

Inclusión de la hoja *Moringa oleifera* sobre constantes inmunológicas en pollos de engorda

Inclusion of the *Moringa oleifera* leaf on immunological constants in broiler chickens

Ramírez-Acosta Mariana¹ mariana.raac@hotmail.com Jiménez-Plascencia Cecilia² cecijimenez_@hotmail.com Juárez-Woo Carlos² cjuarezw@gmail.com Rendón-Guizar Jesús¹ nacho_0911@hotmail.com Ángeles-Espino Alejandro³ aangeles_1305@hotmail.com Sánchez-Chiprés David^{*2} chipres99@hotmail.com

¹Maestría Interinstitucional en Producción Pecuaria, México. ²Departamento de Producción Animal, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. México. ³Departamento de Producción Agrícola Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. México. *Autor responsable y de correspondencia: Sánchez-Chiprés David Román. Departamento de Producción Animal, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias; Camino Ingeniero Ramón Padilla Sánchez #2100, Predio Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México, C.P. 45200

Resumen

La producción avícola tiene gran relevancia por su alto impacto socioeconómico, genera alta demanda de ingredientes. *Moringa oleifera* ha adquirido gran importancia como suplemento nutricional y planta medicinal, por tanto, podría representar una alternativa como estimulante inmunológico. Se evaluaron los efectos de la inclusión de la hoja *M. oleifera* sobre constantes inmunológicas de pollos de engorda. Se utilizaron 180 pollos (hembras) línea genética Cobb distribuidas en 3 tratamientos: Control, M10 y M20. Se evaluó morfometría intestinal y contenido de IgY a los 21 y 42 días. Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar, se realizó ANDEVA y comparación de medias de Tukey. A los 42 días, la altura de vellosidades del duodeno del Control obtuvo valores más bajos (1485 µm) con respecto a los grupos M10 y M20. La altura de vellosidades de yeyuno fue significativamente mayor (P<0.05) en M10, con respecto a M20 y Control. En la profundidad de criptas de yeyuno existió diferencia (P<0.05) entre Control y M20, siendo este último el menor. El contenido de IgY a los 21 días fue significativamente mayor (P<0.05) en M10 y M20 con respecto a Control. *M. oleifera* tiene efecto positivo como inmunoestimulante y puede utilizarse en alimentación animal.

Palabras clave: *Moringa*, pollos engorda, morfometría intestinal, inmunología.

Abstract

The national poultry production has acquired great importance for being an activity of high socioeconomic impact and generates high demand for ingredients. *Moringa oleifera* has acquired great importance as a nutritional supplement and medicinal plant; therefore, it could represent an alternative as an immune stimulant. The effects of the inclusion of the *M. oleifera* leaf on the immunological constants of broiler chickens were evaluated. 180 chickens (females) Cobb genetic line were used, distributed in 3 treatments: Control, M10, and M20. Intestinal morphometry and the content of IgY were determined at 21 and 42 days. A completely randomized statistical design was used: ANOVA and comparison of Tukey's means were performed. At 42 days, the height of villi of the duodenum of the Control group obtained the lowest values (1485 µm) with respect to M10 and M20 groups. The height of the jejunal villi was significantly higher (P<0.05) in the M10 group, with respect to the M20 and Control groups. In the depth of the jejunum crypts, there was a difference (P<0.05) between the Control and M20, the latter being the least. The IgY content at 21 days was significantly higher (P<0.05) in the M10 and M20 than in the Control. *M. oleifera* has a positive effect as an immunostimulant and can be used in animal feeding.

Keywords: *Moringa*, broiler, intestinal morphometry, immunology.

INTRODUCCIÓN

Los sectores de producción de aves en los países en desarrollo enfrentan algunos problemas, como el incremento de los costos de alimentación; debido a esto, se han buscado fuentes alternativas en su alimentación que se encuentren disponibles y no sean costosas. La avicultura tiene alto impacto en los ámbitos económico y social; ya que más del 60 % de la proteína animal que se consume en México y el mundo proviene de la industria avícola (SAGARPA, 2017).

Moringa oleifera es el género de un árbol perteneciente a la familia Moringaceae (Kumar et al., 2013); ha sido utilizada principalmente para consumo humano, ya que ha adquirido gran importancia como suplemento nutricional y planta medicinal; esto trae como consecuencia el incremento en su costo; por lo tanto, para ser utilizada en la alimentación animal debe promoverse que se planten más árboles en las producciones donde se requiere (Etalem et al. 2014). Esta planta tiene importancia como forrajera debido a sus características nutricionales y a su alto rendimiento en producción de biomasa fresca (Padilla et al., 2014). Las hojas del género *M. oleifera* se distinguen por su elevado contenido de macronutrientes como proteína y energía; y micronutrientes como vitaminas y minerales. Sin embargo, cabe mencionar que también posee fenoles, factores anti-nutricionales como taninos, saponinas, fitatos y oxalatos (Teteh et al., 2013).

Uno de los factores que es importante tomar en cuenta en los animales es el estrés, el cual puede afectar la modulación de la respuesta inmune, entre otras cosas; lo que provoca cambios en las células inmunes circulantes en sangre. Las causas más comunes de estrés en animales se deben a la alimentación y a las condiciones ambientales. Se ha comprobado que *M. oleifera* es un árbol rico en vitaminas, minerales y antioxidantes, que promueve la salud y mejora la respuesta inmune. Se realizó un estudio para evaluar el efecto de la hoja de *M. oleifera* como inmunomodulador en ratones, y se demostró que tiene potencial significativo como agente inmunomodulador (Al-Majali et al., 2017).

Se ha demostrado que los mediadores proinflamatorios producidos durante la respuesta inflamatoria, agravan el desarrollo patológico de algunas enfermedades crónicas y se demostró que *M. oleifera* es un potente inhibidor de la inflamación (Channarong et al., 2011)

Asimismo, es importante tomar en cuenta el desarrollo del intestino, el cual se ve reflejado en la integridad de su morfología; tiene una relación directa con el crecimiento y desarrollo del animal. Se realizó un estudio donde se evaluaron los efectos del polvo de las hojas de *M. oleifera* como suplemento dietético, para evaluar morfometría intestinal en ratas sin obtener diferencias significativas (Zvinorova et al., 2015). El desarrollo de la mucosa intestinal muestra relación a la presencia o ausencia de

agentes exógenos, el cual se ve reflejado en el cambio de altura y densidad de las vellosidades y profundidad de las criptas, entre otros (Gomide, 2004).

La importancia de este trabajo radica en buscar una alternativa viable y disponible de una fuente alimenticia, que tenga un efecto en el sistema inmunológico y pueda ser incorporada a las dietas de las producciones avícolas. Se espera que la inclusión de la hoja de *M. oleifera* en la alimentación de pollos de engorda tenga un efecto positivo en sus constantes inmunológicas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la inclusión de la hoja de *M. oleifera* sobre los constantes inmunológicas de pollos de engorda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 180 pollos línea Cobb, hembras de un día de nacidas; fueron distribuidas en 3 tratamientos de 6 repeticiones cada uno y 10 réplicas por repetición: 1. Control, 2. M10 (10% de inclusión de *M. oleifera*), 3. M20 (20% de inclusión de *M. oleifera*). Se alojaron en corrales de 1 m² por cada 10 aves (Cobb 500, 2013; Cobb 500, 2015). Las dietas se formularon al 95 % de lo estipulado por la NRC (1994) (tabla 1).

Tabla 1. Niveles de inclusión de ingredientes en dietas de iniciación y finalización.

Ingrediente	Control		M10		M20	
	I	F	I	F	I	F
Aceite	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Sorgo	48.18	59.28	46.91	58.20	45.31	58.23
Pasta de soya	35.92	26.34	32.80	24.50	30.50	22.00
Hoja de <i>M. oleifera</i>	-	-	4.50	3.00	8.50	5.50
Carbonato de Ca	1.21	1.10	1.00	0.97	0.79	0.88
Fosfato dicálcico	0.68	0.28	0.80	0.34	0.90	0.39
Premezcla	8.00	7.00	8.00	7.00	8.00	7.00

I = Dieta etapa iniciación, F = Dieta etapa finalización.

Para la evaluación morfométrica microscópica, se tomaron muestras del duodeno y yeyuno de las aves destinadas a eutanasia humanitaria, a los 21 y 42 días de edad (SEMARNAT, 1995); las muestras se conservaron en formol al 10 %. Se realizó la técnica de inclusión en parafina; posteriormente se realizaron cortes histológicos de 4 micras de grosor y la tinción de hematoxilina eosina. Se realizó la lectura de las placas con un microscopio de objetivo micrométrico, luego se midió la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas intestinales; a continuación, se utilizó el programa Motic Images Plus® (Rodríguez, 2012).

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar; para después realizar ANDEVA. Cuando existió diferencia estadística entre los tratamientos, se realizó la prueba de Tukey para comparación de medias con un nivel de confianza del 95 %. Los datos se analizaron en el paquete estadístico Minitab (2014)®. Se extrajeron 3 ml de

sangre de 3 aves por corral, a los 21 y 42 días de edad, y se colocaron las muestras en tubos de recolección; estos se dejaron reposar hasta completa coagulación y después se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min. Se separaron los sueros y se transfirieron a microviales de 1.5 ml; a continuación, se realizaron dos alícuotas de cada uno.

La cuantificación de IgY se realizó mediante un método de ELISA tipo Sandwich, se usaron los estándares disponibles en el kit; se agregaron las muestras a los pocillos de microtitulación de poliestireno (incluidas en el kit) que contienen anticuerpos Anti-IgY adsorbidos en el fondo, y se permitió que se unieran durante 30 min. Posteriormente se realizaron cuatro lavados para remover las proteínas que no se unieron; se añadió anticuerpo Anti-IgY conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) en la dilución recomendada por el kit, y se incubó a 37 °C durante el tiempo indicado en el kit. Se realizaron nuevamente 4 lavados y posteriormente se añadió sustrato cromogénico 3, 3', 5, 5' – tetrametilbencidina (TMB) y se incubó durante 10 min en oscuridad. Finalmente se adicionó una solución para detener la reacción, y se procedió a la lectura de absorbancia; se utilizó un filtro para 450 nm en un lector de ELISA. La cantidad de anticuerpos contenidos en la muestra es directamente proporcional a la absorbancia a 450 nm (MyBioSource®).

Para realizar el análisis estadístico se utilizó una tendencia lineal de coincidencia con puntos de datos conocidos; utilizando el método de los mínimos cuadrados para determinar los valores en ng/ml. Una vez obtenidos dichos valores, se realizó ANDEVA; cuando existió diferencia estadística entre los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey con nivel de significancia del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con respecto a la altura de vellosidades en el duodeno a los 21 días, el tratamiento que tuvo valores más elevados fue M20, con un valor de 1620 μm , que fue superior al grupo M10 y Control en 156 y 366 μm , respectivamente. Por otra parte, al comparar el grupo Control, éste fue menor por 210 μm con respecto al grupo M10. La altura de las vellosidades del yeyuno mostró un comportamiento similar, ya que el grupo M20 presentó un valor de 1537 μm , que fue superior en 165 y 271 μm a los grupos M10 y Control, respectivamente. Las diferencias fueron estadísticamente significativas y se presentan en la tabla 2. Para la medición de la profundidad de criptas del duodeno a los 21 días, se presentó un comportamiento opuesto, ya que el grupo M20 obtuvo un valor de 213 μm ; el cual es menor que Control y M10 por 38 y 44 μm , respectivamente; estos valores son estadísticamente significativos. En Yeyuno no existió diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos; dichos resultados se muestran en la tabla 2. A los 42 días de edad, en la altura de vellosidades del duodeno, el grupo Control obtuvo un valor de 1485 μm , que fue mayor por 170 y 160 μm a los grupos M10 y M20, respectivamente; estas diferencias son estadísticamente significativas. Sin embargo, la altura de las vellosidades del yeyuno fue significativamente mayor en el tratamiento M10, con un valor de 1579 μm respecto a los tratamientos M20 y Control,

que obtuvieron 155 y 164 μm menos, respectivamente; esta diferencia es estadísticamente significativa (tabla 2).

Sin embargo, para la medición de profundidad de criptas de duodeno a los 42 días de edad, no se presentó el mismo patrón, ya que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos; por el contrario, en yeyuno existió diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento Control y M20 con valores de 190 y 167 μm , respectivamente (tabla 2).

Tabla 2. Altura de vellosidades y profundidad de criptas intestinales a los 21 y 42 días.

	Control	M10	M20	Valor P	EE
Altura de Vellosidades a los 21 días (μm)					
Duodeno	1263 ^c	1473 ^b	1629 ^a	<0.001	56.27
Yeyuno	1266 ^b	1372 ^b	1537 ^a	<0.001	68.90
Profundidad de Criptas a los 21 días (μm)					
Duodeno	251 ^a	257 ^a	213 ^b	<0.001	15.30
Yeyuno	262 ^a	227 ^a	258 ^a	0.051	18.33
Altura de Vellosidades a los 42 días (μm)					
Duodeno	1485 ^b	1655 ^a	1645 ^a	<0.001	52.13
Yeyuno	1415 ^b	1579 ^a	1424 ^b	0.002	61.98
Profundidad de Criptas a los 42 días (μm)					
Duodeno	193 ^a	177 ^a	181 ^a	0.098	9.52
Yeyuno	190 ^a	176 ^{ab}	167 ^b	0.015	10.05

^{a,b} Literales diferentes por fila indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

EE= Error Estándar de la desviación.

Esta tendencia de comportamiento que aumenta la altura de vellosidades y disminuye profundidad de criptas, sugiere una mayor absorción de nutrientes y conduce a una mejor digestión (Lipismita *et al.*, 2015). Zvinorova *et al.* (2015) midieron la altura de las vellosidades intestinales y profundidad de las criptas en ratas, se utilizaron dietas con 14 y 20 % de *M. oleifera* y no obtuvieron diferencias significativas entre la longitud de vellosidades, profundidad de criptas, ni en la proporción de ambas.

Al analizar los resultados de la cantidad de IgY en el día 21, el tratamiento Control obtuvo un valor de 92 ng/ml, menor por 85 y 121 ng/ml a los grupos M10 y M20; estos valores son estadísticamente significativos; sin embargo, entre el tratamiento M10 y M20 no existió diferencia estadística significativa. A los 42 días, el grupo Control tuvo un valor más elevado por 52 ng/ml, con respecto al grupo M10; esta diferencia es estadísticamente significativa. Sin embargo, entre el tratamiento Control y M20 no existió diferencia estadística significativa, al igual que entre el tratamiento M10 y M20 (tabla 4). No existen trabajos en los que se haya determinado la cantidad de Inmunoglobulinas en aves al utilizar *M. oleifera*.

CONCLUSIÓN

El desarrollo de las vellosidades intestinales fue mejor en los animales alimentados con *M. oleifera*, ya que se obtuvieron vellosidades más largas y criptas menos profundas. *M. oleifera* tuvo un efecto positivo como inmunoestimulante a los 21 días, ya que eleva los niveles de IgY en sangre.

Tabla 3. Diferentes niveles de inclusión de la hoja de *M. oleifera* sobre la cantidad de IgY expresada en ng/mL a los 21 y 42 días de edad

Tratamiento	21 días	42 días
Control	92 ^a	160 ^a
M10	177 ^b	108 ^b
M20	213 ^b	140 ^{ab}
Valor P	<0.001	0.048
EE	29.13	30.10

^{a,b} Literales diferentes por columna indican diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

EE= Error Estándar de la desviación

LITERATURA CITADA

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Inc. Washington, D.C. E.U.A. ISBN 10: 0935584676 -ISBN 13: 9780935584677

AL-MAJALI IS, Al-Oran SA, Hassuneh MR, Al-Qaralleh HN, Abu Rayyan W, Al-Thunibat OY, Mallah E, Abu-Rayyan A, Salem S. 2017. Immunomodulatory effect of *Moringa peregrina* leaves, *ex vivo* and *in vivo* study. *Central European Journal of Immunology*. 42:3. Pp. 231 – 238. ISSN: 1426-3912. DOI: [10.5114/CEJI.2017.70964](https://doi.org/10.5114/CEJI.2017.70964).

CHANNARONG M, Pimajai C, Phawachaya P, Saovaros S, Siriporn T. 2011. *M. oleifera* Pod inhibits inflammatory mediator production by Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Murine Macrophage Cell Lines. 35:2 Pp. 445 – 455. ISSN: 0360-3997, EISSN: 1573-2576. DOI: [10.1007/s10753-011-9334-4](https://doi.org/10.1007/s10753-011-9334-4).

GOMIDE JM, Vinícius SE, Macari M, Boleli IC. 2004. Use of scanning electron microscopy for the evaluation of intestinal epithelium integrity. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 33: 6. ISSN: 1806-9290.

KUMAR DD, Dora J, Kumar A, Kumar GR. 2013. A Multipurpose Tree - *Moringa oleifera*. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*. 2: 415 - 422. ISSN: 2277-5005

LIPISMITA S, Vishwa BC, Guttula S, Ramesh S, Ashok KP. 2015. Prebiotic potential of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in Wistar rats: effects of levels of supplementation on hindgut fermentation, intestinal morphology, blood metabolites and immune response. *J Sci Food Agric*. 95: 1689-1696. DOI: [10.1002/jsfa.6873](https://doi.org/10.1002/jsfa.6873).

MARTÍN C, Martín G, García A, Fernández T, Hernández E, Puls J. 2013. Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes*. 36 (2): 137 - 149. ISSN: 0864-0394.

MINITAB STATISTICAL SOFTWARE, 2014. State College, PA.

MyBioSource®, Chicken IgY ELISA Kit, Immunoperoxidase Assay for Determination of IgY in Chicken Samples, MBS564008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1994. Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition, 1994. Washington, DC: The National Academy Press. ISBN: 978-0-309-04892-7.

PADILLA C, Fraga N, Scull I, Tuero R, Sarduy L. 2014. Efecto de la altura de corte en indicadores de la producción de forraje de *Moringa oleifera* vc. Plain. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 48 (4): 405 - 409. ISSN: 0034-7485

RODRÍGUEZ JC. 2012. Respuesta morfométrica intestinal de pollos alimentados con diferentes niveles de morera (*Morus alba*). *Revista Citecsa*. 3 (4). ISSN: 2027-6745.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2017. *Comunicado de prensa*, La Paz, Baja California Sur, 13 de octubre de 2017. Disponible en la Web: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/bajacaliforniasur/boletines/2017/octubre/Documents/2017BS336.pdf>

SEMARNAT (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural). 1996. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. NOM-033-ZOO-1995, México: Diario Oficial de la Federación, 17 p. Disponible: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5376424&fecha=18/12/2014

TALHA E. 2013. The use of *Moringa oleifera* in poultry diets. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 37: 492 - 496. DOI: 10.3906/vet-1211-40

TETEH A, Lawson E, Tona K, Decuypere E, Gbeassor M. 2013. *Moringa oleifera* Leave: Hydro-Alcoholic Extract and Effects on Growth Performance of Broilers. *International Journal of Poultry Science*. 12 (7): 401 - 405. ISSN: 1682-8356.

YAMÉOGO CW, Bengaly MD, Savadogo A, Nikiema PA, Traore SA. 2011. Determination of Chemical Composition and Nutritional Values of *Moringa oleifera* Leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*. 10 (3): 264 – 26. ISSN: 1680-5194.

ZVINOROVA PI, Lekhanya L, Erlwanger K, Chivandi E. 2013. Dietary effects of *Moringa oleifera* leaf powder on growth, gastrointestinal morphometry and blood and liver metabolites in Sprague Dawley rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 99. 21-28. DOI: 10.1111/jpn.12182

Agradecimientos

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Universidad de Guadalajara.