15: Efecto de la dieta en la presentación de lesiones en tejido de bolsa de Fabricio.

		M37W	Ph3
		nº (%)	nº (%)
Depleción	Sin lesión	6 (25,00)	6 (26,10)
	Leve	5 (20,80)	6 (26,10)
	Moderada	9 (37,50)	7 (30,40)
	Severa	4 (16,70)	4 (17,40)
Vacuolización medular	Sin lesión	6 (25,00)	6 (26,10)
	Leve	8 (33,30)	10 (43,50)
	Moderada	6 (25,00)	3 (13,00)
	Severa	4 (16,70)	4 (17,40)
Vacuolización cortical	Sin lesión	19 (79,10)	16 (69,60)
	Leve	3 (12,50)	5 (21,70)
	Moderada	1 (4,20)	1 (4,30)
	Severa	1 (4,20)	1 (4,40)

(Ph3 n= 23; M37W n=24). Los valores expresan el número y % de animales.

No existen diferencias significativas para depleción $\chi^2=0,320$; $P=0,956$.

No existen diferencias significativas para vacuolización medular $\chi^2=1,201$; $P=0,753$.

No existen diferencias significativas para vacuolización cortical $\chi^2=0,736$; $P=0,865$.

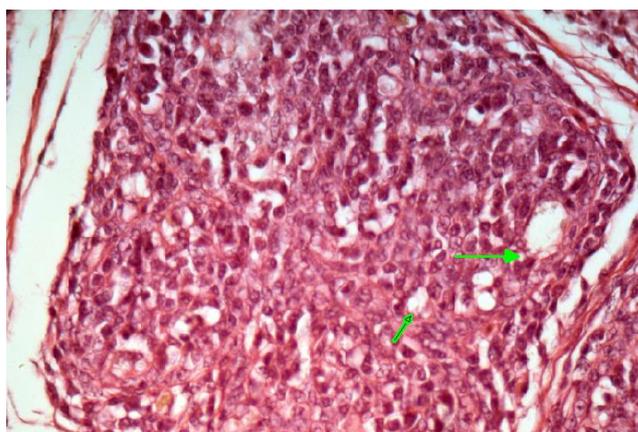


Fig. 11: Folículo de la bolsa de Fabricio, donde es posible comprobar la existencia de vacuolas tanto en la zona medular como en la cortical. (Hematoxilina Eosina x 40).

Según el experimento de Tabeekh y Mayah (2009) la regresión del peso de la bolsa a partir de la semana 10 de vida del pollo es más rápida que la regresión del volumen, todo indica que el proceso de degeneración de la bolsa se inicia a partir de la depleción linfocitaria de los folículos, seguido de la infiltración de los espacios interfoliculares por tejido conectivo. Una vez producido cierto grado de depleción, es posible apreciar zonas de vacuolización.

3.4.5.4 Riñón

En el examen macroscópico no se observó ninguna lesión.

La frecuencia de presentación de lesiones en cortes histológicos de riñón fue similar para todos los grupos de lesiones ($P>0,05$). En ambos tratamientos, el número de pollos que aparecen con agregados linfoides y con hematíes en el espacio intersticial es elevado. La graduación de las lesiones presentadas en todos los casos es leve, lo que hace compatibles las apreciaciones macroscópicas y los hallazgos microscópicos.

Tabla 16: *Efecto de la dieta Ph3 en la presentación de lesiones en tejido de riñón.*

Lesión	M37W nº (%)	Ph3 nº (%)	χ^2	P
Agregados linfoides	22 (91,67)	22 (95,65)	0,312	0,576
Atrofia glomerular	7 (29,17)	9 (39,13)	0,519	0,471
Dilatación tubular	8 (33,33)	4 (17,39)	1,570	0,210
Extravasación hemática intersticial	22 (91,67)	23 (100)	2,002	0,157
Hipertrofia tubular	9 (12,50)	8 (21,74)	0,038	0,846
Mineralización	3 (37,50)	5 (34,78)	0,710	0,399

(Ph3 n= 23; control M37W n=24). Los valores expresan el número y el % de animales.

La complejidad estructural del riñón de las aves y las diferencias con los mamíferos hacen de este órgano un sujeto de estudio particular; pueden encontrarse descripciones precisas en Siller (1981), Goldstein y Skadhauge (1999). Destaca el doble sistema venoso, similar a peces y reptiles y la presencia de dos tipos de nefronas unas de tipo reptiliano y otras similares a los mamíferos. La vinculación de síndromes renales con esteatosis hepática o síndrome de hígado graso quedó descrita en el pollo (Siller 1981) y probablemente es uno de los débitos fisiológicos que la avicultura moderna genera en los pollos de engorde debido a las dietas de alto crecimiento que aportan proteína y energía en cantidades elevadas.

3.4.5.5 Bazo

El bazo es un órgano linfoide y hematopoyético, que en los pollos empieza a realizar su función tan pronto como se genera el esbozo esplénico, entre los días 7 y 11 de incubación (Oláh y Vervelde 2008). En la zona de pulpa roja, tienen lugar los principales eventos hematopoyéticos, no obstante están presentes abundantes linfocitos T independientes, especialmente CD8⁺ y TCR $\gamma\delta$, células NK y especialmente macrófagos capaces de expresar Complejo de Histocompatibilidad Mayor de tipo II (CHM II) (Jeurissen et al. 1999).

Los principales grupos linfoides se encuentran en la pulpa blanca, en ella hay algunas áreas bien definidas: la zona de los linfocitos perielipsoides, rodeados por la cápsula de Schweigger-Seidel que filtrará la llegada de antígenos hasta los linfocitos perielipsoides (Oláh y Glick 1982); la zona de los linfocitos de envoltura periarteriolar y en la base, otro grupo conocido como centro germinal. Dado que en el bazo no hay entrada de vasos linfáticos, ni aferentes ni eferentes, la información antigénica, procede directamente de la sangre.

En el experimento no hay diferencias significativas entre tratamientos en relación a la morfología de la pulpa blanca (hipertrofia y atrofia), atrofia de pulpa roja, presencia de pigmentos, fibrosis o alteraciones en las cápsulas de Schweigger-Seidel. Se observó

hipertrofia significativa ($P<0,01$) de la pulpa roja en los pollos que comieron la dieta M37W (33,33%) en relación con los que comieron la dieta Ph3 (ningún caso).

Se aprecia hiperplasia arterial en los pollos del tratamiento Ph3 prácticamente en casi todos los casos (91,30%), esta frecuencia es significativamente diferente ($P<0,01$) de la encontrada en el tratamiento M37W (36,36%). Los nódulos linfoides aumentados, también presentan una elevada frecuencia (65,22%) para el tratamiento Ph3, significativamente diferente ($P<0,01$) con M37W (25%).

Tabla 17: *Efecto de la dieta Ph3 en la presentación de alteraciones en tejido de bazo.*

Lesión	M37W nº (%)	Ph3 nº (%)	P
Atrofia pulpa blanca	8 (33,33)	5 (21,74)	0,374
Hipertrofia pulpa blanca	9 (37,50)	15 (65,22)	0,057
Atrofia pulpa roja	11 (45,83)	12 (52,17)	0,252
Hipertrofia pulpa roja	8 (33,33)	-	0,0024**
Hiperplasia arterial	12 (36,36)	21 (91,3)	0,0020**
Fibrosis	3 (12,50)	4 (17,39)	0,638
Pigmentos	6 (25,00)	8 (34,78)	0,463
Nódulos linfáticos aumentados	6 (25,00)	15 (65,22)	0,0056**
Cápsula de Schweigger-Seidel	6 (25,00)	4 (17,39)	0,524

(Ph3 n=23; M37W n=24) (** $P<0,01$). Los valores expresan el número y el % de animales.

La hiperplasia arterial y un mayor tamaño en los nódulos linfáticos hacen suponer una mayor reacción inflamatoria en el bazo del tratamiento Ph3. Debido a la complejidad estructural de este órgano linfoide no se ha podido determinar si esta reacción está más vinculada a la respuesta inmunológica humoral o celular; aunque todo parece indicar en función de la detección de anticuerpos en suero, que podría tratarse de una reacción de la inmunidad celular, linfocitos T CD4 y CD8, ambos presentes en el bazo.

3.4.5.6 Timo

En las aves el timo se sitúa en el cuello, paralelo al nervio vago y a la vena yugular interna; a cada lado del cuello se pueden encontrar 7 u 8 lóbulos de entre 6 y 12 mm de diámetro, cada lóbulo está rodeado de una cápsula de tejido fibroso de la que parten los septos que dividen de forma incompleta el parénquima. Histológicamente está formado por una médula central, rodeada de córtex lobulado (Davison et al. 2008).

Este órgano modifica su tamaño relativo a lo largo de la vida del pollo; durante las 2 primeras semanas de vida, hay un crecimiento relativo en tamaño y peso muy rápido, llegando al máximo al final de la segunda semana, luego va decreciendo hasta desaparecer a la semana 20. Durante este periodo los lóbulos se van atrofiando, el parénquima es invadido por tejido adiposo y la diferenciación entre médula y córtex, desaparece (Tarek et al. 2012) a la vez que el número de corpúsculos de Hassal se incrementa (Haseeb et al. 2014).

En el timo, se encuentran linfocitos T, macrófagos y células dendríticas de procedencia exógena, que durante el periodo embrionario van llegando en oleadas sucesivas (Coltey et al. 1989). Las células T, tras la diferenciación y expansión por el córtex, se convertirán en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺.

Diferentes agentes patógenos pueden producir lesiones en el timo. Hadipour et al. (2011) han comprobado que la infección experimental con una cepa de influenza aviar (H5N2) de baja patogenicidad, produce en pollos de 20 días depleción linfocitaria en el área medular. La infección experimental con virus de Marek, produce en el timo cambios en el perfil proteómico, atrofia y finalmente inmunodepresión (Hu et al. 2012). La intoxicación experimental con Deoxinivalenol (DON) produce lesiones intensas en el timo, degeneración, necrosis y depleción (Solcan et al. 2012)

Tabla 18: *Alteraciones en tejido de timo en respuesta a la dieta con maíz Ph3.*

Lesión	M37W nº (%)	Ph3 nº (%)	P
Hipertofia cortical	18 (75,00)	17 (73,91)	0,931
Hipertrofia medular	-	7 (30,43)	0,0034**
Atrofia medular	15 (65,22)	9 (39,13)	0,077
Pocos Corpúsculos de Hassal	6 (25,00)	9 (39,13)	0,299
Hiperplasia arteriolar	7 (29,17)	4 (17,39)	0,340

(Ph3 n= 23; M37W n=24) (**P<0,01). Los valores expresan el número y el % de animales.

En los resultados se evidencia hipertrofia medular significativamente mayor en los pollos del tratamiento Ph3 lo que indica que hubo una reacción inmunitaria celular mayor, aunque también pudiera deberse a una regresión más tardía del timo, especialmente cuando se comparan los resultados de atrofia medular (Davison et al. 2008).

En ningún caso se detectaron lesiones graves como degeneración o necrosis; y los hallazgos son compatibles con las características de órgano sano.

3.4.5.7 Tonsilas cecales

Forman parte del tejido linfoide secundario y se presentan como un área engrosada en la parte proximal de cada uno de los ciegos. El tejido linfoide se estructura en torno a las criptas del lumen intestinal y está formado por tejido linfoide difuso con algunos centros germinales más densos, la mucosa de la cripta se encuentra invadida de linfocitos (Glick 1986).

La exposición continua a antígenos, la presencia tanto de linfocitos T como B y de células plasmáticas productoras de anticuerpos (IgM, IgG e IgA) hacen de las tonsilas cecales un verdadero órgano centinela.

En las muestras histológicas de las tonsilas cecales, se valoró la depleción linfocitaria y la infiltración linfocitaria en la mucosa intestinal; en ningún caso se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (P>0,05).

Tabla 19: Efecto de la dieta Ph3 en la presentación de alteraciones en tejido de tonsilas cecales.

Lesión	M37W nº (%)	Ph3 nº (%)	P
Depleción linfocitaria	5 (20,83)	9 (39,13)	0,170
Infiltrado linfocitario en mucosa	2 (8,33)	2 (8,70)	0,964

(Ph3 n=23; M37W n=24). Los valores expresan el número y el % de animales.

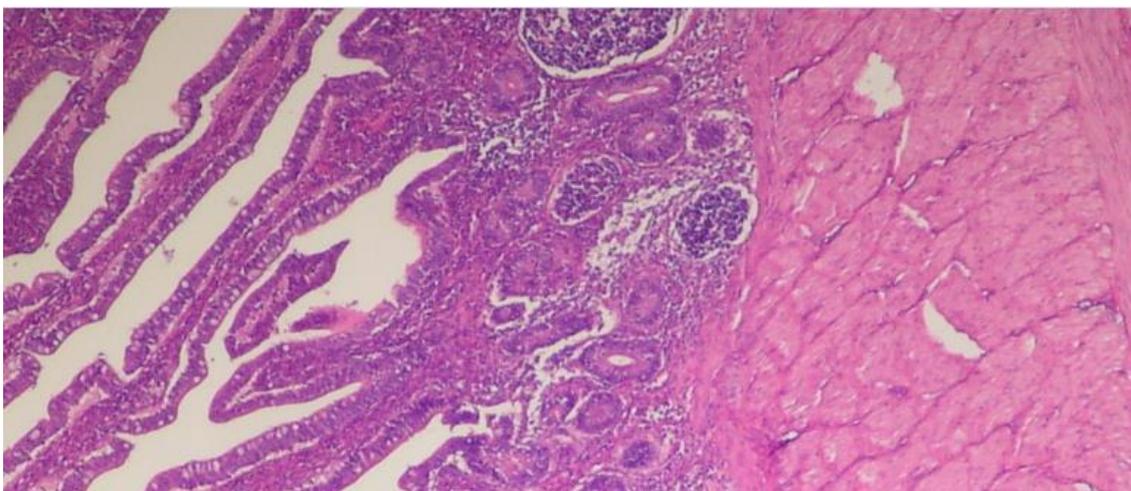


Fig. 12: Tonsila cecal, obsérvense tres nódulos linfoides completos en la zona central de la imagen y en el extremo superior otro incompleto. (Hematoxilina Eosina x 40).

3.4.6 Bioquímica

Antes del sacrificio y una vez aturdidos, se extrajo sangre de todos los pollos (n=47); tras el desuerado, se desecharon tres muestras por presentar una cantidad insuficiente de suero, para garantizar la analítica completa. Los sueros fueron analizados en el Servicio de Laboratorio del Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Lleida.

No se encontraron diferencias significativas entre los pollos que comieron las dietas M37W y Ph3 para las variables bioquímicas estudiadas ($P>0,05$). Los valores medios de las determinaciones bioquímicas son propios de un lote sano.

El valor obtenido en los pollos de la dieta Ph3 para la glucosa, $238,52 \pm 4,409$ mg/dl, es ligeramente inferior al encontrado por Abdi-Hachesoo et al. (2011), $260,50 \pm 18,71$ mg/dl con pollos de la misma estirpe genética (Ross) pero en edad adulta.

Los resultados de Abdi-Hachesoo et al. (2011) para transaminasa glutámico pirúvica, GPT ($10,20 \pm 2,25$ UI/L) son superiores a los hallados en pollos que han comido maíz M37W, ($4,33 \pm 1,241$ UI/L) o maíz Ph3 ($6,13 \pm 2,448$ UI/L). Sin embargo Sribhen et al. (2003) obtiene valores de $2,13 \pm 1,30$ UI/L que son dos y tres veces inferiores respectivamente que los de los pollos del ensayo que han comido maíz M37W y Ph3. Por otra parte, Silva et al. (2008) obtienen valores ($3,853 \pm 1,969$ UI/L) similares a la dieta con maíz M37W, e inferiores al obtenido en el tratamiento Ph3.

Tabla 20: *Bioquímica sanguínea, efecto de la dieta con maíz Ph3.*

	M37W	Ph3	P
Glucosa(mg/dl)	236,38±3,246	238,52±4,409	0,702
Proteína total (g/dl)	2,90±0,085	3,039±0,065	0,196
Albumina (mg/dl)	1,63±0,030	1,70±0,026	0,187
GOT (UI/L)	249,33±14,726	312,22±42,775	0,188
GPT (UI /L)	4,33±1,241	6,13±2,448	0,528
LDH (UI /L)	2644,29±274,661	2777,43±210,234	0,699
GGT (UI /L)	21,05±1,059	18,65±1,360	0,177
FAL (UI /L)	1987,38±168,063	2111,83±185,040	0,623
Bilirrubina total (mg/dl)	0,0514±0,003	0,0596±0,003	0,066
Hemoglobinemia (mg/dl)	118,24±71,898	124,52±57,147	0,945
Lipemia (mg/dl)	2,48±0,313	2,52±0,382	0,928
Creatinina (mg/dl)	0,03±0,005	0,04±0,021	0,660
Ácido Úrico (mg/dl)	4,13±0,753	4,78±0,940	0,600
Ca (mg/dl)	9,86±0,187	10,17±0,122	0,170
K (mEq/L)	6,33±0,598	6,96±0,735	0,515
P (mg/dl)	7,96±0,247	8,31±0,358	0,432
Na (mEq/L)	147,07±0,941	148,29±0,620	0,275

(Ph3 n= 22, M37W n=22). GOT transaminasa glutámico oxalacética; GPT transaminasa glutámico pirúvica; LDH Lactato deshidrogenasa; GGT Gamma glutamil transpeptidasa; FAL Fosfatasa alcalina. Los valores corresponden a la media y error estándar.

Para GOT, el valor del tratamiento con maíz Ph3, 312,22±42,775 UI/L es superior a los hallados por Abdi-Hachesoo et al. (2011), 198,40±14,06 UI/L, Silva et al. (2008), 228,95±49,66 UI/L Burlikowska et al. (2010) 254,58±33,91 UI/L. o Bowes et al. (1989) 254±29,3. El valor medio de GOT en los pollos que han comido maíz M37W, (249,33±14,726 UI/L) se halla cercano a los resultados descritos.

Sribhen et al. (2003) obtiene datos de variables bioquímicas sanguíneas para pollos de 35 días de edad; el valor de la creatinina es de 0,20±0,04 mg/dl, muy superior al obtenido en los pollos de los tratamientos M37W y Ph3; 0,035±0,054 y 0,04±0,021 mg/dl respectivamente.

El color del suero fue valorado por colorimetría y expresado en escala de cero a dos, para determinar los valores de ictericia; en humanos y mamíferos este parámetro da una referencia de la bilirrubina y de la biliverdina presentes en el suero. En el estudio este valor queda modificado por la elevada presencia de carotenoides y de sus metabolitos (Tabla 21).

Tabla 21: Efecto de la dieta en los valores de color en el suero.

COLOR ¹	M37W nº (%)	Ph3 nº (%)
0	21 (95,55 %)	2 (9,09 %)*
1	0 (0 %)	2 (9,09 %)
2	1 (4,55 %)	18 (81,82 %)*

(Ph3 n= 23, M37W n=22) (*P<0,05). Los valores expresan el número y el % de animales.

¹El color corresponde al índice icterico en determinaciones bioquímicas.

Existen diferencias entre los tratamientos M37W y Ph3 para la variable color del suero medido por cromatografía con el índice icterico estas diferencias son significativas en los rangos extremos (0 y 2) y en el conjunto de la variable ($\chi^2 = 32,904$, $P < 0,0001$). El caso positivo de grado 2 de la dieta control M37W, probablemente se trate de un caso de hemólisis.

Tabla 22: Efecto de la dieta con maíz en colesterol, triglicéridos y ratio HDL/LDL.

	M37W	Ph3	P
Colesterol (mg/dl)	153,81±5,106	163,96±4,565	0,145
HDL (mg/dl)	119,29±3,885	126,17±4,010	0,226
LDL (mg/dl)	27,14±1,333	27,91±1,484	0,703
VLDL (mg/dl)	10,01±1,027	11,42±1,317	0,410
TRIG (mg/dl)	50,05±5,135	57,09±6,587	0,410
HDL/LDL (mg/dl) / (mg/dl)	4,53±0,173	4,69±0,199	0,537

(n=22). Los valores expresan la media ± el error estándar.

No existen diferencias significativas entre los tratamientos para el colesterol total, para los tipos LDL y HDL ni para VLDL tampoco para Triglicéridos ni para la ratio HDL/LDL ($P > 0,05$).

Los valores de colesterol total en el grupo de la dieta Ph3 (163,96±4,565 mg/dl) son similares a los obtenidos por Sribhen et al. (2003) (141±22 mg/dl) y claramente inferiores a los presentados por Suchý et al. (2004) (283 mg/dl).

3.4.7 Hematología

Las muestras hematológicas fueron analizadas en el Servicio de Laboratorio del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida a partir de un envío ciego de las mismas. En el estudio se empleó un hemocitómetro y el estudio de los leucocitos fue realizado en cámara de Neubauer.

Existen diferencias significativas ($P = 0,040$) entre los pollos que han comido maíz M37W y los que han comido maíz Ph3 para el recuento total de leucocitos (21.672±2.859 vs. 14.892±1.535 leucocitos/ μ l respectivamente); también se han producido diferencias significativas, $P = 0,046$ en el recuento de heterófilos (11.800±1.872 y 7.641±883 para los tratamientos M37W y Ph3).

Tabla 23: Hemograma, efecto de la dieta con maíz Ph3.

	M37W	Ph3	P
Hematocrito %	34,27±0,675	35,38±0,738	0,286
Hemoglobina (g/dl)	11,29±0,244	11,75±0,250	0,203
Leucocitos (n/μl)	21.672,73±2.859,024	14.892,31±1.535,998	0,040*
Eosinófilos (n/μl)	1.064,36±164,499	836,31±155,447	0,326
Basófilos (n/μl)	2.368,73±415,674	1.518,15±226,090	0,074
Linfocitos (n/μl)	5.837,45±564,882	4.525,54±463,614	0,083
Monocitos (n/μl)	601,45±153,154	371,08±75,006	0,170
Heterófilos (n/μl)	11.800,73±1.872,092	7.641,23±883,212	0,046*
L/H ¹ (n/n)	0,583±0,0796	0,629±0,0477	0,614

Medias con error estándar, (M37W n=11; Ph3 n= 13) *P<0,05.

¹L/H, Linfocitos/Heterófilos.

La respuesta inmunitaria medida en base a la concentración de elementos de la serie blanca fue más moderada en los pollos que comieron la dieta Ph3, la fórmula leucocitaria mantiene el perfil sin diferencias significativas entre dieta M37W y dieta Ph3.

Estudios con ratones a los que se les ha administrado Luteína, Astaxantina, y β-Carotenos y han sido desafiados con un antígeno de respuesta T-dependiente, demuestran que estos compuestos poseen un importante efecto inmunomodulador (Jyonouchi et al. 1994). La base de estos efectos está en la capacidad de los carotenoides para insertarse en la membrana celular y protegerla de la peroxidación de los lípidos. Esto potencia la capacidad de respuesta de los linfocitos; también el resto de efectos y la acción conjunta de ellos como la potenciación de la comunicación celular a través de las ventanas celulares, el bloqueo de los radicales libres y la inhibición de la oxidación por el ácido araquidónico, participan de esta regulación (Deming et al. 2002).

Tabla 24: Efecto de la dieta con maíz Ph3 en la fórmula leucocitaria.

	M37W	Ph3	P
Eosinófilos (%)	5,36±0,778	5,54±0,573	0,855
Basófilos (%)	10,55±1,082	10,00±0,884	0,697
Monocitos (%)	2,64±0,491	2,92±0,655	0,737
Linfocitos (%)	28,64±1,983	30,85±1,436	0,367
Heterófilos (%)	52,82±2,789	50,69±1,886	0,524

Medias con error estándar, (M37W n=11; Ph3 n= 13).

No existen diferencias (P>0,05) en la distribución porcentual de los diferentes tipos de leucocitos.

El perfil leucocitario es similar a los publicados por otros autores (Johnson-Delaney 2008; Carpenter 2013; Samour 2006) y difiere del publicado por Abdi-hachesoo et al. (2011)

realizado con pollo adulto de 26 semanas de vida, heterófilos $30,20 \pm 5,39$ %, linfocitos $61,60 \pm 6,60$ % y basófilos $1,1 \pm 1,1$ %; los valores porcentuales de monocitos y eosinófilos son similares.

3.4.8 Serología

Se realizó el estudio serológico de las principales enfermedades víricas de los pollos; para ello se hizo un envío ciego de 47 muestras de suero a el Centro de Estudios de Sanidad Avícola de Cataluña y Aragón (CESAC). Se controlaron, Anemia del Pollo (CAV), enfermedad de Gumboro (IBD), enfermedad de Newcastle (NCD), afectación por Reovirus (REO) y Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV).

Para el estudio de los títulos frente a IBV se empleó la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH), incluyendo la cepa clásica M41 y las cepas variantes (QX, 973/B, IT02). También se empleó esta técnica para el estudio de NCD. Los títulos de anticuerpos frente a IBD, CAV y REO fueron determinados por la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Estas técnicas y determinaciones son de rutina en el CESAC.

La respuesta a IBD y IBV está afectada por el protocolo vacunal seguido con los pollos, que fueron vacunados frente a IBV en la incubadora el primer día de vida y frente a IBD durante la prueba a los 16 días de vida.

No se han detectado diferencias significativas entre los tratamientos para los títulos serológicos de las enfermedades estudiadas ($P > 0,05$).

Los títulos expresados frente a Reovirus se estima que lo son por respuesta frente a virus campo. En el caso de CAV, los títulos presentes pueden ser anticuerpos residuales originados en la inmunidad maternal, o al contacto con virus CAV de campo dado la dificultad de evitar su presencia en condiciones convencionales (Rosenberger y Cloud 1998).

Tabla 25: Efecto de la dieta Ph3 en los títulos serológicos (IBV, IBD, REO, CAV y NCD¹).

	M37W (n=24)	Ph3 (n=21)	P	
IBV	M41	3,67±0,143	3,48±0,164	0,384
	793-B	3,29±0,185	2,95±0,109	0,123
	QX	2,42±0,133	2,19±0,088	0,164
	IT02	3,21±0,180	2,86±0,143	0,142
IBD	2.145,04±289,824	1.614,14±320,337	0,225	
REO	40,42±17,543	74,00±42,700	0,450	
CAV	0,97±0,012	0,99±0,013	0,451	
NCD	nd	nd	-	

Medias con error estándar, (Ph3 n= 22, M37W n=22); nd, no detectado.

¹Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV, enfermedad de Gumboro (IBD), Reovirus (REO) Anemia del Pollo (CAV), enfermedad de Newcastle (NCD).

3.4.9 Análisis de carotenos

La concentración de carotenos depositados en diferentes tejidos y suero fue analizada por HPLC en un laboratorio de Bioquímica molecular en J.W. Goethe Universität, Frankfurt, Alemania.

3.4.9.1 Suero

Los pollos que comieron la dieta Ph3, presentan una concentración de carotenoides en suero de 3,42 µg/ml, que es 12 veces superior al valor alcanzado en los pollos control, que comieron una dieta baja en carotenoides, (0,28 µg/ml de suero). Los valores alcanzados son suficientes para que las muestras de suero del tratamiento se diferencien por presentar un color más amarillo.

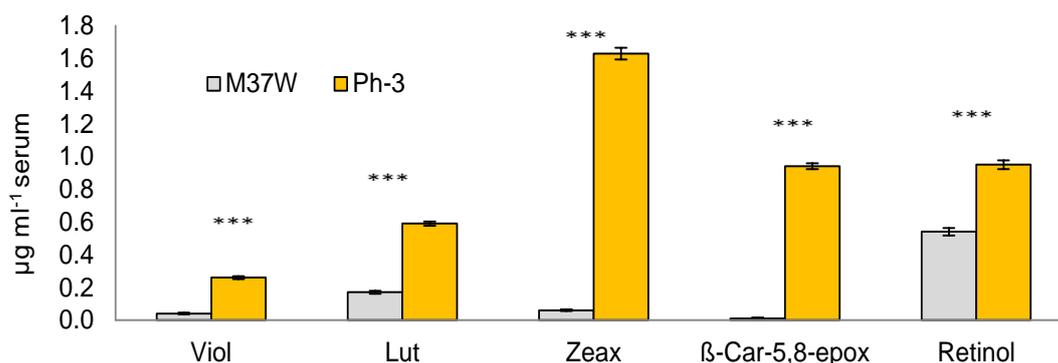


Fig. 13: Concentración de carotenoides y retinol en suero. Los valores expresan la concentración media y el error estándar en µg de carotenoides por ml de suero; (n=5); ***P<0,001. Viol, Violaxantina; Lut, Luteína; Zeax, Zeaxantina; β-Car-5,8-epox, β-Caroteno-5,8-epóxido.

La concentración de retinol en suero en los pollos que comieron la dieta Ph3 es de 0,95 µg/ml, un 75% más que en los pollos que comieron la dieta M37W (0,54 µg/ml). Estos

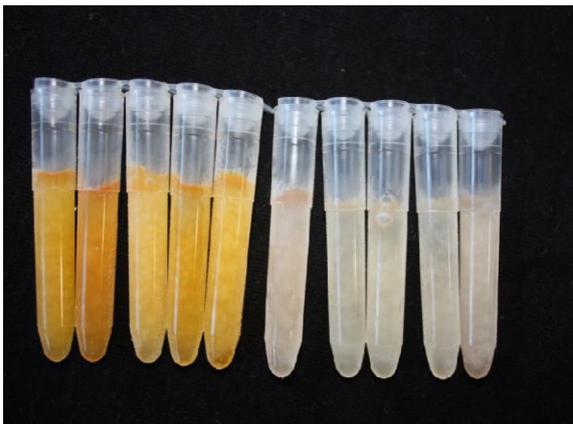


Fig. 14: Muestras de suero obtenido de los pollos; a la izquierda las muestras pertenecientes al tratamiento Ph3, a la derecha las muestras pertenecientes al control.

datos demuestran que hay transformación de los carotenoides precursores de vitamina A (α y β -Caroteno y β -Criptoxantina) procedentes del maíz modificado genéticamente en retinol. El pienso de la dieta M37W prácticamente es carente en carotenoides precursores de vitamina A; se puede considerar que la concentración de retinol en suero en la dieta M37W es procedente del aporte del suplemento en vitamina A del pienso (12.000 UI vitamina A) y que es igual en ambos tratamientos y que por lo tanto el diferencial Ph3 y M37W (41 µg/ml) es procedente de la metabolización sufrida por los precursores de carotenos aportados en la

dieta Ph3 (6,17 µg/g en el pienso de crecimiento).

3.4.9.2 Músculo

Se valoró y estudió la concentración de carotenoides en tejido muscular; los resultados demuestran diferencias entre la dieta Ph3 y la dieta M37W, también existen diferencias cualitativas y cuantitativas entre los dos músculos.

En *pectoralis major* (pechuga), hay diferencias significativas ($P < 0,001$) entre dietas Ph3 y M37W para luteína, zeaxantina y β -caroteno. A pesar de estar presentes en ambos piensos, violaxantina ($0,54 \pm 0,041$ µg/g) y β -criptoxantina ($0,36 \pm 0,027$ µg/g) aparecen exclusivamente en la pechuga de los pollos que han comido la dieta Ph3, otros autores en este músculo, únicamente encuentran luteína y zeaxantina, destacando expresamente la ausencia de β -carotenos (Le Bihan-Duval et al. 2011).

En el músculo *iliotibial* (muslo) se encuentran diferencias significativas ($P < 0,001$) para la zeaxantina. Destaca la presencia en el tratamiento Ph3 de epóxidos de zeaxantina y β -carotenos (zeaxantina-5,8-epóxido, $0,47 \pm 0,031$ µg/g y β -caroteno-5,8-epóxido $0,49 \pm 0,031$ µg/g) que indican que existe metabolización de estos carotenoides en sus epóxidos; esto no se encuentra en el tratamiento M37W y tampoco se ha detectado en el músculo de pechuga.

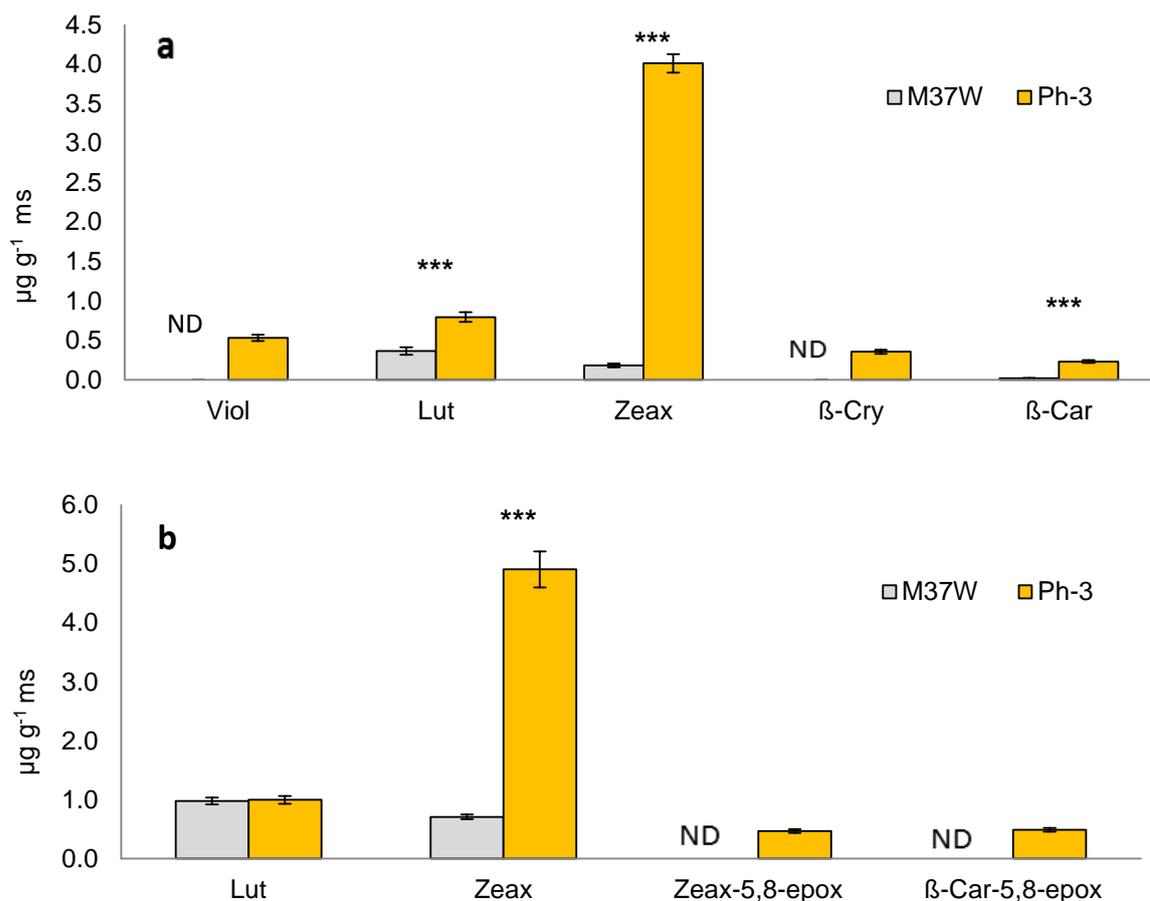


Fig. 15: Efecto de la dieta Ph3 en los carotenoides en tejido muscular. (a) pechuga, pectoralis major; (b) muslo, iliotibial. Los valores expresan la concentración media y el error estándar en µg de carotenoides por g de materia seca; (n=5); ***P<0,001. Viol, Violaxantina; Lut, Luteína; Zeax, Zeaxantina; α-Cry, α-Criptoxantina; β-Cry, β-Criptoxantina; β-Car, β-Caroteno; Zeax-5,8-epox, Zeaxantina-5,8-epóxido; β-Car-5,8-epox, β-Caroteno-5,8-epóxido.

En el músculo de la pata, a diferencia del músculo de la pechuga, no se detectaron violaxantina, β-criptoxantina y β-carotenos.

Existe por tanto una diferencia clara entre ambos grupos musculares no solo en la concentración de carotenoides sino también en la presencia y metabolización de los mismos.

3.4.9.3 Piel

Se tomaron muestras de tres áreas diferentes de la piel (pechuga, muslo y pata) que son representativas en el momento de la compra por su valoración por el consumidor.

Existen diferencias significativas (P<0,001) entre las dieta Ph3 y M37W para la concentración de zeaxantina, en la piel de pechuga muslo y pata, para los epóxidos de zeaxantina y β-carotenos en la piel de pechuga, así como para la luteína en la piel de la pata.

Se ha detectado zeaxantina-5,8-epóxido y β-caroteno-5,8-epóxido en pechuga, muslo y pata de los pollos de la dieta Ph3 y únicamente en piel de pechuga en la dieta M37W.

Se observa homogeneidad en los resultados de las muestras de piel, con independencia del origen, tanto en la concentración de carotenoides, como en la presencia y en la metabolización. Contrasta este hecho con las diferencias observadas en el tejido muscular.

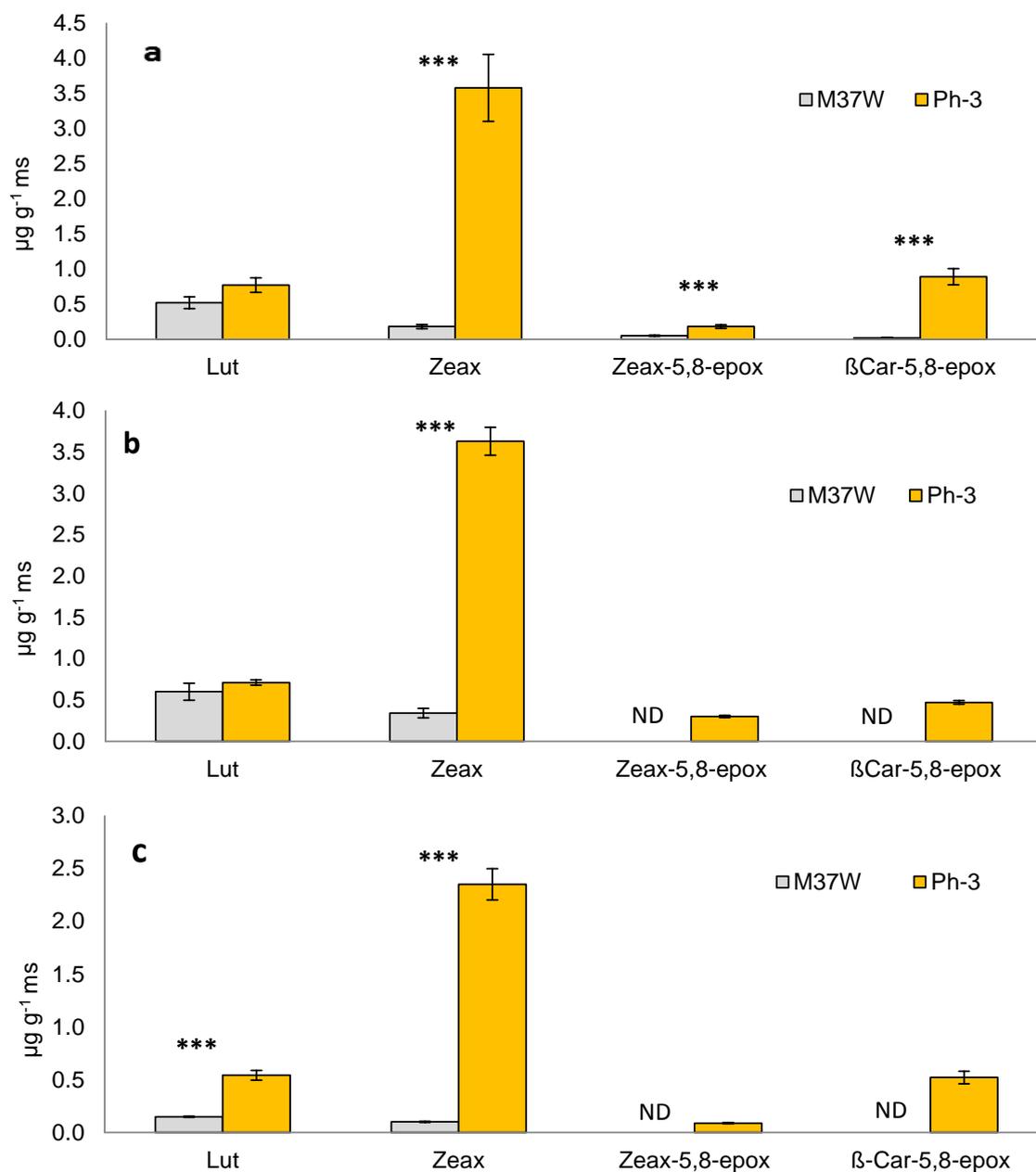


Fig. 16: Efecto de la dieta Ph3 en los carotenoides en la piel. **(a)** Piel de pechuga, área del apteridio tronco lateral; **(b)** Piel de muslo, área iliotibial; **(c)** Piel de la pata, área tarso lateral. Los valores expresan la concentración media y el error estándar en μg de carotenoides por g de materia seca; (n=5); ***P<0,001. Lut, Luteína; Zeax, Zeaxantina; β-Car, β-Caroteno; Zeax-5,8-epox, Zeaxantina-5,8-epóxido; β-Car-5,8-epox, β-Caroteno-5,8-epóxido.

3.4.9.4 Tejido periférico

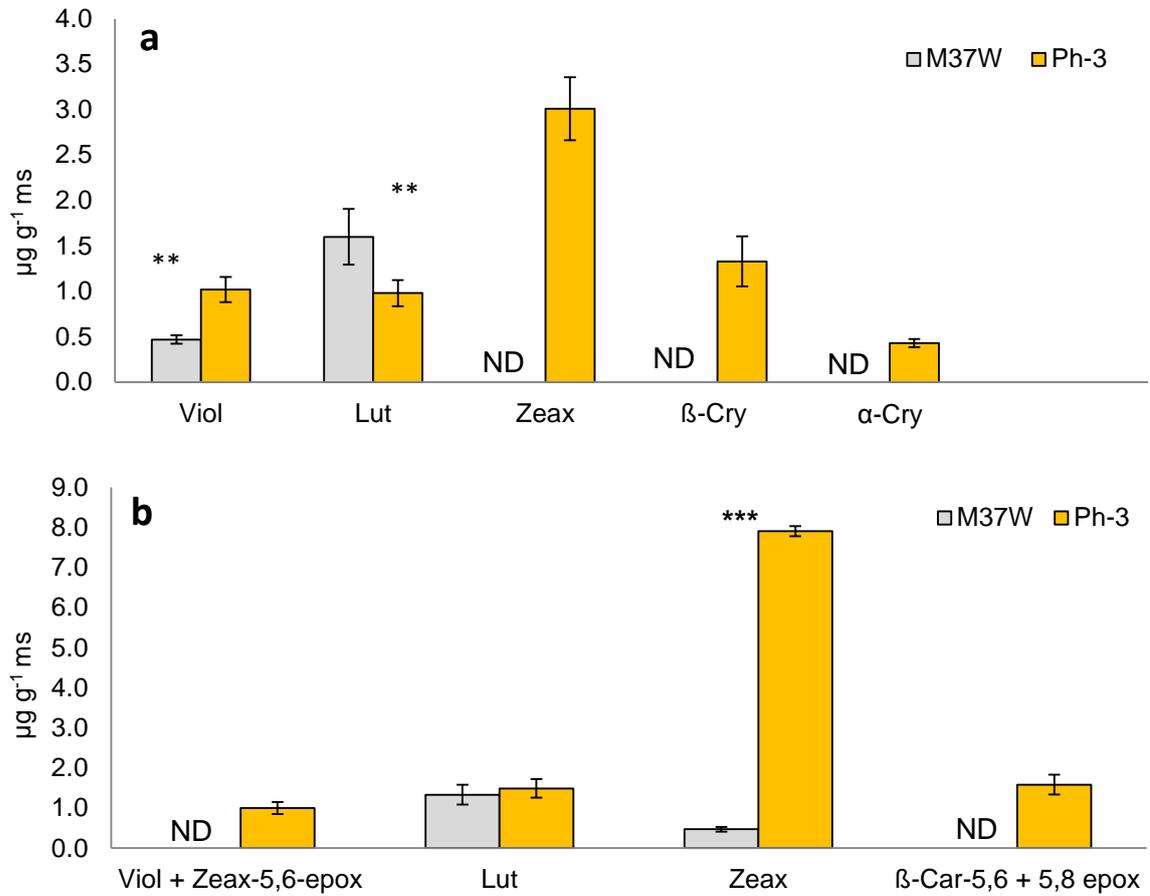


Fig. 17: Efecto de la dieta Ph3 en los carotenoides de tejidos periféricos. **(a)** Base de las plumas. **(b)** Cresta. Los valores expresan la concentración media y el error estándar en µg de carotenoides por g de materia seca (ms); n=5; **P<0,01, ***P<0,001. Viol, Violaxantina; Lut, Luteína; Zeax, Zeaxantina; β-Cry, β-Criptoxantina; α-Cry, α-Criptoxantina; Zeax-5,6-epox, Zeaxantina-5,6-epóxido; β-Car-5,6-epox, β-Caroteno-5,6-epóxido β-Car-5,8-epox, β-Caroteno-5,8-epóxido.

El análisis de carotenoides en tejido periférico, se realizó sobre muestras de plumas y de cresta; las plumas se recogieron de la zona caudal y se les extrajo el *umbricus distalis* de la región del cálamo (Yasuda 2002) para utilizarlo en la determinación de carotenoides.



Fig. 18: Plumas, M37W (izquierda) y Ph3 (derecha).

En la base de las plumas se encontraron diferencias significativas (P<0,01) entre ambos tratamientos para violaxantina y luteína, la concentración de esta última en las plumas de los pollos con dieta M37W, es superior a la presentada por las plumas procedentes del tratamiento Ph3. En las plumas de los pollos de la dieta Ph3,

aparece zeaxantina, α y β -criptoxantina. Se confirma que los carotenoides aportados por el maíz Ph3 llegan hasta el folículo de las plumas y son encontrados en el cálamo. La pigmentación es apreciable en toda la longitud del cálamo e incluso en la base de las primeras bárbulas.

El color de las plumas está determinado genéticamente y es generado principalmente por melanina que combinada con porfirinas y carotenoides da lugar a gran variedad de colores en algunas aves (Leeson y Walsh 2010). Sorprendentemente, los pollos del tratamiento Ph3 presentaron coloración amarilla procedente de los carotenoides de la dieta en las bárbulas de las plumas.

En la cresta se encontraron diferencias significativas ($P < 0,001$) en la concentración de zeaxantina entre las crestas de los pollos de la dieta Ph3 ($7,91 \pm 0,124 \mu\text{g/g}$) y los de la dieta M37W ($0,47 \pm 0,063 \mu\text{g/g}$). Aparecieron únicamente en la dieta Ph3 epóxidos de violaxantina, zeaxantina y β -carotenos lo cual demuestra que existe metabolización de estas sustancias en la cresta.

3.4.9.5 Grasa abdominal

Se hallaron diferencias para la concentración de zeaxantina y zeaxantina-5,8-epóxido ($P < 0,001$) entre la grasa de los pollos procedentes de la dieta Ph3 y los de la dieta M37W; se detectó β -caroteno-5,8-epóxido en la grasa de los pollos Ph3, estando ausente en los pollos M37W.

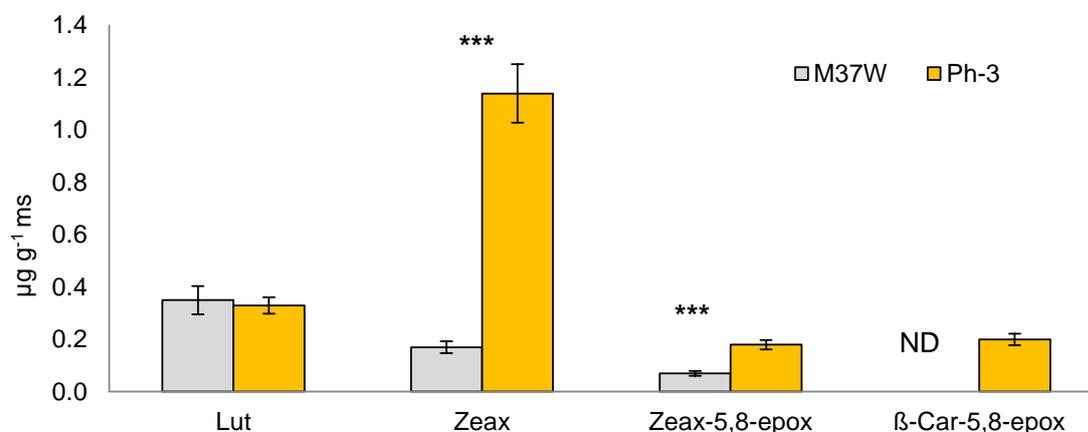


Fig. 19: Efecto de la dieta Ph3 en la concentración de carotenoides en la grasa abdominal. Los valores expresan la concentración media y el error estándar en μg de carotenoides por g de materia seca (ms); $n=5$; *** $P < 0.001$; Lut, Luteína; Zeax, Zeaxantina; Zeax-5,8-epox, Zeaxantina-5,8-epóxido; β -Car-5,8-epox, β -Caroteno-5,8-epóxido.

La presencia de epóxidos en la grasa demuestra que existe metabolización de carotenos en la misma.

3.4.9.6 Hígado

En los pollos que han comido la dieta Ph3, la mayor concentración de carotenoides está en hígado, donde destaca la elevada concentración de retinol (Vitamina A) y ácido retinoico (Fig. 20). Estos valores son superiores a los publicados por Koutsos et al. (2003), donde la concentración de carotenoides (luteína, zeaxantina y cantaxantina) en hígado, con una dieta que incluye carotenoides ($38,4 \text{ mg/kg}$ de pienso) es $1,97 \mu\text{g/g}$. En el ensayo los

pollos que comen maíz Ph3, con una concentración de carotenoides de 26,99 mg/kg de pienso, presentan valores hepáticos de luteína más zeaxantina de 11,93 µg/g. En el tratamiento Ph3, la concentración total de carotenoides, excluyendo retinol y ácido retinoico es 21,9 µg/g ms.

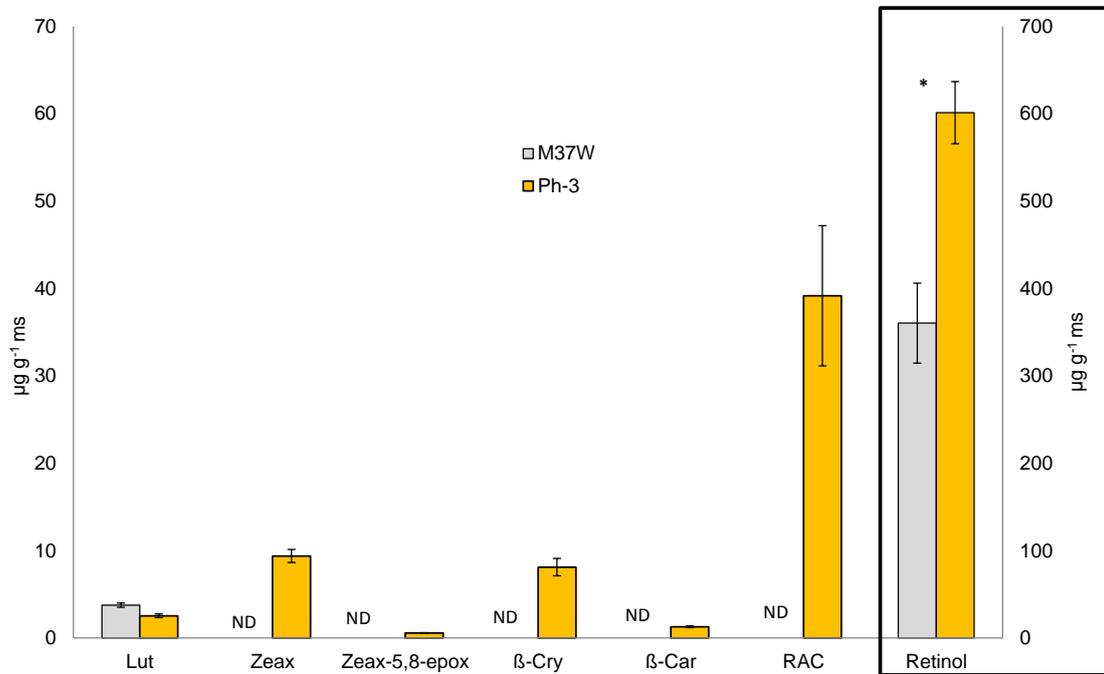


Fig. 20: Efecto de la dieta Ph3 en la concentración de carotenoides en tejido hepático. Los valores expresan la concentración media y el error estándar en µg de carotenoides por g de materia seca (ms); n=5; *P<0,05; Lut, Luteína; Zeax, Zeaxantina; Zeax-5,8-epox, Zeaxantina-5,8-epóxido; β-Cry, β-Criptoxantina; β-Car, β-Caroteno; RAC, Ácido Retinoico. Los valores de Retinol están reflejados en el eje de la derecha.

3.4.9.7 Concentración total de carotenoides en tejidos

La suma de carotenoides totales en los diferentes tipos de tejidos del pollo, proporciona conocimiento sobre la distribución de los mismos. Destaca la cresta como el órgano que acumula más carotenoides, seguido de la base de las plumas.

Curiosamente, en la piel de la pata, aunque sirve como referencia de color, para valorar comercialmente los pollos amarillos, la cantidad acumulada de carotenos es menor que en otros tejidos y que en otros tramos de la piel. La grasa abdominal a pesar de dar un aspecto espectacular al color del pollo amarillo no acumula grandes cantidades de carotenoides.

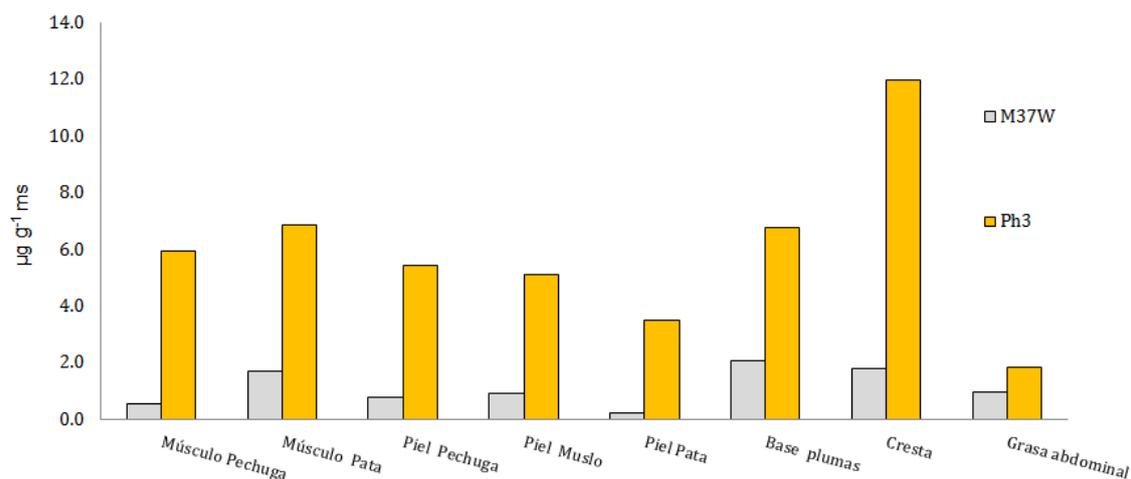


Fig. 21: Concentración total de carotenoides en los tejidos estudiados para los tratamientos M37W y Ph3. Los valores se obtienen como la suma de los diferentes carotenoides y de sus metabolitos directos hallados en cada tejido para cada estudio en μg de carotenoides por g de materia seca (ms); $n=5$.



Fig. 22: Izquierda, dieta M37W, derecha, dieta Ph3. A, cabezas; B, pechugas; C, muslos; D, patas.

3.5 CONCLUSIONES

1. El maíz Ph3 obtenido por ingeniería genética para la expresión elevada de carotenoides, libera estos compuestos bioactivos en los tejidos y fluidos del pollo de forma significativa.
2. Se confirma el uso del maíz Ph3 como un método óptimo para alcanzar en los pollos la coloración amarilla solicitada por algunos consumidores.
3. La alimentación con pienso en base a maíz Ph3 no tuvo efecto en los principales parámetros productivos.
4. El tratamiento Ph3 no afectó al peso relativo de hígado, bazo, y corazón sin embargo sí que se encontraron diferencias en el peso de la bolsa de Fabricio, siendo mayor en los pollos del tratamiento Ph3. La dieta Ph3 tuvo un efecto protector celular en hígado.
5. La dieta con maíz Ph3 no afectó las funciones renales, hepáticas, ni homeostáticas, no se vieron afectados los parámetros bioquímicos. El consumo de maíz Ph3 no afectó la concentración ni el perfil de colesterol ni de triglicéridos.
6. Los pollos que comieron la dieta Ph3 presentaron una concentración inferior de leucocitos, explicada fundamentalmente por una concentración también menor de heterófilos. La fórmula leucocitaria no presenta diferencias significativas. La respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos no se vio afectada por la dieta Ph3.

ENSAYO II

Evolución del color, valoración productiva y sanitaria en pollos criados en una explotación comercial alimentados con maíz Ph3 fortificado con carotenoides

Ensayo II

Evolución del color, valoración productiva y sanitaria en pollos criados en una explotación comercial alimentados con maíz Ph3 fortificado con carotenoides

4.1 INTRODUCCIÓN

En el sector avícola la actividad económicamente más importante es el de engorde de pollos, debido a su corto período de crecimiento y el gran volumen de producción. Este sector ha sido favorecido por la actual situación económica ya que se trata de un alimento sano, nutritivo y barato (Castelló et al. 2002).

En España se consumen aproximadamente 25 kg de carne de ave por persona y año, de los cuales 19 kg son de carne de pollo (FAO, 2012); estos datos son inferiores a los proporcionados por el Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente (29,4 Kg de carne de ave por persona y año) de (MAGRAMA 2014b).

El consumo de pollo tipificado como “pollo amarillo”, habitual en Galicia, País Vasco y ciertas áreas de Cataluña, es incierta y no se disponen de estudios ni estadísticas recientes, aunque en base a datos previos (Federación Avícola Catalana 1992), se estima que un 20% del mercado de carne de pollo es amarillo. Sin embargo en otros países como Brasil, China o Estados Unidos, prácticamente todo el pollo consumido es amarillo.

La pigmentación del pollo de engorde es un factor importante en la aceptación del consumidor y la calidad percibida de éste. El color de la piel de los pollos es proporcionado por carotenoides presentes en la dieta que se depositan en la piel y la grasa subcutánea. Que también están implicados en el crecimiento, el metabolismo y la fertilidad (Pérez-Vendrell et al. 2001).

En un ensayo previo realizado en la Universidad de Lleida (ver Ensayo I) en condiciones experimentales se compararon dos grupos de pollos machos *Ross 308*, uno de los cuales fue alimentado con pienso que contenía el maíz transgénico Ph3 y el otro pienso elaborado a partir del maíz isogénico (M37W) que se utilizó como patrón para las modificaciones genéticas. Se obtuvo diferencias significativas en la coloración tanto externa (piel, plumas) como interna músculo y grasa de los pollos alimentados con el maíz Ph3. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos en las variables de crecimiento, rendimiento, consumo y mortalidad. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el peso de la bolsa de Fabricio.

4.2 OBJETIVOS

Estudiar la liberación de carotenoides biológicamente activos a partir del maíz rico en carotenoides (M37W-Ph3) en pollos de engorde criados en una granja comercial y las repercusiones en los parámetros comerciales productivos y sanitarios.

Determinar la evolución del color de la piel (patas) de los pollos alimentados con maíz Ph3 durante la fase de crecimiento y la afectación de la citada evolución por el manejo, condición sanitaria, o tratamientos medicamentosos efectuados en la granja.

Analizar el efecto de la alimentación con maíz Ph3 en el rendimiento de la canal de los pollos criados hasta la edad de 35 días.

4.3 MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.1 Preparación de la dieta

El cultivo del maíz empleado en esta prueba, queda descrito en en la página 24.

La elaboración de las dietas, control y experimental, se realizó según las recomendaciones publicadas por National Research Council (1994) para la alimentación de pollo, actualizadas por fórmulas comerciales recientes (Aviagen 2008) y elaboradas en el centro de investigación IRTA Mas de Bover, de Reus.

Antes de la preparación de los piensos, el maíz Ph3 se molió para posteriormente ser liofilizado. Este proceso se puede realizar para conservar las características organolépticas y nutritivas , reduciendo las pérdidas de los componentes volátiles o termosensibles a partir de un proceso de conservación que combina la congelación y la deshidratación (Ramírez 2006). El objetivo de la liofilización en el ensayo era estabilizar los carotenoides.

En la Tabla 26 se muestran todos los componentes de los piensos utilizados para el estudio y la proporción de utilización de cada uno de estos componentes.

Tabla 26: *Composición (%) del pienso.*

Ingredientes (%)	Inicio (0-9 días)	Crecimiento (10-35 días)	
		M37W	Ph3
Maíz comercial	28,30	-	-
Maíz M37W	-	58,209	-
Maíz Ph3	-	-	58,209
Soja 47.5% Brasil XPRT	29,50	17,861	17,861
Soja integral (FFS)	7,16	15,835	15,835
Aceite de soja	5,80	4,167	4,167
Trigo	24,60	-	-
Fosfato monocálcico	0,49	1,228	1,228
Carbonato de Calcio	1,39	1,097	1,097
Metionina	0,37	0,333	0,333
Treonina	0,05	0,047	0,047
Colina 60%	-	0,042	0,042
Lisina polvo 79% base	0,50	0,277	0,277
Sal	0,30	0,317	0,317
Bicarbonato sosa	-	0,119	0,119
Corrector básico*	1,52	0,313	0,313
Complemento	-	0,104	0,104
Salinomicina 12%	-	0,052	0,052

*Corrector Arranque: Vitamina A, 10.000 UI/Kg; vitamina D3, 2.000 UI/Kg; vitamina E, 80 UI/kg; vitamina B1, 2 mg/kg; vitamina B2 8 mg/kg; vitamina B6, 4 mg/kg; vitamina B12 0,02 mg/kg; vitamina K; 2,25 mg/kg; ácido fólico, 1 mg/kg; ácido nicotínico, 40 mg/kg; ácido pantoténico 11,7 mg/kg; biotina, 0,1 mg/kg; cobre, 6 mg/kg; zinc 54 mg/kg; hierro, 40 mg/kg; manganeso, 77 mg/kg; cobalto, 0,2 mg/kg; selenio, 0,45 mg/kg; iodo, 2,25 mg/kg; BHT antioxidante, 125 mg/kg.
Corrector Crecimiento: Vitamina A, 8.000 UI/Kg; vitamina D3, 1.600 UI/Kg; vitamina E, 40 UI/kg; vitamina B1, 2 mg/kg; vitamina B2 5,6 mg/kg; vitamina B6, 4 mg/kg; vitamina B12 0,02 mg/kg; vitamina K; 2,25 mg/kg; ácido fólico, 1 mg/kg; ácido nicotínico, 40 mg/kg; ácido pantoténico 11,7 mg/kg; biotina, 0,1 mg/kg; cobre, 6 mg/kg; zinc 54 mg/kg; hierro, 40 mg/kg; manganeso, 77 mg/kg; cobalto, 0,2 mg/kg; selenio, 0,45 mg/kg; iodo, 2,25 mg/kg; BHT antioxidante, 125 mg/kg.

El pienso de iniciación, utilizado durante los nueve primeros días de vida de los pollos para los dos tratamientos, provenía de una fórmula comercial y era el mismo que consumían el resto de pollos de la granja.

Se elaboraron 80 kg de pienso de crecimiento para cada tratamiento. El único componente diferente entre las dos dietas fue el maíz. Los otros componentes, se pusieron en la misma proporción en cada una de las dietas para reducir al máximo cualquier confusión para el estudio.

4.3.2 Diseño experimental

El experimento consistió en la evaluación de dos piensos diferenciados por el tipo de maíz utilizado. Uno llevó maíz Ph3 enriquecido con carotenoides, y el otro, maíz M37W sin carotenoides. Se criaron 48 pollos machos de la estirpe Ross 308, 24 por tratamiento.

Los pollos fueron alojados en la granja recién nacidos, a los 6 días fueron escogidos al azar los 48 que participaron en el estudio y se realojaron en los corrales experimentales; entre los días 6 y 8 inclusive, se procedió al proceso de adaptación al nuevo alojamiento para iniciar el tratamiento a los 9 días de vida. Los corrales consistían en dos cercados de 2m² cada uno (2×1m), rodeados por rejas metálicas, y a una densidad de 12 pollos/m².



Fig. 23: Distribución de los tratamientos en el interior de la nave.

Para cumplir los objetivos, los pollos incluidos en el experimento estuvieron en el mismo ambiente físico y microbiológico que el resto del lote de la granja, bebieron la misma agua y recibieron los mismos cuidados y, si procedía, tratamientos medicamentosos. Las rejas metálicas y la identificación individual evitaron en todo momento la mezcla de los pollos experimentales con los del resto de la granja.

El experimento fue previamente aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Lleida.

4.3.3 Cría y condiciones ambientales

Las aves se alojaron en la explotación ganadera Albana (REGA ES250160032931) de Alguaire (Lleida). Al inicio del experimento entraron 25.775 pollos, procedentes de una incubadora comercial, que se distribuyeron por sexos entre las dos naves de la granja, el experimento se realizó en la nave de machos. En la primera semana de vida la densidad de los animales era de 30 pollitos/m² y se redujo a 14 pollos/m² posteriormente.

Para el control de la temperatura y humedad se utilizó un registrador de temperatura, (precisión 0,1 °C y error ±0,5 °C) y humedad, (precisión 0,1 % y error ±3%) (Testo174H, Alemania).

La temperatura de la nave era inicialmente de 32 ° C durante los primeros días de vida de los animales y se fue reduciendo gradualmente hasta 23°C. La calefacción era a partir de

aire caliente producido por una caldera de biomasa con combustión externa. El sistema permitió que la variación diaria de la temperatura fuera mínima.

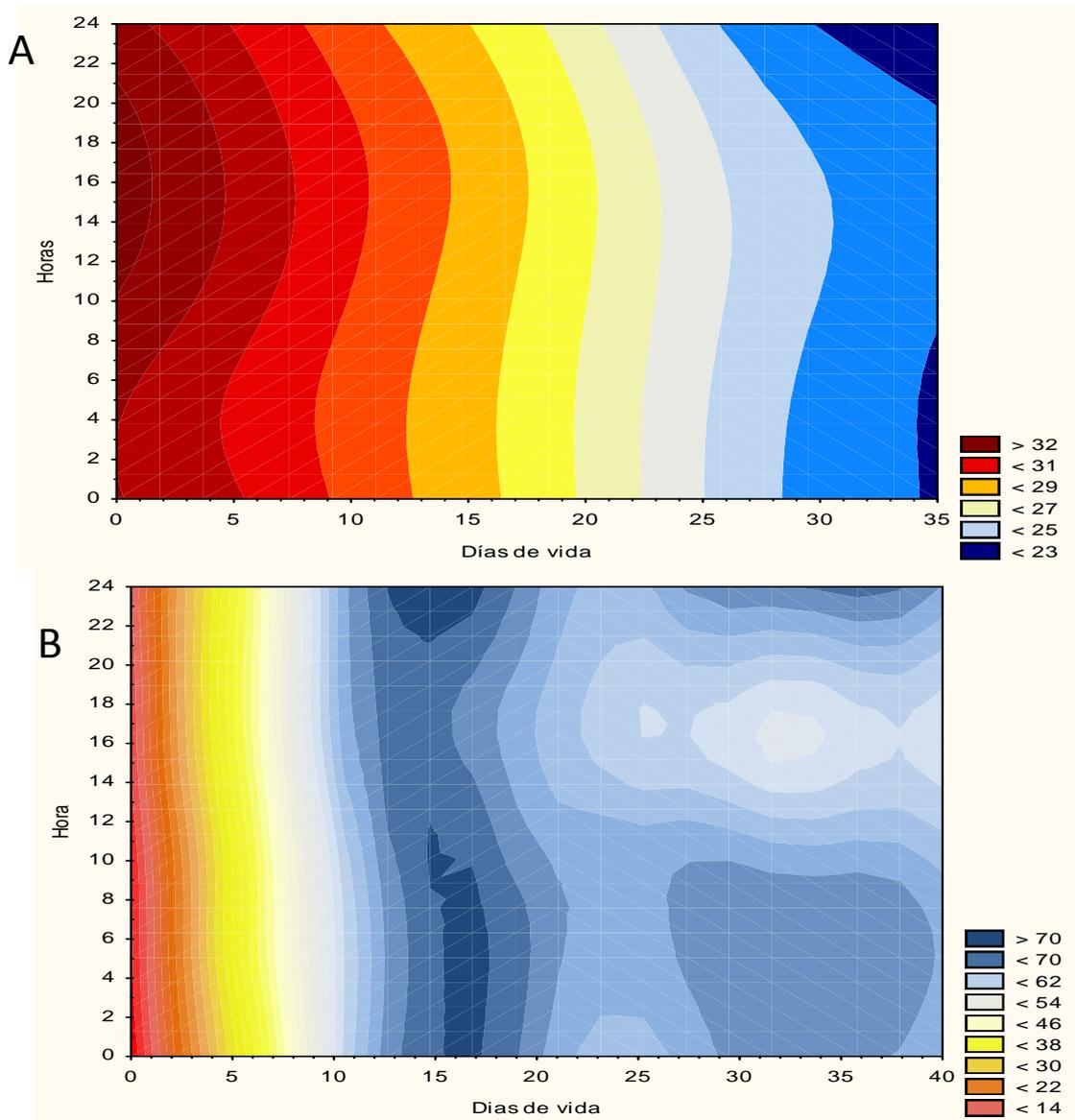


Fig. 24: **(A)** Variación de la temperatura (en rangos de 2 °C) a lo largo de todo el experimento en función de día y la hora. Los perfiles de temperatura han sido ponderados por el método de los mínimos cuadrados. **(B)** Variación de la humedad relativa (%) a lo largo del experimento en función del día y la hora. Los perfiles de humedad han sido ponderados por el método de los mínimos cuadrados.

Los valores de temperatura y humedad se mantuvieron según la guía (Aviagen 2010) excepto entre los días 14 y 21 en que los valores de humedad fueron superiores.

La ventilación de la granja era mixta, natural y forzada con ventiladores transversales cuando fue necesario.

La iluminación de la nave fue mixta, con ventanas y tubos fluorescentes de 18 W, con una intensidad instalada de 0,78 W/m². El programa de luz que se siguió en la primera semana

de vida fue 23 horas de luz que se redujeron para alcanzar 18 horas de luz y 6 horas seguidas de oscuridad hasta el final del engorde.

Los animales se vacunaron de bronquitis infecciosa (NOBILIS® IB MA5, MSD) mediante vacunación con spray el día 0 de vida y de enfermedad de Gumboro el día 18 con vacuna viva clonada (Hipragumboro CH/80, Hipra) suministrada vía oral en el agua de beber.

El pienso y el agua fueron suministrados ad libitum durante todo el ensayo. En los primeros días de vida de los animales, el sistema de alimentación utilizado fue de platos apoyado por bandejas y tiras de papeles, y durante el experimento fue manual con 2 tolvas por cada grupo. El pienso se retiró 6 horas antes del sacrificio. Los dos cercados fueron situados en el centro de la nave para poder aprovechar una de las líneas de tetinas de la granja para el suministro de agua a los animales.

Una vez al día los pollos eran observados para comprobar su correcto estado de salud así como su crecimiento.

El día 24 de vida de los animales se administró Amprolium (Coccivex®, SP Veterinaria SA) para reforzar el tratamiento preventivo de coccidiosis, en el que la dosis era de 125 mg/L de Amprolium en el agua de bebida durante 3 días.

El día 25 se administró enrofloxacin (Polistes®, Polichem, SL) para el tratamiento preventivo de problemas respiratorios, en el que la dosis diaria era de 10 mg de enrofloxacin por Kg de peso vivo en el agua de bebida durante 8 días.

En el momento de la carga de los animales para ser transportados al matadero se produjo una baja, a causa de una insuficiencia cardíaca aguda. El animal muerto se pesó y se siguió con él las mismas pautas que con los que se sacrificaron en el matadero.

Los animales fueron sacrificados con 35 días de vida, en el matadero comercial Mytidasa SL, (Riudoms), las canales y vísceras fueron recogidas para su estudio.

4.3.4 Recogida de datos

4.3.4.1 Datos de producción

Durante la fase de cría, se realizó un seguimiento de la cantidad de pienso suministrada a las tolvas cada vez que se rellenaban. También cada semana, a la misma hora, se realizaba un control de peso de todos los animales de cada tratamiento individualmente con una balanza (GRAM S3R España).

Tras el sacrificio de los animales en el matadero, se identificó cada canal, con las correspondientes vísceras extraídas, con un número para facilitar el análisis y toma de muestras en el laboratorio.

Las canales fueron pesadas en el laboratorio para calcular posteriormente su rendimiento.

4.3.4.2 Estudio colorimétrico

Cada tres días en la fase de engorde de los animales se controló el color de la piel en la zona lateral del tarso a cinco animales de cada tratamiento con el espectrofotómetro portátil CM-700D (Konica Minolta Sensing Inc. Osaka, Japan) con un diámetro de máscara

de 3 mm, el iluminante D65 y el ángulo de observación de 10 °. Los resultados obtenidos eran expresados a partir del sistema tricromático CIE Lab, luminosidad (L^*), eje verde-rojo (a^*) y eje azul-amarillo (b^*). Este modelo permite dimensionar totalmente el espectro visible para las personas. Los valores de L^* están comprendidos entre 0 (oscuridad total) y 100 (máxima luminosidad). En los valores (a^*) y (b^*) el rango es de 255 unidades expresadas desde -128 hasta +127 (Mcguire 1992).

Veinticuatro horas después del sacrificio de los animales, se midió el color de las regiones anatómicas como pata, piel y carne del muslo, y piel y carne de pechuga que son las regiones más representativas en la valoración del color por parte del consumidor.

4.3.4.3 Muestras biológicas

Una vez aturdidos y antes de sacrificar los animales, se extrajo sangre de la vena alar (formalmente, *Vena radialis* y *Vena ulnaris superficialis*) para el estudio bioquímico, hematológico y serológico en dos tubos de recogida de muestras por cada pollo. Las muestras de sangre para hematología fueron recogidas en tubos con EDTA y se enviaron inmediatamente al laboratorio de análisis. El resto de tubos, sin anticoagulante fueron centrifugados durante 10 minutos a 2.500 rpm para separar el suero del resto de componentes de la sangre. El suero de cada tubo se dividió en tres tubos ependorf para enviar a los laboratorios de bioquímica, química (carotenos) y serología. Las muestras para estudio bioquímico y hematológico fueron analizadas en un laboratorio independiente (Laboratorio Dr. F. Echevarne, Análisis, S.A., Barcelona), las muestras para serología, fueron analizadas en el Centro de Sanidad Avícola de Catalunya (CESAC).

El corazón, el hígado, el bazo y la bolsa de Fabricio se pesaron en el laboratorio con una balanza (KERN EW Alemania) para obtener la relación del peso de cada órgano (g) respecto al peso de cada pollo (kg).

4.3.4.4 Análisis de carotenoides

Para determinar la presencia y la cantidad de carotenoides, durante la necropsia, se tomaron muestras de músculo (músculo pectoral), de la piel de la zona de la pechuga, y la cresta. Las muestras fueron inmediatamente congeladas a -80 ° C para posteriormente ser liofilizadas.

El protocolo de determinación de carotenoides fue el mismo que ha quedado descrito en el Ensayo I y que puede consultarse en la página 27, (Análisis de carotenoides).

El análisis se realizó en el laboratorio de Biosíntesis Molecular, Universidad JW Goethe, Frankfurt, Alemania.

4.3.5 Análisis estadístico

Los datos de peso de los animales, peso de órganos, color, serología y bioquímica son expresadas en el apartado de resultados como media \pm error estándar. Todos los parámetros anteriormente mencionados fueron analizados para determinar las diferencias entre tratamientos mediante comparación de medias con t-Student, (JMP 11 SAS Institute, 2012).

Para la realización de las gráficas de control ambiental de la explotación durante la fase de engorde de los pollos, los perfiles de temperatura y humedad fueron ponderados por el método de los mínimos cuadrados.

En el estudio de las variables cualitativas, se ha empleado, tablas de contingencia y test χ^2 , las diferencias entre niveles se han determinado por comparación de proporciones de columna (prueba z).

Los datos expresados en porcentaje fueron transformados mediante una función arcsen para lograr una distribución normal (Snedecor y Cochran 1989). Y cuando fue necesario se normalizaron los valores con la función raíz cuadrada más 0,5 Para la significación de los resultados se ha considerado $P < 0,05$.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Dieta

La variante Ph3 tiene alto rendimiento en cuanto al contenido en β -caroteno licopeno, zeaxantina y luteína, sustancias valoradas tanto por el aporte vitamínico como por su efecto pigmentante.

Tabla 27: *Contenido (mg/g materia seca) de carotenoides del maíz M37W y la variante modificada Ph3.*

	M37W	Ph3
Fitoeno ($\mu\text{g/g}$)	0	9,40 \pm 2,42
Licopeno ($\mu\text{g/g}$)	0	26,69 \pm 10,65
γ -Carotenos ($\mu\text{g/g}$)	0,07 \pm 0,03	3,31 \pm 0,19
α -Carotenos ($\mu\text{g/g}$)	0,09 \pm 0,02	6,10 \pm 0,65
β -Carotenos ($\mu\text{g/g}$)	0,14 \pm 0,05	57,35 \pm 5,77
α -Criptoxantina ($\mu\text{g/g}$)	0	12,2 \pm 2,32
β -Criptoxantina ($\mu\text{g/g}$)	0	5,97 \pm 0,65
Luteína ($\mu\text{g/g}$)	0,53 \pm 0,14	9,76 \pm 1,32
Zeaxantina ($\mu\text{g/g}$)	0,27 \pm 0,08	25,36 \pm 3,42
Total carotenoides ($\mu\text{g/g}$)	1,1	156,14

(Zhu et al. 2008).

Los dos tipos de maíz fueron analizados en laboratorios independientes para determinar la composición nutricional (Covitsa, Lleida) y la detección y cuantificación de micotoxinas (Servicio Científico Técnico de Calidad Microbiológica en el Sector Agroalimentario, Universidad de Lleida).

Tabla 28: *Análisis nutricional y de micotoxinas del maíz.*

Componentes	M37W	Ph3
Proteína (%)	10,37	11,11
Fibra (%)	2,88	3,96
Grasa (%)	3,22	3,11
Cenizas (%)	1,49	1,42
Humedad (%)	11,22	11,31
Micotoxinas		
Zearalenona (ppb)	nd*	nd
Deoxynivalenol (ppb)	nd	nd
T-2 toxina (ppb)	6,43	4,26
Total fumonisinas (ppm)	1,45	2,72
Ochratoxina A (ppb)	1,81	1,93
Total aflatoxinas (ppb)	nd	nd
Aflatoxina B1 (ppb)	nd	nd

*nd: No detectado.

El valor nutricional de ambos tipos de maíz es similar y comparable al maíz de cultivo general, y al publicado por Nutrient Requirements of Poultry, (1994). La concentración de micotoxinas es muy baja, incluso inferior a la publicada por Brake et al. (2003) en un estudio similar y en algunos casos incluso no se ha podido detectar.

Tabla 29: *Análisis del pienso.*

	Inicio	Crecimiento	
		M37W	Ph3
Proteína (%)	23,63	23,22	23,34
Fibra (%)	5,96	4,46	4,19
Grasa (%)	8,57	9,23	9,76
Cenizas (%)	5,31	5,44	5,00
Humedad (%)	12,84	12,21	8,60
Carotenoides (µg/g)			
Violaxantina		0,13 ± 0,01	2,77 + 0,31***
Luteína		1,05 ± 0,03	3,69 + 0,47***
Zeaxantina		0,40 ± 0,01	10,85 + 1,18***
α-criptoxantina		-	3,47 + 0,47
β-criptoxantina		0,25 ± 0,01	3,15 + 0,37***
β-carotenos		0,07 ± 0,01	3,02 + 0,31***
Total carotenoides		1,9	26,95

(n=5), ***en la misma fila indica diferencias significativas (P<0,001).

4.4.2 Crecimiento

No hubo diferencias significativas entre las medias de peso de los dos tratamientos durante el periodo de cría (8, 18, 21, 28, 35 días), (P>0,05).

Tabla 30. *Efecto de la dieta Ph3 en el peso vivo(g) los días 8, 18, 21,28 y 35 de vida*

Días	M37W	Ph3
8	169,62±3,644	160,33±3,866
18	608,62±16,969	602,12±15,448
21	854,70±20,695	833,50±17,184
28	1.346,79±30,045	1.298,12±23,239
35	1.720,20±42,223	1.661,95±27,780

Los valores corresponden a las medias y el error estándar (n=48). No se encontraron diferencias significativas para las medias de peso entre los tratamientos

Los índices de conversión fueron IC_{M37W}=1,47 e IC_{Ph3}=1,41, estos índices fueron similares entre ambas dietas y para obtenerlo se tuvo en cuenta el pienso consumido total y el peso final a los 35 días.

La Ganancia Media Diaria (GMD) de los dos grupos calculada a partir del peso del día 9 de vida y el peso final de los pollos, fue GMD_{M37W}=59,64 g/día y GMD_{Ph3} =57,75 g/día. Este valor zootécnico, fue un 3% superior en los pollos que han comido la dieta M37W y podría haberse debido a una menor ingesta de pienso en los pollos del tratamiento Ph3.

En el primer estudio (pag.32) el crecimiento para los tratamientos M37W y Ph3 fue, 300 y 386 g superior para los mismos días de vida que en el estudio realizado en la granja; el consumo de pienso entre los días 9 y 35 también fue inferior en 565 g (M37W) y 607 g (Ph3) en el estudio realizado en granja.

La diferencia de pesos entre los ensayos I (pag.32) y II se explica por el menor consumo de pienso en el segundo, además del impacto negativo de la densidad en el peso de los pollos (Heckert et al. 2002).

4.4.3 Colorimetría

4.4.3.1 Evolución del color durante el crecimiento

Durante el crecimiento, el color de la piel de los pollos se midió desde el inicio y periódicamente hasta la finalización de la de la prueba, esto se hizo en la zona lateral del tarso siempre por la misma persona con el colorímetro CM-700D (Konica Minolta Sensing Inc. Osaka, Japan). El color de la piel en los pollos de igual edad y dieta, presenta variaciones dependientes de sexo, línea genética y también del lugar de la piel donde se hace la medición (Sirri et al. 2010), en el ensayo se trabajó con machos Ross 308 de la misma edad y con una máscara de 3mm necesaria para medir en el color en la caña de pollos muy jóvenes.



Fig. 25: *Control de color.*

Los pollos que comieron la dieta Ph3, presentan una línea de valores medios de L* inferior a la de los pollos que comieron la dieta M37W, aunque estas diferencias solo son significativas los días 19, 22, 29 y 31, al aumentar el color o grado de saturación, la luminosidad tiende a disminuir.

Los valores de a* (rojos), son más elevados en los pollos que han comido la dieta Ph3, esto avala la hipótesis de que los carotenoides del maíz modificado genéticamente son liberados y depositados posteriormente en la piel de los pollos. El nivel de significación $P < 0,05$, se alcanza ya a los 5 días del tratamiento con la dieta Ph3 y

se mantiene con un alto grado de significación, $P < 0,001$ durante la mayor parte del experimento. Las xantofilas aportadas en la dieta y depositadas en la epidermis, son las responsables de estos cambios de color (Petracci y Fletcher 2002).

En la gama del color amarillo (b*), los pollos alimentados con el maíz Ph3 tienen valores de coloración significativamente más elevados que los alimentados con el maíz M37W durante toda la etapa de crecimiento. Las diferencias son significativas a partir del 14 día de vida (5 de tratamiento) y se mantienen hasta el final del ensayo.

Entre los días 26 y 31 hay un descenso de la coloración amarillenta (b*) en los dos tratamientos no vinculada a la alimentación. El día 25 de vida, se inició un tratamiento con enrofloxacina que duró 6 días, se establece la hipótesis de que exista alguna interacción,

modificando la absorción y/o la metabolización de los carotenoides, pero debería ser confirmada con estudios específicos.

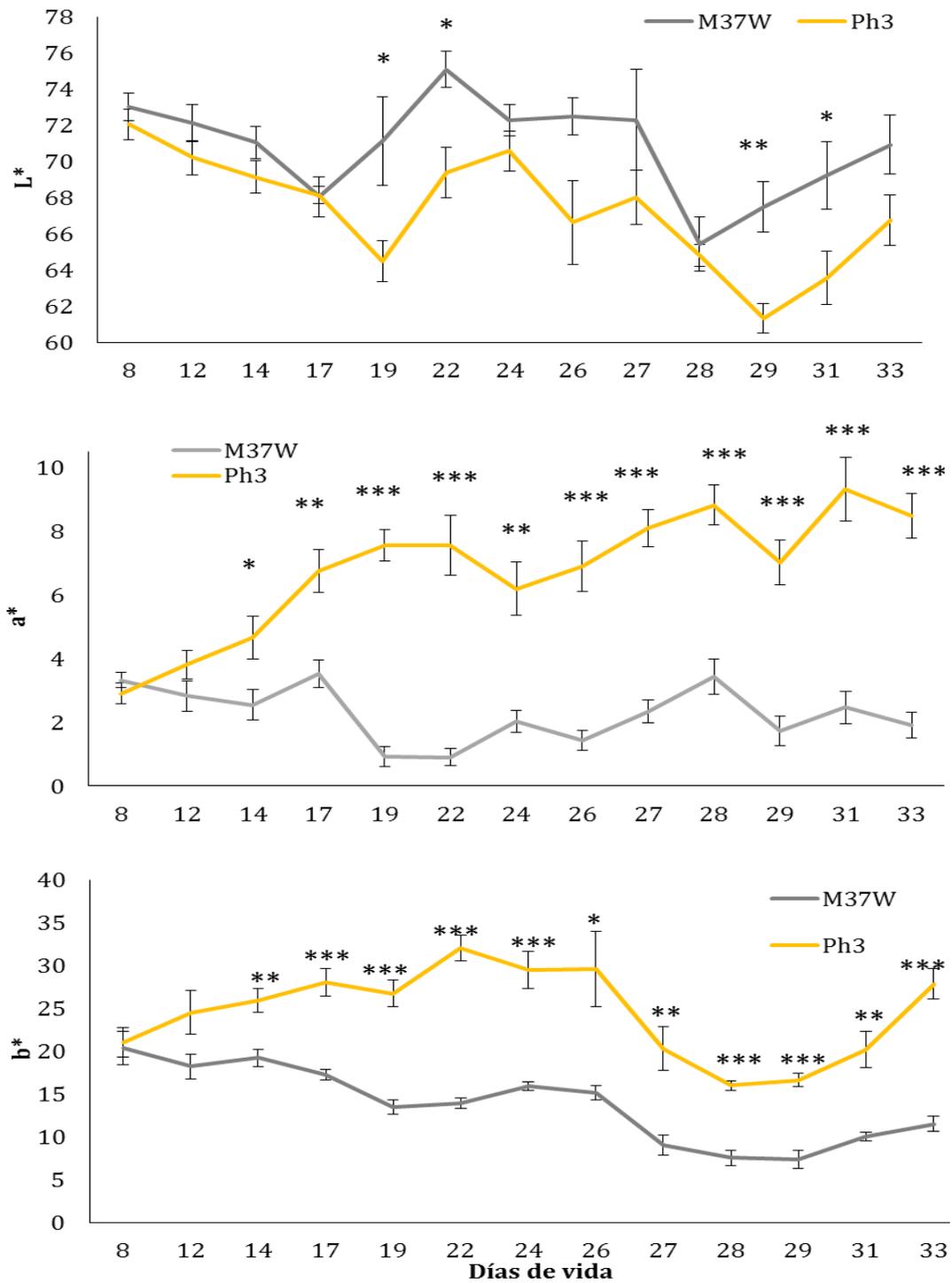


Fig. 26: Efecto del consumo de la dieta Ph3 en luminosidad (L^*) rojos (a^*) y amarillos (b^*) durante el ensayo, $n=5$, * $P<0,05$ ** $P<0,01$ *** $P<0,001$ entre tratamientos para el mismo día.

4.4.3.2 Color de la canal

Se midió el color 24 horas después de del sacrificio en diferentes regiones de la piel y el músculo.

Taula 31: Efecto del consumo de la dieta Ph3 en el color medio de las diferentes regiones anatómicas 24 horas post mortem.

Tejido: Región		M37W	Ph3	P
Piel caña: <i>Tarso lateral</i>	L*	76,32±0,530	71,89±0,780***	<0,0001***
	a*	-1,06±0,149	7,37±0,380***	<0,0001***
	b*	10,68±0,489	34,09±0,899***	<0,0001***
Piel pechuga: <i>Apteridio del tronco lateral</i>	L*	62,57±0,648	59,16±0,480***	0,0001***
	a*	-1,04±0,126	0,59±0,128***	<0,0001***
	b*	0,39±0,460	7,15±0,536***	<0,0001***
Piel muslo : <i>Petiridio femoralis</i>	L*	70,84±0,399	69,31±0,510*	0,0240*
	a*	-0,17±0,107	2,65±0,200***	<0,0001***
	b*	4,43±0,319	14,45±0,516***	<0,0001***
Músculo: <i>Pectoralis major</i>	L*	48,79±0,730	47,09±0,380*	0,0001***
	a*	-0,26±0,060	1,31±0,088***	<0,0001***
	b*	-2,46±0,202	0,73±0,260***	<0,0001***
Músculo: <i>Iliotibial</i>	L*	43,51±3,990	47,04±0,350	0,3736
	a*	0,28±0,090	2,37±0,179***	<0,0001***
	b*	-1,75±0,248	2,59±0,407***	<0,0001***

(M37W n = 23, Ph3 n = 24). Los valores corresponden a las medias y el error estándar. En la misma fila * P<0,05 y *** P<0,001 indican diferencias significativas

¹ L * = Luminosidad; a * = rojo; b * = amarillo.

El valor de luminosidad (L*) en las diferentes regiones anatómicas es significativamente diferente entre los dos tratamientos, excepto en el músculo iliotibial. Se observó que el valor (L*) en los pollos que consumieron la dieta con el maíz M37W es siempre superior al de los que consumieron el maíz Ph3, excluyendo el muslo que es a la inversa; por ello se puede afirmar que colores más bajos de L * indican colores más oscuros. El valor L* en la piel tiende a aumentar durante las primeras horas posteriores al sacrificio (Petracci y Fletcher 2002), en el ensayo ocurrió así para ambos tratamientos.

Las gamas de color rojo (a*) y amarillo (b*) son significativamente diferentes entre los dos tratamientos siendo siempre el tratamiento Ph3 el que presenta valores de coloración mayores. Por tanto, se confirma que una parte de los carotenoides aportados en la dieta no son degradados a apocarotenos y que se acumulan en los tejidos corporales, siendo más visibles en los tejidos periféricos.

La región anatómica con el valor máximo a^* para el tratamiento con el maíz Ph3 es la piel del *tarso lateral*, siendo este de $7,37 \pm 0,380$, valor superior al publicado por Castañeda et al. (2005) donde se observa que $a^*=1,65$ después del sacrificio a la edad de 49 días, con una dieta de crecimiento y acabado similar a las dietas comerciales para pollo amarillo que contenía pigmentos amarillos y rojos de origen natural a concentraciones de 85 ppm de pigmento amarillos y 3 ppm de pigmentos rojos.

En la gama de color amarillo (b^*), la piel del *tarso lateral* también alcanza el máximo valor que es de $34,09 \pm 0,899$ con el maíz Ph3, siendo también muy superior al encontrado por Castañeda et al. (2005) en el mismo experimento, en el que llega a valores $b^*=15,75$.

4.4.4 Cuantificación de carotenoides

Para detectar y cuantificar los carotenoides, durante la necropsia, se tomaron muestras de músculo y piel del pecho, y la cresta. La concentración de carotenoides depositados en estos tejidos y suero fueron analizados por HPLC en el laboratorio de Biosíntesis Molecular, Universidad JW Goethe, Frankfurt, Alemania.

4.4.4.1 Cresta

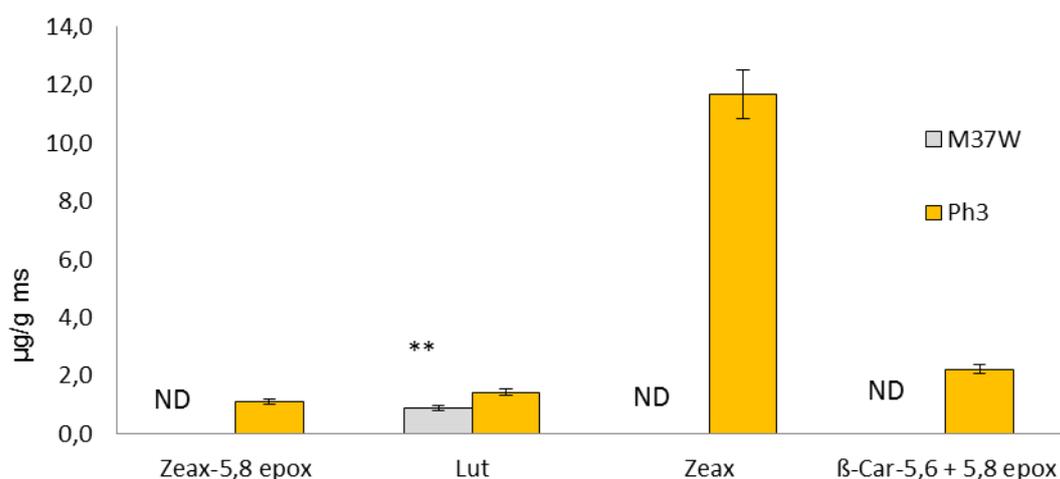


Fig. 27: Efecto del consumo de la dieta Ph3 en la concentración de carotenoides en la cresta. Los valores expresan la concentración media y el error estándar en μg de carotenoides por g de materia seca (ms); ($n = 5$); ** $P < 0,01$. Zeax-5, 8 epox, zeaxantina 5,8 epóxido; Lut, luteína; Zeax, zeaxantina; β -Car-5, 6+5,8-epoxi, β -caroteno-5.6 epóxido + β -caroteno-5.8 epóxido. nd: no detectado.

Los pollos alimentados con la dieta Ph3 presentaron una concentración total de carotenoides en la cresta de $16,43 \mu\text{g/g ms}$, en el tratamiento M37W era de $0,89 \mu\text{g/g ms}$. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre los dos tratamientos en la luteína, que fue el único carotenoide detectado en el tratamiento M37W ($0,89 \pm 0,22 \mu\text{g/g ms}$), siendo la concentración $1,43 \pm 0,23 \mu\text{g/g ms}$ en la dieta Ph3.

En los pollos que han comido la dieta Ph3 destaca la elevada concentración de zeaxantina, $11,67 \pm 0,849 \mu\text{g/g ms}$ y su metabolización en tejido periférico a zeaxantina-5-8 epóxido $1,10 \pm 0,080 \mu\text{g/g ms}$; también se ha producido metabolización de los β -carotenos a

epóxidos 5,6 y 5,8 de β -caroteno, $2,23 \pm 0,161$ $\mu\text{g/g ms}$. Un hecho similar ha quedado descrito en el ensayo I (pág. 53).

4.4.4.2 Pechuga: músculo y piel.

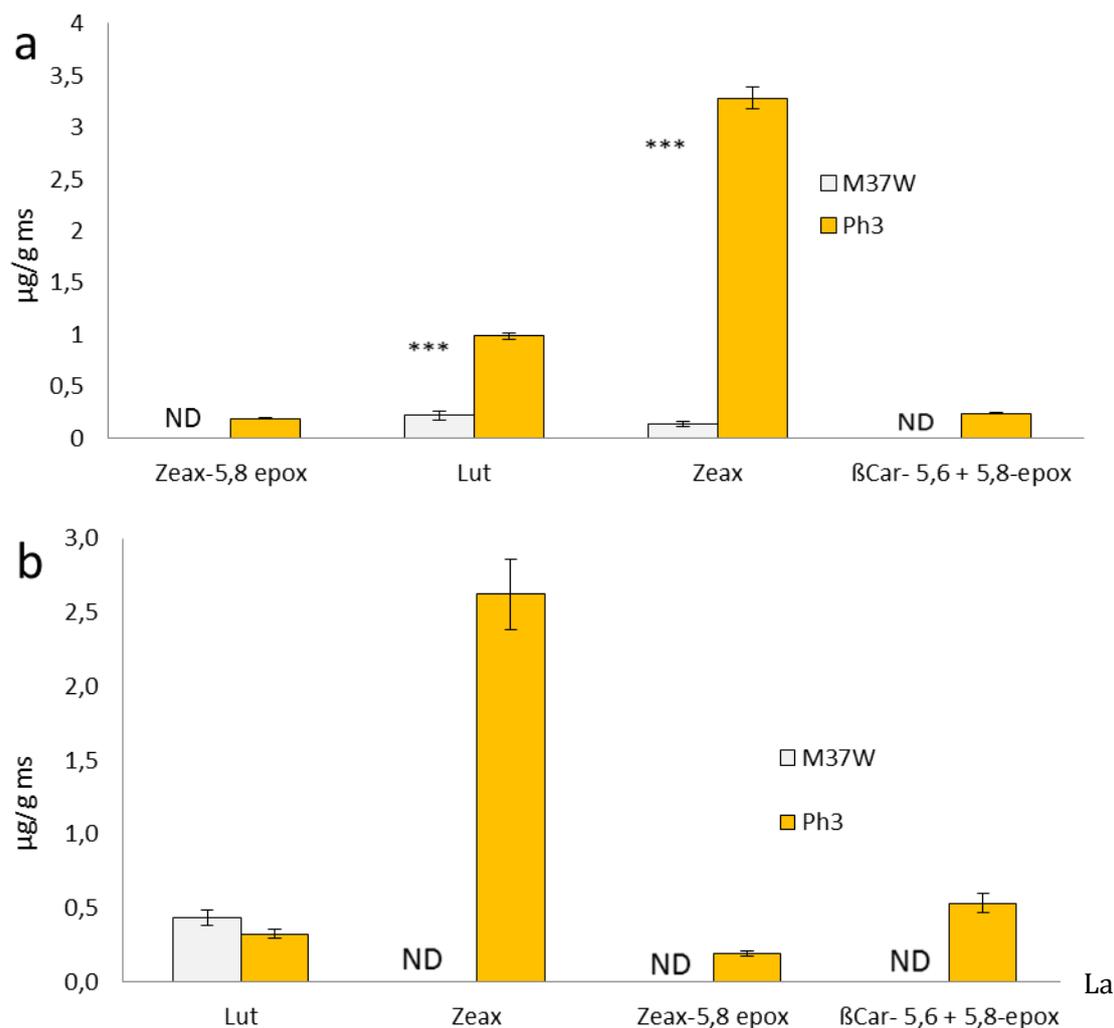


Fig. 28: Efecto del consumo de la dieta Ph3 en la concentración de carotenoides en **(a)** Musculo pectoralis mayor y **(b)** Piel de pechuga. Los valores expresan la concentración media y el error estándar en μg de carotenoides por g de materia seca (ms); (n=5); *** $P < 0,001$. Zeax-5, 8 epox, zeaxantina 5,8 epóxido; Lut, luteína; Zeax, zeaxantina; β -Car-5, 6 +5,8-epoxi, β -caroteno -5,6 +5,8 epóxido.

La concentración total de carotenoides en el *pectoralis mayor* del tratamiento Ph3 es de $4,7$ mg/g ms y en el tratamiento M37W es de $0,36$ $\mu\text{g/g ms}$. Tanto luteína como zeaxantina presentan diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los dos tratamientos en el *pectoralis mayor*. En el tratamiento Ph3, destaca la similitud en la concentración de carotenoides en músculo de pechuga entre el presente estudio y el del ensayo I (Fig. 15-a), aunque en este estudio realizado en granja, hay presencia de epóxidos de β -caroteno y zeaxantina, que estaban ausentes en el anterior ensayo.

La concentración total de carotenoides es de $3,66$ $\mu\text{g/g ms}$ en la piel de la pechuga en los pollos alimentados con el maíz Ph3 y de $0,43$ $\mu\text{g/g ms}$ en los pollos alimentados con maíz

M37W. En la piel de los pollos que comieron la dieta Ph3 se encontraron cantidades importantes de zeaxantina ($2,62 \pm 0,237 \mu\text{g/g ms}$) y de epóxidos procedentes de su metabolización (*zeaxantina 5,8 epóxido*, $0,19 \pm 0,017 \mu\text{g/g ms}$) y epóxidos derivados del metabolismo de los β -carotenos (*β -caroteno-5, 6 epóxido* y *β -caroteno-5,8 epóxido*, $0,53 \pm 0,062 \mu\text{g/g ms}$); estas sustancias no fueron encontradas en los pollos del grupo control e indican que ha existido esta metabolización.

4.4.4.3 Suero

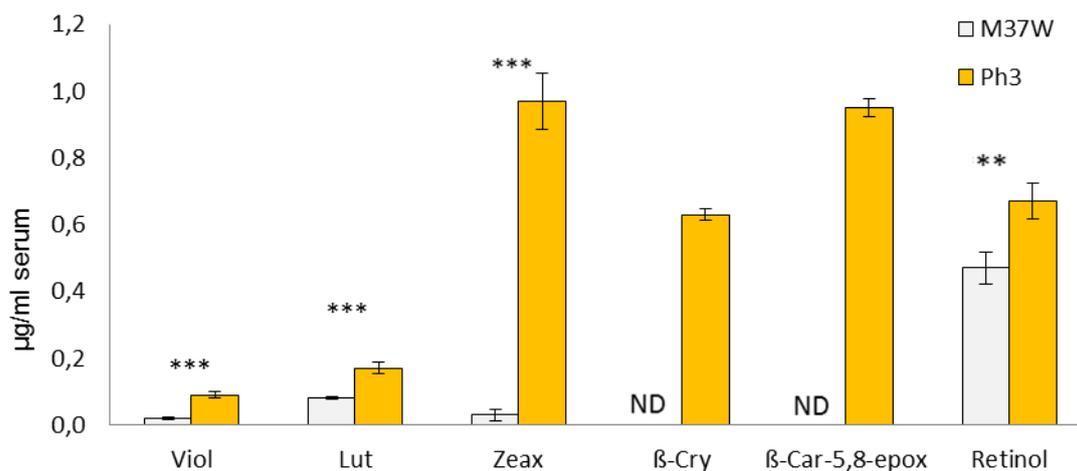


Fig. 29: Efecto del consumo de la dieta Ph3 en la concentración de carotenoides en suero. Los valores expresan la concentración media y el error estándar en μg de carotenoides por ml de suero; ($n=5$); ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Viol, Violaxantina; Lut, luteína; Zeax, zeaxantina; β -Cry, β -criptoxantina; β -Car-5, 6 +5,8-epoxi, β -caroteno -5,6 +5,8 epóxido; nd no detectado.

Los pollos que han consumido la dieta con el maíz Ph3 presentan una concentración total de carotenoides en suero de $3,48 \mu\text{g/ml}$ respecto a los $0,6 \mu\text{g/ml}$ que presentan los pollos del tratamiento control. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en violaxantina ($P < 0,001$), luteína ($P < 0,001$), zeaxantina ($P < 0,001$) y retinol ($P < 0,01$). La zeaxantina fue el carotenoide con una concentración más elevada en el suero de los pollos que consumieron la dieta con el maíz transgénico ($0,97 \pm 0,085 \mu\text{g/ml}$).

La concentración y composición del perfil carotenoides del suero es muy similar al de los pollos criados en condiciones experimentales (Pag.49) con la salvedad de que en el experimento en granja, aparece β -criptoxantina $0,63 \pm 0,012 \mu\text{g/ml}$.

4.4.4.4 Concentración total

En los pollos que han comido la dieta Ph3, la concentración más elevada de carotenoides está en la cresta, donde destaca la zeaxantina (Fig. 27). Comparando la cresta con los otros dos tejidos analizados se puede afirmar que en ella hay una importante acumulación de carotenoides.

La concentración para la cresta, músculo y piel de pechuga es equivalente a la encontrada en el estudio previo, (Pág.55, Fig. 21).

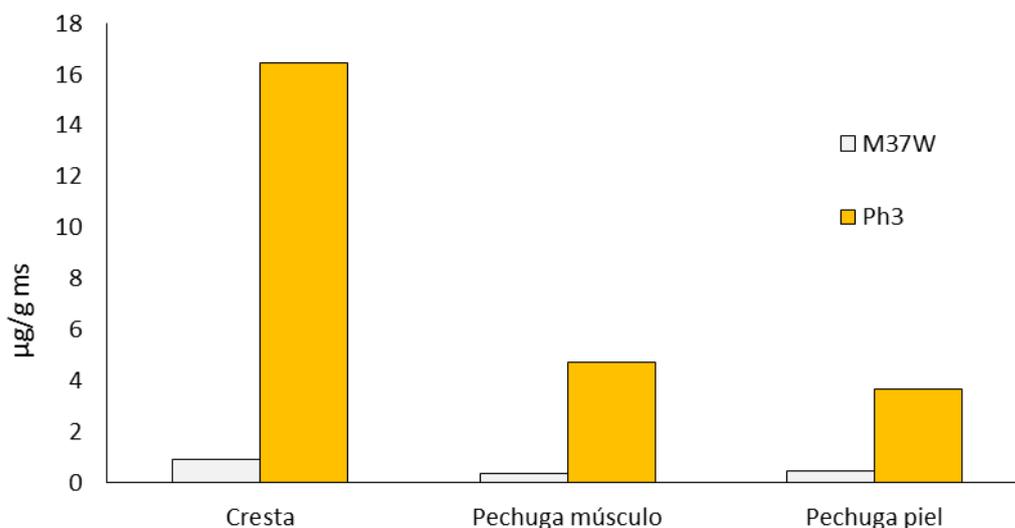


Fig. 30: Efecto de la dieta Ph3 en la concentración total de carotenoides en los tejidos estudiados. Los valores obtenidos se obtienen como la suma de los distintos carotenoides y sus metabolitos directamente encontrados en cada tejido para cada estudio en μg de carotenoides por g de materia seca (ms); ($n = 5$).

El pienso que contiene maíz Ph3 ha liberado carotenoides en los tejidos y fluidos de los pollos de forma significativa en relación al pienso que contiene maíz M37W carente de carotenoides

4.4.5 Rendimiento de la canal

Las canales obtenidas en el matadero fueron desplumadas, evisceradas, pero conservando cabeza y patas. Según la clasificación de los tipos de canales de pollo del RD 2087/1994, las canales obtenidas en este experimento son muy parecidas a las de los pollos tipo 65%, excepto por la presencia de cabeza y las patas, lo que hace incrementar el rendimiento en un 10%.

Para calcular el rendimiento de la canal, se partió del cociente entre el peso de la canal, obtenido después del sacrificio de cada pollo, y el peso vivo a los 35 días antes del sacrificio.

Tanto en el rendimiento de la canal como en el peso de la canal y el peso vivo final no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos ($P > 0,05$). Los valores más elevados en peso vivo final y peso de la canal se presentan en el tratamiento M37W. El mayor rendimiento de la canal es obtenido por el tratamiento Ph3.

Tabla 32: Efecto del consumo de la dieta Ph3 en el rendimiento de la canal. Los valores corresponden a las medias y el error estándar ($n = 24$).

	M37W	Ph3
Rendimiento canal (%)	75,97±0,571	76,30±0,555
Peso canal (g)	1.305,33±31,211	1.267,33±21,431
Peso vivo (35 días)(g)	1.720,20±42,223	1.661,95±27,780



Fig. 31: Visceras extraídas en el matadero

Fig. 32: Canales de los pollos

4.4.6 Peso de órganos

Se extrajeron enteros, hígado, bolsa de Fabricio, bazo y corazón para ser pesados y posteriormente obtener el peso relativo del órgano.

Los animales alimentados con el pienso que contenía el maíz Ph3 no mostraron diferencias en los índices (g/kgpv) en los órganos extraídos en comparación con los pollos alimentados con el pienso que contenía el maíz de blanco control ($P>0,05$).

Tabla 33: Efecto del tratamiento pH-3 en el peso relativo (g/kgpv) de los órganos;

Órgano	M37W	Ph3
Hígado (g/kgpv)	25,43±1,009 (n=16)	24,93±0,896 (n=17)
Bolsa de Fabricio (g/kgpv)	1,87±0,208 (n=10)	1,65±0,119 (n=13)
Bazo (g/kgpv)	1,59±0,097 (n=17)	1,56±0,123 (n=17)
Corazón (g/kgpv)	6,86±0,097 (n=16)	7,20±0,123 (n=17)

Valores medios y el error estándar.

Los pesos relativos de la bolsa de Fabricio ($0,96±0,08$ g/kgpv) y del bazo ($1,23±0,11$ g/kgpv) encontrados en el grupo control del experimento realizado por Puvadolpirod y Thaxton (2000) utilizando pollos Peterson x Arbor Acres son inferiores a los encontrados en el tratamiento Ph3, donde el peso relativo de la bolsa de Fabricio es de $1,65±0,119$ g/kgpv y el del bazo es $1,56±0,123$ g/kgpv. En cambio, el peso relativo del hígado es superior ($27,40±1,56$ g/kgpv) al del tratamiento Ph3 ($24,93±0,896$ g/kgpv).

4.4.7 Bioquímica

Antes de sacrificar los animales y una vez aturcidos, se extrajo sangre de la vena alar de 9 pollos de cada tratamiento para realizar el estudio bioquímico en un laboratorio independiente (Laboratorio Dr. F. Echevarne, Análisis, S.A., Barcelona).

No se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos con respecto a las variables bioquímicas ($P > 0,05$) excepto en el caso del sodio ($P = 0,039$). Comparando los valores del sodio tanto de la dieta control como de la dieta con el maíz transgénico ($152,88 \pm 0,538$ mEq/L y $151,00 \pm 0,645$ mEq/L respectivamente) con los resultados publicados por Silva et al. (2007) con pollos de estirpe Hybro-PG con 35 días de edad ($150,1 \pm 16,42$ mEq/L) se observa que las diferencias en el ensayo no son relevantes.

Los valores de glucosa en los pollos que consumieron la dieta con maíz Ph3 y la dieta con maíz M37W ($239,88 \pm 4,321$ mg/dl y $233,44 \pm 5,582$ mg/dl respectivamente) son inferiores al encontrado al encontrado por Bowes et al. (1989), $15,1 \pm 1,3$ mmol/L que equivale a $272,04$ mg/dl con pollos Hubbard de 42 días de edad y también por Abdi-hachesoo et al. (2011), $260,50 \pm 18,71$ mg/dl con pollos de estirpe Ross 308 con 18 semanas de vida, La disminución de los valores de glucosa puede estar relacionada con un fallo hepático, neoplasia o septicemia (Harrison y Lightfoot 2006). Aunque la hipótesis más probable para estas diferencias con los valores referenciados en la bibliografía, está en el tiempo transcurrido desde la última ingesta (período de ayuno más el transporte al matadero) y el momento de la toma de muestras de sangre.

Una disminución de los niveles de albúmina en el plasma puede estar relacionado con afecciones de diferentes órganos y/o tejidos como el hígado, riñón, intestino, piel, sangre, etc. (Harrison y Lightfoot 2006). Los valores obtenidos de albúmina en el tratamiento Ph3 ($10,55 \pm 0,293$ g/L) y en el tratamiento control ($10,85 \pm 0,508$ g/L) son inferiores a los encontrados por Bowes et al. (1989) $13,7 \pm 1,4$ g/L, Silva et al. (2007) $1,75 \pm 0,33$ g/dl, Abdi-hachesoo et al. (2011) $2,43 \pm 0,42$ g/dl o Sasipriya y Siddhuraju (2013) $1,3$ g/dl. No se encontraron afectaciones en ningún órgano.

Los resultados de Silva et al. (2007) para GPT transaminasa, LDH y GGT ($3,853 \pm 1,969$ UI/L, $2,028 \pm 625$ UI/L y $37,32 \pm 8,8$ UI/L respectivamente) son superiores a los obtenidos en los pollos que consumieron el maíz M37W ($3,22 \pm 0,22$ UI/L, $1,903 \pm 514,836$ UI/L y $20 \pm 1,000$ UI/L respectivamente) o el maíz Ph3 ($2,88 \pm 0,66$ UI/L, $1875,89 \pm 889,04$ UI/L y $17,44 \pm 3,908$ UI/L respectivamente).

En la enzima GOT transaminasa, los valores obtenidos tanto en los pollos que consumieron el maíz transgénico ($242,55 \pm 22,13$ UI/L) como los que consumieron la variante salvaje ($268,77 \pm 11,198$ UI/ml) son superiores al publicado por Silva et al. (2007) $228,95 \pm 49,66$ UI/L. La actividad de esta última variable es considerada actualmente como un indicador muy sensible pero no específico de enfermedad hepatocelular (Harrison y Lightfoot 2006).

Tabla 34: *Bioquímica sanguínea.*

	M37W	Ph3
Glucosa (mg/dl)	233,44±5,582	239,88±4,321
Proteínas (g/L)	29,14±0,828	29,22±0,618
Albumina (g/L)	10,85±0,508	10,55±0,293
Globulinas (g/L)	18,28±0,521	18,66±0,440
GPT transaminasa (UI/L)	3,22±0,222	2,88±0,200
GOT transaminasa (UI/L)	268,77±11,198	242,55±7,376
LDH (UI/L)	1875,89±299,668	1903,00±514,836
GGT (UI/ L)	20,00±1,000	17,44±1,302
FAL (UI/ L)	7.107,71±1707,130	9647,22±1813,740
Bilirrubina (mg/dl)	0,10±0,009	0,11±0,0119
Creatinina (mg/dl)	0,24±0,007	0,22±0,010
Ácido úrico (mg/dl)	8,30±0,859	7,35±1,025
Calcio (mg/L)	111,11±1,513	107,88±1,888
Fósforo (mg/dl)	6,51±0,198	6,34±0,1864
Potasio (mEq/L)	7,23±0,190	7,47±0,156
Sodio (mEq/L)	152,88±0,538	151,00±0,645*

(n = 9)* $P < 0,05$. Los valores corresponden a las medias y el error estándar.

GPT transaminasa, transaminasa glutamicopirúvica; GOT transaminasa, transaminasa glutamicooxalacética; LDH, lactato deshidrogenasa; GGT, glutamil transpeptidasa; FAL, fosfatasa alcalina.

Las variables bioquímicas que pueden dar información sobre el funcionamiento renal son: proteínas, ácido úrico, creatinina y electrolitos (potasio y sodio). Los niveles de proteína en los pollos que consumieron la dieta control y los que consumieron la dieta con el maíz Ph3 (29,14±0,828 g/L y 29,22 ± 0,618 g/L respectivamente) son algo inferiores que el encontrado por Bowes et al. (1989) 32,6±2,3g/L y a los encontrados por Abdi-hachesoo et al. (2011) 3,53±0,42 g/dl. Aunque este no sea el caso, la hipoproteinemia se asocia a una insuficiencia renal debida a una nefrosis tubular avanzada y nefritis intersticial en pollos (Harrison y Lightfoot 2006).

El ácido úrico dio un valor de 7,35±1,025 mg/dl en el grupo tratamiento (Ph3) y 8,30±0,859 mg/dl en el grupo control. Estos valores son superiores al obtenido por Bowes et al. (1989) 380±77 μ mol/L, que equivale a 6,46 mg/dl y también al valor obtenido por Silva et al. (2007) 5,3±1,14 mg/dl.

Altos niveles de ácido úrico se han correlacionado histológicamente con enfermedades renales graves en pollos. Algo similar pasa con los electrolitos en el plasma, ya que el riñón de las aves participa de forma activa en la regulación de los electrolitos es razonable suponer que los trastornos de electrolitos están asociados a enfermedades renales (Harrison y Lightfoot 2006).

Tabla 35 Efecto de la dieta con el maíz Ph3 en el colesterol total, LDL y HDL.

	M37W	Ph3
Colesterol (mg/dl)	110,88±3,142	106,55±4,116
LDL (mg/dl)	42,77±1,512	41,32±2,608
HDL(mg/dl)	72,66±3,064	67,11±3,011

Los valores corresponden a las medias y el error estándar (n = 9).

LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad.

No existen diferencias significativas entre los tratamientos ni en el colesterol total ni en el tipo, LDL o HDL (P>0,05).

Los valores de colesterol son muy similares entre ambos tratamientos y claramente inferiores a los obtenidos en un estudio previo (Pág. 46) con las mismas dietas y con la misma estirpe de pollos 153,81±5,106 y 163,96±4,565 mg/dl, para M37W y Ph3 respectivamente.

4.4.8 Hematología

Los resultados hematológicos fueron obtenidos en un laboratorio independiente (Laboratorio Dr. F. Echevarne, Análisis, S.A., Barcelona) de 7 muestras de sangre de cada tratamiento.

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ni en el resultado del hemograma ni en la fórmula leucocitaria (P>0,05).

La relación linfocitos/heterófilos fue menor en este ensayo que en el realizado en el centro de experimentación animal.

Tabla 36: Hemograma, efecto de la dieta.

	M37W	Ph3	P
Hematocrito %	30,71±4,17	29,43±1,11	0,771
Hemoglobina (g/dl)	10,40±0,54	10,91±0,36	0,445
Leucocitos (n/μl)	24.228,57±8.500,926	15.771,43±1.233,996	0,344
Eosinófilos (n/μl)	313,14±103,153	686,86±166,391	0,080
Basófilos (n/μl)	1.102,86±277,739	899,43±253,845	0,599
Linfocitos (n/μl)	9.509,14±2.750,815	6.764,57±545,827	0,347
Monocitos (n/μl)	405,14±148,010	288,00±114,263	0,543
Heterófilos (n/μl)	12.898,29±5.834,847	7.132,57±615,958	0,345
Linfocitos/heterófilos	0,981±0,168	0,965±0,069	0,930

(n=7). Los resultados representan la media con el error estándar.

El recuento de leucocitos es menor en el tratamiento Ph3, en concordancia con los resultados del ensayo I (Pag.46), aunque estas diferencias no son significativas.

Los basófilos participan en la reacción inflamatoria aguda, especialmente cuando es de origen no infeccioso, el número de basófilos hallados en ambos grupos están dentro de los parámetros de normalidad publicados en la revisión de Maxwell y Robertson (1995).

No se ha detectado eosinofilia en ninguno de los tratamientos ni alteraciones en las forma de estas células, los eosinófilos pueden actuar como moduladores tempranos de la inflamación en las respuestas de hipersensibilidad tardía en la gallina. (Maxwell 1987).

Los heterófilos de las aves, son similares a los neutrófilos en los mamíferos, difieren en que la actividad antimicrobiana depende de mecanismos no oxidativos, son determinantes en infecciones bacterianas y fúngicas (Bennoune et al. 2009). En el ensayo no hay diferencias significativas entre las dos dietas, igual que en el ensayo I, el número de heterófilos es mayor en los pollos que han comido la dieta M37W.

El número de heterófilos aumenta como respuesta a estrés moderado y crónico, sin embargo es posible ver reacciones de heteropenia en casos de estrés agudo (Maxwell 1993). La ratio linfocitos/heterófilos puede verse afectada por el estrés. En las gallinas, la participación de los heterófilos en la fórmula leucocitaria, disminuye fisiológicamente desde el 50% en animales jóvenes hasta el 20-25% en animales adultos (Maxwell y Robertson 1998).

No existen diferencias significativas entre las dietas M37W y Ph3 para ningún componente de la fórmula leucocitaria ($P > 0,05$).

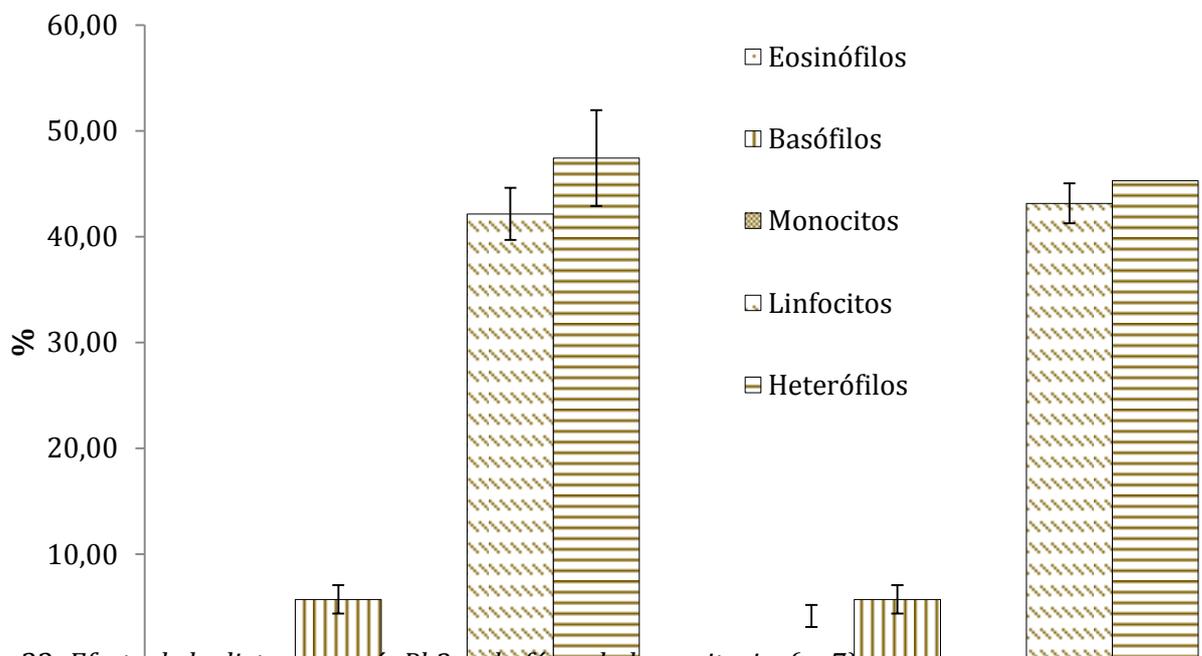


Fig. 33: Efecto de la dieta con maíz Ph3 en la fórmula leucocitaria (n=7).

4.4.9 Histología

El estudio histopatológico de pulmón, hígado, bolsa de Fabricio, bazo y tonsilas cecales, no presenta diferencias relevantes entre los tratamientos ($P > 0,05$).

Tabla 37: *Efecto de la dieta en la intensidad de las lesiones observadas en muestras de pulmón.*

Lesión		M37W nº (%)	Ph3 nº (%)
Inflamación	Sin lesión	2 (28,60)	3 (42,90)
	Leve [$<10\%$]	5 (71,40)	3 (42,90)
	Moderada [11-20%]	-	1 (14,20)
	Severa [$>20\%$]	-	-
Fibrosis	Sin lesión	4 (57,10)	4 (57,10)
	Leve [$<10\%$]	2 (28,60)	3 (42,90)
	Moderada [11-20%]	1 (14,30)	-
	Severa [$>20\%$]	-	-

($n=10$). Los valores expresan el número y el porcentaje de animales afectados.

No se han encontrado diferencias significativas en el efecto de la dieta con maíz Ph3 sobre las lesiones de inflamación y fibrosis pulmonar ($P > 0,05$).

Tabla 38: *Efecto de la dieta en la presentación y gravedad de lesiones hepáticas.*

Lesión		M37W nº (%)	Ph3 nº (%)
Esteatosis	Sin lesión	10 (100)	10 (100)
	Leve [5-33%]	-	-
	Moderada [34-66%]	-	-
	Severa [$>66\%$]	-	-
Inflamación	Sin lesión	1 (10,00)	-
	Leve [<2 focos]	4 (40,00)	7 (70,00)
	Moderada [2-4 focos]	4 (40,00)	3 (30,00)
	Severa [>4 focos]	1 (10,00)	-
Necrosis	Sin lesión	9 (90,00)	8 (80,00)
	Leve	1 (10,00)	2 (20,00)
	Moderada	-	-
	Severa	-	-
Fibrosis	Sin lesión	7 (70,00)	5 (50,00)
	Leve	3 (30,00)	5 (50,00)
	Moderada	-	-
	Cirrosis	-	-

($n=10$). Los valores expresan el número y el % de casos para cada variable.

No se han encontrado diferencias significativas en ninguna variable estudiada en relación al daño hepático ($P>0,05$). El ritmo más lento de crecimiento de los pollos ha podido provocar la ausencia de esteatosis hepáticas y de otras lesiones hepáticas subsidiarias más graves.

Tabla 39: *Efecto de la dieta en la presentación de lesiones en bolsa de Fabricio.*

		M37W	Ph3
		nº (%)	nº (%)
Depleción	Sin lesión	2 (20,00)	2 (20,00)
	Leve	4 (40,00)	3 (30,00)
	Moderada	4 (40,00)	5 (50,00)
	Severa	-	-
Vacuolización medular	Sin lesión	5 (50,00)	4 (40,00)
	Leve	5 (50,00)	6 (60,00)
	Moderada	-	-
	Severa	-	-
Vacuolización cortical	Sin lesión	5 (50,00)	8 (80,00)
	Leve	5 (50,00)	1 (10,00)
	Moderada	-	1 (10,00)
	Severa	-	-

($n=10$). Los valores expresan el número y el % de animales para cada tipo de lesión.

No se han detectado diferencias significativas en las características histológicas de las muestras de bolsa de Fabricio de los pollos que han comido la dieta Ph3.

El grado de depleción y vacuolización detectado es propio de la evolución natural de la bolsa de Fabricio, donde es fisiológica la apoptosis linfocitaria.

Tabla 40: *Estudio histológico de tejido de bazo, efecto de la dieta.*

Lesión	M37W	Ph3	P
	nº (%)	nº (%)	
Atrofia pulpa blanca	5 (50,00)	4 (40,00)	0,653
Hipertrofia pulpa blanca	-	4 (40,00)	0,025*
Atrofia pulpa roja	-	2 (20,00)	0,136
Hipertrofia pulpa roja	4 (40,00)	4 (40,00)	1,000
Hiperplasia arterial	-	-	-
Fibrosis	-	-	-
Nº de nódulos linfáticos	1 (10,00)	3 (30,00)	0,264

($n=10$) Los valores son el número y el % de animales para cada tipo de lesión. (* $P<0,05$).

Existen diferencias significativas en la frecuencia de presentación de hipertrofia de pulpa blanca en bazo, ($P=0,025$), que pueden ser debidas a una mayor activación en los linfocitos del tratamiento Ph-3, puesto que la las vainas linfáticas periarteriolas y los elipsoides de la pulpa blanca del bazo participan activamente en el establecimiento de la inmunidad adquirida e innata (Oláh y Vervelde 2008).

Tabla 41: *Características histológicas del tejido de tonsilas cecales*

Lesión	M37W nº (%)	Ph3 nº (%)	P
Depleción linfocitaria	5 (50,00)	5 (50,00)	1,000
Infiltrado linfocitario en mucosa	7 (70,00)	9 (90,00)	0,2636

($n=10$).

No existen diferencias significativas en las características histológicas de las tonsilas cecales de los pollos que han comido la dieta con maíz Ph3 ($P>0,05$).

4.4.10 Serología

Para la detección de anticuerpos frente a algunas enfermedades aviares, se enviaron 10 muestras de suero por tratamiento al Centro de Estudios de Sanidad Avícola de Cataluña y Aragón (CESAC). Se controló la Anemia del Pollo (CAV), la enfermedad de Gumboro (IBD) y la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV).

La respuesta a las enfermedades IBV y IBD estuvo inducida por el protocolo de vacunación que se siguió en la explotación; se vacunó de IBV el día 0 de vida con spray y para la enfermedad de Gumboro se vacunó vía oral en el agua de bebida el día 18 de vida.

Habitualmente, las gallinas reproductoras se infectan de virus CAV de forma natural durante el período de recría sin que haya sintomatología; esta infección produce inmunidad y anticuerpos que pueden transmitirse a los polluelos mediante los anticuerpos de la yema (IgY). Esta carga de anticuerpos no es constante y tiende a disminuir con la edad del polluelo (Rosenberger y Cloud 1998).

Tabla 42: *Efecto de la dieta con el maíz Ph3 en los títulos serológicos.*

	M37W	Ph3
CAV (ELISA)	0,90±0,01	0,91±0,02
IBD (ELISA)	123,90±54,63	196,50±53,17
IBV (IH)	464,80±322,59	484,30±185,46

($n = 10$). Los valores corresponden a medias y el error estándar.

CAV, Anemia del Pollo; IBD, enfermedad de Gumboro; IBV, Bronquitis Infecciosa Aviar; ELISA, Ensayo para inmunoabsorción ligado a enzimas; IH, inhibición de la hemaglutinación.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para los títulos de serología de las enfermedades estudiadas entre los tratamientos ($P>0,05$).

Se compararon los resultados obtenidos en este estudio con los resultados del estudio anterior (Pág. 48) destacando los resultados obtenidos en enfermedad de Gumboro (IBD).

En este estudio se obtuvieron unos títulos serológicos de IBD en el grupo control de $123,90 \pm 54,63$ y en el grupo tratamiento de $196,50 \pm 53,17$, en cambio en el estudio del ensayo I en condiciones experimentales se obtuvieron unos títulos de esta enfermedad en el grupo M37W de $2.145,04 \pm 289,824$ y en el grupo Ph3 de $1.614,14 \pm 320,337$. Estas diferencias pueden ser por la cepa utilizada para la vacunación, en este estudio se utilizó una cepa intermedia que induce títulos serológicos más bajos que la cepa intermedia plus, utilizada en el primer estudio, que es más inmunógena generando títulos serológicos más altos.

4.5 CONCLUSIONES

1. El maíz Ph3 obtenido por ingeniería genética para la expresión elevada de carotenoides, libera de forma significativa estos compuestos bioactivos en los tejidos y fluidos de los pollos criados en granja.
2. Los pollos que comen maíz Ph3 en su dieta, presentan una evolución del color hacia tonalidades naranjas a partir del día 5 posterior al inicio del tratamiento. Durante el crecimiento el color y la deposición de pigmentos puede verse afectada por algunas circunstancias.
3. La alimentación con el maíz Ph3 no alteró los parámetros productivos ni el rendimiento canal.
4. Las canales de los pollos alimentados con el maíz Ph3 presentan una coloración más amarilla-naranja que los pollos alimentados con el maíz M37W, la coloración de la canal es similar a la habitual en pollos que se comercializan bajo la denominación de "*pollo amarillo*".
5. No se han encontrado diferencias significativas en los parámetros sanitarios analizados. Es más probable encontrar hipertrofia de pulpa blanca en el bazo de los pollos del tratamiento Ph3.

ENSAYO III

Efecto de la alimentación en pollos con maíz fortificado en carotenoides Ph3 en la respuesta al desafío experimental con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

Ensayo III

Efecto de la alimentación en pollos con maíz fortificado en carotenoides Ph3 en la respuesta al desafío experimental con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

5.1 INTRODUCCIÓN

El maíz y la soja comerciales no tienen en cantidad suficiente los carotenoides que producen la piel amarilla de los pollos y que prefieren algunos consumidores. Para ello, normalmente se usan pigmentos sintéticos o naturales que producen un incremento de los costes de producción (Castañeda et al. 2005).

El maíz amarillo transgénico multivitamínico, Maíz Ph3 es el resultado de la combinación de los genotipos *Zmpsy1* y *Pacrt1* (Zhu et al. 2008) acumula cuatro carotenoides muy importantes nutricionalmente β -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina. En los animales los carotenoides desarrollan actividad como moléculas antioxidantes, pero algunos carotenoides específicos son nutrientes esenciales y son precursores de moléculas importantes que no pueden ser sintetizadas de *novo* como los α -, β - γ -caroteno y β -criptoxantina que son necesarios para sintetizar el pigmento visual de la retina y el regulador del ácido retinoico (Botella-Pavia y Rodríguez-Concepción 2006).

La salmonelosis es la toxiinfección alimentaria más frecuente en los seres humanos (Santos et al. 2013) y la segunda toxiinfección en la Unión Europea; está causada por un grupo de bacilos Gram negativo no esporulados, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, género *Salmonella*. Los serotipos más importantes actualmente son *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*. Los productos avícolas son la mayor fuente de infección de *Salmonella* en humanos en EEUU (Santos et al. 2013) y en Europa la salmonelosis preocupa en la industria de la cría de pollo que busca reducir los casos de infección (Vilà et al. 2012). Desde 2003 todos los estados miembros de la Unión Europea están obligados a tener programas de control de *Salmonella* (Fernández-Rubio et al. 2009).

Los pollos recién nacidos son altamente sensibles a *Salmonella enteritidis*, esta sensibilidad disminuye con la edad durante la primera semana (Gast y Beard 1989). En los ensayos de Desmidt et al. (1997), se desafió dos grupos de pollos con *Salmonella enteritidis* fago tipo 4 a las edades de 1 y 28 días pero únicamente los pollos infectados el primer día de vida presentaron síntomas clínicos e incremento de mortalidad, encontraron títulos serológicos en ambos grupos, estos fueron tres veces más persistentes en los pollitos infectados el primer día de vida, en ambos grupos aislaron *Salmonella* en los principales órganos y se elevó el número de heterófilos. *Salmonella enteritidis* tiene tendencia a acantonarse en ovario (Lister 1988).

Las gallinas adultas no presentan síntomas apreciables después de un desafío con *Salmonella Enteritidis*, pero se convierten en portadoras y difusoras de la bacteria en un proceso de contaminación horizontal (Suzuki 1994). La transmisión vía vertical es efectiva tanto por penetración a través de la cáscara o por contaminación transovárica, pudiendo colonizar cualquier parte del órgano reproductor de la gallina y contaminar cualquier parte del huevo en origen o por colonización posterior a la puesta (Gantois et al. 2009).

El cumplimiento del plan de prevalencia de la UE ha reducido significativamente el número de salmonelosis en humanos (EFSA 2011), aunque algunos episodios aún son posibles (EFSA 2014a) a partir de alimentos de origen animal o de alimentos de origen vegetal como melones o sandías (EFSA 2014b).

La vacunación, con vacunas tradicionales o más recientemente con vacunas de última generación con bacterias de síntesis (Jawale et al. 2012) y más importante aún, la bioseguridad en ponedoras y reproductoras reduce la contaminación de los huevos por *Salmonella*, que son la mayor fuente de infección y por tanto su presencia en el pollo recién nacido. Las medidas preventivas como la higiene y el control de roedores e insectos durante el engorde son eficaces para impedir la contaminación de los lotes (Fernández-Rubio et al. 2009).

De forma general, las cepas de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos han estimulado la búsqueda de tratamientos alternativos para el control de enfermedades como el uso de extractos vegetales con actividad antioxidante y vitaminas A, E y C (Bolder et al. 1999; Kidd 2004) los probióticos (Higgins et al. 2007, 2010) que son eficaces mediante el mecanismo de exclusión competitiva (Mountzouris et al. 2009), los polisacáridos de alginato de sodio que activaron la barrera defensiva frente a *Salmonella*, en pollos (Yan et al. 2011) o los β -Glucanos, adicionados en el pienso, que pueden potenciar la defensa del huésped frente a *Salmonella* debido a que estimulan la actividad fagocitaria de los macrófagos (Chen et al. 2008). Con la suplementación de estos aditivos y debido en parte a sus propiedades antioxidantes se han mantenido altos los niveles de protección inmune en animales sometidos a presiones de estrés e infecciones (Ola-Fadunsin y Ademola 2013).

5.2 OBJETIVOS

El objetivo de este ensayo es comparar el efecto de una dieta con maíz Ph3 enriquecido en carotenoides en pollos infectados experimentalmente con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, frente a pollos que comen una dieta con maíz M37W carente de carotenos. Se estudiaron parámetros productivos, sanitarios y el efecto sobre el sistema inmune de pollos que han sido infectados experimentalmente. También se ha analizado la evolución del cambio de color de las patas de los animales según el maíz que han consumido.

Las características de estos objetivos obligaron a realizar el ensayo en aisladores preparados para realizar este tipo de pruebas.

5.3 MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1 Elaboración de las dietas

Para conseguir el objetivo, se diseñó el experimento con cuatro grupos de pollos, dos alimentados con pienso elaborado con maíz transgénico multivitamínico y dos alimentados con la misma fórmula de pienso pero elaborado con el maíz isogénico control carente de carotenos y en cada uno de los dos grupos la mitad se desafiaron con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.

Antes de la preparación de los piensos, el maíz Ph3 se molió para posteriormente ser liofilizado. Este proceso se realizó para conservar las características organolépticas y nutritivas y, reducir las pérdidas de los componentes volátiles o termosensibles a partir de un proceso de conservación que combina la congelación y la deshidratación (Ramírez 2006). El cultivo del maíz empleado en esta prueba, queda descrito en en la página 24 (Preparación de la dieta

La elaboración de las dietas, control y experimental, se realizó según las recomendaciones publicadas por National Research Council (1994) para la alimentación de pollo, actualizadas por fórmulas comerciales recientes (Aviagen 2008) y elaboradas en el centro de investigación IRTA Mas de Bover, de Reus.

Tabla 43: *Formula completa de los piensos según el porcentaje de ingredientes*

Ingrediente	M37W	Ph3
Maíz M37W (%)	52,241	-
Maíz Ph3 (%)	-	52,241
Soja 47,5% Brasil (%)	36,056	36,056
Aceite de soja (%)	6,801	6,801
Fosfato Mono cálcico (%)	1,523	1,523
Carbonato de calcio (%)	1,455	1,455
Sal (%)	0,347	0,347
Metionina (%)	0,326	0,326
Complemento de pollos Pre (%)	0,303	0,303
Corrector Básico* (%)	0,303	0,303
Lisina en polvo 79% BASE (%)	0,269	0,269
Bicarbonato de sosa (%)	0,233	0,233
Cygro (%)	0,051	0,051
Colina 60% (%)	0,051	0,051
Treonina (%)	0,042	0,042

*Corrector: Vitamina A, 10.000 UI/Kg; vitamina D3, 2.000 UI/Kg; vitamina E, 80 UI/kg; vitamina B1, 2 mg/kg, vitamina B2 8 mg/kg; vitamina B6, 4 mg/kg; vitamina B12 0,02 mg/kg; vitamina K; 2,25 mg/kg; ácido fólico, 1 mg/kg, ácido nicotínico, 40 mg/kg; ácido pantoténico 11,7 mg/kg; biotina, 0,1 mg/kg; cobre, 6 mg/kg; zinc 54 mg/kg; hierro, 40 mg/kg; manganeso, 77 mg/kg; cobalto, 0,2 mg/kg; selenio, 0,45 mg/kg; iodo, 2,25 mg/kg; BHT antioxidante, 125 mg/kg.

Para la elaboración del pienso, primero se hizo una premezcla con la soja, el aceite de soja y los minerales, se hizo una segunda mezcla con el maíz triturado dentro la mezcladora durante 5 minutos hasta que el pienso tuvo una textura consistente y fina sin grumos. El pienso se envasó al vacío y se guardó a 4°C hasta su utilización.

5.3.2 Diseño experimental

El ensayo se realizó en condiciones de aislamiento microbiológico en las instalaciones del Centro de Sanidad Avícola de Cataluña y Aragón, (CESAC) de Reus utilizando cuatro aisladores, uno para cada grupo de pollos.

Se utilizaron 60 pollos machos de la línea Ross 308 que se alojaron aleatoriamente en 4 jaulas aisladoras con 15 animales por jaula.

La distribución de los grupos fue la siguiente: T1, dieta maíz M37W y no infectados; T2, dieta con maíz M37W e infectados; T3, dieta con maíz Ph3 y no infectados; T4 dieta con maíz Ph3 e infectados. La dieta experimental de cada grupo se inicia desde el día 1 y se mantiene hasta el final del ensayo.



Los pollos de los grupos T2 y T4 fueron infectados con 10^8 UFC de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis a los 7 días de edad. Se realizaron necropsias a los 7 y a los 14 días post-infección (dpi).

Este diseño experimental fue aprobado previamente por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Lleida y autorizado por el *Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya*.

Fig. 34: Aplicación del inóculo de *Salmonella*

5.3.3 Cría y condiciones ambientales

Los pollos machos de la estirpe Ross 308 se alojaron en los aisladores el primer día de vida, procedentes de una incubadora comercial. Cuando llegaron se recogieron los fondos de caja para analizar las heces y detectar presencia de *Salmonella*, se pesaron individualmente y se formaron los grupos descritos en el procedimiento experimental.

Cada aislador estaba equipado con bebederos de tetina y comederos de pollos de primera edad. A los 16 días de vida los comederos de primera edad se sustituyeron por comederos de adultos para optimizar el acceso al pienso.

El suministro de agua fue automático en todo momento desde el inicio del experimento hasta el final; el pienso fue suministrado manualmente a partir de los sacos destinados a cada tratamiento.

La infección experimental de los pollos se realizó el día 7 de vida mediante la aplicación oral de un inóculo con una jeringa de 1 ml. Se introdujo la jeringa por el esófago y se liberó el contenido con el agente infeccioso en su interior.

Las condiciones de luz, humedad y temperatura fueron ajustadas automáticamente de acuerdo con las recomendaciones de Aviagen (2010) para el pollo de engorde. Tanto las condiciones ambientales como el estado de salud de los pollos fueron controlados diariamente por el personal técnico del CESAC y por el veterinario responsable de salud y bienestar de los animales de experimentación de la Universidad de Lleida.

El día 14 de vida se sacrificó la mitad de los pollos (8 por tratamiento) y el día 21 se sacrificaron los 7 restantes; inmediatamente después del sacrificio se procedió a la necropsia.



Fig. 35: Aisladores durante el ensayo

5.3.4 Recogida de datos

Cada 2 o 3 días, se midió el color de las patas de los pollos individualmente usando un colorímetro CM-700d portátil compacto, Konica Minolta (Japón) con una máscara de 3 mm de diámetro iluminante D65 y ángulo de observación de 10°. Los resultados obtenidos eran expresados a partir del sistema tricromático CIE Lab, luminosidad (L^*), eje verde-rojo (a^*) y eje azul-amarillo (b^*).

Semanalmente se realizó el control del consumo de pienso, tarando el pienso existente en las tolvas de alimentación; cada vez que se añadió pienso a un tratamiento, éste fue pesado. Los pollos se pesaron individualmente al inicio, a los 7, 14 y 21 días todos los pesos se tomaron con una balanza de precisión Electronic Balance Model FX-1200 (A&D Corporation, U.S.A.).

Se recogieron heces en el momento del alojamiento de los pollos, y posteriormente los días 7 (día de la infección experimental), 14 y 21 de vida. Las heces se recogieron de diferentes puntos de la jaula. Se emplearon guantes limpios en cada tratamiento y espátulas desechables en cada recogida de heces, estas se usaron para determinar la presencia de *Salmonella* en las mismas.

Antes de sacrificar a los pollos se extrajo sangre de la vena alar. La sangre de cada animal se recogió en dos tubos, con y sin anticoagulante etilendiaminotetraacético, (EDTA). La sangre se usó para hematología.

Las necropsias se efectuaron en la sala de necropsias del CESAC. Se preparó la sala y el material estéril. Para evitar contaminaciones se empezó con los grupos 1 y 3, controles no infectados. Se realizó la necropsia a los animales de cada grupo por separado en una mesa diferente y con el material de necropsia diferente. Cuando se hizo la necropsia de los grupos infectados el material de necropsia era individual para cada pollo y se cambió después de la extracción de cada víscera.

En el momento de las necropsias se colocaron los pollos de cada grupo numerados en la mesa y se extrajo y pesó el hígado, el bazo y la bolsa de Fabricio. Por cada tratamiento se tomaron 5 muestras aleatorias, de hígado, bazo, bolsa de Fabricio, timo y ciegos de pollos diferentes y se conservaron en formal al 10% para estudio histológico.

5.3.4.1 Bacteriología.

Para determinar las Unidades Formadoras de Colonias, (UFC), se empleó la técnica del número más probable (NMP)³. Esta técnica sirve para determinar la cantidad de bacterias que hay en cada muestra. Una UFC es el número mínimo de células que se necesitan para dar lugar a una colonia visible para el ojo humano. El NMP se mide en UFC/ml y se usó el método validado ISO/TS 6579-2:2012.

Las muestras analizadas fueron de ciego, hígado y bazo de todos los animales sacrificados a los 7 y a los 14 días post-infección.

Se realizaron hasta 8 diluciones seriadas de la muestra inicial de *Salmonella*, con pre enriquecimiento en 100 ml de agua de peptona. De cada dilución seriada se sembraron 3 series de placas de cultivo semisólido, se incubaron 1 día a 41,5°C y luego se leyeron para determinar si eran positivas o negativas a *Salmonella*.

5.3.4.2 Muestras de sangre

Se tomaron muestras de sangre obtenidas de los pollos en el momento previo al sacrificio y una vez aturcidos mediante sangrado en la vena alar (formalmente, *Vena radialis* y *Vena ulnaris superficialis*). La sangre fue recogida en un tubo con EDTA y fue enviada inmediatamente al laboratorio independiente de análisis (Laboratorio Dr. F. Echevarne, Analisis, S.A., Barcelona) para estudio del hemograma

5.3.5 Análisis estadístico

Se analizó el crecimiento, el color, peso relativo de las vísceras, variables bioquímicas en sangre y hematología y el recuento de colonias para determinar las diferencias ente el tipo de maíz y el desafío con *Salmonella*.

Los datos fueron procesados con un modelo estadístico lineal generalizado (GLM) (JMP® Pro 11 SAS Institute, 2013) donde el tipo de maíz y la infección o no con *Salmonella* fueron los efectos principales en un análisis de varianza de dos vías completamente aleatorizado, se ha incluido la interacción entre las dos variables independientes. Para el análisis *post hoc* se ha empleado el test HSD Tukey.

³ La técnica NMP se basa en el principio de que una bacteria viva puede desarrollarse y producir un cultivo, a medida que se avanza en las diluciones la cantidad de bacterias va disminuyendo de forma que al llegar a la cuarta dilución, la cantidad de bacterias es 10.000 veces menor que en la muestra inicial, la concentración de bacterias en estas series de dilución sigue la distribución de Poisson (Jarvis et al. 2010).

Para el estudio de las diferencias entre medias en el recuento microbiológico, se ha usado el test t-Student. Los valores de tablas y gráficos expresan la media y el error estándar.

En el estudio de las variables cualitativas, se ha empleado, tablas de contingencia y test χ^2 , las diferencias entre niveles de una misma variable se han determinado por comparación de proporciones de columna (prueba z).

Los datos expresados en porcentaje fueron transformados mediante una función arcsen para lograr una distribución normal (Snedecor y Cochran 1989). Cuando fue necesario se normalizaron los valores con la función raíz cuadrada más 0,5 antes de proceder al análisis estadístico.

Para la significación de los resultados en todas las pruebas se ha considerado $P < 0,05$.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Dieta

Los dos tipos de maíz fueron analizados en laboratorios independientes para determinar la composición nutricional (Covitsa, Lleida) y la detección y cuantificación de micotoxinas (Servicio Científico Técnico de Calidad Microbiológica en el Sector Agroalimentario, Universidad de Lleida).

Tabla. 44: *Análisis nutricional.*

		M37W	Ph3	
Maíz	Proteína (%)	11,53	12,55	
	Fibra (%)	4,05	5,49	
	Grasa (%)	2,55	3,48	
	Cenizas (%)	1,69	1,27	
	Humedad (%)	12,76	6,44	
Pienso	Proteína (%)	23,28	23,80	
	Fibra (%)	4,04	3,79	
	Grasa (%)	8,92	9,10	
	Cenizas (%)	6,35	6,31	
	Humedad (%)	11,18	8,37	
	Carotenoides			
	Violaxantina	0,12±0,005	1,15±0,09***	
	Luteína	0,95±0,13	1,9±0,045***	
	Zeaxantina	0,36±0,009	5,75±0,224***	
	α-Criptoxantina	nd	1,66±0,063	
β-Criptoxantina	0,22±0,009	1,6±0,067***		
β-Caroteno	0,06±0,005	1,23±0,036***		

(Para carotenoides, n=5); *** $P < 0,001$; nd, no detectado.

Tabla 45: *Resultado del análisis de micotoxinas en el pienso y el maíz.*

	ZEA (ppb)	DON (ppb)	T-2 (ppb)	FUMO (ppm)	OTA (ppb)	AFT (ppb)	AFB1 (ppb)
Maíz M37W	nd	nd	6,73	1,06	2,77	nd	nd
Maíz Ph3	nd	nd	6,73	0,63	2,71	nd	nd
Pienso M37W	nd	nd	8,76	0,46	2,56	0,65	0,35
Pienso Ph3	nd	15,47	7,20	0,28	2,66	nd	nd

ZEA: zearalenona; DON: deoxynivalenol; T-2: toxina T-2; FUMO: fumonisinas totales; OTA: ocratoxina A; AFT: aflatoxinas totales; AFB1: aflatoxina B1; nd: No detectado.

5.4.2 Consumo y crecimiento

Los pollos que han comido dieta con maíz Ph3 han comido menos pienso que los pollos que han comido la dieta M37W, con una diferencia máxima entre los grupos T-3 y T-1 de 17,92 g/pollo/día durante la 3ª semana. La causa de esta disminución en el consumo del pienso que contiene maíz Ph3 (T-1 y T-4) puede estar en los efectos derivados de la liofilización del maíz, como la mayor adherencia y por tanto mayor dificultad para que

deslice por las tolvas, no hay que descartar que también se vea alterada la palatabilidad (Picard et al. 2002)

Los índices de conversión han sido muy similares en todos los tratamientos, con independencia del tipo de pienso o del desafío infeccioso.

Tabla 46: Índice de conversión (IC) y consumo de pienso durante la segunda y tercera semana de vida.

Días	T-1		T-2		T-3		T-4	
	Consumo g/día/pollo	IC g/g	Consumo g/día/pollo	IC g/g	Consumo g/día/pollo	IC g/g	Consumo g/día/pollo	IC g/g
7-14	42,36	0,921	50,33	0,94	44,38	0,944	45,16	0,919
15-21	93,04	1,678	90,80	1,679	75,12	1,691	77,25	1,633

Los valores de consumo son el consumo medio diario por pollo durante cada periodo; los valores de IC son los acumulados dentro de cada periodo. T-1, M37W no infectado; T-2, M37W infectado; T-3, Ph3 no infectado; T-4, Ph3 infectado.

El día 7 de vida el peso de los pollos en el momento de la infección no presentó diferencias significativas ($P>0,05$) y el peso medio de todos los tratamientos fue de 158 g.

Existe interacción entre los efectos tipo de maíz e infección a los 14 días de vida (7dpi) que determina que los pollos que no han sido infectados y que comen maíz Ph3 presentan pesos menores ($P=0,026$). Puesto que a la misma edad también hay un efecto del consumo de maíz Ph3 en el peso, todo indica que es este el efecto principal ($P=0,009$). La diferencia significativa, se mantiene a los 21 días de vida para el efecto maíz ($P=0,038$).

Tabla 47: Efecto del tipo de maíz y desafío infeccioso sobre el peso de los pollos a 14 y 21 días de edad.

Maíz	Infección	Peso (g)			
		14 días		21 días	
		Media	EE	Media	EE
M37W		470,89 ^a	4,245	981,01 ^a	19,054
Ph3		454,11 ^b	5,044	920,39 ^b	24,358
<i>Valor P</i>		0,009		0,038	
	NO	457,41	4,945	931,53	19,400
	SI	467,59	4,581	969,87	25,783
<i>Valor P</i>		0,106		0,179	
M37W	NO	472,87 ^b	7,0155	980,23	8,2642
M37W	SI	468,91 ^b	4,9138	981,79	38,7907
Ph3	NO	441,95 ^a	5,3941	882,83	27,7840
Ph3	SI	466,27 ^b	7,8456	957,96	36,4512
<i>Valor P</i>		0,026		0,197	

(14 días, n=15; 21 días n=7) ^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias y día indican diferencias significativas ($P<0,05$).EE error estándar.

5.4.3 Peso de las vísceras

No se ha encontrado interacción a las edades de 14 y 21 días (7 y 14 dpi respectivamente) entre maíz consumido (M37W o Ph3) e infección con *Salmonella*.

Tabla 48: Efecto del maíz y la infección con *Salmonella* en el peso relativo de los órganos a los 14 y 21 días de vida (7 y 14 dpi).

Maíz	Infección	14 días	21 días
		(n=16)	(n=14)
		Hígado (g/Kgpv)	
M37W		22,23±0,638 ^b	23,19±1,391 ^a
Ph3		25,21±1,099 ^a	19,82±0,822 ^b
<i>Valor P</i>		0,021	0,014
	No	23,56±0,970	19,25±0,757 ^b
	Sí	23,89±1,006	23,76±1,300 ^a
<i>Valor P</i>		0,788	0,0015
M37W	No	22,01±1,164	20,52±1,272
M37W	Sí	22,46±0,629	25,85±2,099
Ph3	No	25,11±1,386	17,97±0,571
Ph3	Sí	25,31±1,821	21,66±1,209
<i>Valor P</i>		0,918	0,528
		Bazo (g/Kgpv)	
M37W		0,78±0061	1,17±0,080 ^a
Ph3		0,93±0085	0,92±0,045 ^b
<i>Valor P</i>		0,114	0,009
	No	0,76±0,074 ^b	1,03±0,066
	Sí	0,96±0,067 ^a	1,06±0,080
<i>Valor P</i>		0,030	0,771
M37W	No	0,73±0,087	1,15±0,083
M37W	Sí	0,84±0,086	1,18±0,144
Ph3	No	0,78±0,127	0,91±0,083
Ph3	Sí	1,08±0,086	0,93±0,043
<i>Valor P</i>		0,291	0,956
		Bolsa de Fabricio (g/Kgpv)	
M37W		2,30±0,147	2,29±0,154 ^b
Ph3		2,17±0,139	2,90±0,143 ^a
<i>Valor P</i>		0,455	0,005
	No	2,37±0,0126	2,57±0,149
	Sí	2,01±0,152	2,64±0,199
<i>Valor P</i>		0,146	0,733
M37W	No	2,33±0,207	2,28±0,197
M37W	Sí	2,28±0,226	2,31±0,253
Ph3	No	2,41±0,158	2,86±0,170
Ph3	Sí	1,92±0,195	2,97±0,269
<i>Valor P</i>		0,225	0,877

(Para las interacciones, $n_{14 \text{ días}} = 8$ y $n_{21 \text{ días}} = 7$).^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias y día indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

A la edad de 14 días, (7dpi) hay efectos significativo por el tipo de maíz ($P=0,021$) en el peso relativo del hígado y por la infección con *Salmonella* en el peso relativo del bazo ($P=0,030$).

A la edad de 21 días (14 dpi) hay efecto significativo de la dieta en peso relativo de hígado ($P=0,014$), bazo ($P=0,009$) y bolsa de Fabricio ($P=0,006$), se encontraron diferencias por efecto de la infección con *Salmonella* en el peso relativo del hígado ($P=0,002$).

La respuesta inflamatoria del hígado frente a la infección por *Salmonella* es más temprana (7 dpi) en los pollos que comen maíz Ph3, y retorna a la normalidad antes (14 dpi). El peso relativo del hígado de los pollos que han sido infectados es mayor a los 14 dpi que el de los pollos no infectados. En pollos infectados con *Salmonella*, a partir de los 4 dpi ya es posible ver focos inflamatorios en hígado, a partir de los 7 dpi focos necróticos de hepatocitos rodeados de células inflamatorias, a los 14 dpi se encuentra material amorfo eosinofílico (Desmidt et al. 1997). Los resultados obtenidos son contradictorios con los obtenidos por Meriwether et al. (2010), que en pollos que han comido pienso con 40 mg/kg de luteína, obtiene pesos de hígado menores en la respuesta inflamatoria aguda al desafío con lipopolisacárido (LPS), los mecanismos inmunógenos desarrollados a partir de un desafío con LPS son diferentes de los que se desarrollan a partir de un desafío microbiológico, esto podría explicar las diferencias.

Como consecuencia de la reacción inmunitaria tardía, el peso relativo del bazo a los 14 dpi es mayor en los pollos que han comido maíz M37W ($P=0,009$). El peso relativo del bazo a los 7 días se ve incrementado significativamente en los pollos que han sido infectados. Meriwether et al. (2010) describen una disminución en la inflamación del bazo en pollos que han sido alimentados con suplementos de luteína.

En estudios previos (Ensayo I) con los mismos tipos de maíz se observaron diferencias significativas en el peso de la bolsa de Fabricio, siendo mayor en los pollos que comieron pienso con maíz Ph3. En el ensayo III, los grupos que consumieron maíz Ph3 presentan bolsas de Fabricio con un peso significativamente mayor a los 21 días ($P=0,005$), sin que la infección con *Salmonella* tenga efecto en esta variable. Este hecho puede ser importante ya que la bolsa de Fabricio es el órgano necesario para el desarrollo de los linfocitos B, que forman parte del sistema inmunológico en las aves (Ratcliffe 2008).

5.4.4 Colorimetría

Según el esquema CIELab, los valores obtenidos para cada uno de los tratamientos, ofrecen un patrón con diferencias significativas ($P<0,05$) para las variables a^* , rojos y b^* , amarillos, entre los tratamientos que han comido dieta Ph3 (T-3, T-4) y los que han comido dieta M37W (T1-T-2), este patrón se inicia el día 7 de vida y se mantiene hasta el final del experimento (día 21), estas diferencias son atribuidas al maíz de la dieta.

A los 21 días de vida ($P=0,015$) existe interacción de los factores maíz e infección con *Salmonella* para la variable a^* y para la variable b^* a los 14 ($P=0,021$) y 21 días de vida ($P=0,023$), en estos tres casos las pruebas *post hoc* con el test Tukey HSD, determinan la agrupación de los tratamientos por el tipo de maíz consumido, sin que haya diferencias entre los grupos por la infección o no con *Salmonella*, obteniendo medias tanto de a^* o de b^* más elevadas los pollos alimentados con maíz Ph3 fortificado en carotenoides.

La infección con *Salmonella* no afecta a la evolución del color en los pollos que comieron maíz Ph3 o M37W ($P>0,05$).

Los pollos que comieron maíz Ph3 rico en carotenoides presentaron valores L^* (luminosidad) significativamente menores que los tratamientos que comieron el maíz M37W a la edad de 14 ($P=0,014$) y 21 días ($P<0,0001$). No existe interacción entre los factores tipo de dieta e infección con *Salmonella* ($P>0,05$).

Tabla 49: Evolución del color en los tratamientos bajo el efecto del tipo de maíz y de la infección con *Salmonella*.

Maíz	Infección	L*					
		7 días (n=30)		14 días (n=30)		21 días (n=14)	
		Media	EE	Media	EE	Media	EE
M37W		69,67	0,563	70,6 ^a	0,826	72,89 ^a	0,684
Ph3		68,44	0,646	68,39 ^b	0,61	68,98 ^b	0,515
Valor P		0,142		0,024		<0,0001	
	NO	69,56	0,584	70,27	0,657	70,49	0,794
	SI	68,55	0,634	68,72	0,818	71,37	0,812
Valor P		0,231		0,11		0,274	
M37W	NO	70,16	0,883	72,23	0,695	72,78	0,441
M37W	SI	69,17	0,705	68,98	1,395	72,98	1,342
Ph3	NO	68,94	0,761	68,31	0,85	68,19	0,871
Ph3	SI	67,93	1,057	68,46	0,906	69,76	0,143
Valor P		0,993		0,081		0,394	
		a*					
M37W		8,44 ^b	0,532	1,87 ^b	0,245	0,4 ^b	0,3
Ph3		10,73 ^a	0,536	7,5 ^a	0,292	7,65 ^a	0,301
Valor P		0,003		<0,0001		<0,0001	
	NO	9,48	0,612	4,67	0,618	4,05	0,907
	SI	9,68	0,542	4,69	0,592	4	1,174
Valor P		0,783		0,953		0,91	
M37W	NO	8	0,67	1,73	0,321	0,89 ^b	0,290
M37W	SI	8,87	0,837	2,01	0,377	-0,09 ^b	0,460
Ph3	NO	10,96	0,878	7,61	0,389	7,19 ^a	0,410
Ph3	SI	10,5	0,646	7,38	0,447	8,1 ^a	0,390
Valor P		0,369		0,493		0,015	
		b*					
M37W		27,97 ^b	0,461	19,88 ^b	0,709	14,84 ^b	0,564
Ph3		36,33 ^a	0,839	33,83 ^a	0,697	34,23 ^a	0,699
Valor P		<0,001		<0,0001		<0,0001	
	NO	31,86	1,051	27,08	1,702	24,70	2,634
	SI	32,45	1,049	26,63	1,300	24,36	2,886
Valor P		0,527		0,633		0,689	
M37W	NO	27,8	0,716	19,01 ^b	1,059	15,52 ^b	0,720
M37W	SI	28,15	0,605	20,76 ^b	0,923	14,15 ^b	0,830
Ph3	NO	35,91	1,243	35,15 ^a	0,943	33,88 ^a	1,200
Ph3	SI	36,76	1,164	32,51 ^a	0,927	34,57 ^a	0,790
Valor P		0,789		0,021		0,023	

(En grupos de interacción n_7 y 14 días = 8, n_{21} días = 7). ^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias y día indican diferencias significativas ($P < 0,05$). EE, error estándar.

Los grupos de pollos que han comido maíz Ph3, (T-3 y T-4) se diferencian significativamente ($P < 0,001$) en el valor croma de los grupos de pollos que han comido maíz M37W (T-1 y T-2) a partir del día 7 de vida y mantienen esta diferencia hasta el final del ensayo (Fig. 36). Esta evolución en el color no se ve afectada por la infección con el inóculo de *Salmonella* (T-2 y T-4).

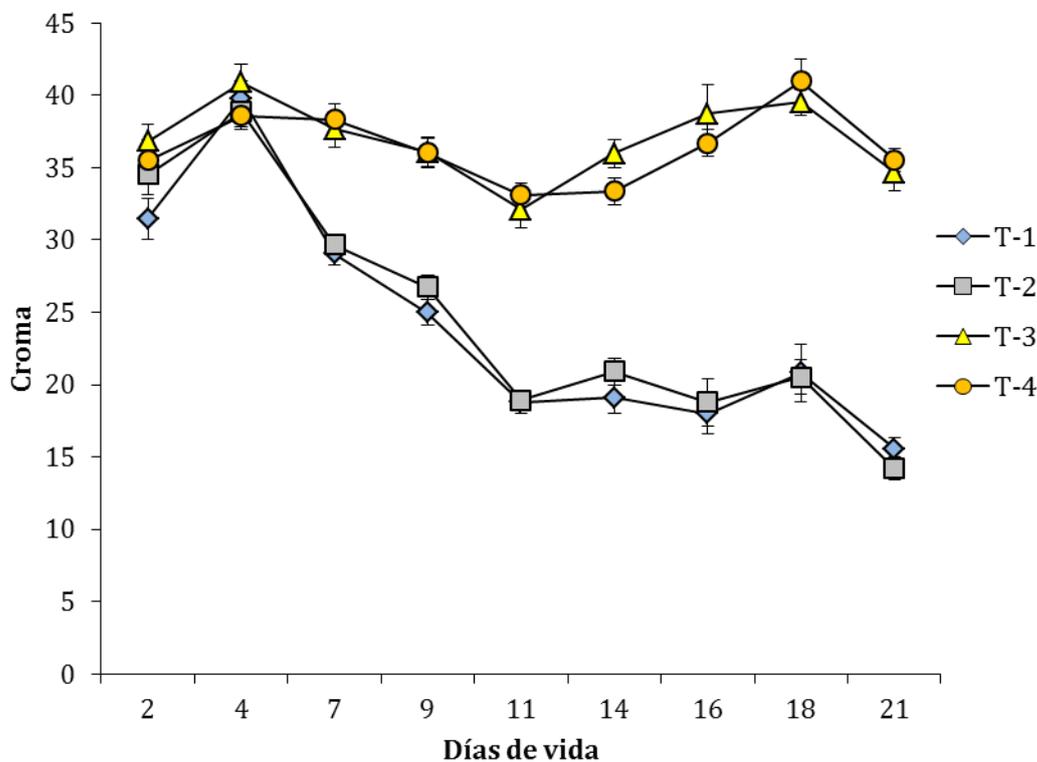


Fig. 36: Efecto de la infección con *Salmonella* y de la dieta con maíz Ph3 en el valor croma. ($n=15$). $P < 0,05$. T1 maíz M37W no infectado; T2 maíz M37W infectado; T3 maíz Ph3 no infectado; T4 maíz Ph3 infectado.

Todos los grupos experimentan un incremento de color entre los días 2 y 4 que se atribuye a la reabsorción del vitelo (Moran 2007), una vez que esta reabsorción ha terminado, los pollos que comen maíz con carotenoides, tienden a mantener el color, mientras que en los que comen maíz M37W disminuye el color (día 7 y siguientes).

Igual que en los ensayos I y II en los que se usaron los mismos tipos de maíz, los pollos que comen pienso con maíz transgénico Ph3 tienen un valor a^* y b^* (rojo y amarillo, respectivamente) en la piel de la pata mucho más elevado que los que ingieren la dieta control. Sin embargo ocurre lo contrario con el valor L^* (luminosidad) que es mayor en los pollos que comen pienso con maíz blanco control, debido a que la luminosidad desciende a tonalidades más oscuras.

En el ensayo con desafío de *Salmonella* se alcanzaron valores de $b^*=33,88 \pm 1,20$ a los 21 días de vida en el grupo que consumía maíz amarillo sin infectar y $b^*=34,57 \pm 0,79$ en el infectado. Estos datos son superiores a los valores alcanzados por Castañeda et al. (2005) $b^*=15,75$, porque el maíz transgénico aporta más carotenos a la dieta.

En el ensayo de *Salmonella* se alcanzó un valor de $a^*=7,19\pm 0,41$ en el grupo que ingirió maíz transgénico no infectado y un valor $a^*=8,10\pm 0,39$ en los pollos que comieron el mismo maíz y fueron infectados, ambos valores son superiores al obtenido por Castañeda et al. (2005) $a^*=1,65$.

El maíz transgénico Ph3 aporta carotenos a la dieta de las aves, una parte sustancial de los mismos no son degradados a apocarotenos a diferencia lo que ocurre en los mamíferos y se acumulan en los tejidos corporales y son visibles en los tejidos periféricos. Los pollos alimentados con maíz transgénico multivitamínico tenían un color anaranjado más intenso.

5.4.5 Bioquímica

El efecto tipo de dieta es estadísticamente significativa en la concentración de calcio en sangre ($P=0,011$). La diferencia entre ambos tipos de maíz es poco relevante ya que los valores normales varían entre 92,8 y 112,9 mg/L, (Talebi 2006; Abdi-hachesoo et al. 2011). Las concentraciones halladas en este ensayo son claramente inferiores a las obtenidas en el resto de ensayos que forman parte de esta tesis (Ensayos I, II, y IV).

La concentración de fósforo se ve afectada por la interacción entre los efectos principales, maíz e infección ($P=0,046$). En el estudio post hoc de esta interacción se observa que los pollos que comen maíz Ph3 y son infectados con *Salmonella*, presentan una concentración menor (5,19 mg/dl). Para este mismo electrolito también hay un efecto significativo general derivado de la infección con *Salmonella* ($P=0,034$). Algunos valores reportados en la bibliografía varían entre 5,03 y 5,57 mg/dl (Talebi 2006; Abdi-hachesoo et al. 2011).

En el resto de electrolitos, sodio y potasio, no se encontraron diferencias en los pollos del ensayo. La concentración de sodio en un pollos machos es de 4,8 mEq/L y la de sodio en sangre 154,8 mEq/L (Simaraks et al. 2004), muy similares a las encontradas.

Tabla 50: Efecto de la dieta y de la infección con *Salmonella* sobre los electrolitos sanguíneos

Maíz	Infección	Ca (mg/L)	P (mg/dl)	K (mEq/L)	Na (mEq/L)
M37W		58,80±1,900 ^a	5,77±0,206	4,41±0,293	143,60±7,056
Ph3		51,57±2,229 ^b	5,97±0,335	4,68±0,296	149,76±0,547
	Valor P	0,011	0,636	0,478	0,3586
	NO	55,00±2,101	6,25±0,320 ^a	4,74±0,330	150,05±0,485
	SI	55,20±2,373	5,47±0,194 ^b	4,35±0,245	143,30±7,046
	Valor P	0,962	0,034	0,312	0,314
M37W	NO	56,50±1,572	5,79±0,329 ^{ab}	4,86±0,344	149,20±0,533
M37W	SI	61,10±3,404	5,74±0,266 ^{ab}	3,95±0,444	138,00±14,245
Ph3	NO	53,64±3,800	6,67±0,515 ^a	4,63±0,562	150,82±0,736
Ph3	SI	49,30±2,108	5,19±0,266 ^b	4,74±0,145	148,60±0,670
	Valor P	0,114	0,046	0,199	0,499

($n=20$, $n=10$ en cada grupo de interacción) Medias \pm error estándar. ^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias indican diferencias significativas ($P<0,05$).

Ca, Calcio; P, Fósforo; K, Potasio; Na, Sodio.

Tabla 51: *Bioquímica, efecto de la dieta y de la infección con Salmonella*

Maíz	Inf	Glucosa (mg/dl)	Proteína Total (g/L)	Albumina (g/L)	Globulina (g/L)	GOT (UI/L)
M37W		212,30±6,409	25,65±0,563	11,50±0,286	14,15±0,365	250,75±18,178
Ph3		213,38±4,734	24,76±0,521	11,05±0,327	13,71±0,250	252,14±24,540
<i>Valor P</i>		<i>0,921</i>	<i>0,214</i>	<i>0,275</i>	<i>0,277</i>	<i>0,923</i>
	NO	215,81±4,660	25,19±0,627	11,33±0,398	13,86±0,295	239,43±17,459
	SI	209,75±6,394	25,20±0,451	11,20±0,172	14,00±0,332	264,10±25,353
<i>Valor P</i>		<i>0,441</i>	<i>0,985</i>	<i>0,746</i>	<i>0,715</i>	<i>0,416</i>
M37W	NO	211,20±8,121	25,10±0,875	11,40±0,542	13,70±0,423	256,90±25,103
M37W	SI	213,40±10,355	26,20±0,712	11,60±0,221	14,60±0,581	244,60±27,506
Ph3	NO	220,00±5,025	25,27±0,935	11,27±0,604	14,00±0,426	223,55±24,397
Ph3	SI	206,10±7,903	24,20±0,359	10,80±0,200	13,40±0,221	283,60±43,277
<i>Valor P</i>		<i>0,2903</i>	<i>0,141</i>	<i>0,427</i>	<i>0,074</i>	<i>0,22</i>
Maíz	Inf	GPT (UI/L)	LDH (UI/L)	GGT (UI/L)	FAL (UI/L)	Bilirrubina (mg/dl)
M37W		2,40±0,222	4501,1±324,02	12,80±0,917	13597,4±846,27	0,066±0,017
Ph3		2,29±0,171	4329,3±520,57	12,48±1,164	12375±1048,75	0,10±0,034
<i>Valor P</i>		<i>0,654</i>	<i>0,738</i>	<i>0,815</i>	<i>0,36</i>	<i>0,329</i>
	NO	2,52±0,203	4945,1±528,97	12,71±1,205	12482,2±1049,6	0,12±0,036
	SI	2,15±0,182	3854,5±252,94	12,55±0,857	13485,6±852,78	0,05±0,008
<i>Valor P</i>		<i>0,153</i>	<i>0,064</i>	<i>0,913</i>	<i>0,453</i>	<i>0,08</i>
M37W	NO	2,70±0,367	5130,7±418,32	12,60±1,462	12822±1004,2	0,09±0,032
M37W	SI	2,10±0,233	3871,4±424,48	13,00±1,183	14373±1371,7	0,04±0,009
Ph3	NO	2,36±0,203	4776,3±958,75	12,82±1,949	12173±1833,4	0,14±0,063
Ph3	SI	2,20±0,291	3837,6±299,79	12,10±1,286	12598±1006,9	0,06±0,013
<i>Valor P</i>		<i>0,41</i>	<i>0,782</i>	<i>0,701</i>	<i>0,67</i>	<i>0,791</i>
Maíz	Inf	Creatinina (mg/dl)	Ácido. Úrico (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
M37W		0,28±0,006 ^a	7,07±0,569	129,65±4,442	46,11±1,328 ^a	89,85±3,208
Ph3		0,25±0,006 ^b	7,78±0,565	125,95±3,344	42,14±1,330 ^b	87,24±2,122
<i>Valor P</i>		<i>0,0002</i>	<i>0,33</i>	<i>0,446</i>	<i>0,022</i>	<i>0,441</i>
	NO	0,26±0,006	8,13±0,646 ^a	129,10±4,280	42,16±1,256 ^a	88,14±2,584
	SI	0,27±0,008	6,70±0,416 ^b	126,35±3,465	46,095±1,407 ^b	88,90±2,839
<i>Valor P</i>		<i>0,49</i>	<i>0,048</i>	<i>0,613</i>	<i>0,023</i>	<i>0,81</i>
M37W	NO	0,28±0,007	8,49±0,801	126,50±6,867	42,64±1,304	86,00±4,158
M37W	SI	0,29±0,009	5,65±0,527	132,80±5,825	49,58±1,751	93,70±4,782
Ph3	NO	0,25±0,008	7,81±1,023	131,45±5,494	41,72±2,142	90,09±3,249
Ph3	SI	0,25±0,009	7,74±0,458	119,90±2,742	42,61±1,611	84,10±2,456
<i>Valor P</i>		<i>0,476</i>	<i>0,059</i>	<i>0,091</i>	<i>0,075</i>	<i>0,06</i>

(n=20, n=10 en cada grupo de interacción) (P<0,05). Medias ±error estándar.

^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias indican diferencias significativas (P<0,05).

Inf, Infección; GOT, Transaminasa Glutámico Oxalacética; GPT, Transaminasa Glutámico Pirúvica; LDH, Lactato Deshidrogenasa; GGT, Gamma Glutamil Transpectidasa; FAL, Fosfatasa Alcalina; LDL, Colesterol LDL; HDL, Colesterol HDL.

Los valores de creatinina, son diferentes por efecto del maíz consumido, presentando los pollos que han comido maíz Ph3 valores menores de este analito (0,25±0,006 mg/L) (P=0,0002), no se ha observado efecto por la infección con *Salmonella* ni interacción entre los efectos principales. Los valores obtenidos en el experimento son inferiores a los

citados por Samour (2006) 0,90 mg/dl y similares a los citados por Sribhen et al. (2003) para pollos de 49 días (0,20 mg/dl), este autor describe una variación fisiológica significativa de la concentración de creatinina en los pollos comerciales que es dependiente de la edad, con tendencia a disminuir en pollo adulto.

La insuficiencia renal puede aumentar el valor de creatinina, también, algunas drogas, deshidratación o daño muscular (Lumeij 1987; Kamel et al. 1993; Misra et al. 2006; Senthilkumaran et al. 2014) Este analito junto con la lactato deshidrogenasa es el principal marcador bioquímico para daño muscular (Brancaccio et al. 2010).

La concentración de colesterol LDL en sangre, es significativamente menor en los pollos que comieron maíz Ph3 ($42,14 \pm 1,330$ vs. $46,11 \pm 1,328$ mg/dl), ($P=0,022$), se ha observado significación estadística para la infección con *Salmonella*, ($46,095 \pm 1,407$ vs. $42,16 \pm 1,256$ mg/dl) ($P=0,023$), sin que haya interacción entre los factores. En este estudio, el peso del hígado (Tabla 48), presenta las mismas tendencias y significaciones, se puede sugerir alguna alteración leve del metabolismo lipídico como causa común de ambas diferencias, no obstante se tratan de diferencias poco relevantes desde un punto de vista clínico (Samour 2006).

5.4.6 Recuento microbiológico

Se realizaron cultivos a los 14 y 21 días de vida (7 y 14 dpi, respectivamente) a partir de muestras de ciego, bazo e hígado para cultivo de salmonela en todos los grupos experimentales. Todos los tratamientos resultaron negativos a salmonela en el momento de iniciarse el ensayo (día 0) y a los 7 días (previo a la infección). Las siembras de los grupos no infectados, (T1, maíz M37W) y (T3, maíz Ph3) resultaron negativas en todas las muestras a 7 y 14 dpi.

Al final del experimento, los cultivos de heces, de los grupos infectados (T2, maíz M37W y T4, maíz Ph3) fueron positivos a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, las heces de los grupos no infectados (T1 y T3) fueron negativas.

No hay diferencias significativas entre los tratamientos infectados (T2 y T4) para los recuentos de colonias ($P>0,05$) en ningún tipo de tejido ni en ninguno de los dos momentos de control.

Aunque existe una reducción de los recuentos entre los 7 y los 14 días dpi, estos no son significativos para ningún órgano ni para ningún tratamiento.

Se observó que a los 7 dpi la *Salmonella* no había colonizado el bazo de algunos pollos. Fernández-Rubio et al. (2009) en un ensayo con dietas diferenciales con ácido butírico infectaron los pollos con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis a día 5 de vida y se sacrificaron a los 42 días de vida. Observaron como el butirato de sodio reduce de forma significativa ($P<0,05$) la infección a partir del día 27 de vida y la protección es efectiva en la fase tardía de la infección, no solo decrece la infección en los ciegos sino que en la dieta con grasa vegetal también afecta a la disminución de la infección en el buche, aunque no se han visto diferencias en el bazo.

La edad (7 días) a la que los pollos fueron sometidos al desafío con *Salmonella* ha hecho disminuir su sensibilidad a la salmonelosis y aunque fue posible aislar *Salmonella* en

algunos órganos la contaminación disminuyó rápidamente entre los días 7 y 14 dpi, efectos similares han sido descritos por Gast y Beard (1989) y Desmidt et al. (1997). El mapa genético de resistencia a *Salmonella* en los pollos, ha sido descrito por Calenge et al. (2010) localizando *locus* en 25 de los 38 cromosomas autosómicos.

Tabla 52: Número de colonias de *Salmonella* por órgano en los grupos infectados.

		T-2 (UFC/g)	T-4 (UFC/g)	P
Ciegos	7 dpi	6.936,00±4.159,249	13.471,00±4.501,100	0,307
	14 dpi	663,71±422,500	3.394,14±3.267,900	0,438
Bazo	7 dpi	397,60±320,000	3.358,00±3.273,900	0,402
	14 dpi	78,86±39,154	49,29±30,293	0,562
Hígado	7 dpi	397,57±319,590	78,86±39,150	0,359
	14 dpi	49,29±30,290	345,00±325,850	0,401

(n=7). T-2, M37W-infectado; T-4, Ph3 -infectado. Los resultados son la media y el error estándar para cada tejido y momento 7 y 14 días post infección (dpi).

5.4.7 Hematología

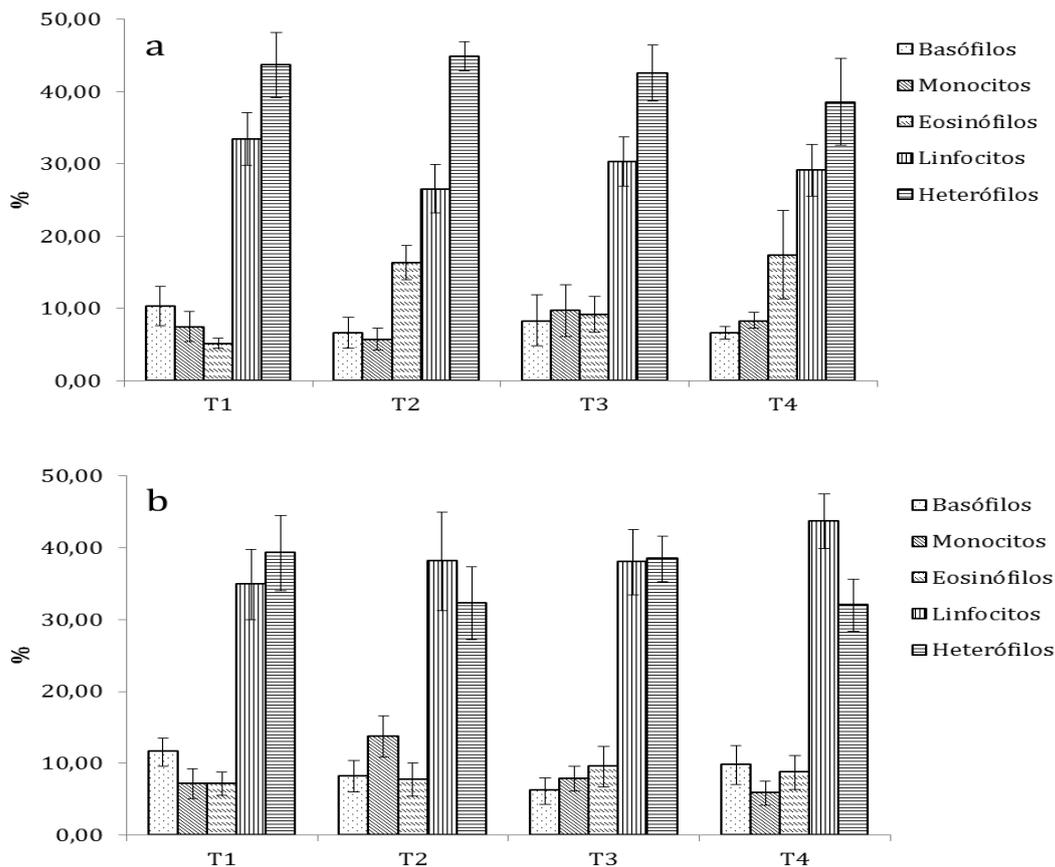


Fig. 37: Fórmula leucocitaria. (a), 7 dpi; (b) 14 dpi; T-1, M37W no infectado; T-2, M37W infectado; T-3, Ph3 no infectado; T-4, Ph3 infectado. (n=7).

No existen diferencias significativas en la fórmula leucocitaria (%) a 7 o a 14 dpi entre los tratamientos. Destacan los incrementos porcentuales de eosinófilos a 7 dpi en los tratamientos infectados con *Salmonella* (T-2 y T-4) frente a los no infectados (T-1 y T-3), los eosinófilos actúan como moduladores tempranos de la inflamación (Maxwell 1987), lo que explica en parte la reacción moderada de basófilos y heterófilos.

A 7 dpi, el predominio en la fórmula es de los heterófilos, a 14 dpi, corresponde a los linfocitos, por una respuesta incrementada en los tratamientos infectados (T-2 y T-4). La respuesta inmunitaria al desafío con *Salmonella* está basada tanto en la proliferación de linfocitos T como B, siendo más destacada la función de los linfocitos T en los casos de infecciones primarias que en infecciones secundarias, en cuyo caso cobran relevancia los linfocitos B mediante una respuesta humoral rápida (Beal et al. 2006).

Tabla 53: Efecto de la dieta y de la infección sobre hematocrito, hemoglobina y leucocitos.

7 dpi.				
Maíz	Infección	Hematocrito (%)	Hemoglobina¹ (g/dl)	Leucocitos (n/μl)
M37W		31,71±0,496		14542,90±979,443
Ph3		31,07±0,474		16142,90±792,944
<i>Valor P</i>		<i>0,2983</i>		<i>0,1698</i>
	NO	30,86±0,455		14285,70±918,123
	SI	31,91±0,486		16400,00±819,542
<i>Valor P</i>		<i>0,0881</i>		<i>0,0731</i>
M37W	NO	31,57±0,719		13371,43±1634,99
M37W	SI	31,86±0,738		15714,29±1013,11
Ph3	NO	32,00±0,690		17085,71±1314,28
Ph3	SI	30,14±0,459		15200,00±837,229
<i>Valor P</i>		<i>0,2057</i>		<i>0,842</i>
14 dpi				
Maíz	Infección	Hematocrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	Leucocitos (n/μl)
M37W		31,71±0,517	10,71±0,175	18400,00±0,1905,920
Ph3		32,14±0,553	10,83±0,172	17471,40±922,873
<i>Valor P</i>		<i>0,5305</i>	<i>0,5867</i>	<i>0,6182</i>
	NO	31,28±0,474	10,57±0,166	17257,10±1158,140
	SI	32,57±0,532	10,96±0,165	18614,30±1762,170
<i>Valor P</i>		<i>0,0669</i>	<i>0,086</i>	<i>0,4674</i>
M37W	NO	31,00±0,577	10,44±0,219	15600,00±1725,99
M37W	SI	32,43±0,782	10,97±0,247	21200,00±3185,68
Ph3	NO	31,57±0,782	10,70±0,255	18914,29±1384,85
Ph3	SI	32,71±0,778	10,96±0,240	16028,57±1038,70
<i>Valor P</i>		<i>0,834</i>	<i>0,5437</i>	<i>0,0288</i>

(n= 14, para grupos de interacción n=7).

^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias y día indican diferencias significativas (P<0,05).

¹La hemoglobina a 7 dpi no pudo determinarse por un error del laboratorio.

Hay interacción entre dieta e infección para la concentración de leucocitos (P=0,029), en el test HSD de Tukey no hubo diferencias significativas entre los grupos de interacción.

Se encontró interacción entre la dieta y la infección a 7 dpi en la concentración de eosinófilos ($P=0,016$), el grupo de interacción que presenta un concentración mayor es el de los pollos que han comido maíz Ph3 y han sido infectados (2893,71 por μl).

Tabla 54: Efecto de la dieta y de la infección con salmonela sobre la serie leucocitaria.

		7 dpi				
Maíz	Inf	Heterófilos (n/ μl)	Linfocitos (n/ μl)	Eosinófilos (n/ μl)	Basófilos (n/ μl)	Monocitos (n/ μl)
M37W		6621,14±649,091	4168,57±313,516	1653,71±372,334	1133,14±214,227	966,29±199,613
Ph3		6557,14±684,291	4784,00±457,344	2276,00±636,510	1113,71±231,77	1412,00±289,704
	Valor P	0,941	0,241	0,333	0,949	0,191
	NO	5883,43±654,231	4342,86±353,363	1775,43±633,993	1123,43±138,812	1160,57±185,038
	SI	7294,86±620,558	4609,71±440,929	2154,29±388,849	1123,43±283,472	1217,71±311,529
	Valor P	0,111	0,608	0,554	1	0,865
M37W	NO	6091,43±1097,385	4347,43±570,318	657,14±99,315	1218,29±223,474	1057,14±342,475
M37W	SI	7150,86±726,589	3989,71±300,013	2650,29±509,732	1048,00±382,772	875,43±229,397
Ph3	NO	7438,86±1064,844	5229,71±790,152	1658,29±559,806	1198,86±446,990	1560,00±573,476
Ph3	SI	5675,43±797,541	4338,29±464,557	2893,71±1146,758	1028,57±174,809	1264,00±165,873
	Valor P	0,685	0,234	0,016	0,575	0,480
		14 dpi				
Maíz	Inf	Heterófilos (n/ μl)	Linfocitos (n/ μl)	Eosinófilos (n/ μl)	Basófilos (n/ μl)	Monocitos (n/ μl)
M37W		6880,29±1262,600	6152,29±630,16	1251,14±208,407	1802,86±291,983	2313,43±732,448
Ph3		6167,14±587,788	7022,57±487,378	1633,71±381,475	1410,00±312,137	1238,00±246,403
	Valor P	0,583	0,235	0,354	0,340	0,124
	NO	6782,57±669,157	6081,14±510,019	1421,14±333,409	1572,86±305,305	1399,43±308,944
	SI	6264,86±1225,200	7093,71±603,503	1463,71±288,712	1640,00±308,601	2152,00±724,187
	Valor P	0,690	0,169	0,917	0,869	0,276
M37W	NO	6242,86±1039,067	5189,71±695,522	1000,00±148,931	1912,57±415,731	1254,86±506,808
M37W	SI	7517,71±2385,973	7114,86±963,419	1502,29±380,798	1693,14±438,849	3372,00±1301,678
Ph3	NO	7322,29±873,834	6972,57±615,267	1842,29±632,770	1233,14±438,878	1544,00±387,012
Ph3	SI	5012,00±537,376	7072,57±806,190	1425,14±464,436	1586,86±468,139	932,00±286,540
	Valor P	0,173	0,213	0,267	0,485	0,054

(n= 14, para grupos de interacción n=7).

^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias y día indican diferencias significativas ($P<0,05$)

5.5 CONCLUSIONES

1. El consumo de maíz rico en carotenoides Ph3 no afecta el grado de contaminación por *Salmonella enterica* serovar Enteritidis tras una infección experimental, valorada por el recuento bacteriano en ciegos, hígado y bazo.
2. De acuerdo con el peso relativo del hígado, hubo una respuesta más temprana en los pollos que comen maíz Ph3 (7dpi) y esta desaparece antes que en los pollos que comen maíz M37W (14 dpi). El efecto de la infección con *Salmonella* en el tamaño del hígado es significativo a los 14 dpi. En el bazo hay una reacción temprana a la infección con *Salmonella* (7dpi), el efecto del consumo de maíz con carotenoides, determina diferencias para este órgano a 14 dpi. La bolsa de Fabricio fue mayor a los 21 días de edad en los pollos que comieron maíz Ph3, con independencia del efecto infección.
3. La salud de los pollos, valorada a través del hemograma y del estudio bioquímico del suero, no se ha visto afectada ni por el consumo de maíz Ph3 rico en carotenos ni por la infección con *Salmonella*. Aunque algunas variables se vieron afectadas dentro del rango de normalidad.
4. El desafío infeccioso con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis no ha producido diferencias significativas en el peso de los pollos a 7 o 14 dpi. Los pollos que comieron maíz Ph3, pesaron menos, como consecuencia de un menor consumo de pienso.
5. La infección experimental con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis no afectó la evolución del color en la piel de las patas. El consumo de una dieta con un 52,24 % de maíz Ph3 genera en la piel valores cromáticos significativamente más intensos y anaranjados.

ENSAYO IV

Respuesta al desafío experimental con *Coccidia* en
pollos alimentados con maíz Ph3 fortificado en
carotenoides

Ensayo IV

Respuesta al desafío experimental con *Coccidia* en pollos alimentados con maíz fortificado en carotenoides Ph3

6.1 INTRODUCCIÓN

La coccidiosis es una enfermedad producida por parásitos protozoarios de tamaño microscópico, conocidos como coccidios, pertenecientes al phylum Apicomplexa; un grupo de protistas caracterizado por la presencia de un orgánulo único denominado complejo apical, que incluye diferentes familias y géneros de parásitos de gran importancia económica y sanitaria (subórdenes, *Coccidia*, *Piroplasma*, y *Plasmodium*) (Vegad y Katiyar 2001)

Dentro del phylum Apicomplexa, la familia Eimeriidae provoca enfermedades que afectan a la mayoría de los animales criados comercialmente para consumo, por ejemplo, aves de corral (gallinas, gallos, pollos, pavos, patos, ocas, etc.), mamíferos domésticos (ovejas, vacas, cerdos, caballos, búfalos de agua, etc.), etc.

El ciclo de vida de estos parásitos depende del género y de la especie, y la mayoría de ellos completan el ciclo en un único hospedador. En el caso del género *Eimeria* que afectan a *Gallus gallus*, el ciclo se desarrolla en un único hospedador; cada especie de *Eimeria* presenta un periodo concreto de prepatencia (tiempo entre la infección y la eliminación de ooquistes) y patencia (duración de la excreción de ooquistes) (en general, entre 2 y 12 días dependiendo de la especie). La diseminación de los ooquistes, dentro y fuera de la granja, se realiza mediante heces, cama, polvo, artrópodos, herramientas, etc. (McDougald y Fitz-Coy 2013)

La coccidiosis se caracteriza por su gran morbilidad y puede dar lugar a infecciones clínicas o sub-clínicas. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea que puede ser hemorrágica, fiebre, anorexia, astenia y, a veces, anemia, ocasionando una disminución de las tasas de crecimiento y producción con grandes pérdidas económicas. La infección por algunas de las especies más patógenas, como *Eimeria tenella*, desencadena un alto índice de mortalidad. Esta enfermedad causa un elevado impacto económico en la industria mundial del pollo, se estima unas pérdidas de unos 3 mil millones de dólares (Qi et al. 2013).

Se han realizado numerosos esfuerzos para frenar y controlar los riesgos de la coccidiosis a la vista de la extraordinaria resistencia de sus agentes etiológicos a los procedimientos aplicados contra ellos (Chapman 1993).

Las distintas medidas aplicadas en la lucha frente a la coccidiosis pueden agruparse en medidas de orden terapéutico basadas en el empleo de anticoccidiales, tales como coccidiostáticos y coccidicidas y medidas de orden preventivo basadas en inmunizaciones (Blake y Tomley 2014). Los coccidiostáticos son productos que inhiben o detienen el desarrollo de los parásitos, mientras que los coccidicidas son productos que destruyen dichos parásitos. Los coccidiostáticos, al no eliminar totalmente los ooquistes, permiten el desarrollo de inmunidad en las aves, utilizándose especialmente en pollos de engorde. Los coccidicidas, al destruir los parásitos, inhiben el desarrollo de la inmunidad por lo que

actualmente se usan cuando aparecen problemas clínicos en los lotes de aves.(Long y Jeffers 1986)

Además, se cree que los productos anticoccidiales no actúan sobre todas las especies de *Eimeria* y que pueden inducir resistencia después de un uso continuado. La coccidiosis se controla con productos químicos llamados coccidiostáticos que se añaden al pienso. A raíz de la introducción de los coccidiostáticos en la alimentación de las aves, disminuyeron los casos severos de coccidiosis; no obstante, la aparición de resistencias frente a los coccidiostáticos y la presión ejercida por los consumidores en demanda de carne sin residuos farmacológicos han limitado el uso de estos fármacos en alimentación animal (Shirley 1995). En el marco legal europeo, el Reglamento (CE) N° 1831/2003, establece la supresión progresiva de la utilización de los coccidiostáticos y los histomonóstatos como aditivos para alimentación animal.

Por otra parte, a falta de desarrollo de nuevas moléculas, la coccidiosis vuelve a generar graves problemas económicos, porque el uso extendido de los coccidiostatos ha causado la aparición de cepas de *Eimeria* resistentes (Ola-Fadunsin y Ademola 2013).

También existen programas vacunales para el control de la coccidiosis, la inmunidad transferida es de tipo celular y se produce por el contacto de esporozoitos y merozoitos que son los estadios infectantes que generan más inmunidad y son diferentes para cada especie de *Eimeria*. Los tipos de vacunas se diferencian por el número y especies de *Eimeria* que incorporan, así como por el grado de atenuación de las mismas (Shirley y Bedrník 1997). Se especula también sobre el papel positivo de la inmunidad maternal (Wallach et al. 1995)

De forma general, las cepas de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos han estimulado la búsqueda de tratamientos alternativos para el control de enfermedades como el uso de extractos vegetales con actividad antioxidante y vitaminas A, E y C (Kidd, 2004). Con la suplementación de estos aditivos se ha visto que los niveles de protección inmune se han mantenido altos en animales sometidos a presiones de estrés e infecciones debido a sus propiedades antioxidantes (Ola-Fadunsin y Ademola 2013).

Otros estudios han demostrado que el extracto de un compuesto antioxidante, proantocianidina de semilla de uva, incorporado en la dieta de pollos tiene efectos beneficiosos en el tratamiento de la coccidiosis causada por *E. tenella* (Wang et al. 2008). Sin embargo otros estudios como el de Allen y Fetterer (2002) demuestran que los antioxidantes en la dieta de las aves no son efectivos en el tratamiento frente a *E. tenella*, pero sí de infecciones causadas por *E. acervulina* y *E. maxima*.

El efecto de los carotenoides en la infección coccidial crónica, ha sido estudiada por Sepp et al. (2011), concluyendo que cuando la concentración de carotenoides es suficientemente elevada, estos tienen un efecto inmunomodulador cuyo estudio es complejo.

La pododermatitis o dermatitis plantar es una condición de la piel de la cara plantar de la garra de los pollos cuyo origen está en una dermatitis por contacto que se caracteriza por lesiones inflamatorias y necrosis que pueden ser desde superficiales a profundas,

pudiendo estas últimas producir abscesos que afectarán a las almohadillas plantar y a las interdigitales (Greene et al. 1985).

Esta enfermedad causa decomisos y descatalogaciones de producto, perjudicando el mercado de patas de pollo que durante el año 2008 generó unas ventas de 280 millones de dólares. Además se ha convertido también en un problema de bienestar para los pollos, tanto en Estados Unidos como en Europa (Shepherd y Fairchild 2010).

Estos problemas han sido descritos en pavos y en pollos, citando entre sus causas la humedad en la yacija y sus orígenes, alta densidad, diarrea, manejo o diseño incorrecto de los bebederos, malabsorción de nutrientes y el uso o no de enzimas en el pienso (Shepherd y Fairchild 2010), el tipo de yacija (Sirri et al. 2007) o la selección genética (de Jong et al. 2012) también han sido citadas entre las causas concomitantes.

Se han descrito casos de pododermatitis tras la aparición de brotes de coccidiosis; las lesiones presentadas en la cara plantar de la pata tenían forma de coliflor y se ha visto que van evolucionando en el tiempo desde abrasión, inflamación, hasta la úlcera con tejido necrótico. La gravedad y la prevalencia, van aumentando con la edad del lote a partir de los 20 días de edad (Greene et al. 1985).

La evolución histopatológica de la lesión implica, la presencia de heterófilos como agentes de respuesta inmune, edema de la dermis e hiperplasia de la epidermis, trombosis y necrosis vascular así como destrucción del tejido en la parte central de la úlcera, que es substituido por material de detritus (Greene et al.1985).

Los carotenoides han demostrado actuar en algunos procesos bioquímicos reduciendo el estrés oxidativo celular, la inflamación y la degeneración celular (Obulesu et al. 2011).

Como base genética se ha utilizado la variante isogénica blanca (*wild type*) sudafricana del maíz (M37W), que no tiene carotenos, debido a la ausencia de la enzima fitoeno sintasa necesaria para la biosíntesis de estos metabolitos (Zhu et al. 2008). Se introdujeron 2 genes: *Zmpsy1* (*Zea mays* fitoeno sintasa 1) y *Pacr1l* (*Pantoea ananatis* fitoeno desaturasa) obteniéndose el Fenotipo 3 (Ph3) con el objetivo de conseguir una expresión genética elevada de carotenoides en la planta, la técnica de transgénesis empleada fue la transformación nuclear combinatoria que es un método que permite obtener una rápida producción de variantes transgénicas de plantas (Zhu et al. 2008).

Los carotenoides son generados en los plastos de las plantas a partir de geranil geranil di fosfato (GGPP). Este elemento sigue una serie de transformaciones biológicas catalizadas por enzimas, como la fitoeno sintasa. Se introdujeron los genes mencionados que codifican para expresar las enzimas necesarias en este proceso que acaba en la obtención de carotenos

6.2 OBJETIVOS

El objetivo de este ensayo es comparar el efecto de la dieta con maíz Ph3 rico en carotenoides en pollos infectados experimentalmente con coccidios. Para ello se estudiaron parámetros de producción, de color, sanitarios y el efecto sobre el sistema inmune en pollos que han sido infectados experimentalmente con *Eimeria tenella*.

Adicionalmente se estudia el efecto de la dieta con maíz Ph3 enriquecido en carotenoides en la incidencia y gravedad de las lesiones por pododermatitis en un modelo de estudio generado tras la infección experimental por coccidia (*E. tenella*).

6.3 MATERIAL Y MÉTODOS

6.3.1 Elaboración de las dietas

Para conseguir el objetivo, se diseñó el experimento con cuatro grupos de pollos, dos alimentados con pienso elaborado con maíz transgénico multivitamínico y dos alimentados con la misma fórmula de pienso pero elaborado con el maíz isogénico control (*wild type*) y en cada uno de los dos grupos la mitad se desafiaron con *Eimeria tenella*.

El maíz empleado en este ensayo fue sembrado y recolectado en plantaciones en el estado de Louisiana en Estados Unidos. Una vez fue finalizado el período de crecimiento y maduración, se cosechó se secó y se envió el maíz a la Universidad de Lleida para realizar las pruebas necesarias, se trituró, liofilizó y se comenzó con el proceso de elaboración de los piensos para la prueba.

Antes de la preparación de los piensos, el maíz Ph3 se molió para posteriormente ser liofilizado. Este proceso se realizó para conservar las características organolépticas y nutritivas y, reducir las pérdidas de los componentes volátiles o termosensibles a partir de un proceso de conservación que combina la congelación y la deshidratación (Ramírez 2006).

La elaboración de las dietas, control y experimental, se realizó según las recomendaciones publicadas por National Research Council (1994) para la alimentación de pollo, actualizadas por fórmulas comerciales recientes (Aviagen 2008) y elaboradas en el centro de investigación del IRTA Mas de Bover, de Reus. El pienso se formuló sin incluir productos anticoccidiales.

Tabla 55: *Formula completa del pienso según el porcentaje de ingredientes.*

Ingrediente	Porcentaje
Maíz blanco / amarillo	52,241
Soja 47,5% Brasil	36,156
Aceite de soja	6,801
Fosfato Mono cálcico	1,523
Carbonato de calcio	1,455
Sal	0,347
Metionina	0,326
Complemento de pollos Pre	0,303
Corrector básico*	0,303
Lisina en polvo 79% base	0,269
Bicarbonato de sosa	0,233
Colina 60%	0,051
Treonina	0,042

*Corrector: Vitamina A, 10.000 UI/Kg; vitamina D3, 2.000 UI/Kg; vitamina E, 80 UI/kg; vitamina B1, 2 mg/kg, vitamina B2 8 mg/kg; vitamina B6, 4 mg/kg; vitamina B12 0,02 mg/kg; vitamina K; 2,25 mg/kg; ácido fólico, 1 mg/kg; ácido nicotínico, 40 mg/kg; ácido pantoténico 11,7 mg/kg; biotina, 0,1 mg/kg; cobre, 6 mg/kg; zinc 54 mg/kg; hierro, 40 mg/kg; manganeso, 77 mg/kg; cobalto, 0,2 mg/kg; selenio, 0,45 mg/kg; iodo, 2,25 mg/kg; BHT antioxidante, 125 mg/kg.

Para la elaboración del pienso, primero se hizo una premezcla con la soja, el aceite de soja y los minerales. Cuando estuvo todo mezclado se hizo una segunda mezcla con el maíz triturado dentro una mezcladora durante 5 minutos hasta que el pienso tuvo una textura consistente y fina sin grumos. El pienso se envasó al vacío y se guardó a 4°C hasta su utilización.

6.3.2 Diseño experimental

Se planteó un diseño con cuatro tratamientos: T1, comen maíz M37W y no son infectados; T2, comen maíz M37W y son infectados; T3, comen maíz Ph3 y no son infectados; T4 comen maíz Ph3 y son infectados.

Para realizar la prueba se utilizaron 56 pollos machos de la línea Ross 308, 14 por tratamiento, que se alojaron aleatoriamente en 4 aisladores con 14 animales en cada uno, seguidamente cada uno de los aisladores fue asignado a un tratamiento.

Los pollos de los grupos T2 y T4 fueron infectados a los 13 días de edad con 30.000 ooquistes esporulados de *Eimeria tenella* cepa Houghton (Chapman y Shirley 2003) (Laboratorios Hipra, Amer). Se realizaron necropsias a los 6 y a los 8 días post-infección (dpi). La dieta experimental de cada uno de los cuatro grupos se inicia el día 1 y se mantiene hasta el final del ensayo.



Fig. 38: Aplicación del inóculo de coccidios a los 13 días de vida.

El ensayo se realizó en condiciones de aislamiento microbiológico en las instalaciones del Centro de Sanidad Avícola de Cataluña y Aragón, (CESAC) de Reus utilizando cuatro aisladores, uno para cada grupo de pollos.

Este diseño experimental fue aprobado previamente por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Lleida y autorizado por el Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya.

6.3.3 Cría y condiciones ambientales

Los 56 pollos machos de la estirpe Ross 308 se alojaron en los aisladores el primer día de vida, procedentes de una incubadora comercial. Cuando llegaron se recogieron los fondos de caja para analizar las heces y detectar presencia de coccidios, se pesaron individualmente y se formaron los grupos descritos en el procedimiento experimental.

Cada aislador estaba equipado con bebederos de tetina y comederos de pollos de primera edad. A los 16 días de vida los comederos de primera edad se sustituyeron por comederos de adultos para optimizar el acceso al pienso.

El suministro de agua fue automático en todo momento desde el inicio del experimento hasta el final; el pienso fue suministrado manualmente a partir de los sacos destinados a cada tratamiento.

La infección experimental de los pollos se realizó el día 13 de vida mediante la aplicación oral de un inóculo con una jeringa de 1 ml. Se introdujo la jeringa por el esófago y se liberó el contenido con el agente infeccioso en su interior.

Las condiciones de luz, humedad y temperatura fueron ajustadas automáticamente de acuerdo con las recomendaciones de Aviagen (2010) para el pollo de engorde. Tanto las condiciones ambientales como el estado de salud de los pollos fue controlado diariamente por el personal técnico del CESAC y por el veterinario responsable de salud y bienestar de los animales de experimentación de la Universidad de Lleida.

El día 19 de vida (6 dpi) se sacrificó la mitad de los pollos (7 por tratamiento) y el día 21 (8 dpi) se sacrificaron los 7 restantes; inmediatamente después del sacrificio se procedió a la necropsia.

6.3.4 Recogida de datos

6.3.4.1 Color y crecimiento

Se midió individualmente el color de las patas de los pollos los días 4, 11, 18 y 21, usando un espectrofotómetro CM-700d portátil compacto, Konica Minolta (Japón) con un diámetro de máscara de 3 mm, el iluminante D65 y el ángulo de observación de 10°. Los resultados obtenidos eran expresados a partir del sistema tricromático CIELab, luminosidad (L^*), eje verde-rojo (a^*) y eje azul-amarillo (b^*).

Semanalmente se realizó el control del consumo de pienso, tarando el pienso existente en las tolvas de alimentación, cada vez que se añadió pienso a un tratamiento, este fue pesado. Los pollos se pesaron individualmente al inicio, a los 7, 14, 19 y 21 días todos los pesos se tomaron con una balanza de precisión Electronic Balance Model FX-1200 (A&D Corporation, U.S.A.). Durante las manipulaciones siempre se tuvieron en cuenta los principios de bioseguridad para evitar contaminaciones o recontaminaciones.

6.3.4.2 Muestras biológicas

Se recogieron heces de diferentes puntos de la jaula en el momento del alojamiento de los pollos, y posteriormente los días 19 y 21 de vida. Se emplearon guantes limpios en cada tratamiento y espátulas desechables en cada recogida de heces, estas se usaron para determinar la presencia de ooquistes en las mismas.

La extracción de sangre antes de la necropsia se realizó, a 5 pollos por grupo y se extrajo de la vena alar (formalmente, *Vena radialis* y *Vena ulnaris superficialis*). Primero se empezó el proceso con los grupos 1 y 3 que no fueron infectados con coccidia, y se usó material estéril diferente con cada grupo de pollos. La sangre se usó para las determinaciones bioquímicas.

El sacrificio y la toma de muestras se efectuaron en la sala de necropsias del CESAC, previamente limpiada y desinfectada. Las superficies de contacto en el área de trabajo así como el material fueron estériles. Para evitar contaminaciones se empezó con los grupos 1 y 3, controles no infectados. Se realizó la necropsia a los animales de cada grupo por separado en una mesa diferente y con el material de necropsia diferente. Cuando se hizo la necropsia de los grupos infectados el material de necropsia era individual para cada pollo y se cambió después de la extracción de cada víscera.

En el momento de las necropsias se colocaron los pollos de cada grupo numerados en la mesa y se extrajo y pesó el hígado, el bazo y la bolsa de Fabricio de todos los pollos. Por cada tratamiento se tomaron 5 muestras procedentes de pollos diferentes de hígado, bazo, bolsa de Fabricio, timo y ciegos y se conservaron en formal al 10% para estudio histológico.

6.3.4.3 Lesiones en ciegos

El índice de lesiones en los ciegos se obtiene comparando patrones de imágenes con la lesión real de los ciegos y se dio el valor de 0 a 4 a cada pollo siendo 0 cuando no hay lesiones y 4 cuando los ciegos están muy lesionados. Se siguió el protocolo establecido para los experimentos de *Eimeria tenella* (Johnson y Reid 1970). Todas las valoraciones fueron realizadas por la misma persona, experta en patología aviar.



Fig. 39: Ciegos preparados para la valoración externa de lesiones.

Primero se presentaron los ciegos junto con íleon y recto de todos los pollos de cada tratamiento y se procedió a su valoración externa, posteriormente con las técnicas de asepsia descritas previamente, fueron abiertos los ciegos para proceder a la valoración de las lesiones.

6.3.4.4 Recuento de ooquistes

Se pesan dos gramos de heces de la muestra homogenizada que se diluyen con 60 ml de solución salina saturada. Se agita la dilución con un imán durante 10 minutos.

Se toma una muestra de la superficie con una pipeta desechable de 1ml y se llenan las dos partes de una cámara de McMaster. Se cuentan los ooquistes observados en las dos rejillas de las 2 cámaras. Para obtener los ooquistes por gramo de heces se multiplica el resultado obtenido por 200. Se tomaron 2 muestras por grupo y se hicieron dos recuentos por muestra.

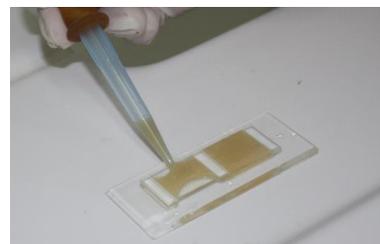


Fig. 40: Carga de la cámara de McMaster para recuento de ooquistes

6.3.4.5 Pododermatitis y lesiones de las patas

Para valorar las lesiones en las patas, se seccionó la pata derecha de cada pollo a la altura de la articulación tibio-tarsal, posteriormente se lavaron con agua para eliminar la suciedad de las mismas y se dejaron secar a temperatura ambiente.

La valoración de las lesiones fue realizada inmediatamente por un experto en patología aviar, utilizando para ello luz natural y cuando fue necesario lupa binocular con iluminante incandescente.

Se observó el grado de dermatitis según la escala de daños que comprende los niveles del 0 (sin lesiones) al 4 (con lesiones severas) en las patas de las aves según la guía de evaluación de la calidad del pollo (Welfare Quality® 2009). También se contaron el

número de úlceras individuales en la cara plantar patas. La evaluación en la escala y el recuento se hizo en 8 pollos al día 6 (dpi).

Para determinar la humedad del material de yacija, se tomaron muestras de diferentes áreas del suelo del aislador y a diferentes profundidades y se mezclaron en una muestra, el proceso se repitió tres veces en cada aislador. Las muestras fueron procesadas inmediatamente en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad de Lleida, mediante secado en estufa durante 24 horas.

6.3.5 Análisis estadístico

Se analizó el crecimiento, el color, peso relativo de las vísceras, variables bioquímicas en sangre, lesiones, excreción de ooquistes e histología.

Los datos fueron procesados con un modelo estadístico lineal generalizado (GLM) (JMP® Pro 11 SAS Institute, 2013) donde el tipo de maíz y la infección o no con *Coccidia* fueron los efectos principales en un análisis de varianza de dos vías completamente aleatorizado, se ha incluido la interacción entre los dos efectos principales. Para el análisis *post hoc* se ha empleado el test HSD Tukey.

En el estudio de las diferencias entre medias del recuento parasitario, se ha usado el test t-Student. Los valores de tablas y gráficos expresan la media y el error estándar.

En el estudio de las variables cualitativas, se ha empleado, tablas de contingencia y test χ^2 , las diferencias entre niveles de una misma variable se han determinado por comparación de proporciones de columna (prueba z).

Los datos expresados en porcentaje fueron transformados mediante una función arcsen para lograr una distribución normal (Snedecor y Cochran 1989). Cuando fue necesario se normalizaron los valores con la función raíz cuadrada más 0,5 antes de proceder al análisis estadístico.

Se han considerado significativos los valores $P < 0,05$.

6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4.1 Dieta

Los dos tipos de maíz fueron analizados en un laboratorio independiente (Covitsa, Lleida), para determinar la composición nutricional

Tabla 56. *Análisis nutricional.*

		M37W	Ph3	
Maíz	Proteína (%)	11,53	12,55	
	Fibra (%)	4,05	5,49	
	Grasa (%)	2,55	3,48	
	Cenizas (%)	1,69	1,27	
	Humedad (%)	12,76	6,44	
Pienso	Proteína (%)	23,28	23,80	
	Fibra (%)	4,04	3,79	
	Grasa (%)	8,92	9,10	
	Cenizas (%)	6,35	6,31	
	Humedad (%)	11,18	8,37	
	Carotenoides			
	Violaxantina	0,12±0,005	1,15±0,09***	
	Luteína	0,95±0,13	1,9±0,045***	
	Zeaxantina	0,36±0,009	5,75±0,224***	
	α-Criptoxantina	nd	1,66±0,063	
β-Criptoxantina	0,22±0,009	1,6±0,067***		
β-Caroteno	0,06±0,005	1,23±0,036***		

(Para carotenoides, n=5); *** P<0,001; nd, no detectado.

Se analizaron las micotoxinas del pienso (Servicio Científico Técnico de Calidad Microbiológica en el Sector Agroalimentario, Universidad de Lleida). La concentración de micotoxinas es muy baja, incluso inferior a la publicada por Brake et al.(2003) en un estudio similar y en algunos casos indetectable.

Tabla 57. *Resultado del análisis de micotoxinas en el pienso y el maíz.*

Tipo de grano	ZEA (ppb)	DON (ppb)	T-2 (ppb)	FUMO (ppm)	OTA (ppb)	AFT (ppb)	AFB1 (ppb)
Maíz M37W	nd	nd	6,73	1,06	2,77	nd	nd
Maíz Ph3	nd	nd	6,73	0,63	2,71	nd	nd
Pienso M37W	nd	nd	8,76	0,46	2,56	0,65	0,35
Pienso Ph3	nd	15,47	7,20	0,28	2,66	nd	nd

ZEA: zearalenona; DON: deoxynivalenol; T-2: toxina T-2; FUMO: fumonisinas totales; OTA: ocratoxina A; AFT: aflatoxinas totales; AFB1: aflatoxina B1; nd: No detectado.

6.4.2 Consumo y crecimiento

Como es de esperar, las diferencias de peso encontradas a 14, 19 y 21 días de vida son debidas al efecto de la infección por coccidia (P=0,002, P<0,001 y P=0,042) y únicamente hay interacción entre el tipo de maíz consumido y la infección o no con coccidia a los 19

días (8 dpi) ($P=0,033$). No ha habido interacción entre los factores en ningún momento del estudio.

En la Fig. 41 se observa la diferencia de peso entre los tratamientos infectados y no infectados.

Tabla 58: Efecto del tipo de maíz y desafío infeccioso sobre el peso de los pollos a 14,19 y 21 días de edad.

Maíz	Infección	Peso (kg)					
		14 días (n=28)		19 días (n=28)		21 días (n=14)	
		Media	EE	Media	EE	Media	EE
M37W		457,69	9,450	693,27 ^b	22,535	939,90	29,630
Ph3		468,38	10,408	746,99 ^a	17,053	961,33	39,381
Valor P		0,398		0,033		0,619	
	NO	483,25 ^a	11,059	772,39 ^a	16,475	993,51 ^a	37,504
	SI	442,82 ^b	6,869	664,95 ^b	19,387	902,85 ^b	22,618
Valor P		0,002		<0,0001		0,042	
M37W	NO	483,86	12,734	753,88	19,362	1014,68	29,169
M37W	SI	431,51	10,169	632,67	34,196	865,12	27,840
Ph3	NO	482,64	18,596	790,90	26,456	972,33	71,824
Ph3	SI	454,12	8,539	699,71	11,522	948,12	26,677
Valor P		0,346		0,529		0,133	

(Para grupos de interacción, $n_{7y19 \text{ días}}=14$, $n_{21 \text{ días}}=7$)

^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias y día indican diferencias significativas ($P<0,05$).EE, error estándar.

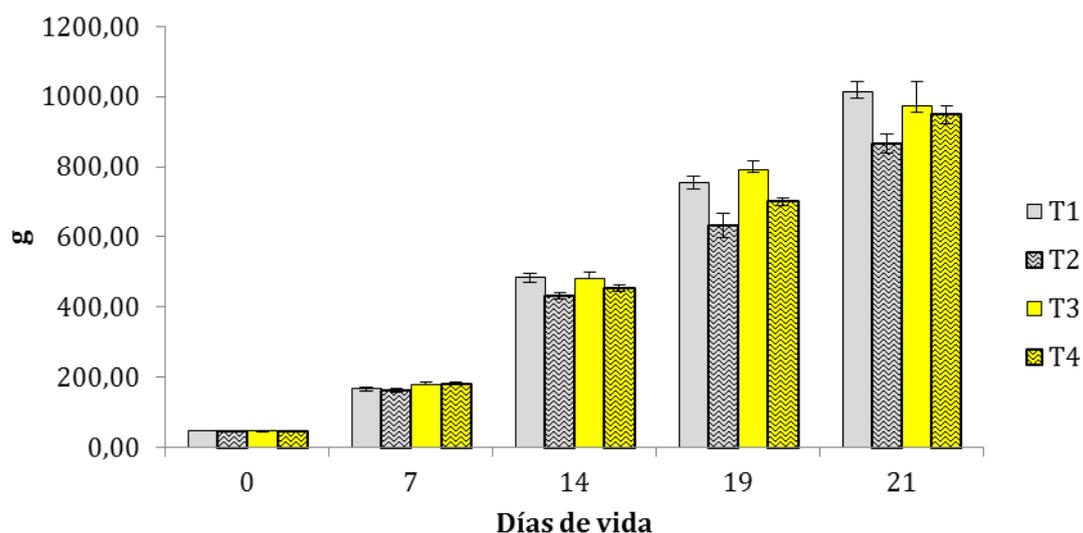


Fig. 41: Evolución del peso de los pollos en los grupos. T-1, M37W no infectado; T-2, M37W infectado; T-3, PH-3 no infectado; T-4, PH-3 infectado

Una mayor afectación por la infección de coccidios en el grupo T2 (M37W e infectado), pudo provocar un menor crecimiento en los pollos del grupo que fue infectado pero no ingirió carotenos. La reducción de peso en el conjunto de lotes de pollos que han sufrido brotes de coccidiosis se estima en 100 g por pollo (Williams 1999)

Tabla 59: *Consumo e índice de conversión en cada periodo por tratamiento.*

		Consumo (g/día/pollo)	IC por periodo (g/g)
7 días	T1	15,07	0,632
	T2	25,60	1,114
	T3	21,86	0,845
	T4	21,89	0,848
14 días	T1	48,28	1,067
	T2	41,60	1,078
	T3	57,94	1,345
	T4	42,99	1,101
19 días (6 dpi)	T1	82,57	1,223
	T2	84,91	1,448
	T3	85,29	1,092
	T4	82,03	1,688
21 días (8 dpi)	T1	101,44	1,167
	T2	73,73	1,074
	T3	97,98	1,210
	T4	74,63	1,596

T-1, M37W no infectado; T-2, M37W infectado; T-3, PH-3 no infectado; T-4, PH-3 infectado.

El consumo de pienso entre los día 19 y 21, cuando la coccidiosis clínica en los grupos infectados ya está bien instaurada ha descendido 25,6 % por debajo del consumo de los pollos no infectados.

6.4.3 Peso de las vísceras

El consumo de maíz Ph3 afecta al peso relativo de bazo (P=0,004) siendo mayor el de los pollos que han comido maíz Ph3 fortificado en carotenoides (0,90 vs. 0,67 g/Kgpv).

La infección con coccidios afecta al peso relativo de hígado, bazo y bolsa de Fabricio (P<0,001, P= 0,003, P= 0,003 respectivamente) que son mayores en los pollos infectados que en los no infectados.

Se ha hallado interacción entre tipo de maíz e infección en la variable peso relativo del hígado (P=0,006), resultando diferencias significativas en el análisis *post hoc* entre los pollos que han comido maíz M37W y que han sido infectados (34,70 g/kgpv) frente a los que han comido el mismo tipo de maíz pero no han sido infectados (23,94 g/kgpv). Los pollos que han comido maíz Ph3 independientemente de la infección, no presentan diferencias en el peso relativo del hígado. La infección con coccidios ha provocado un incremento de tamaño relativo de hígado menor en los pollos que han comido maíz Ph3, sugiriendo un efecto protector en este órgano (28,97 g/kgpv).

Aunque está poco documentada en la bibliografía, es posible la infección con coccidios vía

ascendente desde el duodeno y por los conductos cístico y cístico-entérico de algunos tramos de las vías biliares (Long 1970; Long y Millard 2009), especialmente cuando se realizan desafíos masivos. El incremento de peso del hígado como consecuencia de los procesos inflamatorios hepáticos agudos es posible en el presente ensayo y el efecto inmunomodulador de los carotenoides administrados a altas dosis en la dieta se ha podido reflejar en la interacción detectada (Sepp et al. 2011).

Tabla 60: *Peso relativo (g/kgpv) de los órganos.*

Maíz	Infección	Hígado (n=8)		Bazo (n=8)		Bolsa de Fabricio (n=8)	
		Media	EE	Media	EE	Media	EE
M37W		28,30	2,077	0,67 ^b	0,054	2,21	0,220
Ph3		27,48	1,273	0,90 ^a	0,076	2,31	0,144
<i>Valor P</i>		<i>0,631</i>		<i>0,004</i>		<i>0,654</i>	
	NO	23,94 ^b	1,461	0,67 ^b	0,065	1,92 ^b	0,150
	SI	31,84 ^a	1,322	0,91 ^a	0,066	2,61 ^a	0,176
<i>Valor P</i>		<i><,0001</i>		<i>0,003</i>		<i>0,003</i>	
M37W	NO	21,89 ^c	1,544	0,61	0,083	1,70	0,125
M37W	SI	34,70 ^a	2,097	0,73	0,066	2,73	0,341
Ph3	NO	25,99 ^{bc}	2,359	0,72	0,101	2,13	0,261
Ph3	SI	28,97 ^{ab}	0,864	1,08	0,073	2,49	0,108
<i>Valor P</i>		<i>0,006</i>		<i>0,122</i>		<i>0,129</i>	

^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias indican diferencias significativas. (P<0,05). EE, error estándar.

6.4.4 Colorimetría

Se diseñó un modelo lineal generalizado donde la variable respuesta es el valor de L*, a* y b*, los efectos del modelo fueron el tipo de maíz (M37W o Ph3) y la infección con coccidios (si o no), se incluyó también en el modelo la interacción entre ambos efectos. Este modelo fue aplicado individualmente a los resultados de los días 16 y 21 de vida.

El tipo de maíz consumido (Ph3 o M37W) es significativo en los tres parámetros determinantes del color en el sistema Cie L*a*b*, tanto a la edad de 16 días como a la edad de 21 días (valores P<0,001).

La infección con coccidios demostró ser significativa para los valores L* que fueron mayores (más oscuros) tanto a los 16 y como a los 21 días de edad (P<0,0001 y P=0,0012). El valor a* en estos grupos de pollos no presentó diferencias debidas al factor infección pero sí que lo hizo la variable b* a la edad de 16 días (P= 0,035) siendo menor en los pollos infectados.

A la edad de 16 días, en la variable L* se observó interacción entre los efectos principales (P=0,020). La luminosidad en los grupos que comieron maíz Ph3 no varía, con independencia de si han sido infectados o no, en el caso de los pollos que han comido maíz M37W, el color es más luminoso en los pollos infectados. Estas diferencias se pueden interpretar como una menor afectación por la coccidiosis en la fase temprana (3 dpi) en los pollos que comen maíz Ph3, posiblemente debido al mayor acumulo de carotenoides, protectores frente al estrés oxidativo generado en la respuesta inflamatoria a la infección.

Tabla 61. Efecto del tipo de maíz y de la infección con coccidios en el color de la piel.

		L*			
Maíz	Infección	16 días (n=16)		21 días (n=12)	
		Media	EE	Media	EE
M37W		76,08 ^a	0,720	72,22 ^a	0,710
Ph3		71,95 ^b	0,396	68,93 ^b	1,294
		<i>Valor P</i>		<i>0,0008</i>	
	NO	72,69 ^b	0,582	69,34 ^b	1,251
	SI	75,34 ^a	0,819	72,07 ^a	0,76
		<i>Valor P</i>		<i>0,0012</i>	
M37W	NO	74,04 ^a	0,928	73,24 ^a	0,224
M37W	SI	78,12 ^b	0,410	71,21 ^a	1,326
Ph3	NO	71,35 ^{bc}	0,269	65,44 ^b	0,872
Ph3	SI	72,56 ^c	0,704	73,11 ^a	0,227
		<i>Valor P</i>		<i><,0001</i>	
		a*			
M37W		-0,45 ^b	0,104	-1,29 ^b	0,213
Ph3		6,50 ^a	0,269	6,61 ^a	0,593
		<i>Valor P</i>		<i><,0001</i>	
	NO	2,88	0,878	2,37	1,228
	SI	3,18	0,958	2,62	1,361
		<i>Valor P</i>		<i>0,266</i>	
M37W	NO	-0,4	0,102	-1,4	0,379
M37W	SI	-0,49	0,188	-1,19	0,23
Ph3	NO	6,16	0,469	6,13	0,912
Ph3	SI	6,84	0,239	7,19	0,729
		<i>Valor P</i>		<i>0,448</i>	
		b*			
M37W		17,57 ^b	0,553	13,23 ^b	0,896
Ph3		48,21 ^a	0,944	37,12 ^a	0,56
		<i>Valor P</i>		<i><,0001</i>	
	NO	33,97 ^a	4,012	25,54	3,592
	SI	31,81 ^b	4,029	23,7	3,924
		<i>Valor P</i>		<i>0,469</i>	
M37W	NO	18,69	0,875	13,77	0,951
M37W	SI	16,45	0,435	12,70	1,585
Ph3	NO	49,25	1,226	37,31	0,654
Ph3	SI	47,17	1,416	36,90	1,029
		<i>Valor P</i>		<i>0,749</i>	

(En grupos de interacción $n_{16\text{días}} = 8$, $n_{21\text{ días}} = 6$). ^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias y día indican diferencias significativas ($P < 0,05$). EE, error estándar

Las diferencias de color en la cromina de los grupos T3 y T4 que han comido el maíz Ph3 alto en carotenos, con los grupos T1 y T2 que han comido maíz blanco M37W, aparecen ya a la

edad de 4 días, y se mantienen significativas durante todo el periodo estudiado, para las variables a* y b*.

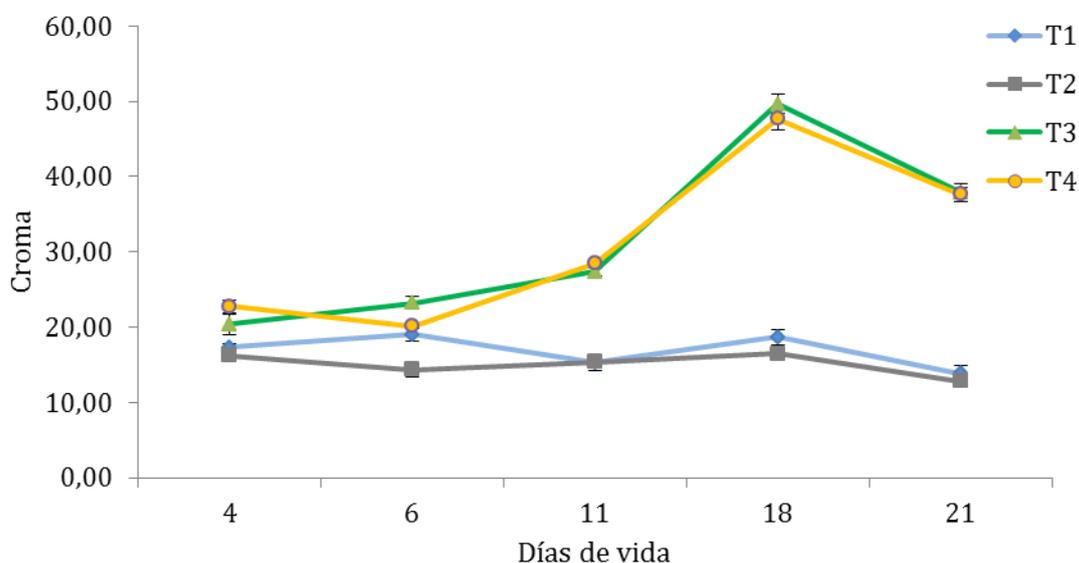


Fig. 42: Valores croma durante el ensayo. T-1, M37W no infectado; T-2, M37W infectado; T-3, PH-3 no infectado; T-4, PH-3 infectado.

Se estudió el efecto del tipo de maíz y de la infección con coccidia para las edades de 18 y 21 días en la variable croma. A la edad de 18 días, tanto el tipo de maíz $P < 0,001$ como la infección o no con coccidia $P = 0,042$ explican la respuesta en la variable croma. Sin embargo, a la edad de 21 días, únicamente el factor tipo de maíz $P < 0,001$, explica la respuesta.

Aunque la infección con coccidios (día 13 de vida) tiene un cierto efecto en el color medido con la variable croma a los 18 días de edad, este efecto es mínimo comparado con el efecto tipo de maíz.

En una infección con nematodos (*Heterakis gallinarum*) en faisán (*Phasianus colchicus*), a los que se les administra una elevada dosis de antioxidantes (α -tocoferol, 100 mg/kg de pienso) Orledge et al. (2012) no encontraron diferencias en la concentración de carotenoides en sangre entre los animales parasitados y los no parasitados, sin embargo, la parasitación de *Lagopus lagopus scoticus* un ave esteparia con *Trichostrongylus tenuis*, un nematodo (Mougeot et al. 2007), produce una disminución significativa en la concentración de carotenoides en sangre y del color rojo de la cresta correlacionadas con la carga parasitaria.

La infección de verderoles (*Carduelis chloris*) con el coccidio *Isospora lacazei*, produce una deficiencia reversible de carotenoides en sangre disponibles para su deposición en las plumas ornamentales (Hörak et al. 2004), en otro estudio con la misma ave (Sild et al. 2011) no se encontró vinculación entre estrés oxidativo inducido y coloración. En el ensayo infectando con *E. tenella*, no se vio reducción de la pigmentación, lo que sugiere

que la matriz de carotenoides aportada por la dieta Ph3 es suficiente para mantener las reacciones de oxidación descritas por Allen (1997) sin que se altere el color de la piel.

6.4.5 Bioquímica

Para valorar el efecto de cada uno de los tratamientos (tipo de maíz) e infección y si entre ellos existe algún tipo de interacción, se diseñó un modelo lineal generalizado (GLM), donde la variable respuesta es el valor de L^* , a^* y b^* , los efectos del modelo fueron el tipo de maíz (M37W o Ph3) y la infección con coccidios (si o no), se incluyó también en el modelo la interacción entre ambos efectos.

Se encontró interacción entre el tipo de maíz consumido y la infección con coccidia para la concentración de fósforo en sangre ($P=0,004$). El tratamiento T1 (maíz M37W, no infectados), tuvo una concentración de $8,34 \pm 0,183$ mg/dl, presentando diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Tanto el tipo de maíz consumido ($P < 0,001$) como la infección con coccidios ($P=0,015$) y la interacción entre ambas ($P=0,004$) explican estas diferencias. El efecto infección con coccidios hace disminuir la concentración de fósforo en el mismo sentido que la infección con *Salmonella* del ensayo III (Tabla 50).

La infección con coccidios afectó al resto de electrolitos analizados Ca ($P=0,002$), K ($0,019$) y Na ($P=0,049$); la deshidratación fruto de la coccidiosis es muy probable que sea el origen de estos desajustes en la concentración de electrolitos que en todo caso están dentro de la normalidad (Andreasen et al. 1996).

Tabla 62: Efecto de la dieta y de la infección con coccidia sobre los electrolitos sanguíneos

Maíz	Infección	Ca (mg/L)	P (mg/dl)	K (mEq/L)	Na (mEq/L)
M37W		96,00±1,738	7,56±0,303 ^a	4,42±0,209	148,80±0,757
Ph3		94,44±1,425	6,41±0,245 ^b	4,86±0,568	148,00±0,782
Valor P		0,268	<0,001	0,468	0,384
	NO	92,22±1,561 ^b	7,44±0,422 ^a	4,03±0,127 ^b	149,44±0,801 ^a
	SI	98,00±1,033 ^a	6,63±0,178 ^b	5,17±0,480 ^a	147,50±0,619 ^b
Valor P		0,002	0,015	0,019	0,049
M37W	NO	93,20±2,746	8,34±0,183 ^a	4,19±0,124	150,40±0,872
M37W	SI	98,80±1,463	6,78±0,273 ^b	4,65±0,395	147,20±0,735
Ph3	NO	91,00±1,080	6,33±0,509 ^b	3,83±0,215	148,25±1,315
Ph3	SI	97,20±1,530	6,48±0,240 ^b	5,69±0,864	147,80±1,068
Valor P		0,859	0,004	0,136	0,130

($n=10$, $n=5$ en cada grupo de interacción) Medias \pm error estándar.

^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Ca, Calcio; P, Fósforo; K, Potasio, Na, Sodio.

Tabla 63: Efecto de la dieta y de la infección con coccidia sobre los indicadores bioquímicos.

Maíz	Inf.	Glucosa (mg/dl)	Proteína Total (g/L)	Albúmina (g/L)	Globulina (g/L)	GOT (UI/L)
M37W		236,00±4,962 ^a	25,90±0,823	10,90±0,379	15,00±0,537 ^a	217,70±20,484
Ph3		202,00±9,257 ^b	24,33±0,850	11,00±0,471	13,33±0,471 ^b	250,67±22381
Valor P		0,002	0,182	0,736	0,018	0,178
	NO	225,11±6,417	25,33±0,745	11,44±0,377	13,89±0,484	260,44±27784
	SI	215,20±10,766	25,00±0,966	10,50±0,401	14,50±0,637	208,90±10,959
Valor P		0,361	0,806	0,071	0,3	0,051
M37W	NO	235,80±6,111	25,80±1,068	11,20±0,583	14,60±0,510	245,60±38,483
M37W	SI	236,20±8,570	26,00±1,378	10,60±0,510	15,40±0,980	189,80±4,236
Ph3	NO	211,75±8,816	24,75±1,109	11,75±0,479	13,00±0,707	279,00±44,236
Ph3	SI	194,20±15,088	24,00±1,342	10,40±0,678	13,60±0,678	228,00±18,442
Valor P		0,339	0,671	0,472	0,881	0,926

Maíz	Inf	GPT (UI/L)	LDH (UI/L)	GGT (UI/L)	FAL (UI/L)	Bilirrubina (mg/dl)
M37W		2,30±0,26	4097,10±586,638	14,40±1,002	11195,10±1905,263	0,07±0,009
Ph3		2,67±0,527	3630,11±606,764	15,33±1,291	14527,67±1425,553	0,07±0,016
Valor P		0,539	0,522	0,576	0,156	0,882
	NO	2,33±0,167	5233,11±492,471 ^a	14,56±0,899	11039,11±1495,439	0,07±0,014
	SI	2,60±0,521	2654,40±325,796 ^b	15,10±1,312	14334,80±1865,364	0,07±0,011
Valor P		0,603	<0,001	0,717	0,167	0,882
M37W	NO	2,40±0,245	5552,40±624,129	14,60±1,631	9460,00±2384,313	0,06±0,013
M37W	SI	2,20±0,490	2641,80±316,482	14,20±1,356	12930,20±3024,050	0,08±0,014
Ph3	NO	2,25±0,250	4834,00±842,831	14,50±0,645	13013,00±1267,034	0,08±0,031
Ph3	SI	3,00±0,949	2667,00±614,331	16,00±2,345	15739,40±2350,911	0,06±0,018
Valor P		0,372	0,492	0,533	0,865	0,425

Maíz	Inf	Creatinina (mg/dl)	Ácido. Úrico (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
M37W		0,29±0,004 ^a	8,73±0,768	136,00±4,271 ^a	48,55±2,923 ^a	89,30±2,638
Ph3		0,25±0,009 ^b	7,97±0,641	119,11±5,941 ^b	40,83±2,387 ^b	83,78±3,908
Valor P		0,001	0,319	0,013	0,023	0,206
	NO	0,27±0,009	8,49±0,83	135,56±4,631 ^a	48,27±3,041	89,89±2,908
	SI	0,28±0,009	8,26±0,629	121,20±5,787 ^b	41,86±2,584	83,80±3,473
Valor P		0,188	0,93	0,038	0,082	0,183
M37W	NO	0,29±0,005	9,72±1,167	144,60±2,249	53,94±3,564	93,40±0,748
M37W	SI	0,29±0,007	7,74±0,897	127,40±6,329	43,16±3,349	85,20±4,727
Ph3	NO	0,24±0,008	6,95±0,665	124,25±6,600	41,18±2,032	85,50±6,185
Ph3	SI	0,26±0,015	8,78±0,918	115,00±9,560	40,56±4,242	82,40±5,564
Valor P		0,271	0,036	0,512	0,118	0,54

(n=10, n=5 en cada grupo de interacción) (P<0,05). Medias ±error estándar.

^{ab} Diferentes letras en columna en el mismo grupo de medias indican diferencias significativas (P<0,05).

Inf, Infección; GOT, Transaminasa Glutámico Oxalacética; GPT, Transaminasa Glutámico Pirúvica; LDH, Lactato Deshidrogenasa; GGT, Gamma Glutamil Transpectidasa; FAL, Fosfatasa Alcalina; LDL, Colesterol LDL; HDL, Colesterol HDL.

El tipo de maíz consumido hizo variar la concentración de glucosa entre los tratamientos en (P=0,002). Los valores de glucosa obtenidos por los pollos que han comido el maíz Ph3 (202,00±9,257 mg/dl) son inferiores a los descritos por Sribhen et al. (2003) (242-253 mg/dl), Andreasen et al. (1996) obtuvieron un rango de valores dependiendo de la especie y del grado de hemólisis de la muestra (170-270 mg/dl).

Las globulinas totales en sangre variaron significativamente por efecto de la dieta ($P=0,018$) obteniendo los pollos que comieron el maíz Ph3 rico en carotenoides los valores más bajos ($13,33\pm 0,471$ g/L). Los valores referenciados para varían entre 13,10 mg/dl (Bowes et al. 1989) a 21 mg/dl (Burlikowska et al. 2010). Ambos grupos de pollos en función de maíz de la dieta están dentro de los valores de normalidad.

La concentración de lactato deshidrogenasa (LDH), presentó valores superiores en los pollos no infectados, el efecto infección con coccidios es significativo ($P<0,001$), sin que se detectaran interacción entre los efectos principales ni por el tipo de maíz consumido. Esta enzima puede estar elevada en casos de lesión muscular o hepática (Hochleithner 1994).

En la concentración sanguínea de colesterol se detectaron diferencias significativas ($P=0,013$) por efecto de la dieta y como es de esperar por la afectación entérica, también fue significativo el efecto de la infección con coccidios ($P=0,038$). La fracción HDL presentó valores menores ($40,83\pm 2,387$ mg/dl) en los pollos de la dieta Ph3 ($P=0,023$). En los ensayos previos en pollos no hubo diferencias en el colesterol por efecto de la dieta.

Se encontraron diferencias significativas para los valores de creatinina entre tratamientos, el análisis de varianza con un modelo lineal generalizado determina que las diferencias son debidas al efecto del maíz consumido ($P=0,001$), no se detectó interacción entre el tipo de maíz y la infección con coccidios para los valores de creatinina ($P=0,188$). Los valores obtenidos en el tratamiento T2 (maíz M37W y no infección), $0,29\pm 0,007$ g/L son tres veces inferiores a los citados por Samour (2006) 0,90 g/L.

La creatinina es un producto de desecho del metabolismo energético muscular, cada día alrededor de un 1,7% del conjunto, creatina más fosfato de creatina se transforma en creatinina y es eliminada en la orina, el aclaramiento de la misma es un buen indicador de la función renal (Wyss y Kaddurah-Daouk 2000).

Los valores de creatinina pueden verse aumentados en insuficiencia renal (Misra et al. 2006), la administración de monensina (Kamel et al. 1993) o la deshidratación (Lumeij 1987) incrementó sus valores, sin embargo, el tipo de grasa, vegetal o animal, incluida en el pienso, no modificó su concentración (Burlikowska et al. 2010). Este analito está elevado en caso de daño muscular (Senthilkumaran et al. 2014) y junto con la lactato deshidrogenasa es el principal marcador bioquímico para esta lesión (Brancaccio et al. 2010).

Existe cierta controversia en relación a capacidad de los carotenoides en la prevención del estrés oxidativo. Este fenómeno es responsable en algunos casos del daño muscular previo a un incremento en la creatinina sérica, las moléculas con actividad antioxidante no han demostrado claramente su eficacia para prevenir este proceso (König et al. 2001). Otros autores han demostrado que los carotenoides son eficaces previniendo el estrés oxidativo y la movilización de los mismos hacia los puntos de inflamación (Costantini y Dell'Omo 2006).

Se encontró interacción entre los factores principales para la concentración en sangre de ácido úrico ($P=0,036$) sin que los estudios *post hoc* lleguen a determinar diferencias entre grupos. El balance hídrico tiende a alterarse en los cuadros de diarrea y esto puede afectar el aclaramiento renal para algunas sustancias como puede ser el ácido úrico

6.4.6 Lesiones y recuento de ooquistes

En los tratamientos T1 y T3, que no fueron infectados, el recuento de ooquistes fue negativo. En los tratamientos infectados, existen diferencias significativas ($P < 0,05$) en la excreción de ooquistes para los días 6 y 9 (dpi).

Se observa un descenso de ooquistes en los días 8 y 9 después de la infección relacionado con el ciclo del parásito. Después de la infección, el ciclo de estos protozoos se inicia con la fase asexual (esquizogonia) seguido de la fase sexual (gametogonia) que termina con la expulsión de los ooquistes a través de las heces. Los ooquistes esporulan (esporogonia) en pocos días en el exterior entre las heces y la cama dependiendo de la temperatura y la humedad (McDougald y Fitz-Coy 2013).

La ingestión de un elevado número de nuevos ooquistes esporulados inicia un ciclo nuevo masivo y una nueva ola de ooquistes que se excretan por las heces de nuevo. El grupo con dieta control puede haber iniciado una nueva ola de excreción de ooquistes en el día 9 post infección, pero el grupo de la dieta rica en antioxidantes puede haber mejorado su inmunidad y esta nueva ola puede haberse retrasado o reducido. Se puede especular que en el primer ciclo, la inmunidad específica a los coccidios es similar en ambos tratamientos, pero en el segundo ciclo el grupo con dieta a base de maíz rico en antioxidantes puede haber mejorado la inmunidad humoral.

Tabla 64: *Evolución de la excreción de ooquistes en heces en los tratamientos infectados.*

Días post- infección	T2	T4
	Ooquistes/g heces (x1000)	Ooquistes/g heces (x1000)
6	132,8±2,9	87±1.2 *
7	223,2±8,6	241.8±3.5
8	29,0±0,7	32,0±1,5
9	56,9±4,3	14,2±0,9 *

Los datos se obtienen de la mezcla de las heces de todos los animales del grupo y repetido 4 veces (n=4). Los valores representan la media ± el error estándar.

T2: maíz M37W desafiados con E. tenella, T4: maíz Ph3 desafiado con E. tenella. (Los grupos no infectados T1 y T3 fueron negativos y no se presentan en la tabla).

** Indica diferencias significativas en la misma fila ($P < 0,05$).*

Tabla 65: *Graduación de lesiones en intestino.*

Tratamiento	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
T2	-	-	-	6 (75,00%)	2 (25,00%)
T4	1 (12,50%)	-	-	6 (75,00%)	1 (12,50%)

Protocolo de Johnson y Reid, (1970). n=8, $P < 0,05$. T2: dieta control desafiados con E. tenella, T4: dieta de maíz rico en carotenoides desafiado con E. tenella

No se han observado diferencias significativas en la gravedad de las lesiones de coccidios entre los pollos del grupo que han comido maíz M37W (T2) y los pollos que han comido maíz Ph3 (T4).



Los carotenoides son biomoléculas que reaccionan ante la infección por coccidios, viendo reducida su concentración en sangre (Ruff et al. 1974), esta reacción tiene lugar en el bloqueo de radicales libres y se mantiene tanto en la mucosa intestinal como en la circulación sanguínea, esto ha sido confirmado en los desafíos con *E. maxima* con una disminución de la pigmentación en la piel y en la concentración en sangre de carotenoides (Allen 1997).

Fig. 43: Coccidiosis en ciegos.

6.4.7 Lesiones de pododermatitis

El control de la afectación por pododermatitis se realizó de acuerdo con el protocolo Welfare Quality® (2009). Se consideró no obstante, que el citado protocolo sobreestima las lesiones de almohadilla plantar (*pulvinus metatarsalis*) y subestima las lesiones ulcerosas que se producen en las almohadillas digitales (*pulvinus digitalis pedis*), por lo que adicionalmente se hizo un control de las mismas en todos los pollos del ensayo sacrificados el día 19 de vida (6dpi).

El modelo lineal general, determina que las diferencias son debidas tanto al factor tipo de maíz $P < 0,0001$ como a la infección por coccidia $P < 0,0001$, existiendo interacción entre los factores $P = 0,013$. En el test de comparación de medias, hay diferencias significativas en el número de úlceras entre el tratamiento T2 y el resto de tratamientos ($P < 0,05$), también hay diferencias significativas entre los tratamientos T3 y T1, ($P = 0,022$).

Tabla 66: Efecto de la dieta Ph3 en la presentación de úlceras en las patas en grupos infectados o no de coccidia.

Grupo	Dieta	Infección	Nº de úlceras
T1	M37W	No	2,62±0,625 ^b
T2	M37W	Si	5,75±0,453 ^a
T3	Ph3	No	0,62±0,263 ^c
T4	Ph3	Si	1,19±0,423 ^{bc}
<i>P</i>			0,013

($n=8$), ($P < 0,05$). ^{ab} Diferentes letras en la misma columna indica diferencias significativas.

Tabla 67: Pododermatitis en los pollos sacrificados el día 19 (6 dpi).

	Grado 0 nº (%)	Grado 1 nº (%)	Grado 2 nº (%)
T1	1 (12,50%) ^b	7 (87,50%) ^a	0 ^b
T2	0 ^b	2 (25,00%) ^b	6 (75,00%) ^a
T3	6 (75,00%) ^a	2 (25,00%) ^b	0 ^b
T4	3 (37,50%) ^{ab}	5 (75,00%) ^{ab}	0 ^b

(n= 8), (P< 0,05).^{ab} Diferentes letras en la misma columna indica diferencias significativas, T1 maíz M37W no infectados; T2 maíz M37W infectados; T3 maíz Ph3 no infectados; T4 maíz Ph3 infectados. Welfare Quality® (2009).

Existen diferencias significativas entre los tratamientos $\chi^2=30,900$, (P<0,001), también existen diferencias entre niveles, T3 tiene más animales sin ninguna úlcera (Grado 0) que los tratamientos T1 y T2, el tratamiento T1 tiene más animales en grado 1 que T2 y T3, el tratamiento T2 es el único que tiene animales con lesiones de grado 2, siendo este valor significativo.

Los resultados de ambos controles son coincidentes, los pollos que han comido maíz Ph3 rico en carotenoides (T3 y T4) tienen menos úlceras y un grado de pododermatitis menor que los que han comido maíz M37W (T1 y T2). Dentro de cada dieta, los grupos que han sido infectados tienen más úlceras y un grado de pododermatitis mayor.

Puesto que la humedad de la yacija es un factor predisponente primordial en la aparición y gravedad de las lesiones de las patas de los pollos, se controló en los cuatro aisladores, tomando una serie de 10 muestras en diferentes puntos de los mismos, estas muestras se agruparon para determinar en el laboratorio la humedad. Como es de esperar, la yacija de los grupos infectados con coccidia T2 y T4, tienen un porcentual de humedad significativamente mayor que los grupos T1 y T3 que no habían estado infectados, sin embargo entre ellos no hay diferencias.

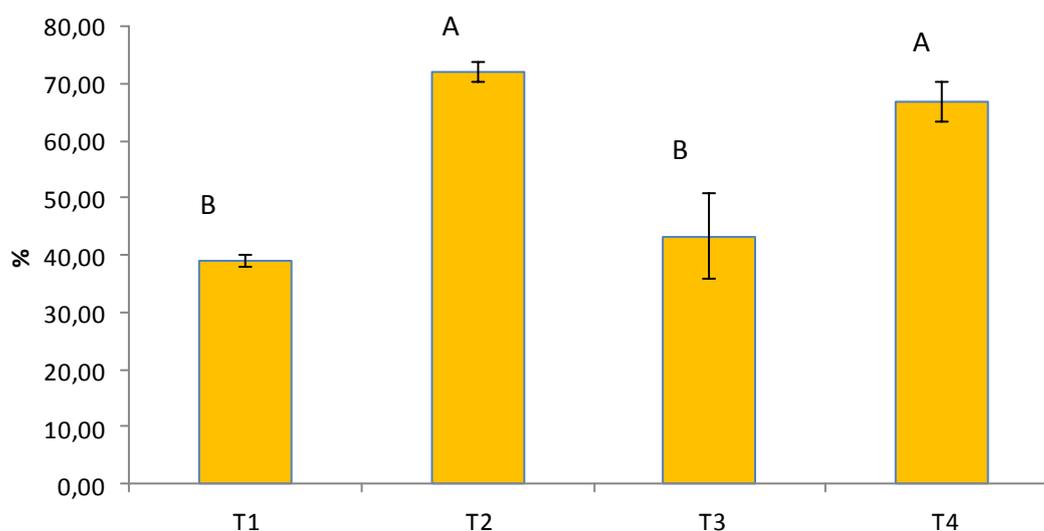


Fig. 44: Porcentaje de humedad en la yacija de los cuatro aisladores. n=3 P<0,05. T1 maíz M37W no infectados; T2 maíz M37W infectados; T3 maíz Ph3 no infectados T4 maíz Ph3 infectados.

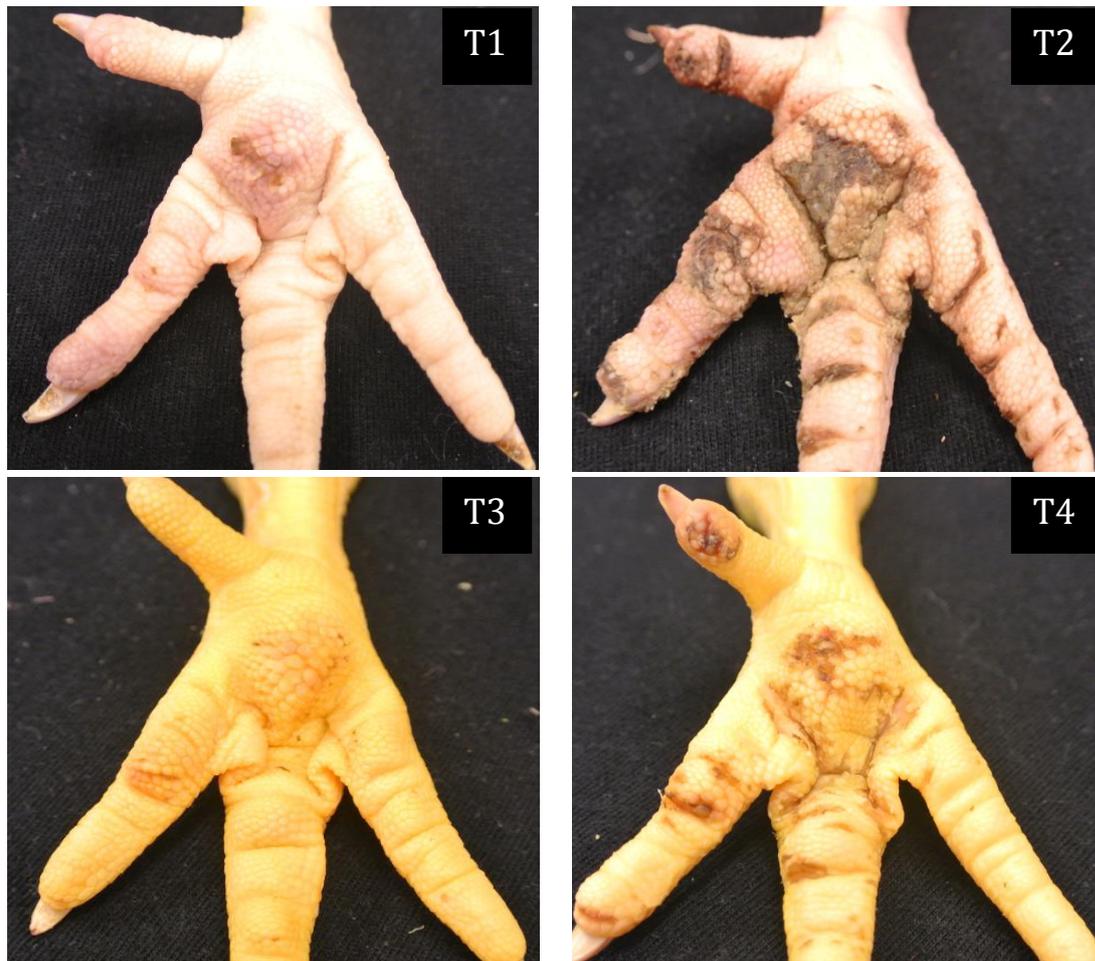


Fig. 45: Patas de pollos preparadas para su valoración.

6.4.8 Histología

6.4.8.1 Hígado

En los resultados histológicos de hígado, no hubo lesiones de esteatosis, fibrosis o necrosis hepatocelular en ningún tratamiento, sí que hubo lesiones de inflamación hepática con diferencias significativas ($\chi^2=20,052$, $P=0,02$) entre los lotes que han sido infectados con coccidia (T2 y T4) y los que no han sido infectados (T1 y T3).

Algunos autores han reportado daños hepáticos en pavos como consecuencia de la infección ascendente de este órgano vía conducto biliar o cístico-entérico por parte de los coccidios, (Critchley et al. 1986) y en aves silvestres (Reece 1989) casos similares han sido descritos por (Long 1970; Long y Millard 2009) en pollos después de infección experimental vía oral con *E. Tenella*. La diferencia en la respuesta inmunitaria en hígado de pollos infectados y no infectados, puede ser explicada por una posible infección a través del conducto cístico o cístico-entérico.

Tabla 68: Efecto de la dieta Ph3 y de la infección con coccidia en la presentación y gravedad de lesiones hepáticas.

Lesión	T1	T2	T3	T4	
	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	
Inflamación*	Sin lesión	4(80,00) ^a	0 ^b	3 (60,00) ^a	0 ^b
	Leve [<2 focos]	1(20,00)	0	2 (40,00)	0
	Moderada[2-4 focos]	0 ^b	5(100) ^a	0 ^b	5 (100) ^a
	Severa [>4 focos]	0	0	0	0

Los valores expresan el número y el % de casos. n=5,*P<0,05, ^{ab} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas, P<0,05.

T1 maíz M37W, no infectados; T2 maíz M37W, infectados; T3 maíz Ph3, no infectados; T4 maíz Ph3, infectados.

Tabla 69: Presencia de agregados linfocitarios en hígado.

Lesión	T1	T2	T3	T4
Agregados linfocitarios nº por campo (x10)*	0,34±0,169 ^b	3,1±0,719 ^a	0,6±0,084 ^b	3,08±0,465 ^a

Los valores expresan la media y el error estándar. n=5, P<0,05, ^{ab} letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas, T1 maíz M37W no infectado; T2 maíz M37W infectados; T3 maíz Ph3 no infectado; T4 maíz Ph3 infectado.

Las muestras de hígado observadas al microscopio (x10) presentan diferencias significativas entre los tratamientos en el nº de agregados linfocitarios (P<0,05) entre los tratamientos que han sido infectados con coccidia (T2 y T4) y los que no han sido infectados (T1 y T2).

6.4.8.2 Bolsa de Fabricio

En el estudio de la bolsa de Fabricio, se contaron los espacios vacuolares en las áreas medular y cortical del folículo (media de 10 campos a 40 aumentos por muestra) y se valoró el grado de depleción.

Tabla 70: Efecto de la dieta Ph3 y de la infección con coccidia en la presentación de lesiones de depleción, en bolsa de Fabricio.

		T1	T2	T3	T4
		nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)
Depleción	Sin lesión	3 (60,00)	1	2 (40,00)	-
	Leve	2 (40,00)	2 (40,00)	3 (60,00)	3 (60,00)
	Moderada	-	2 (40,00)	-	2 (40,00)
	Severa	-	-	-	-

Los valores expresan el número y el % de animales. n=5; T1 maíz M37W no infectado; T2 maíz M37W infectado; T3 maíz Ph3 no infectado; T4 maíz Ph3 infectado.

No hubo diferencias significativas en el grado de depleción entre los tratamientos $\chi^2 = 7,733$, P=0,258.

Tabla 71: Efecto de la dieta Ph3 y la infección por coccidia en el número medio de vacuolas por campo (x40) en bolsa de Fabricio.

Vacuolización	T1	T2	T3	T4
Medular	0 ^c	11,94±2,333 ^a	2,28±0,301 ^{bc}	5,38±0,218 ^b
Cortical	0 ^c	12,54±1,460 ^a	2,12±0,343 ^{bc}	4,32±0,116 ^b

Media y error estándar n=10; ^{ab} letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas, (P<0,05). T1 maíz M37W no infectados; T2 maíz M37W infectados; T3 maíz Ph3 no infectados; T4 maíz Ph3 infectados.

El tratamiento T2, presenta significativamente más vacuolas (zona medular o cortical) que el resto de tratamientos. El tratamiento T4 también presenta más vacuolas que el tratamiento T1. No existen diferencias entre los tratamientos no infectados T1 y T3.

La dieta alta en carotenoides puede haber promovido la repoblación folicular más rápido que la dieta de control, reduciendo la inflamación inicial y mejorando la respuesta inmune (Blount et al. 2003; Chew y Park 2004).

6.4.8.3 Tonsilas cecales

Tabla 72: Nódulos linfoides activados en tonsilas cecales.

	T1 nº (%)	T2 nº (%)	T3 nº (%)	T4 nº (%)
Sin lesión	1 (20,00) ^{ab}	0 ^b	4 (80,00) ^a	4 (80,00) ^a
Leve	4 (80,00) ^b	5 (100,00) ^b	1 (20,00) ^a	1 (20,00) ^a
Moderada	-	-	-	-
Severa	-	-	-	-

Los valores expresan el número y el % de animales para cada nivel. n=5; ^{ab} letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas, (P<0,05). T1 maíz M37W no infectados; T2 maíz M37W infectados; T3 maíz Ph3 no infectados; T4 maíz Ph3 infectados.

La distribución de las muestras presenta diferencias significativas $\chi^2=10,303$ y P=0,016. Las muestras de los pollos del tratamiento T1 y T2, manifestaron la presencia significativa de más nódulos linfoides que los tratamientos T3 y T4 (P<0,05).

Existe una agrupación de valores entre los tratamientos en función del tipo de maíz que han comido (M37W o Ph3).

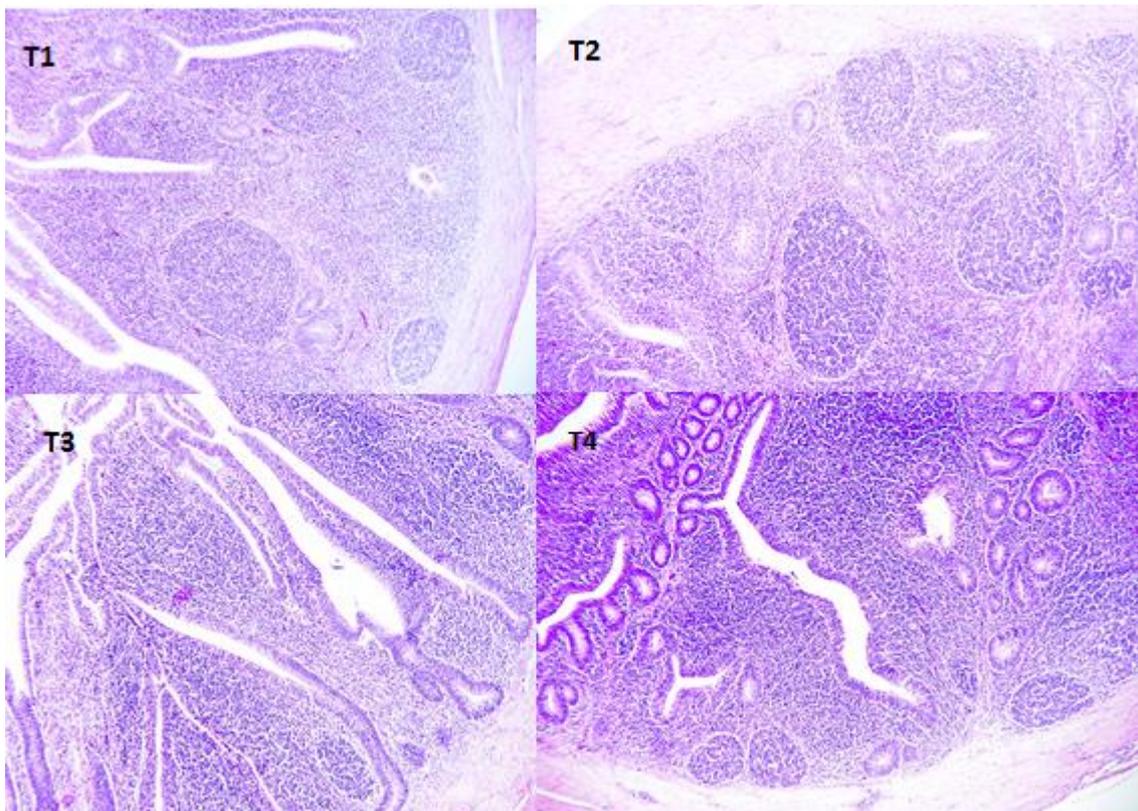


Fig. 46: Cortes histológicas de tonsilas cecales, se aprecian los nódulos linfoides en cada uno de los tratamientos. T1 maíz M37W no infectados; T2 maíz M37W infectados; T3 maíz Ph3 no infectados; T4 maíz Ph3 infectados.

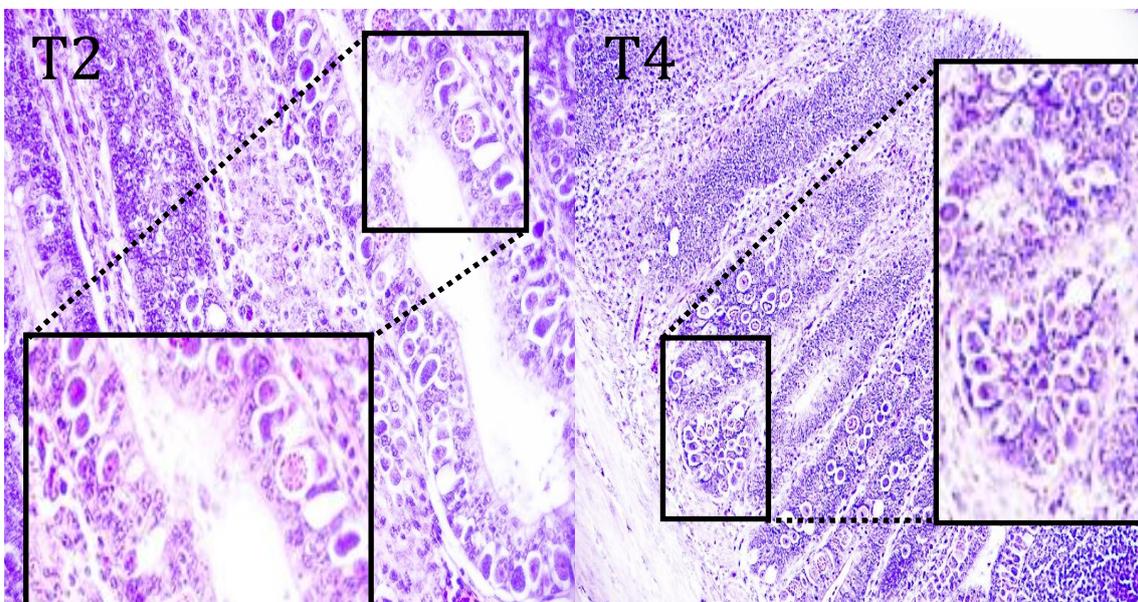


Fig. 47: Afectación de la mucosa de ciego por la invasión intracelular de coccidios. Tratamientos infectados T2 y T4, en ambos pueden verse diferentes formas del parásito invadiendo la mucosa del ciego. T2 maíz M37W infectados; T4 maíz Ph3 infectados.

6.5 CONCLUSIONES

1. En los pollos que comen maíz Ph3 se observa una reducción significativa del número de ooquistes (*E.tenella*) excretados.
2. La infección con coccidia (probablemente por la humedad de la yacija) incrementa la pododermatitis y el número de úlceras en las patas, que se reducen significativamente en los pollos que comen maíz enriquecido en carotenoides Ph3.
3. Los analitos sanguíneos marcan diferencias entre tratamientos para colesterol, creatinina, lactato deshidrogenasa, glucosa, y fósforo. El efecto tipo de maíz, es determinante en las variables colesterol, creatinina, glucosa y fósforo. El efecto infección con coccidios, es determinante en la variable lactato deshidrogenasa. Tanto el efecto infección con coccidios como el efecto maíz y la interacción entre ambos son determinantes en la variabilidad de las medias del fósforo.
4. El consumo de maíz Ph3 incrementa significativamente el color de la piel en las patas de los pollos en la gama amarillo naranja y la infección con ooquistes de *E.tenella* únicamente produce una disminución transitoria (5 dpi).
5. La infección con coccidia produce una disminución en el peso de los pollos y un aumento del peso de hígado, bazo y bolsa de Fabricio. Se constata inflamación hepática y depleción linfocitaria en bolsa de Fabricio en los grupos infectados con coccidia.

[Redacted text block]

[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

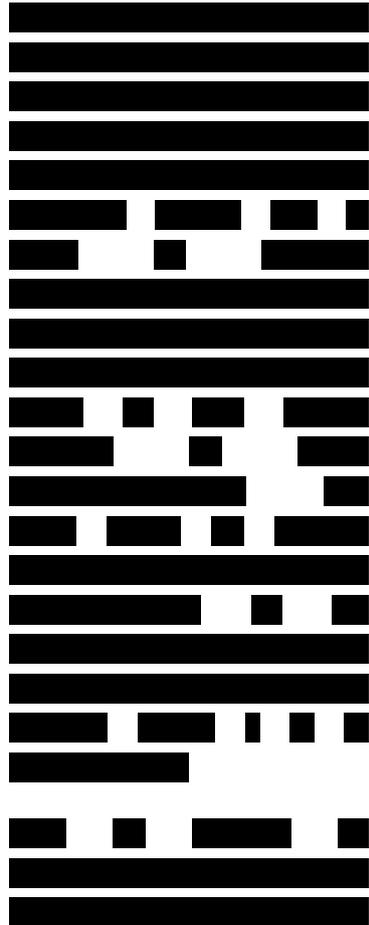
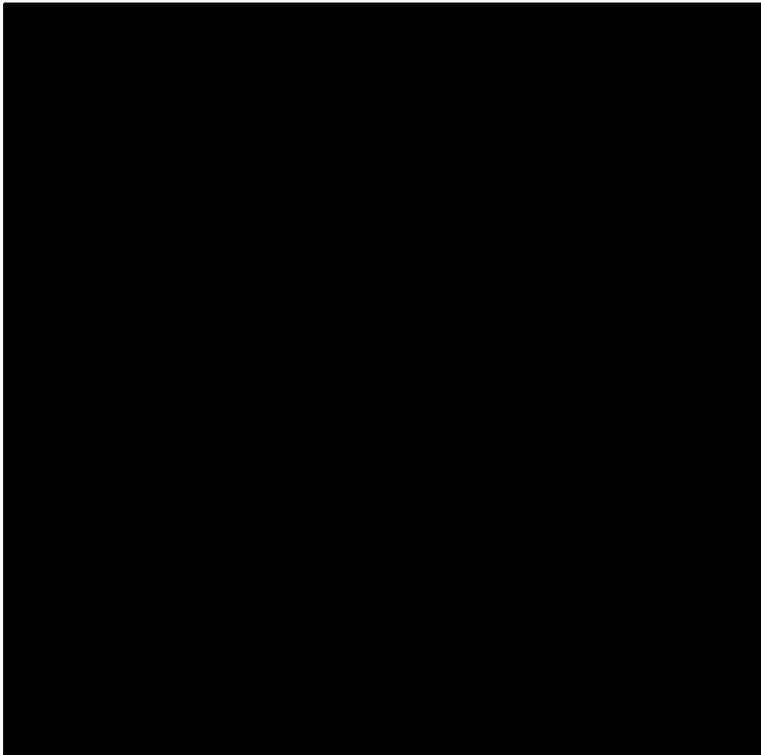


Fig. 50: Panel de yemas procedentes de cada una de las dietas desde que se inicia el tratamiento (día 0) hasta la finalización del mismo (día 20).

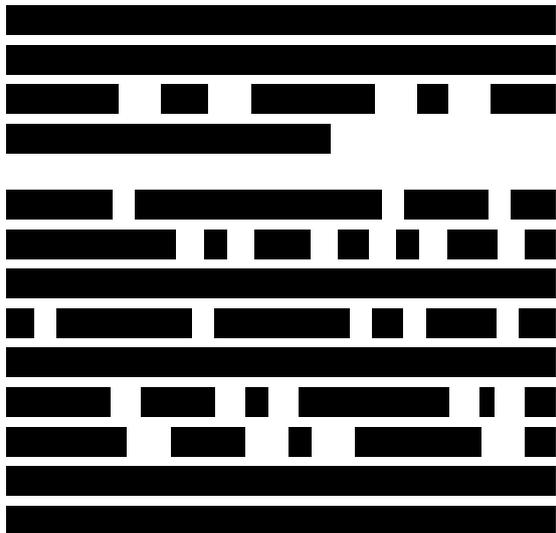
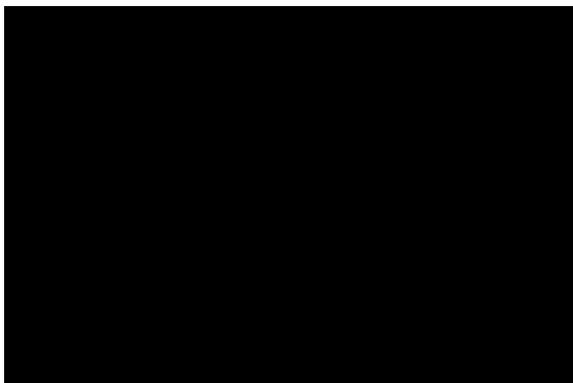
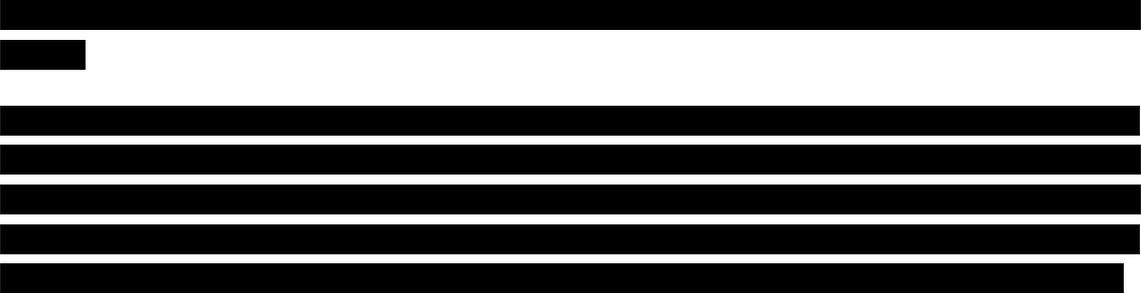
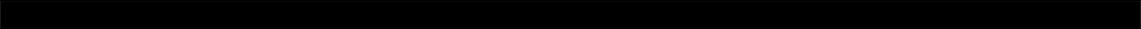


Fig. 51: Contrastación con abanico DSM del valor obtenido automáticamente en el Egg Analyzer.



[Redacted text block]

[Redacted text block]

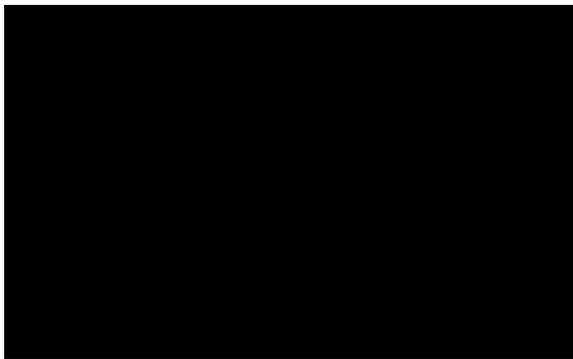
[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]	[Redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



[Redacted text block]

Fig. 52: Yema de huevo del tratamiento BKT, tras 5 días de tratamiento (día 18 del experimento).

[Redacted text block]

- [REDACTED]

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Los ensayos que han concluido con la redacción de esta tesis se han formulado con el ánimo de demostrar la idoneidad del uso de los maíces transgénicos Ph3 y BKT en la cría de pollos y en la producción de huevo.

La deposición de carotenoides en tejidos y yema y su valoración mediante estudio cromatográfico y químico era el principal objetivo, para ello se diseñó diferentes supuestos que se traducen en los ensayos realizados según los cuales, las aves han sido alimentados con maíz blanco (sin carotenos) o maíz amarillo (alto en carotenos) en condiciones diferentes.

Al igual que otros animales, los pollos no pueden sintetizar carotenoides *de novo* y deben obtenerlos de los alimentos. El fenotipo “piel amarilla”, depende de una mutación del gen identificado como *BCDO2*, localizado entre las posiciones 6,26–6,29 Mbp del cromosoma 24 (Eriksson et al. 2008; Schmid et al. 2000).

Cuando los pollos se criaron hasta la edad de 35 días (Ensayos I y II) los valores de las variables a* (rojos) y b* (amarillos) del sistema de medición de color CIELab fueron superiores en los pollos que comieron maíz amarillo del ensayo I, los resultados obtenidos en ambos ensayos son superiores a los publicados en otros estudios (Castañeda et al 2005). El incremento de color se produce en piel, cresta, músculo y grasa, sugiriendo una amplia distribución de los carotenoides en los tejidos.

En el ensayo II con pollos criados en granja y sometidos a los mismos tratamientos veterinarios y manejo que el resto del lote, tanto en el grupo con dieta con maíz Ph3 como en el grupo control, maíz M37W, presentaron una disminución de los valores cromáticos b* (amarillos) entre los día 26 y 31 de edad coincidiendo con un tratamiento con enrofloxacina, La medicación con enrofloxacina en el agua de bebida a dosis terapéuticas pudiera haber afectado la deposición de algunos carotenoides en tejido periférico de los pollos.

En las pruebas con infección experimental, con *Salmonella* o con coccidios, en las que los pollos fueron sacrificados a la edad de 21 días, los valores de a* y b* en ambos ensayos, fueron superiores en los pollos de los grupos que comieron maíz Ph3 con alto contenido en carotenoides. En el ensayo III, infección con *Salmonella*, no hubo diferencias entre los pollos infectados o no, siendo el efecto maíz el único que determinó las diferencias en el color.

En el ensayo IV, infección con coccidios, a los 18 días de edad (5 dpi), además del efecto ya descrito del tipo de maíz, se aprecia el efecto de la infección con coccidios, que provoca una disminución de los valores de saturación de color (croma) en los pollos infectados, esto último desaparece a la edad de 21 días (8 dpi). La actividad antioxidante de los carotenoides es también esencial para la inmunomodulación, los períodos de estrés inmunológico producen una reducción de su concentración en la circulación y una depigmentación general de los tejidos (Hamelin y Altemueller 2012).



[REDACTED]

La preferencia de los consumidores por el color de la piel de pollos de engorde varía según la región, pero el color dorado “amarillo” de la piel es deseable, ya que se asocia con la buena salud por lo tanto es típica la adición de suplementos de luteína, zeaxantina y cantaxantina (Hamelin y Altemueller 2012). Los pollos seleccionados para alta tasa de crecimiento tienen la carne más pálida que los animales con una tasa de crecimiento más baja y su músculo de la pechuga contiene luteína y zeaxantina, pero no β -caroteno (Le Bihan-Duval et al. 2011). Los resultados analíticos de estos ensayos sugieren que tanto la carne pálida y el bajo contenido de β -caroteno de la carne de pechuga de pollos de engorde podrían abordarse mediante la alimentación de las aves con una dieta de maíz alto en carotenoides.

La concentración de carotenoides en sangre representa el flujo de pigmentos hacia los tejidos periféricos, mientras que el almacenamiento principal para los carotenoides y retinol se produce en el hígado (Koutsos et al. 2003; Jlali et al. 2014). Los niveles de carotenoides en suero fueron mayores en las aves alimentadas con el maíz manipulado genéticamente (Ph3) que en los alimentados con la dieta control. Aunque los niveles de retinol también fueron significativamente distintos, las diferencias entre ambas dietas fue menor que con el resto de carotenoides. Perfiles de carotenoides en suero han sido reportados en otras aves (Mcgraw et al. 2006), y ambos, carotenoides y retinol tienden a mantenerse hasta que las reservas almacenadas se agotan, por lo que no se consideran indicadores fiables de status nutricional (Swayne et al. 2013).

Considerando los ensayos en los que se cuantificó la concentración de carotenoides y retinol en hígado, las aves alimentadas con el maíz manipulado contenían niveles mucho más altos de carotenoides y retinol que los procedentes de aves que habían comido la dieta control o maíz convencional, lo que probablemente refleja la mayor oferta de carotenoides en el maíz fortificado en carotenoides. La ausencia de β -caroteno en la mayoría de los tejidos de las aves alimentadas con maíz Ph3, junto con los niveles más elevados de productos de oxidación de los β -carotenos en piel y músculo y los niveles más altos de retinol en el hígado, sugieren que el exceso de β -caroteno a partir de la dieta maíz Ph3, se metaboliza a retinol o se oxida en línea con su actividad antioxidante. Por tanto, estos resultados sugieren que los carotenoides del maíz manipulado son más biodisponibles que las que se añaden a las dietas a base de maíz comerciales estándar, lo que probablemente refleja los diferentes grados de complejidad del efecto de la matriz en cada uno de las dietas (Furusho et al. 2000). Estos resultados sugieren que los niveles de retinol hepático de las aves también pueden utilizarse para evaluar la biodisponibilidad de los carotenoides, como se observa en ratas (Furusho et al. 2000).

[REDACTED]

[REDACTED]

En el ensayo en condiciones de experimentación (Ensayo I) los pollos han podido expresar plenamente su potencial de crecimiento en condiciones óptimas de densidad, calidad ambiental y bajo riesgo microbiológico, unido todo ello a un manejo minucioso en todos los detalles, el consumo de pienso y el crecimiento han sido superiores y el índice de conversión mejor en comparación con los del Ensayo II, criados en granja, los factores ambientales y especialmente la densidad de cría, pueden afectar los parámetros productivos (Heckert et al. 2002).

En todos los ensayos con pollos en los que el maíz fue liofilizado (Ensayo II, III, IV), los animales consumieron menos este tipo de dieta, sin que esto afectase significativamente el índice de conversión o el peso al final de los experimentos. El proceso de liofilización puede afectar a las cualidades físicas y de palatabilidad del producto provocando que este quede más apelmazado en las tolvas de reparto y por lo tanto menos accesible para los animales,

[REDACTED]

El crecimiento de los pollos que han sido criados hasta la edad de 21 días y en los que se ha realizado desafío infeccioso con *Salmonella* o *Coccidia*, presenta diferencias por el tipo de maíz utilizado en el ensayo III, *Salmonella*. En los pollos infectados con *Coccidia*, las diferencias de peso dependen de la propia infección, no parece por tanto que el desafío con salmonela haya sido especialmente patogénico para los animales, efecto que sí que ha tenido la infección con coccidios.

Los síntomas y lesiones derivados de la infección con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis únicamente son perceptibles en ocasiones de estrés acusado y la afectación es menor a medida que aumenta la edad del pollo en el momento de la infección (Suzuki 1994), la recuperación también es más rápida en pollos infectados a edad más adulta (Desmidt et al. 1997). Esto podría explicar que los pollos del ensayo III, infectados con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis no hayan presentado diferencias con los no infectados.

Se observaron diferencias en algunos indicadores generales de salud cuando se comparan las dietas de alto contenido en carotenoides y el control. La bolsa de Fabricio en las aves alimentadas con la dieta rica en carotenoides ofrece una mejor respuesta

inmunomoduladora frente a la vacunación con cepas intermedias plus (Ensayo I) que han demostrado inducir lesiones morfológicas en el sistema linfoide, con reducción del peso de la bolsa en comparación con los animales vacunados con cepas intermedias o suaves (Moraes et al. 2004).

La dieta alta en carotenoides puede haber promovido la repoblación folicular más rápido que la dieta de control, reduciendo así la inflamación inicial y la mejora de la respuesta inmune (Blount et al. 2003; Chew y Park 2004). Esta hipótesis fue probada utilizando las mismas dos dietas para alimentar a las aves vacunadas con una vacuna intermedia y no se encontraron diferencias en el peso de la bolsa de Fabricio entre los grupos tratamiento y control. El vínculo entre los carotenoides, el estrés oxidativo y el sistema inmune en algunas aves ha sido previamente descrito (Lucas et al. 2014).

Los niveles relativos y absolutos de heterófilos en pollos son ampliamente utilizados como indicadores de salud debido a que están influenciados por el estrés, la administración de corticosteroides y procesos inflamatorios agudos (Gross y Siegel 1983; Maxwell 1993). En el ensayo I, el número de heterófilos circulantes en las aves alimentadas con la dieta control fue mayor que en los alimentados con la dieta alta en carotenoides, y esto se considera una respuesta a la inflamación o stress (Fudge 2000).

La dieta alta en carotenoides parece que retrasa el ciclo reproductivo de *E. tenella*. La disminución en el número de ooquistes en el día 9 dpi probablemente refleja el ciclo vital del parásito, que dura de 4-7 días (Harrison y Lightfoot 2006). Después de la infección con un gran número de ooquistes hay una mayor probabilidad de reinfección. La ingestión de una gran cantidad de nuevos ooquistes esporulados inicia una nueva ola de desarrollo de ooquistes, y la nueva generación también puede difundirse a través de las heces. La dieta rica en carotenoides parecía promover la resistencia contra los coccidios y la excreción de cantidades masivas de ooquistes fue atenuada o retrasada. Paralelamente la respuesta inmunitaria fue modulada detectándose un menor número de nódulos linfáticos activados (Fig. 46)

La pododermatitis o dermatitis plantar es una condición de la piel de la cara plantar de la garra de los pollos cuyo origen está en una dermatitis por contacto que se caracteriza por lesiones inflamatorias y necrosis que pueden ser desde superficiales a profundas, pudiendo estas últimas producir abscesos que afectarán a las almohadillas plantar y a las interdigitales (Greene et al. 1985). Se han descrito casos de pododermatitis tras la detección de brotes de coccidiosis; las lesiones presentadas en la cara plantar de la pata tenían forma de coliflor y se ha visto cómo van evolucionando en el tiempo desde la abrasión, la inflamación, hasta la úlcera con tejido necrótico. La gravedad y la prevalencia, van aumentando con la edad del lote a partir de los 20 días de edad (Greene et al. 1985).

En el ensayo IV los pollos que han comido maíz Ph3 rico en carotenoides tienen menos úlceras y un grado de pododermatitis menor que los que han comido maíz control M37W, dentro de cada dieta, los grupos que han sido infectados tienen más úlceras y un grado de pododermatitis mayor. Los resultados sugieren que la afectación por coccidia predispone a los pollos a padecer pododermatitis, probablemente por la mayor humedad de las camas y que la ingesta de maíz enriquecido en carotenoides Ph3 disminuye el grado de afectación, tanto en pollos infectados con coccidios como en pollos no infectados. Los carotenoides han demostrado actuar en algunos procesos bioquímicos reduciendo el estrés oxidativo celular, la inflamación y la degeneración celular (Obulesu et al. 2011).

En los ensayos que han concluido en esta tesis, se han probado dos variedades de maíz modificado genéticamente que expresan concentraciones diferentes de carotenoides en alimentación de pollo y de gallina, a través de este estudio se ha determinado la biodisponibilidad de estos carotenoides en tejidos, modificando el color de los mismos y haciéndolos comercialmente deseables, tanto la carne como los huevos. Se han detectado efectos beneficiosos para la salud de los animales, especialmente en cuestiones relacionadas con la inmunidad, respuesta a coccidiosis y a pododermatitis, aspectos todos ellos de máxima relevancia en la avicultura moderna.

Más allá de esta tesis, pero dentro del mismo proyecto de investigación se han realizado estudios de proteómica y metabólica en el maíz y en los tejidos y huevos de las aves para determinar los efectos de las modificaciones genéticas del maíz y del consumo del mismo a nivel molecular.

Se sugieren nuevos estudios orientados hacia algunos aspectos. En el ámbito de la producción, es conveniente realizar estudios con un número mayor de animales que profundicen en aspectos como la variabilidad de la pigmentación y los factores que inciden en la misma, en contraste con las diferentes opciones comerciales existentes en la actualidad, abriendo el foco también a las cuestiones económicas.

Algunos hallazgos que se han apreciado en estos ensayos, indican, que dirigir la atención hacia la descripción de los mecanismos intrínsecos de actuación de los diferentes carotenoides en los efectos relacionados con la salud en los pollos, nos ayudará a comprender los mecanismos moleculares de actuación en los escenarios patogénicos o pre-patogénicos.

Los estudios sobre los efectos en la calidad del producto, especialmente la carne, en relación a la vida media útil o la mejora en los procesos de peroxidación ya están siendo estudiados.

La mejora agronómica de los maíces transgénicos, buscando un mayor rendimiento así como un mejor comportamiento frente a las plagas de insectos, está dando resultados que posibilitarán disponer de un producto comercialmente competitivo.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

1. El uso de maíces fortificados en carotenoides (Ph3 en pollos y gallinas BKT en gallinas) en alimentación aviar, no modifica las variables productivas.
2. El uso de maíz modificado genéticamente para la expresión elevada de carotenoides Ph3, ha demostrado ser una forma eficaz de producir en los pollos la pigmentación de piel y otros tejidos que caracteriza al “pollo amarillo”.
3. El uso de maíz modificado genéticamente para la expresión elevada de carotenoides Ph3, ha demostrado ser una forma eficaz de proporcionar a los pollos estas sustancias bioactivas, con actividad metabólica, que se distribuyen en tejidos y fluidos del organismo animal.
4. Las variables habituales incluidas en la bioquímica sanguínea no mostraron diferencias consistentes en los pollos sanos que han sido alimentados con maíz rico en carotenoides Ph3.
5. La respuesta de los pollos a un desafío infeccioso con *Salmonella entérica* serovar Enteritidis no se ha visto afectada por el consumo de maíz Ph3 modificado genéticamente.
6. El desafío infeccioso con inóculos de *Salmonella entérica* serovar Enteritidis o de *Eimeria tenella* no modificó al final de los ensayos el color de la piel de los pollos que comieron maíz enriquecido con carotenoides.
7. La respuesta de los pollos alimentados con maíz Ph3 a un desafío infeccioso con *Eimeria tenella* presenta una disminución en la excreción de ooquistes.
8. El consumo de maíz Ph3 reduce significativamente la gravedad de las lesiones de pododermatitis y el número de úlceras podales tanto en los grupos de animales infectados con *Eimeria tenella* como en los no infectados.

9. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED].

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abdi-hachesoo, Bahman, Alireza Talebi, and Siamak Asri-rezaei. 2011. "Comparative Study on Blood Profiles of Indigenous and Ross-308 Broiler Breeders." *Global Veterinaria* 7(3): 238–241.
- Aizawa, Koichi, and Takahiro Inakuma. 2009. "Dietary capsanthin, the main carotenoid in paprika (*Capsicum annuum*), alters plasma high-density lipoprotein-cholesterol levels and hepatic gene expression in rats." *The British journal of nutrition* 102(12): 1760–1766.
- Allen, P C. 1997. "Production of free radical species during *Eimeria maxima* infections in chickens." *Poultry Science* 76(6): 814–821.
- Allen, P C, and RH Fetterer. 2002. "Recent Advances in Biology and Immunobiology of *Eimeria* Species and in Diagnosis and Control of Infection with These Coccidian Parasites of Poultry." *Clinical microbiology reviews* 15(1): 58.
- Andreasen, J R, C B Andreasen, A B Sonn, and D C Robeson. 1996. "The effects of haemolysis on serum chemistry measurements in poultry." *Avian pathology: journal of the W.V.P.A* 25(3): 519–536.
- Angulo, E., J. Brufau, A. Miquel, and E. Esteve-García. 1993. "Research Note: Effect of Diet Density and Pelleting on Productive Parameters of Japanese Quail." *Poultry Science* 72(3): 607–610.
- Aviagen. 2008. 1–20 *Objetivos de rendimiento Especificaciones nutricionales*. ed. Aviagen. Newbridge: Aviagen Limited.
- . 2010. 104 *Pollo de carne, manual de manejo*. Newbridge.
- Beal, R K, P Wigley, C Powers, P A Barrow, and A L Smith. 2006. "Cross-reactive cellular and humoral immune responses to *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis are associated with protection to heterologous re-challenge." *Veterinary immunology and immunopathology* 114(1-2): 84–93.
- Bendch, Adrienne. 1989. "Carotenoids and the Immune Response." *The Journal of Nutrition* (July 1988): 112–115.
- Bennoune, O., M. Melizi, K. Khazal, R. Bourouba, and A. Ayachi. 2009. "Chicken heterophils: a model for non-oxidative antimicrobial activity." *World's Poultry Science Journal* 65(04): 625.
- Biehler, Eric, Ala'a Alkerwi, Lucien Hoffmann, Elmar Krause, Michèle Guillaume, Marie-Lise Lair, and Torsten Bohn. 2012. "Contribution of violaxanthin, neoxanthin, phytoene and phytofluene to total carotenoid intake: Assessment in Luxembourg." *Journal of Food Composition and Analysis* 25(1): 56–65.
- Le Bihan-Duval, Elisabeth, Javad Nadaf, Cécile Berri, Frédérique Pitel, Benoît Graulet, Estelle Godet, Sophie Y Leroux, Olivier Demeure, Sandrine Lagarrigue, Cécile Duby, Larry A Cogburn, Catherine M Beaumont, and Michel J Duclos. 2011.

- “Detection of a Cis eQTL controlling BCMO1 gene expression leads to the identification of a QTG for chicken breast meat color.” *PloS one* 6(7): e14825.
- Blake, D P, and F M Tomley. 2014. “Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge.” *Trends in parasitology* 30(1): 12–9.
- Blount, JD, NB Metcalfe, Ti R Birkhead, and P F Surai. 2003. “Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches.” *Science (New York, N.Y.)* 300(5616): 125–7.
- BOE. 2013. 11370–11421 *Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.* REAL DECRETO.
- Bolder, N M, J A Wagenaar, F F Putirulan, K T Veldman, and M Sommer. 1999. “The effect of flavophospholipol (Flavomycin) and salinomycin sodium (Sacox) on the excretion of *Clostridium perfringens*, *Salmonella enteritidis*, and *Campylobacter jejuni* in broilers after experimental infection.” *Poultry Science* 78(12): 1681–9.
- Botella-Pavia, P, and M Rodríguez-Concepción. 2006. “Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods.” *Physiologia Plantarum* 126: 369–381.
- Bowes, V A, R J Julian, and T Stirtzinger. 1989. “Comparison of serum biochemical profiles of male broilers with female broilers and White Leghorn chickens.” *Canadian journal of veterinary research Revue canadienne de recherche veterinaire* 53(1): 7–11.
- Brady, L., D.R. Romsos, and G.A. Leveille. 1976. “In vitro estimation of fatty acid synthesis in the chicken (*Gallus domesticus*) utilizing 3H O.” *Comp. Biochem. Physiol.* 54: 403–407.
- Brake, J, M A Faust, and J Stein. 2003. “Evaluation of transgenic event Bt11 hybrid corn in broiler chickens.” *Poultry Science* 82(4): 551–9.
- Brake, J, M Faust, and J Stein. 2005. “Evaluation of transgenic hybrid corn (VIP3A) in broiler chickens.” *Poultry Science* 84(3): 503–512.
- Brake, J, and D Vlachos. 1998. “Evaluation of transgenic event 176 ‘Bt’ corn in broiler chickens.” *Poultry Science* 77(5): 648–653.
- Brancaccio, Paola, Giuseppe Lippi, and Nicola Maffulli. 2010. “Biochemical markers of muscular damage.” *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 48(6): 757–67.
- Britton, George, Synnove Liaaen-Jensen, and Hanspeter Pfander. 2009. *Carotenoids Volum 5: Nutrition and Health.* ed. Birkhäuser Verlag. Basel.
- Burlikowska, K, A Piotrowska, and R Szymeczko. 2010. “Effect of dietary fat type on performance , biochemical indices and fatty acids profile in the blood serum of broiler chickens.” *Journal of Animal and Feed Sciences* 19: 440–451.

- Burri, Betty Jane. 1997. "β-carotene and human health : A review of current research." *Nutrition Research* 17(3): 547–580.
- Butler, Michael W, Matthew B Toomey, and Kevin J McGraw. 2010. "How many color metrics do we need? Evaluating how different color-scoring procedures explain carotenoid pigment content in avian bare-part and plumage ornaments." *Behavioral Ecology and Sociobiology* 65(2): 401–413.
- Buxadé, C. 1988. *El pollo de carne*. 2^a ed. Madrid: Mundi-Prensa.
- Calenge, Fanny, Pete Kaiser, Alain Vignal, and Catherine Beaumont. 2010. "Genetic control of resistance to salmonellosis and to Salmonella carrier-state in fowl: a review." *Genetics, selection, evolution : GSE* 42: 11.
- Carpenter, James W. 2012. *Exotic Animal Formulary*. 4th ed. St. Louis: Elsevier Science.
- Castañeda, M P, E M Hirschler, and A R Sams. 2005. "Skin pigmentation evaluation in broilers fed natural and synthetic pigments." *Poultry Science* 84(1): 143–147.
- Castelló, José Antonio, Ramón Cedó, Ricardo Cepero, Enrique García, Miguel Pontes, and José M^a Vaquerizo. 2002. *Producción de Carne de Pollo*. Arenys de Mar: Real Escuela de Avicultura.
- CE. 1999. 53–57 *DIRECTIVA 1999/74/CE DEL CONSEJO de 19 de julio de 1999 por la que se establecen las normas m'nimas de protecci>n de las gallinas ponedoras*. DIRECTIVA.
- Chapman, H D. 1993. "Resistance to anticoccidial drugs in fowl." *Parasitology Today* 9(5): 159–162.
- Chapman, H D, and M W Shirley. 2003. "The Houghton strain of Eimeria tenella: a review of the type strain selected for genome sequencing." *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 32(2): 115–27.
- Chen, K-L, B-C Weng, M-T Chang, Y-H Liao, T-T Chen, and C Chu. 2008. "Direct enhancement of the phagocytic and bactericidal capability of abdominal macrophage of chicks by beta-1,3-1,6-glucan." *Poultry Science* 87(11): 2242–9.
- Chew, Boon P, and Jean Soon Park. 2004. "Functions and Actions of Retinoids and Carotenoids : Building on the Vision of James Allen Olson Carotenoid Action on the Immune Response 1." *The Journal of Nutrition* 134(1): 257–261.
- Christen, William G, J Michael Gaziano, and Charles H Hennekens. 2000. "Design of Physicians' Health Study II- A randomized trial of beta-carotene, vitamins E and C, and multivitamins, in prevention of cancer, cardiovascular disease, and eye disease, and review of results of completed trials." *Annals of Epidemiology* 2797(99): 125–134.
- Christou, P, T Capell, A Kohli, J Gatehouse, and A M R Gatehouse. 2006. "Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops." *Trends in plant science* 11(6): 302–8.

- Chung, Hae-yun, Helen M Rasmussen, and Elizabeth J Johnson. 2004. "Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men." *The Journal of Nutrition* 134(May): 1887–1893.
- CIE. 2009. "Data Set of Window Glass Transmission (CIE 184:2009 Indoor Daylight Illuminants)." <http://www.cie.co.at/index.php/LEFTMENU/DOWNLOADS> (August 5, 2014).
- Collins. 2014. "Collins English." <http://www.collinsdictionary.com/english-thesaurus> (April 10, 2014).
- Coltey, M., RP Bucy, SCH Chen, J Cihak, U Losch, D Char, S N M L E Douarin, and M D Cooperis. 1989. "Analysis of the first two waves of thymus homing stem cells and their T cell progeny in chick-quail chimeras." *Journal of Experimental Medicine* 170(August): 543–557.
- Cooper, MD, and JHM Wrathall. 2010. "Assurance schemes as a tool to tackle genetic welfare problems in farm animals: broilers." *Animal Welfare* 19(S)(6): 51–56.
- Costantini, D, and G Dell’Omo. 2006. "Effects of T-cell-mediated immune response on avian oxidative stress." *Comparative biochemistry and physiology Part A: Molecular & integrative physiology* 145(1): 137–42.
- Crawford, R D. 2003. "Chapter 1. Origin And History of Poultry Species." In *Poultry Breeding and Genetics*, ed. R D Crawford. Amsterdam: Elsevier B.V., p. 1–42.
- Critchley, K L, P L Long, J Johnson, O J Fletcher, and J R Glisson. 1986. "Coccidial oocysts in the liver of a turkey poult." *Avian pathology: journal of the W.V.P.A* 15(3): 619–21.
- Davies, B H. 1976. "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments." In *Carotenoids*, ed. T W Goodwin. London: Academic Press, p. 38–165.
- Davison, Fred, Bernd Kaspers, and Karel A. Schat. 2008. 496 *Avian Immunology*. First edit. eds. T F Davison, B Kaspers, and KA Schat. San Diego: Elsevier Ltd.
- Deming, DM, T Boileau, K H Heintz, A Christine, CA Atkinson, and JW Erdman. 2002. "Carotenoids: Linking Chemistry, Absorption, and Metabolism to Potential Roles in Human Health and Disease." In *Handbook of Antioxidants*, eds. E Cadenas and L Packer. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 200–232.
- Desmidt, M, R Ducatelle, and F Haesebrouck. 1997. "Pathogenesis of Salmonella enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens." *Veterinary microbiology* 56(1-2): 99–109.
- Domínguez, Marlene, Jordi Colmenero, and Ramón Bataller. 2009. "Treatment of liver fibrosis." *Gastroenterología y hepatología* 32(9): 627–32.
- DSM. 2014. "DSM in Animal nutrition & health." http://www.dsm.com/markets/anh/en_US/species/species-poultry/species-poultry-pigmentation.html (July 17, 2014).

- Eenennaam, A L Van, and A E Young. 2014. "Prevalence and impacts of genetically engineered feedstuffs on livestock populations 1." *Journal of Animal Science* 92(10): 4255–4278.
- EFSA. 2011. 9 85 *Analysis of the baseline survey on the prevalence of Campylobacter in broiler batches and of Campylobacter and Salmonella on broiler carcasses , Part B : Analysis of factors associated with Salmonella contamination of broiler carcasses.* Parma.
- . 2014a. 21 10 *Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis infections associated with consumption of eggs from Germany.* Parma.
- . 2014b. 12 1–77 *Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin . Part 2 (Salmonella in melons) 1.* Parma.
- Einspanier, R., Andreas Klotz, Jana Kraft, Karen Aulrich, Rita Poser, Fredi Gele, Gerhard Jahreis, and Gerhard Flachowsky. 2001. "The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material." *European Food Research and Technology* 212: 129–134.
- Eriksson, Jonas, Greger Larson, Ulrika Gunnarsson, Bertrand Bed'hom, Michele Tixier-Boichard, Lina Strömstedt, Dominic Wright, Annemieke Jungerius, Addie Vereijken, Ettore Randi, Per Jensen, and Leif Andersson. 2008. "Identification of the yellow skin gene reveals a hybrid origin of the domestic chicken." *PLoS Genetics* 4(2): 1–8.
- Estruch, Juan J, Gregory W Warren, Martha A Mullins, Gordon J Nye, Joyce A Craig, and Michael G Koziel. 1996. "Vip3A, a novel Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(May): 5389–5394.
- FAO. 1993. *El maíz en la nutrición humana.* Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- . 2012. "FAOSTAT." <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=569&lang=es#ancor> (July 27, 2014).
- . 2013. "FAO Statistical Yearbook 2013 World Food and Agriculture" ed. FAO. : 307. <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF> (April 10, 2014).
- Farré, Gemma, Chao Bai, Richard M Twyman, Teresa Capell, Paul Christou, and Changfu Zhu. 2011. "Nutritious crops producing multiple carotenoids--a metabolic balancing act." *Trends in plant science* 16(10): 532–40.
- Fede, M.R. 1980. "Structure and Gas-Flow Pattern in the Avian Respiratory System." *Poultry Science* 59: 2642–2653.
- Federación Avícola Catalana. 1992. "Comunicación personal."

- Fernández-Rubio, C, C Ordóñez, J Abad-González, A Garcia-Gallego, M Pilar Honrubia, J Jose Mallo, and R Balaña-Fouce. 2009. "Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from Salmonella Enteritidis infection." *Poultry science* 88(5): 943–8.
- Fudge, A. 2000. 486 *Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets*. ed. Saunders Company. Philadelphia, PA, USA: Saunders Company.
- Furusho, T., E. Kataoka, T. Yasuhara, M. Wada, and S. Masushige. 2000. "Retinol Equivalence of Carotenoids Can be Evaluated by Hepatic Vitamin A Content." *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 70(2): 43–47.
- Gantois, Inne, Richard Ducatelle, Frank Pasmans, Freddy Haesebrouck, Richard Gast, Tom J Humphrey, and Filip Van Immerseel. 2009. "Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis." *FEMS microbiology reviews* 33(4): 718–38.
- Gast, R K, and C W Beard. 1989. "Age-Related Changes in the Persistence and Pathogenicity of Salmonella typhimurium in Chicks." *Poultry Science* 68(11): 1454–1460.
- Glick, B. 1986. Avian Physiology 87–101 *Avian Physiology*. Four ed. ed. P. D. Sturkie. New York, NY: Springer New York.
- Goldstein, D L, and E Skadhauge. 1999. "Renal and Extrarenal Regulation of Body Fluid Composition." In *Avian Physiology*, ed. P. D. Sturkie. New York, NY: Springer New York, p. 265–297.
- Gonnet, Jean-François. 1998. "Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited—1. A colorimetric definition using the CIELAB scale." *Food Chemistry* 63(3): 409–415.
- Greene, J A, R M McCracken, and R T Evans. 1985. "A contact dermatitis of broilers - clinical and pathological findings." *Avian pathology: journal of the W.V.P.A* 14(1): 23–38.
- Griminger, P. 1986. "Lipid metabolism." In *Avian Physiology*, ed. P. Sturkie. New York, NY: Springer New York, p. 345–358.
- Gross, W, and H Siegel. 1983. "Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens." *Avian Diseases* 27: 972–979.
- Hadipour, M M, S H Farjadian, F Azad, N Sheibani, and A Olyaie. 2011. "Histologic Lesions of Thymus and Bursa of Fabricius in Commercial Broiler Chickens Inoculated with H9N2 Avian Influenza Virus." *International Journal of Animal and Veterinary Advances* 3(3): 186–188.
- Hamelin, C, and U Altemueller. 2012. "The effect of carotenoids on yolk and skin pigmentation." *World Poult.*
- Hammershøj, M, U Kidmose, and S Steinfeldt. 2010. "Deposition of carotenoids in egg yolk by short-term supplement of coloured carrot (*Daucus carota*) varieties as

- forage material for egg-laying hens.” *Journal of the science of food and agriculture* 90(7): 1163–71.
- Harrison, G J, and T L Lightfoot. 2006a. *Clinical Avian Medicine Vol 2*. eds. G J Harrison and T Lightfoot. Palm Beach, Florida, USA: Spix Publishing, Inc.
- . 2006b. *Clinical Avian Medicine Volume I*. ed. Inc Spix Publishing. Palm Beach, Florida: Spix Publishing.
- Haseeb, Abdul, Muhammad Ghiasuddin Shah, Jameel Ahmed Gandahi, Ghulam Murtaza Lochi, Muhammad Shoaib Khan, Muhammad Faisal, Faisal Ayub Kiani, Raza Ali, and Susheel Kumar Oad. 2014. “Histo-morphological Study on Thymus of Aseel chicken.” *Journal of Agriculture and Food Technology* 4(2): 1–5.
- Havenstein, G., P. Ferket, and M. Qureshi. 2003. “Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets.” *Poultry Science* 82(10): 1500–1508.
- Heckert, R A, I Estevez, E Russek-Cohen, and R Pettit-Riley. 2002. “Effects of density and perch availability on the immune status of broilers.” *Poultry Science* 81(4): 451–7.
- Hencken, H. 1992. “Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation.” *Poultry Science* 71(4): 711–717.
- Hermier, D. 1997. “Conference: Avian Lipoprotein Metabolism: An Update Lipoprotein Metabolism and Fattening in Poultry 1.” *The Journal of nutrition* 127(5): 805–808.
- Higgins, J P, S E Higgins, A D Wolfenden, S N Henderson, A Torres-Rodriguez, J L Vicente, B M Hargis, and G Tellez. 2010. “Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on Salmonella Enteritidis in neonatal broilers.” *Poultry Science* 89(2): 243–7.
- Higgins, S E, G F Erf, J P Higgins, S N Henderson, A D Wolfenden, G Gaona-Ramirez, and B M Hargis. 2007. “Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage numbers and phagocytosis of Salmonella enteritidis by abdominal exudate cells.” *Poultry Science* 86(11): 2315–21.
- Hill, B, T H Roger, and F W Vorhagen. 1997. “Comparative analysis of the quantization of color spaces on the basis of the CIELAB color-difference formula.” *ACM Transactions on Graphics* 16(2): 109–154.
- Hochleithner, M. 1994. “Biochemistries.” In *Avian medicine: principles and application*, eds. B W Ritchie, G J Harrison, and L R Harrison. Lake Worth, Florida: Wingers Publishing, inc., p. 39.
- Holt, P S, R H Davies, J Dewulf, R K Gast, J K Huwe, D R Jones, D Waltman, and K R Willian. 2011. “The impact of different housing systems on egg safety and quality.” *Poultry science* 90(1): 251–62.

- Hõrak, P, L Saks, U Karu, I Ots, P F Surai, and K J McGraw. 2004. "How coccidian parasites affect health and appearance of greenfinches." *Journal of Animal Ecology* 73: 935–947.
- Hu, Xuming, Aijian Qin, Kun Qian, Hongxia Shao, Chuan Yu, Wencai Xu, and Ji Miao. 2012. "Analysis of protein expression profiles in the thymus of chickens infected with Marek ' s disease virus." *Virology Journal* 9(1): 1.
- IOM. 2000. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. ed. National Academy of Sciences. Washington, D.C.: National Academy Press.
- Jacobs, C M, P L Utterback, C M Parsons, D Rice, B Smith, M Hinds, M Liebergesell, and T Sauber. 2008. "Performance of laying hens fed diets containing DAS-59122-7 maize grain compared with diets containing nontransgenic maize grain." *Poultry Science* 87(3): 475–479.
- Jawale, C V, A Chaudhari, B W Jeon, R M Nandre, and J H Lee. 2012. "Characterization of a novel inactivated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis vaccine candidate generated using a modified cI857/ λ PR/gene E expression system." *Infection and immunity* 80(4): 1502–9.
- Jennings, J., L. Albee, D. Kolwyck, J. Surber, M L Taylor, G. Hartnell, R. Lirette, and K. Glenn. 2003. "Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard Corn Borer Corn." *Poultry Science* 82(3): 371–380.
- Jeurissen, S., F. Wagenaar, and E. Janse. 1999. "Further characterization of M cells in gut-associated lymphoid tissues of the chicken." *Poultry Science* 78(7): 965–972.
- Jiang, Y. H., R. B. McGeachin, and C. A. Bailey. 1994. " α -Tocopherol, β -Carotene, and Retinol Enrichment of Chicken Eggs." *Poultry Science* 73(7): 1137–1143.
- Jlali, M, B Graulet, M Chabault, E Godet, S Leroux, C Praud, E Le, M J Duclos, and C Berri. 2012. "gene alters xanthophyll metabolism through a selective effect on its mRNA abundance in the breast muscle 1." *Journal of Animal Science* 90: 4280–4288.
- Johnson, Joyce, and W.Malcolm Reid. 1970. "Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens." *Experimental Parasitology* 28(1): 30–36.
- Johnson-Delaney, Cathy A. 2008. *Exotic Companion Medicine Handbook*. ed. K. Storm Hudelson. Lake Worth: Zoological Education Network,.
- Jones, H E, C C Warkup, A Williams, and E Audsley. 2008. "The effect of genetic improvement on emissions from livestock systems." In *59th Annual Meeting of the European Association of Animal Production*, , p. 28.
- De Jong, I. C., J. van Harn, H. Gunnink, V. A. Hindle, and A. Lourens. 2012. "Erratum to 'Footpad dermatitis in Dutch broiler flocks: Prevalence and factors of influence' [Poult. Sci. 91(7):1569-1574]." *Poultry Science* 91: 2411–2411.

- Jyonouchi, H, L Zhang, M Gross, and Y Tomita. 1994. "Immunomodulating actions of carotenoids: enhancement of in vivo and in vitro antibody production to T-dependent antigens." *Nutrition and Cancer* 21(1): 47–58.
- Kamel, F M, A H Azzam, and M I Abd El-Aziz. 1993. "Effect of Virginiamycin and Monensin Interaction on Salmonella Infected Chicks." *Journal of Applied Animal Research* 3(1): 47–54.
- Kapell, D N R G, W G Hill, A-M Neeteson, J McAdam, A N M Koerhuis, and S Avendaño. 2012. "Twenty-five years of selection for improved leg health in purebred broiler lines and underlying genetic parameters." *Poultry Science* 91: 3032–43.
- Kidd, M T. 2004. "Nutritional modulation of immune function in broilers." *Poultry Science* 83(4): 650–7.
- Kiefer, C, S Hessel, J M Lampert, K Vogt, M O Lederer, D E Breithaupt, and J von Lintig. 2001. "Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A." *The Journal of Biological Chemistry* 276: 14110–14116.
- Kleiner, David E, Elizabeth M Brunt, Mark Van Natta, Cynthia Behling, Melissa J Contos, Oscar W Cummings, Linda D Ferrell, Yao-Chang Liu, Michael S Torbenson, Aynur Unalp-Arida, Matthew Yeh, Arthur J McCullough, and Arun J Sanyal. 2005. "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 41(6): 1313–21.
- König, D, K H Wagner, I Elmadfa, and A Berg. 2001. "Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress." *Exercise immunology review* 7: 108–133.
- Kotrbaček, V, M Skřivan, J Kopecký, O Pěnkava, P Hudečková, I Uhríková, and J Doubek. 2013. "Retention of carotenoids in egg yolks of laying hens supplemented with heterotrophic *C. hlorella*." 2013(5): 193–200.
- Koutsos, Elizabeth a, Andrew J Clifford, C Christopher Calvert, and Kirk C Klasing. 2003. "Maternal carotenoid status modifies the incorporation of dietary carotenoids into immune tissues of growing chickens (*Gallus gallus domesticus*)." *The Journal of Nutrition* 133(4): 1132–1138.
- Koutsos, Elizabeth A, Juan Carlos García, and Kirk C Klasing. 2006. "Nutritional Immunology Carotenoids from In Ovo or Dietary Sources Blunt Systemic Indices of the Inflammatory Response in Growing Chicks (*Gallus gallus domesticus*) 1 , 2." *The Journal of Nutrition* (October 2005): 1027–1031.
- Koziel, Michael G, Gary L Beland, Cindy Bowman, Nadine B Carozzi, Rebecca Crenshaw, Lyle Crossland, John Dawson, Nalini Desai, Martha Hill, Sue Kadwell, Karen Launis, Kelly Lewis, Daryl Maddox, Kathryn McPherson, Moez R Meghji, Ellis Merlin, Richard Rhodes, Gregory W Warren, Martha Wright, and Stephen V Evola. 1993. "Field Performance of Elite Transgenic Maize Plants Expressing an Insecticidal Protein Derived from *Bacillus thuringiensis*." *Nature Biotechnology* 11(2): 194–200.

- Leeson, S., and J D. Summers. 2008. 413 *Commercial Poultry Nutrition: 3rd Edition*. ed. University Books. Guelph, Ontario: Nottingham University Press.
- Leeson, S., and JD. Summers. 2000. 339 *Broiler Breeder Production*. Guelph: Nottingham University Press.
- Leeson, S., and T. Walsh. 2010. "Feathering in commercial poultry I. Feather growth and composition." *World's Poultry Science Journal* 60(01): 42–51.
- Lister, S. 1988. "Salmonella enteritidis infection in broilers and broiler breeders." *Veterinary Record* 123(13): 350–350.
- Liu, G.-D., G.-Y. Hou, D.-J. Wang, S.-J. Lv, X.-Y. Zhang, W.-P. Sun, and Y. Yang. 2008. "Skin Pigmentation Evaluation in Broilers Fed Different Levels of Natural Okra and Synthetic Pigments." *The Journal of Applied Poultry Research* 17(4): 498–504.
- Liu, Y Q, C R Davis, S T Schmaelzle, T Rocheford, M E Cook, and S a Tanumihardjo. 2012. "β-Cryptoxanthin biofortified maize (*Zea mays*) increases β-cryptoxanthin concentration and enhances the color of chicken egg yolk." *Poultry Science* 91(2): 432–8.
- Long, P L. 1970. "Development (schizogony) of *Eimeria tenella* in the liver of chickens treated with corticosteroid." *Nature, London* 225: 290–291.
- Long, P L, and B. J. Millard. 2009. "Rejection of *Eimeria* by foreign hosts." *Parasitology* 78(02): 239–247.
- Long, P.L., and T.K. Jeffers. 1986. "Control of chicken coccidiosis." *Parasitology Today* 2(9): 236–240.
- Lucas, Alberto, Judith Morales, and Alberto Velando. 2014. "Differential effects of specific carotenoids on oxidative damage and immune." *J Exp Biol* 217: 1253–1262.
- Lumeij, J T. 1987. "Plasma urea, creatinine and uric acid concentrations in response to dehydration in racing pigeons (*Columba livia domestica*)." *Avian pathology: journal of the W.V.P.A* 16(3): 377–82.
- MAGRAMA. 2014a. *El sector de la avicultura de puesta en cifras: Principales indicadores económicos en 2013*. Madrid.
- . 2014b. 73 *El sector de la carne de aves en cifras: principales indicadores económicos en 2013*. Madrid.
- Makovický, P, E Tůmová, R Rajmon, Z Bízková, and H Härtlová. 2011. "The influence of restrictive feeding of chickens on the microscopic structure of their liver." *Acta Veterinaria Brno* 81(1): 27–30.
- Marusich, W., E. De Ritter, and J. C. Bauernfeind. 1960. "Evaluation of Carotenoid Pigments for Coloring Egg Yolks." *Poultry Science* 39(6): 1338–1345.

- Maxwell, M H. 1987. "The avian eosinophil—a review." *World's Poultry Science Journal* 43(3): 190–207.
- . 1993. "Avian blood leucocyte responses to stress." *World's Poultry Science Journal* 49(1): 34–43.
- Maxwell, M H, and G W Robertson. 1995. "The avian basophilic leukocyte: A review." *World's Poultry Science Journal* 51(3): 307–325.
- Maxwell, M H, and G. W. Robertson. 1998. "The avian heterophil leucocyte: A review." *World's Poultry Science Journal* 54(2): 155–178.
- McDougald, L R, and S H Fitz-Coy. 2013. "SECTION V Parasitic Diseases." In *Diseases of Poultry, 13th edition*, ed. D E Swayne. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell, p. 1148–1201.
- Mcgraw, K J, P M Nolan, and O L Crino. 2006. "Carotenoid accumulation strategies for becoming a colourful House Finch: analyses of plasma and liver pigments in wild moulting birds." *Functional Ecology* 20(4): 678–688.
- Mcguire, R G. 1992. "Reporting of Objective Color Measurements." *Hort Science* 27(12): 1254–1255.
- Meriwether, L S, B D Humphrey, D G Peterson, K C Klasing, and E a Koutsos. 2010. "Lutein exposure, in ovo or in the diet, reduces parameters of inflammation in the liver and spleen laying-type chicks (*Gallus gallus domesticus*)." *Journal of animal physiology and animal nutrition* 94(5): e115–22.
- Micozzi, M.S., E.D. Brown, P.R. Taylor, and E. Wolfe. 1988. "Carotenoderma in men with elevated carotenoid intake from foods and β -carotene supplements." *American Journal of Clinical Nutrition* 48: 1061–1064.
- Misra, S, J D Gordon, A Fu, J F Glockner, A R Chade, J Mandrekar, L Lerman, and D Mukhopadhyay. 2006. "The porcine remnant kidney model of chronic renal insufficiency." *The Journal of surgical research* 135(2): 370–9.
- Moraes, HLS, CTP Salle, FO Salle, AP Padilha, VP Nascimento, GF Souza, RA Pereira, and JO Artencio. 2004. "Infectious Bursal Disease: Evaluation of Pathogenicity of Commercial Vaccines from Brazil in Specific Pathogen Free Chichens." *Journal, Brazilian Science, Poultry Brasileira, Revista*: 243–248.
- Moran, E T. 2007. "Nutrition of the developing embryo and hatchling." *Poultry Science* 86(5): 1043–9.
- Mortensen, A. 2009. "Supplements." In *Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health*, ed. Dr. George Britton. Basel: Birkhäuser Verlag, p. 67–82.
- Mougeot, F., L. Pérez-Rodríguez, J. Martínez-Padilla, F. Leckie, and S. M. Redpath. 2007. "Parasites, testosterone and honest carotenoid-based signalling of health." *Functional Ecology* 21(5): 886–898.

- Mountzouris, K C, C Balaskas, I Xanthakos, A Tzivinikou, and K Fegeros. 2009. "Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella enteritidis*." *British poultry science* 50(4): 467–78.
- Müller, Hermann, Egbert Mundt, Nicolas Eterradossi, and M Rafiqul Islam. 2012. "Current status of vaccines against infectious bursal disease." *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 41(2): 133–9.
- Nakaue, H. S., A. A. Kurnick, B. J. Hulett, and B. L. Reid. 1966. "Effect of Ethoxyquin on Carotenoid Stability and Utilization." *Poultry Science* 45(3): 478–483.
- Naqvi, S, G Farré, G Sanahuja, T Capell, C Zhu, and P Christou. 2010. "When more is better: multigene engineering in plants." *Trends in plant science* 15(1): 48–56.
- Naqvi, Shaista, Changfu Zhu, Gemma Farre, Koreen Ramessar, Ludovic Bassie, Jürgen Breitenbach, Dario Perez Conesa, Gaspar Ros, Gerhard Sandmann, Teresa Capell, and Paul Christou. 2009. "Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(19): 7762–7767.
- National Research Council. 1994. 176 *Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition, 1994*. Ninth. ed. National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press.
- Nayak, L., M. K. Raval, B. Biswal, and U. C. Biswal. 2001. "Photoprotection of green leaves by zeaxanthin , a two-channel process." *CURRENT SCIENCE* 81(9): 9–10.
- NCBI. 2014. "HomoloGene." http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene?linkname=gene_homologene&from_uid=419792 (August 4, 2014).
- Nimpf, Johannes, Markus Radosavljevic, and Wolfgang J Schneider. 1989. "Specific postendocytic proteolysis of apolipoprotein B in oocytes does not abolish receptor recognition." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(February): 906–910.
- Obulesu, M, Muralidhara Rao Dowlathabad, and P V Bramhachari. 2011. "Carotenoids and Alzheimer's Disease: An insight into therapeutic role of retinoids in animal models." *Neurochemistry International* 59(5): 535–41.
- Ochiai, K, E Handharyani, and T Umemura. 2002. "Idiopathic hepatic fibrosis with cholestasis in broiler chickens: immunohistochemistry of hepatic stellate cells." *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 31(5): 425–8.
- Ola-Fadunsin, Shola David, and Isaiah Oluwafemi Ademola. 2013. "Direct effects of *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae) acetone leaf extract on broiler chickens naturally infected with *Eimeria* species." *Tropical animal health and production* 45(6): 1423–8.

- Oláh, I, and B Glick. 1982. "Splenic white pulp and associated vascular channels in chicken spleen." *The American journal of anatomy* 165(4): 445–80.
- Oláh, I, and L Vervelde. 2008. "Structure of the avian lymphoid system." In *Avian immunology*, eds. T F Davison, B Kaspers, and KA Schat. London: Elsevier Ltd, p. 13–50.
- Omayma, A, and B Abdel Nasser. 2013. "Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2(1): 225–234.
- Orledge, Josephine M., Jonathan D. Blount, Andrew N. Hoodless, and Nick J. Royle. 2012. "Antioxidant supplementation during early development reduces parasite load but does not affect sexual ornament expression in adult ring-necked pheasants." *Functional Ecology* 26(3): 688–700.
- Packer, Lester, Klaus Kraemer, Ute Obermüller-Jevic, and Helmut Sies. 2005. *Carotenoids and Retinoids Molecular Aspects and Health Issues*. Aoc Press. Champaign, Illinois.
- Parshad, R K, R Kaur, and J K Natt. 2008. "Structural heterogeneity of yolk spheres in hierarchical follicles from hen ovary: a histochemical study." *British Poultry Science* 49(3): 265–72.
- Pérez-Vendrell, A M, J M Hernández, L Llauradó, J Schierle, and J Brufau. 2001. "Influence of source and ratio of xanthophyll pigments on broiler chicken pigmentation and performance." *Poultry Science* 80(3): 320–326.
- Peters, A, A G Denk, K Delhey, and B Kempenaers. 2004. "Carotenoid-based bill colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards." *Journal of evolutionary biology* 17(5): 1111–20.
- Petracci, M, and D L Fletcher. 2002. "Broiler skin and meat color changes during storage." *Poultry science* 81(10): 1589–97.
- Picard, M, JP Melcion, D Bertrand, and JM Faure. 2002. "Poultry Feedstuffs Supply, Composition and Nutritive Value." In *Visual and tactile cues perceived by chickens*, eds. J.M. McNab and K.N. Boorman. Wallingford: CABI Publishing, p. 279–300.
- Puvadolpirod, S, and J P Thaxton. 2000. "Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters." *Poultry Science* 79(3): 363–9.
- Qi, N S, Y Y Wang, S Q Liao, C Y Wu, M N Lv, J Li, Z X Tong, and M F Sun. 2013. "Partial protective of chickens against *Eimeria tenella* challenge with recombinant EtMIC-1 antigen." *Parasitology research* 112(6): 2281–7.
- Rahim, A. 2005. "Type of Fatty Acids, Lipoprotein Secretion from Liver and Fatty Liver Syndrome in Laying Hens." *International Journal of Poultry Science* 4(11): 917–919.
- Ramírez, J S. 2006. "Liofilización de Alimentos." *ReCiTeIA* 6(2): 40.

- Ratcliffe, Michael J H. 2008. "B cells, the bursa of Fabricius and the generation of antibody repertoires." In *Avian immunology*, eds. Fred Davison, Bernd Kaspers, and Karel A. Schat. San Diego: Elsevier Ltd, p. 67–89.
- Reece, R L. 1989. "Hepatic coccidiosis (*Eimeria* sp) in a wild magpie-lark (*Grallina cyanoleuca*)." *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 18(2): 357–62.
- Rosenberger, J K, and S S Cloud. 1998. "Chicken anemia virus." *Poultry Science* 77(8): 1190–1192.
- Ruff, M. D., W. M. Reid, and J. K. Johnson. 1974. "Lowered Blood Carotenoid Levels in Chickens Infected with *Coccidia*." *Poultry Science* 53(5): 1801–1809.
- Samour, JAIME. 2006. *Clinical Avian Medicine (2-volume set) 557 Avian Medicine (Vol. II)*. eds. GREG J. HARRISON and TERESA L LIGHTFOOT. Palm Beach: Spix Publishing, Inc.
- Sandmann, Gerhard. 2002. "Combinatorial Biosynthesis of Carotenoids in a Heterologous Host: A Powerful Approach for the Biosynthesis of Novel Structures." *ChemBioChem* 3(7): 629–635.
- Santos, E G, F G P Costa, J H V Silva, T D D Martins, D F Figueiredo-Lima, M Macari, C J B Oliveira, and P E N Givisiez. 2013. "Protective effect of mannan oligosaccharides against early colonization by *Salmonella Enteritidis* in chicks is improved by higher dietary threonine levels." *Journal of applied microbiology* 114(4): 1158–65.
- Santos, E, Ospina, and E O Oviedo. 2004. "Evaluation of Xanthophylls Extracted from *Tagetes erectus* (Marigold Flower) and *Capsicum Sp.* (Red Pepper Paprika) as a Pigment for Egg-yolks Compare with Synthetic Pigments." *International Journal of Poultry Science* 3(11): 685–689.
- Sasipriya, Gopalakrishnan, and Perumal Siddhuraju. 2013. "Evaluation of growth performance, serum biochemistry and haematological parameters on broiler birds fed with raw and processed samples of *Entada scandens*, *Canavalia gladiata* and *Canavalia ensiformis* seed meal as an alternative protein source." *Tropical animal health and production* 45(3): 811–20.
- Schmid, M., I. Nanda, M. Guttenbach, C. Steinlein, M. Hoehn, M. Scharl, T. Haaf, S. Weigend, R. Fries, J-M. Buerstedde, K. Wimmers, D.W. Burt, J. Smith, S. A'Hara, A. Law, D.K. Griffin, N. Bumstead, J. Kaufman, P.A. Thomson, T. Burke, M .A.M. Groenen, R.P.M.A. Crooijmans, A. Vignal, V. Fillon, M. Morisson, F. Pitel, M. Tixier-Boichard, K. Ladjali-Mohammed, J. Hillel, A. Mäki-Tanila, H.H. Cheng, M.E. Delany, J. Burnside, and S. Mizuno. 2000. "First report on chicken genes and chromosomes 2000." *Cytogenetic and Genome Research* 90(3-4): 169–218.
- Schuppan, Detlef, and Nezam H Afdhal. 2008. "Liver cirrhosis." *Lancet* 371(9615): 838–51.

- Senthilkumaran, Subramanian, Shah Sweni, Namasivayam Balamurugan, and Ponniah Thirumalaikolundusubramanian. 2014. "Acute rhabdomyolysis: Cook in soup." *International journal of critical illness and injury science* 4(3): 271.
- Sepp, Tuul, Ulvi Karu, Elin Sild, Marju Männiste, and Peeter Hõrak. 2011. "Effects of carotenoids, immune activation and immune suppression on the intensity of chronic coccidiosis in greenfinches." *Experimental Parasitology* 127(3): 651–657.
- Shepherd, E M, and B D Fairchild. 2010. "Footpad dermatitis in poultry." *Poultry science* 89(10): 2043–51.
- Shirley, M W, and P Bedrník. 1997. "Live Attenuated Vaccines against Avian Coccidiosis." *Parasitology Today* 13(12): 481–484.
- Shirley, M.W. 1995. "Coccidiosis research - COST effective." *Parasitology Today* 11(3): 89–91.
- Sild, Elin, Tuul Sepp, Marju Männiste, and Peeter Hõrak. 2011. "Carotenoid intake does not affect immune-stimulated oxidative burst in greenfinches." *The Journal of experimental biology* 214(Pt 20): 3467–73.
- Siller, W G. 1981. "Renal pathology of the fowl--a review." *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 10(3): 187–262.
- Silva. 2007. "Blood Serum Components and Serum Protein Test of Hybro-PG Broilers of Different Ages."
- Silva, Prl, OC Freitas Neto, AC Laurentiz, Junqueira OM, and Fagliari JJ. 2008. "Blood Serum Components and Serum Protein Test of Hybro-PG Broilers of Different Ages." *Journal, Brazilian Science, Poultry Brasileira, Revista* 9(4): 229–232.
- Silversides, F G. 1994. "The haugh unit correction for egg weight is not adequate for comparing eggs from chickens of different lines and ages." *Poultry Science* 3(1): 120–126.
- Simarakas, S, O Chinrasri, and S Aengwanich. 2004. "Hematological, electrolyte and serum biochemical values of the Thai indigenous chickens (*Gallus domesticus*) in northeastern, Thailand." *Songklanakarin J. Sci. Technol* 26(3): 425–430.
- Sirri, F, G Minelli, E Folegatti, S Lolli, and A Meluzzi. 2007. "Foot dermatitis and productive traits in broiler chickens kept with different stocking densities , litter types and light regimen." 6: 734–736.
- Sirri, F, M Petracci, M Bianchi, and A Meluzzi. 2010. "Survey of skin pigmentation of yellow-skinned broiler chickens." *Poultry Science* 89(7): 1556–1561.
- Snedecor, G W, and W G Cochran. 1989. *504 Statistical Methods (8Th Ed)*. 8^a ed. ed. IOWA STATE UNIVERSITY PRESS. Iowa: IOWA STATE UNIVERSITY PRESS.

- Solcan, Carmen, C Cotea, and Gh Solcan. 2012. "Immunosuppressive action of deoxynivalenol of thymus in chickens." *Cercetări Agronomice în Moldova XLV(4)*: 99–104.
- Soler, MD, Mateos M, Safón E, Soler P, and Garcés C. 2011. "Caracterización del color y relación con el pH de pechuga de pollo durante el procesado de las canales en matadero." In *XLVIII SIMPOSIO CIENTÍFICO DE AVICULTURA*,.
- Sribhen, C, A Choothesa, T Songserm, and K Sribhen. 2003. "Age-Related Differences in Levels of Blood Chemistry Parameters and Cardiac Marker Proteins in Commercial Broilers." *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 326: 321–326.
- Suchý, P, E. Straková, B Jarka, J Thiemel, and V Vecerek. 2004. "Differences between metabolic profiles of egg-type and meat-type hybrid hens." *Czech J. Anim. Sci.* 49(8): 323–328.
- Surai, P F. 2012. "The antioxidant properties of canthaxanthin and its potential effects in the poultry eggs and on embryonic development of the chick. Part 1." *World's Poultry Science Journal* 68(03): 465–476.
- Surai, P F, and B K Speake. 1998. "Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo." *Molecules (Basel, Switzerland)* 2863(98): 645–651.
- Surai, P F, BK Speake, and NHC Sparks. 2001. "Carotenoids in Avian Nutrition and Embryonic Development. 1. Absorption, Availability and Levels in Plasma and Egg Yolk." *Journal of Poultry Science* 38(1): 1–27.
- Suzuki, S. 1994. "Pathogenicity of Salmonella enteritidis in poultry." *International journal of food microbiology* 21(1-2): 89–105.
- Swayne, D E, J R Glisson, L R McDougald, L K Nolan, D L Suarez, and Nair V L. 2013. *1423 Diseases of Poultry, 13th edition*. 13^a ed. ed. D E et al. Swayne. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Tabeeh, M A S Abu, and A A S Al- Mayah. 2009. "Morphological investigation of bursa of fabricius of imported broilers and local chicks vaccinated with two types of ibd vaccines." *Iraqi Journal of Veterinari Sciences* 23(II): 201–206.
- Takita, Yuko, Makoto Ichimiya, Yoshiaki Hamamoto, and Masahiko Muto. 2006. "A case of carotenemia associated with ingestion of nutrient supplements." *The Journal of dermatology* 33(2): 132–4.
- Talebi, A. 2006. "Biochemical Parameters in Broiler Chickens Vaccinated Against NO, IB and IBO." *International Journal of Poultry Science* 5(12): 1151–1155.
- Tarek, Khenenou, Melizi Mohamed, Bennoune Omar, and Benzaoui Hassina. 2012. "Morpho-Histological Study of the Thymus of Broiler Chickens During Post-Hashing Age." *International Journal of Poultry Science* 11(1): 78–80.
- Tona, K., O.M. Onagbesan, V. Bruggeman, K. Mertens, Y. Jego, and E. Decuypere. 2004. "Comparison of Feed Intake , Blood Metabolic Parameters , Body and Organ

- Weights of Growing Broilers Originating from Dwarf and Standard Broiler Breeder Lines.” *International Journal of Poultry Science* 3(6): 422–426.
- Toomey, Matthew B, Michael W Butler, and Kevin J McGraw. 2010. “Immune-system activation depletes retinal carotenoids in house finches (*Carpodacus mexicanus*).” *Journal of Experimental Biology* 213(Pt 10): 1709–1716.
- United Nations. 2013. pp.54 *World Population Prospects. The 2012 Revision. Volume II: Demographic profiles*. New York.
- UPAC, and IUB. 1974. 26 *Nomenclature of Carotenoids*. ed. UPAC—IUB. London: Butterworths.
- USDA. 2006. “Poultry Yearbook.” *Poultry Yearbook*. <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1367>.
- Vegad, J L, and A K Katiyar. 2001. 649 *A TEXTBOOK OF VETERINARY SPECIAL (Infectious Diseases of Livestock and Poultry)*. 1st ed. eds. J L Vegad and A K Katiyar. Charbagh, Lucknow INDIA: International Book Distributing CO.
- Vilà, B., D. de Queiroz, I. Badiola, A. Pérez-Vendrell, and J. Brufau. 2012. “Effects of carob bean gum on performance, nutrient digestibility and *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonisation in chickens.” *Food Research International* 45(2): 1133–1138.
- Wallach, M, N C Smith, R Braun, and J Eckert. 1995. “Potential control of chicken coccidiosis by maternal immunization.” *Parasitology Today* 11(7): 262–265.
- Wang, M L, X Suo, J H Gu, W W Zhang, Q Fang, and X Wang. 2008. “Influence of grape seed proanthocyanidin extract in broiler chickens: effect on chicken coccidiosis and antioxidant status.” *Poultry science* 87(11): 2273–80.
- Watson, Rebecca R, Zhenxing Fu, and John B West. 2007. “Morphometry of the extremely thin pulmonary blood-gas barrier in the chicken lung.” *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 292(3): L769–77.
- Weatherall, I L, and B D Coombs. 1992. “Skin color measurements in terms of CIELAB color space values.” *The Journal of investigative dermatology* 99: 468–473.
- Welfare Quality®. 2009. *Welfare Quality® assessment protocol for poultry (broilers, laying hens)*. *Welfare Quality® Consortium*. Lelystad, Netherlands: Welfare Quality.
- West, B, and B X Zhou. 1989. “Did chickens go north? New evidence for domestication.” *World’s Poultry Science Journal* 45: 205–18.
- WHO. 2011. “Children aged 6-59 months who received vitamin A supplementation (%)” http://apps.who.int/gho/indicatorregistry/App_Main/view_indicator.aspx?iid=69 (April 27, 2014).

- Williams, R.B. 1999. "A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry." *International Journal for Parasitology* 29(8): 1209–1229.
- World Health Organization. 2009. 68 WHO. *Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005*. Geneva: WHO.
- Wyss, M, and R Kaddurah-Daouk. 2000. "Creatine and Creatinine Metabolism." *Physiological reviews* 80(3): 1107–1214.
- Yan, G L, Y M Guo, J M Yuan, D Liu, and B K Zhang. 2011. "Sodium alginate oligosaccharides from brown algae inhibit Salmonella Enteritidis colonization in broiler chickens." *Poultry science* 90(7): 1441–8.
- Yasuda, M. 2002. *The Anatomical Atlas of Gallus*. Tokio: University of Tokyo Press.
- Yerian, Lisa. 2011. "Histopathological evaluation of fatty and alcoholic liver diseases." *Journal of digestive diseases* 12(1): 17–24.
- Yonekura-Sakakibara, Keiko, and Kazuki Saito. 2006. "Review: Genetically modified plants for the promotion of human health." *Biotechnology letters* 28(24): 1983–91.
- Zhu, Changfu, Shaista Naqvi, Jürgen Breitenbach, Gerhard Sandmann, Paul Christou, and Teresa Capell. 2008. "Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(47): 18232–7.

