EFECTO DE LA EDAD Y EL NIVEL DE VITAMINA E EN DIETAS DE POLLOS BROILER SOBRE LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.

Menoyo, D[1]., Naranjo, N[1]., Rey, A[2]., Frikha, M[1]., López-Bote, C.J[2]., Mateos, G.G[1].

[1]Departamento de Producción Animal. E.T.S.I. Agrónomos. UPM. 28040 Madrid. david.menoyo@upm.es[2]Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria UCM. 28040 Madrid.

INTRODUCCIÓN

La vitamina E pertenece al grupo de nutrientes con capacidad reguladora del sistema inmune (Koutsos y Klasing, 2008). En aves, la vitamina E induce cambios tanto en el sistema inmune innato como en el específico, mejora la función fagocítica de los macrófagos, amortigua la respuesta en fase aguda, disminuye la proporción de heterófilos y potencia la síntesis de anticuerpos (Koutsos y Klasing, 2008; Khan et al., 2012). Recientemente se ha demostrado que parte del efecto de la vitamina E está ligado a su capacidad de actuar directamente sobre factores de transcripción nuclear que modulan la expresión de citoquinas, tales como el factor-Kappa B o el PPARγ (Koutsos y Klasing, 2008; Nakamura y Omaye, 2009). Por otro lado, el impacto de la vitamina E sobre la modulación del sistema inmune viene definido por factores tales como la edad y la relación dosis-respuesta. En broiler la inclusión en la dieta de niveles moderadamente superiores (25-50 UI/kg dieta) al recomendado por el National Research Council (NRC, 1994; 10 UI/kg) aumenta los títulos de anticuerpos tras la vacunación (Friedman et al., 1998; Leshchinsky y Klasing, 2001; Lin y Chang, 2006). Sin embargo, niveles superiores a 150 UI/kg tienen un efecto supresor sobre la producción de anticuerpos (Koutsos y Klasing, 2008). En relación a la edad es importante determinar aquellos periodos o "ventanas" en los que es necesario estimular el sistema inmune (Kogut, 2009). Un periodo a considerar sería el de las dos primeras semanas de vida del pollo debido a la menor funcionalidad de macrófagos y heterófilos (Kogut, 2009). El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto del nivel de Vitamina E y la edad sobre la modulación de la respuesta inmune en pollos. Para ello se estudió el efecto de la inclusión de 40 y 160 ppm de vitamina E en la dieta sobre la expresión de la interleuquina 2 (IL 2), el interferón gamma (IFNγ) y el factor de crecimiento mielomonocítico (MGF) en el bazo de los animales a los 7 y 21 días de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 336 pollitos broiler Ross 308 de un día de edad. Las aves se pesaron a su llegada a la granja experimental (41,4 ± 2,6 g) y se distribuyeron en bloques aleatorios entre los distintos tratamientos experimentales. Se utilizó un diseño completamente al azar con 3 tratamientos; dieta control sin vitamina E añadida (control negativo) y dos tratamientos extras con 40 o 160 ppm de vitamina E sintética añadida. La dieta basal contenía 18,2 mg α-tocoferol/kg aportados por las materias primas. La ración base contenía un 54% de maíz, 37% de harina de soja y añadía un 4% de aceite de soja. Tras el análisis de Cada tratamiento se replicó siete veces y la unidad experimental fue la jaula con 16 pollos. A los 7 y 21 días de edad se sacrificaron y tomaron muestras de tres pollos al azar por cada réplica. Homogeneizados de tres bazos se dispusieron en tubos eppendorf con 1ml de una solución preservadora de ARN (RNA later, Ambion) y se almacenaron a -80ºC para el posterior análisis de expresión de citoquinas. La extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando el GenEluteMammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y la síntesis del ADN complementario (cDNA) utilizando el High-CapacitycDNA Archive Kit (AppliedBiosystems Foster City, CA, USA) siguiendo las

instrucciones y recomendaciones del fabricante. El estudio de la abundancia relativa del ARNm de los genes diana se llevó a cabo con el ABI Prism7300 Sequence Detector System (AppliedBiosystems Foster City, CA, USA) utilizando SYBR®Green (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) como agente intercalante de fluorescencia. Para la cuantificación se utilizaron cebadores específicos de pollo que amplifican los siguientes genes a estudio: gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y ubiquitina (UB) utilizados como genes housekeeping o de referencia para normalizar los resultados de expresión, e INFγ, IL2 y MGF como genes indicadores de funcionalidad del sistema inmune. Los cebadores utilizados para el gen UB fueron seleccionados a partir del artículo de DeBoever et al. (2008). Los de los genes GAPDH, INFγ, IL2 y MGF se diseñados a partir de las secuencias codificantes accesibles en el GenBank y el NCBI con referencias K01458.1, Y07922.1, AF000631.1 y NM_205279.1 respectivamente. Para este diseño, se utilizó el programa Primer Express v.2 (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) y se seleccionaron los juegos de cebadores más específicos procurando acotar regiones codificantes. Para analizar el efecto de los distintos tratamientos sobre los cambios de expresión de los genes estudiados se utilizó el procedimiento mixed del paquete estadístico SAS incluyendo el nivel de vitamina E y el tiempo como efectos fijos siguiendo el modelo propuesto por Steibel et al. (2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 7 días de edad se observaron cambios significativos de expresión de las tres citoquinas objeto de estudio en aquellas aves alimentadas con 160 ppm de vitamina E. La IL2, el MGF y el IFNγ aumentaron su expresión 2, 3,6 y 2,3 veces respectivamente ($P<0,05$) respecto a la dieta control (Figura 1). No se observaron cambios de expresión debido a la vitamina E a los 21 días de edad. El correcto aporte de nutrientes inmediatamente después de la eclosión es vital para el rápido desarrollo del sistema inmune en pollos (Dibner et al. 1998). La vitamina E tiene un efecto estimulador del sistema inmune de las aves permitiendo mejorar y modular la funcionalidad fagocítica de macrófagos y heterófilos y potenciando la proliferación de linfocitos B (Koutsos y Klasing 2008). Parte de estos efectos están mediados por el efecto directo de la vitamina E sobre la IL2 o el IFNγ (Calder y Kew, 2002). Los resultados del presente estudio parecen indicar un efecto potenciador del poder de la vitamina E a niveles de 160 ppm al incrementar la expresión de la IL2 y del IFNγ indicadores de una mayor activación de linfocitos T y células Natural Killer. Un aumento de expresión de ambas citoquinas y de CD3+ en pollos se ha relacionado con la maduración del GALT a los 14 días de vida (Bar-Sira et al., 2002). Por lo tanto, la inclusión de 160 ppm de vitamina E en dietas de arranque para pollos presenta un efecto positivo sobre el desarrollo de la funcionalidad del sistema inmune.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Bar-Shira, E., Sklan, D., y Friedman A. 2003.Develop. Comp. Immunology 27, 147–157.•Calder, P.C. y Kew, S. 2002. Brit. J. Nutr., 88, S165–S176.•Dibner, J.J., Knight, C.D., Kitchell, M.L. y Atwell, C.A. 1998. J. Appl. Poult. Res., 7, 425-436.•De Boever, S., Vangestel, C., De Backer, P., Croubels, S. y Sys, S.U. 2008. Vet. Immunol.Immunopat. 122, 312–317. • Friedman, A., Bartov, I. y Sklan, D. 1998. Poult. Sci., 77, 956-962.•Khan, R.U., Rahman, Z.U., Nikousefat, Z., Javdani, M., Tufarelli, V., Dario, C.,Selvaggi, M. y Laudadio, V. 2012. World's Poult. Sci. J., 68, 31-39.•Kogut, M.H. 2009. J. Applied Poult. Res., 18, 111–124.•Koutsos, E.A. y Klasing, K. 2008. Factors modulating the avian immune system. En: Avian Immunology. T. Fred Davison, Bernd Kaspers, KarelAntoniSchat Eds. Academic Press. 323-338.•Leshchinsky, T.V. y Klasing, K.C. 2001.Poult. Sci., 80, 1590-1599.•Lin, Y.E y Chang, S.J. 2006. Asian-Australasian J. Anim. Sci., 19, 884-891. •Nakamura, Y.K. y Omaye, S.T. 2009. J. Func. Foods, 1, 241–252.•National Research Council, 1994.Nutrient Requirements of Poultry, 9th Edition.National Academy Press, Washington, DC.

Agradecimientos: El presente trabajo ha sido parcialmente financiado por la Comunidad de Madrid S2009/AGR-1704.

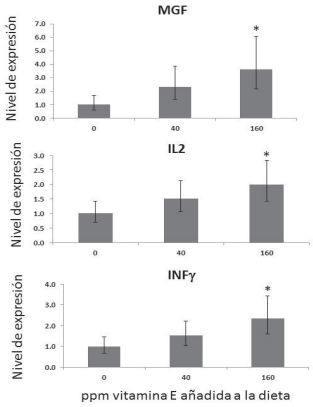


Figura 1: *Efecto del nivel de vitamina E en el pienso sobre la expresión de los genes IL2, INFγ y MGF en pollitos de 7 días de edad. El índice representa el cambio de expresión del nivel de VE (40 o 160 ppm) en relación al control. (Promedio ± SEM; n = 6) * P ‹ 0,05.*

AGE AND DIETARY VITAMIN E LEVEL MODULATE IMMUNE RESPONSE IN BROILERS

ABSTRACT: The effects of age and dietary vitamin E concentration in the immune response of broiler were studied. A total of 336 Ross 308 chicks with an initial BW of 41.4 ± 2.6 g were randomly assigned to 3 experimental diets, a control diet with no added vitamin E and the same basal diet supplemented with 40 or 160 ppm of vitamin. The experimental unit was the cage with 16 birds and there were seven cages per treatment. At 7 and 21 d of age, 3 birds per cage were slaughtered and their spleen removed for cytokine gene expression analysis by real time RT-PCR. Interleukin 2 (IL2), myelomonocytic growth factor (MGF), and Interferon-gamma (IFNγ) gene expression were selected as indicators of immune system functionality. The expression of IL2, MGF and IFNγ increased ($P < 0.05$) by 2, 3.6, and 2.3 folds, respectively in birds fed the 160 ppm supplemented diet at 7 d of age when compared to those fed the control diet. No dietary effects were observed in cytokine gene expression in birds at 21 d of age. Under our experimental conditions the inclusion of 160 ppm of vitamin E in the diet enhances immune function during the first week of age of the chicks.

Key words: age, broilers, immune system, vitamin E.