

Efecto modulador de los aceites esenciales de menta y eucalipto en pollos infectados con vVND

Pakistan Veterinary Journal, 2016, 36(3): 350-355

Autores:

MHH Awaad, MAA Afify, SA Zoulfekar, Faten F Mohammed, MA Elmenawy y HM Hafez.

Resumen

El tratamiento de pollos de engorde con una mezcla de aceites esenciales de menta y eucalipto mejoró la protección y el rendimiento productivo en comparación con las aves infectadas del grupo control positivo.

Este tratamiento disminuyó la mortalidad total, aumentó el peso corporal final y redujo el índice de conversión alimenticia final, conocido como FCR, con diferencias significativas de $P \leq 0.05$.

La mezcla de aceites esenciales de menta y eucalipto tuvo un efecto positivo sobre las lesiones macroscópicas y microscópicas. Además, mejoró los títulos de anticuerpos medidos por HI y ELISA contra la vacuna del virus de Newcastle, en comparación con los grupos control no tratados.

En conclusión, la mezcla de aceites esenciales de menta y eucalipto usada en esta investigación controló significativamente la infección por el virus velogénico de Newcastle, ya que tuvo un efecto inmunomodulador y estimuló positivamente la respuesta inmune contra este virus altamente agresivo, el cual tiene un gran impacto económico negativo en la industria avícola.

Palabras clave: pollos de engorde, eucalipto, respuesta inmune, menta, aceites volátiles, virus velogénico de Newcastle.

Introducción

Los productos herbales y sus extractos oleosos se han usado como terapia natural en productos farmacéuticos. Sin embargo, solo en los últimos años las plantas aromáticas y sus extractos se han introducido en la alimentación animal.

Existen complicaciones porque los productos herbales y sus aceites usados como aditivos alimentarios pueden variar mucho según su origen botánico, procesamiento y composición.

La mayoría de estudios investigaron mezclas de distintos compuestos activos y reportaron sus efectos sobre el rendimiento productivo, más que sobre sus impactos fisiológicos.

Los componentes inmunomoduladores fortalecen los mecanismos de defensa e inmunidad del organismo. Actualmente se usan para estimular la respuesta inmune no específica tanto en medicina humana como veterinaria.

La mezcla de aceites esenciales de menta y eucalipto demostró tener un efecto inmunoestimulante sobre la respuesta inmune humoral y celular frente a la enfermedad de Newcastle en pollos.

También se evidenció su utilidad para modular la respuesta inmune en aves inmunocomprometidas después de la infección con el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, IBDV, y/o después de la vacunación contra IBDV, en comparación con grupos control no tratados.

El presente ensayo tuvo como objetivo determinar los posibles efectos moduladores del uso de aceites esenciales de menta y eucalipto en emulsificantes en pollos de engorde infectados con el virus velogénico de Newcastle, vVND.

Materiales y métodos

Mezcla de aceites esenciales volátiles

Se utilizó una mezcla comercial de aceites esenciales volátiles de menta y eucalipto en emulsificantes, producida bajo el nombre comercial **Mentofin®** por la empresa EWABO Co., Alemania.

Mentofin contiene:

- Cineol: **42.2%**
 - Limoneno: **3.5%**
 - L-mentol: **48.7%**
 - Felandreno: **0.5%**
 - Alfa-pineno: **1.0%**
 - Beta-pineno: **0.3%**
 - Terpineol: **0.3%**
-

Cepa desafiante del virus de Newcastle

El virus fue aislado en embriones de pollo de 10 días de edad e identificado como virus de Newcastle mediante PCR.

La secuencia del producto de PCR demostró ser similar al genotipo VII, Chicken/China/SDWF07/2011, número de acceso JQ015296.

La velogenicidad del virus fue monitoreada mediante inoculación intramuscular en 10 aves de 28 días de edad, pollos de engorde libres de anticuerpos contra Newcastle. Se usó una dosis de **10^{6.8} EID50/ml/ave**, lo que produjo **100% de mortalidad**.

Diseño experimental

Se utilizaron **300 pollos de engorde Arbor Acres** de un día de edad. Fueron distribuidos en 5 grupos iguales, del grupo 1 al 5, con **60 aves por grupo**.

Cada grupo fue dividido en 3 réplicas de 20 aves cada una, mantenidas en aisladores bajo estrictas medidas de bioseguridad.

Las aves tuvieron libre acceso al agua y fueron alimentadas con una ración comercial ad libitum.

Las aves de los grupos 2, 3 y 4 fueron vacunadas contra diferentes enfermedades de acuerdo con los programas de vacunación usados normalmente en granjas egipcias de pollos de engorde.

Los grupos 1 y 5 se mantuvieron como grupos control sin vacunación contra Newcastle.

Tratamiento con aceites esenciales

Los pollos de los grupos 1, 3 y 5 fueron tratados con la mezcla de aceites esenciales volátiles de menta y eucalipto por dos vías:

1. Vía oral en agua de bebida

Se aplicó en los siguientes intervalos:

- Día 4 al 7
- Día 16 al 18
- Día 25 al 39

Dosis: **0.25 mL/L**, durante **12 horas al día**.

2. Vía spray

Se aplicó en los días:

3, 7, 12, 13, 15, 16, 19, 23, 27, 31, 35 y 39.

Dosis: **0.1 mL/20 mL de agua/10 aves**, usando spray fino menor de 3 micras, según recomendación del fabricante.

Los grupos 2 y 4 no recibieron tratamiento.

Desafío viral

Al día 28 de edad, se seleccionaron aleatoriamente 2 aves de cada réplica, es decir 6 aves por grupo, de los grupos 1 al 4. Estas aves fueron infectadas por vía intramuscular con una dosis de **10^{6.8} EID₅₀/mL/ave** del virus velogénico de Newcastle.

Luego fueron mantenidas con sus compañeras de corral para permitir infección por contacto.

El grupo 5 permaneció sin infección como control negativo.

Las aves infectadas fueron observadas durante 14 días post infección para evaluar:

- Tasa de supervivencia.
 - Lesiones macroscópicas en aves muertas.
 - Lesiones macroscópicas en aves sacrificadas al final del periodo de observación.
-

Evaluación inmunológica

Al primer día de edad se tomaron muestras de sangre de 12 aves seleccionadas aleatoriamente para determinar el título medio de anticuerpos maternos contra el virus de Newcastle.

Además, se tomaron muestras de 36 aves por grupo, 12 por réplica, a los días 7, 14, 21 y 28 de edad.

Estas muestras fueron analizadas mediante:

- ELISA.
 - Prueba de inhibición de la hemaglutinación, HI.
-

Examen histopatológico

Al día 35 de edad, se sacrificaron 3 pollos infectados por contacto, seleccionados aleatoriamente de cada grupo infectado.

Se tomaron muestras de:

- Tonsilas cecales.
- Pulmones.
- Tráquea.

Estas muestras fueron sometidas a examen histopatológico para evaluar lesiones microscópicas.

Los pollos restantes fueron evaluados según variables de rendimiento productivo.

Análisis estadístico

Se utilizó análisis de varianza de una vía mediante el procedimiento de modelos lineales generales del software SAS.

El factor principal fue la suplementación con Mentofin como efecto medio.

Los valores medios fueron evaluados mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

La significancia estadística se consideró con **$P \leq 0.05$** .

Resultados

Se observó una alta tasa de supervivencia, **100%**, en el grupo control negativo tratado, vacunado y no desafiado.

En cambio, se registró **100% de mortalidad** en el grupo control positivo no tratado, no vacunado y desafiado.

El uso conjunto de aceites volátiles con vacunación contra Newcastle en el grupo 3, tratado, vacunado y desafiado, produjo los mejores resultados de protección frente al desafío con vVND, alcanzando **80% de protección**.

La tasa de supervivencia frente al desafío con vVND fue:

- Grupo 1, tratado/no vacunado/desafiado: **18.33%**
- Grupo 2, no tratado/vacunado/desafiado: **61.67%**
- Grupo 3, tratado/vacunado/desafiado: **80%**

- Grupo 4, no tratado/no vacunado/desafiado: **0%**
- Grupo 5, tratado/vacunado/no desafiado: **100%**

La puntuación de lesiones post mortem varió entre los grupos y fue mayor en el grupo 4, que fue el grupo no tratado, no vacunado y desafiado.

La suplementación con aceites esenciales mejoró significativamente los parámetros de rendimiento, especialmente peso corporal e índice de conversión alimenticia.

Resultados inmunológicos

Los títulos medios de ELISA fueron significativamente más altos en todos los intervalos evaluados en los grupos vacunados contra Newcastle y tratados con aceites volátiles, grupos 3 y 5.

También se observaron títulos superiores en el grupo 1, no vacunado pero tratado con aceites volátiles, en comparación con el grupo control positivo 4.

Los títulos HI de los grupos vacunados y tratados con aceites esenciales, grupos 3 y 5, mostraron un aumento significativo en comparación con los grupos 1 y 4 en todos los intervalos estudiados.

Hallazgos histopatológicos

No se detectaron lesiones histopatológicas evidentes en el grupo control negativo 5, tratado, vacunado y no desafiado.

Además, las aves de este grupo mostraron aumento del tamaño folicular en las tonsilas cecales, con activación linfoblástica de los elementos foliculares.

Lesiones en tráquea

Las lesiones microscópicas traqueales fueron más severas en el grupo 4, no tratado, no vacunado y desafiado.

Estas lesiones incluyeron:

- Deciliación marcada.
- Necrosis del epitelio traqueal.
- Proliferación hiperplásica focal del epitelio.
- Infiltración linfocítica intensa.
- Congestión.
- Hemorragia.
- Edema severo en la lámina propia.

Las lesiones fueron menos severas en el grupo 1 que en el grupo 2.

En el grupo 3, tratado, vacunado y desafiado, las lesiones se caracterizaron por hiperplasia de células caliciformes del epitelio traqueal, infiltración linfocítica y dilatación de capilares sanguíneos en la lámina propia.

Lesiones en pulmones

En el grupo 1 se observaron lesiones pulmonares leves, como:

- Edema interlobular e intersticial leve.
- Degeneración del epitelio de los bronquios secundarios.
- Congestión.
- Aumento de linfocitos en la lámina propia.
- Edema perivascular e intersticial.

En el grupo 2 se observaron lesiones más avanzadas que en el grupo 1, caracterizadas por:

- Mayor edema intersticial y perivascular.
- Infiltración linfocítica en bronquios secundarios y parabronquios.
- Extensión hacia infundíbulos y capilares aéreos.
- Congestión de capilares sanguíneos.

En el grupo 3, las lesiones fueron muy leves y se limitaron a edema intersticial perivascular. No se detectaron otras lesiones en parabronquios o capilares aéreos.

En el grupo 4 se registraron lesiones severas y significativas, caracterizadas por:

- Reacción inflamatoria y necrótica severa.
- Afectación de bronquios secundarios, parabronquios y capilares aéreos.
- Infiltración de linfocitos y heterófilos.
- Exudado proteico en la luz de los capilares aéreos.
- Hemorragia focal.

Lesiones en tonsilas cecales

Las lesiones microscópicas de las tonsilas cecales se caracterizaron por:

- Depleción linfoide.
- Necrosis de elementos linfoides de los folículos.

Las lesiones fueron significativamente más severas en el grupo 4.

En el grupo 1 fueron menores que en el grupo 2.

En el grupo 3, las lesiones fueron leves y se observó depleción linfocítica asociada con activación linfoblástica y aumento del tamaño folicular.

El grupo 4 presentó la peor puntuación total de lesiones microscópicas, con **34.25**, frente a los otros grupos desafiados, que tuvieron puntuaciones de:

- Grupo 1: **18.75**
- Grupo 2: **20.5**
- Grupo 3: **17.25**

Discusión

La alta tasa de supervivencia, 100%, observada en el grupo control negativo tratado, vacunado y no desafiado indicó la seguridad de las vacunas contra Newcastle usadas y de la mezcla de aceites esenciales administrada.

Por otro lado, la tasa de supervivencia de 0% en el grupo control positivo no tratado, no vacunado y desafiado indicó la alta virulencia del virus de Newcastle utilizado.

En los grupos de aves desafiadas, el efecto de la mezcla de aceites volátiles podría deberse a su actividad antiviral.

Este resultado confirma hallazgos previos sobre el efecto de los aceites esenciales de menta y eucalipto en infecciones concomitantes por ORT y virus velogénico de Newcastle en pollos de engorde.

Los resultados también concuerdan con investigaciones que evaluaron el impacto de los aceites esenciales de eucalipto y menta sobre la modulación inmune y la producción en pollos desafiados con virus velogénico de Newcastle caracterizado molecularmente.

Los hallazgos del grupo 1 podrían explicarse porque esta mezcla posee un potente efecto inmunomodulador, lo que confirma investigaciones previas que señalan que los aceites esenciales de eucalipto y menta fortalecen tanto la respuesta inmune innata/celular como la respuesta humoral.

También se reportaron hallazgos similares en estudios donde los aceites esenciales de eucalipto y menta mejoraron la homogeneidad de la respuesta inmune y el rendimiento en pollos infectados con **Mycoplasma gallisepticum** y virus H9N2.

Rendimiento productivo

La suplementación con aceites esenciales mejoró significativamente los parámetros productivos, como el peso corporal y el índice de conversión alimenticia.

Estas variables se correlacionaron positivamente con el porcentaje de supervivencia.

Los peores parámetros se registraron en el grupo control positivo 4, no tratado, no vacunado y desafiado.

La mejora del rendimiento mediante suplementación con aceites esenciales ya había sido descrita por otros investigadores.

El posible modo de acción de los productos herbales podría estar relacionado con:

- Propiedades antimicrobianas.
 - Actividad antioxidante.
 - Efecto antiinflamatorio.
-

Respuesta inmune

El estado inmune significativamente más alto en los grupos vacunados contra Newcastle y tratados con aceites volátiles, grupos 3 y 5, así como en el grupo 1, no vacunado pero tratado, en comparación con el grupo 4, puede atribuirse a que el aceite de menta mantiene la integridad estructural de las células inmunes.

Esto ocurre debido a su fuerte acción antioxidante, que protege la membrana celular frente a radicales libres oxidantes, generando una mejor respuesta inmune.

Otros autores concluyeron que la administración de una mezcla de aceites de eucalipto y menta estimuló la respuesta inmune en pollos.

La mejora del sistema inmune por productos herbales y aceites también ha sido reportada por varios investigadores.

Lesiones patológicas

La mejora de las lesiones macroscópicas y microscópicas observada en los grupos suplementados con aceites volátiles, con o sin vacunación, podría deberse a una posible acción antiviral o virucida, capaz de influir sobre la virulencia del agente desafiante.

Además, este efecto podría estar relacionado con la inmunidad celular y local, que participa en la eliminación del virus de los tejidos.

El aumento del tamaño folicular en las tonsilas cecales con activación linfoblástica observado en los grupos 1, 3 y 5 coincide con estudios previos, donde se reportó que las aves tratadas con aceites esenciales de menta y eucalipto presentaron hiperplasia y activación linfocítica en:

- Bolsa de Fabricio.
 - Timo.
 - Bazo.
 - Tonsilas cecales.
-

Conclusiones

La mezcla de aceites esenciales de menta y eucalipto demostró tener efectos inmunomoduladores.

Además, estimuló positivamente la respuesta inmune contra el virus velogénico de Newcastle, una enfermedad de gran impacto económico negativo en la industria avícola.

También mejoró los parámetros clínicos, patológicos y productivos de los pollos evaluados.

Traducción de figuras principales

Figura 1

Patrón electroforético por PCR del gen amplificado de la proteína de fusión del virus de Newcastle.

- Carril 1: marcador molecular de 100 pares de bases.
- Carril 2: muestra de fluido de huevo con resultado positivo a 200 pb.
- Carriles 3 a 5: muestras control negativas de fluido de huevo.

Figura 2

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión del aislado del virus de Newcastle.

Figura 3

Lesiones microscópicas en tráquea. Tinción H&E, aumento 200x.

a) Grupo tratado con Mentofin, grupo 1: muestra deciliación e hiperplasia del epitelio mucoso traqueal, asociada con infiltración linfocítica, congestión, edema leve de la lámina propia y poca exudación de eritrocitos.

b) Grupo vacunado, grupo 2: muestra hipertrofia e hiperplasia de la mucosa traqueal, con deciliación extensa, infiltración linfocítica, congestión moderada y edema.

c) Grupo tratado con Mentofin y vacunado, grupo 3: muestra deciliación focal leve de la mucosa traqueal, hiperplasia de células caliciformes y reacción inflamatoria leve en la mucosa.

d) Grupo no tratado y no vacunado, control positivo, grupo 4: muestra necrosis extensa con hiperplasia de la mucosa traqueal, edema severo, congestión y hemorragias en la lámina propia.

Figura 4

Lesiones microscópicas en pulmones. Tinción H&E.

a) Grupo tratado con Mentofin, grupo 1: no muestra reacción inflamatoria en parabronquios ni capilares aéreos, excepto congestión leve de capilares sanguíneos.

b) Grupo vacunado, grupo 2: muestra desprendimiento del epitelio que recubre el parabronquio, congestión de capilares sanguíneos y edema. Aumento 400x.

c) Grupo tratado con Mentofin y vacunado, grupo 3: muestra congestión leve de capilares sanguíneos en los lóbulos pulmonares, asociada con edema perivascular leve.

d) Grupo no tratado y no vacunado, control positivo, grupo 4: muestra necrosis del epitelio que recubre parabronquios y capilares aéreos, congestión de capilares sanguíneos, destrucción extensa de parabronquios, edema severo de capilares aéreos y obliteración extensa de capilares aéreos. Aumento 400x.

Figura 5

Lesiones microscópicas de tonsilas cecales. Tinción H&E.

a) Grupo vacunado, grupo 2: muestra hiperplasia extensa de los folículos linfoides. Aumento 100x.

b) Grupo tratado con Mentofin, grupo 1: muestra depleción leve de elementos linfoides. Aumento 400x.

c) Grupo tratado con Mentofin y vacunado, grupo 3: muestra depleción linfocítica leve del folículo linfoide con activación linfoblástica. Aumento 400x.

d) Grupo no tratado y no vacunado, control positivo, grupo 4: muestra linfocitólisis severa y necrosis de la mayoría de elementos linfoides que componen el folículo. Aumento 400x.

Contribución de los autores

MHHA y HMM planificaron la investigación.

MAA y SAZ aplicaron la evaluación del estado inmune y registraron la mortalidad y las lesiones post mortem.

FFM realizó el examen histopatológico.

MAE aplicó los valores de rendimiento productivo y el análisis estadístico.

Todos los autores participaron en la redacción y revisión del manuscrito. Todos leyeron y aprobaron la versión final.

Las referencias bibliográficas se mantienen igual que en el documento original porque son citas científicas y normalmente no se traducen.