

Sustancias húmicas en la disminución del estrés en gallinas ponedoras durante la fase posmuda

Humic substances decrease the stress in layer hens during the post molting phase

Fecha de recepción: 6 de mayo de 2014
Fecha de aceptación: 31 de diciembre de 2014

Rosa Angélica Sanmiguel-Plazas¹,
Claudia Alexandra Rodríguez-Niño²,
Wilson Javier Aguirre-Pedrerros³

Resumen

Una de las prácticas productivas en gallinas ponedoras que causa polémica es la muda forzada, debido al estrés nutricional al que son sometidas durante este período. Esta investigación evaluó el efecto de las sustancias húmicas (SH) en los indicadores de estrés durante la fase de posmuda. Se utilizaron 120 gallinas ponedoras Hy Line Brown, en los primeros 60 días de la posmuda, las cuales se dividieron en cuatro grupos: El primero y segundo grupo se suplementaron con 0,1 y 0,2% de SH, respectivamente; el tercer grupo se suplementó con 0,25 mg/kg de clorhidrato de levamisol, y el cuarto grupo no recibió suplementación. Se tomaron muestras sanguíneas los días 8,30 y 60, para evaluar hematocritos y relación heterófilos/linfocitos (H/L), y se registró la inmovilidad tónica (IT) los días 30 y 60. Se evidenció que los días 30 y 60, los grupos suplementados con SH incrementaron la concentración de hematocrito y disminuyeron la relación H/L y el tiempo de IT ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos indican que las SH provenientes de la biotransformación de cachaza, hojas y vinaza de la producción de azúcar se comportan como agentes mitigadores de estrés en la fase temprana y media de la posmuda en gallinas ponedoras Hy Line Brown.

Palabras clave: Bienestar animal, Gallinas ponedoras, Estrés nutricional, Muda forzada, Sustancias húmicas.

Abstract

One of the productive practices in laying hens that causes controversy in the animal welfare area is the nutritional stress produced during the forced molt phase. The current research relates the experiment implemented to evaluate the effect of the Humic Substances (HS) on stress indicators during the post molting phase. 120 HyLine Brown laying hens were observed within the 60 first days of the post molting, which

1 M. Sc. Universidad Cooperativa de Colombia (Ibagué, Colombia). rosa.sanmiguel@campusucc.edu.co.

2 Universidad Cooperativa de Colombia (Ibagué, Colombia).

3 Universidad Cooperativa de Colombia (Ibagué, Colombia). javier.aguirre@campusucc.edu.co.

were divided in four groups: the first and second were supplemented with 0,1 and 0,2% of HS respectively, the third group was supplemented with 0,25 mg/kg of hydrochloride of levamisole, and the fourth was not supplemented at all; blood samples were taken the days 8, 30 and 60 to evaluate hematocrit and Heterophils/Lymphocytes relationship (H/L) and the tonic immobility was recorded from the days 30th and 60th. It was evidenced that the groups supplemented with HS improved the hematocrit by the day 30th, decreased the H/L relationship and the tonic immobility time days 30th and 60th ($p < 0,05$). The results obtained in this research indicate that the HS from the cachaza, leaves and vinasse from the sugar production, perform as stress reliever agents in the early and middle phase of the post molting in Hy Line Brown laying hens.

Keywords: Animal welfare, Laying hens, Nutritional stress, Forced Molt, Humic Substances, Hematocrit, Heterophils/Lymphocytes relationship, Tonic immobility.

Introducción

Existen diferentes métodos en la industria avícola para extender la vida productiva de las gallinas ponedoras; el más común es la inducción de la muda (1), cuyo procedimiento más usado es el programa de muda convencional mediante ayuno prolongado de las aves, con pérdida de peso que las lleve al peso obtenido a las 18 semanas de vida. Después de un cese total de la producción de huevos durante al menos 2 semanas, se logra una mejor producción, ya que se mejora el porcentaje de postura y la calidad del huevo y de la cáscara (2, 3), mientras que disminuyen significativamente la fertilidad y la eclosionabilidad en gallinas reproductoras (4). Pero, no obstante los incrementos en productividad, es conocido que durante la práctica de muda forzada los niveles de corticoides adrenales plasmáticos se incrementan, lo cual indica el nivel de estrés fisiológico al que son sometidas las aves (5).

Por las condiciones que se manejan en el proceso de muda forzada, existe discusión y rechazo de los movimientos defensores del bienestar animal, generándose la necesidad de investigar los indicadores de estrés que evidencien científicamente el impacto de dichas prácticas en el bienestar de las aves, y, adicionalmente, de establecer alternativas para mitigar el estrés.

Existen diversas maneras de evidenciar los niveles de estrés en aves. La relación de heterófilos/linfocitos (H/L) es considerada un indicador indirecto de niveles de estrés, puesto que la producción de corticosterona se incrementa, estimulando la producción de heterófilos inmaduros de la médula ósea a la sangre periférica, lo cual se refleja en el incremento de la relación H/L en presencia de factores predisponentes de estrés (6). Adicionalmente, el hematocrito también es considerado un indicador de estrés agudo (7).

De acuerdo con publicaciones en los últimos años, las Sustancias Húmicas (SH) son una alternativa potencial como promotores de crecimiento en pollos de engorde y en gallinas ponedoras (8), puesto que al suplementar con porcentajes bajos de SH se mejora el desempeño productivo, las características de la carcasa, la calidad de los huevos y

la inmunidad innata. Lo anterior puede ser observado, incluso, en la etapa final del ciclo productivo y en la fase temprana de la posmuda, donde fisiológicamente se genera una disminución en la producción y en la calidad del producto, pero al suplementar con SH la calidad de los huevos mejora, sin afectar los parámetros productivos (9, 10).

También es de destacar que los parámetros productivos de las aves dependen de factores tales como el manejo, el estado nutricional y sanitario y el desempeño inmunológico. No obstante, a pesar de existir reportes acerca del efecto de las SH sobre parámetros productivos y fisiológicos, existen vacíos acerca del efecto sobre el bienestar animal e indicadores de estrés en las diferentes fases de producción. La presente investigación evaluó el efecto de la suplementación de la dieta con 0,1 y 0,2% de ácidos húmicos sobre el hematocrito, la relación H/L y la inmovilidad tónica, como indicadores de estrés en gallinas ponedoras comerciales en la fase de posmuda.

Metodología

Condiciones experimentales: este estudio fue realizado en las instalaciones de gallinas ponedoras enjauladas de la granja experimental de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede El Salado, Ibagué, Colombia, 03°24"N74°56". El rango térmico registrado durante los experimentos osciló entre 19 y 31°C.

Al experimento se sometieron 120 gallinas Hy Line Brown, de 80 semanas de edad, que iniciaban la fase de la posmuda. Las gallinas se mantuvieron levantadas en piso y se trasladaron a jaula a las 16 semanas de vida. Una vez terminó el primer ciclo productivo, las gallinas clínicamente sanas se sometieron al régimen de ayuno forzado que tradicionalmente se maneja en la granja experimental; el suministro de alimento se disminuyó progresivamente (25% el primer día, 50% el segundo día, 75% el tercer día, 100% del cuarto día en adelante) y se suplementó con 5 gramos de carbonato de calcio. Cada tres días se realizó pesaje de las gallinas hasta el día 12, cuando se obtuvo un 0% de producción y el 23% de pérdida de peso, como lo sugiere el manual de Hy-Line 2009-2011 (11).

En todos los grupos, una vez se inició la fase de posmuda, se suministró el 25% de la alimentación el primer día, el 50% el segundo día y el 100% el tercer día (115g de alimento concentrado/ave/día). El agua se suministró a libertad con bebedero automático.

Los experimentos fueron realizados por personal experto en el manejo de las gallinas en fase posmuda, bajo la normatividad, tanto en producción como en bienestar animal, avalada por el comité de Bioética de la Universidad del Tolima, y regidos por la ley 84 de 1988 de la república de Colombia.

Las muestras sanguíneas para determinar hematocrito y relación heterófilos/linfocitos se tomaron en los días 8, 30 y 60 del experimento, y la prueba de inmovilidad tónica se realizó los días 30 y 60, teniendo en cuenta que en los primeros días de la posmuda las gallinas se encuentran desmineralizadas, y la manipulación que requiere la prueba de inmovilidad tónica puede ser contraproducente para la integridad ósea de ellas.

Sustancias húmicas: las sustancias húmicas sometidas al experimento se obtuvieron de la biotransformación de la cachaza, hoja y vinaza de la producción de azúcar y alcohol; estos insumos se sometieron a un proceso biotecnológico de transformación y estabilización de la materia orgánica (80% de ácidos húmicos), obteniendo un pH de 6.4, densidad de 0,73g/cm³, humedad máxima de 12,32% y 62,45% de cenizas. Este producto fue suministrado por el ingenio PBA Productos Biotecnológicos.

Diseño experimental: se realizó un diseño experimental completamente al azar. Las gallinas se distribuyeron en cuatro grupos durante los primeros sesenta días de la fase posmuda. Dos grupos fueron suplementados con SH (0,1 y 0,2%), de acuerdo con los resultados de publicaciones recientes (12, 13); un grupo control positivo fue suplementado con clorhidrato de levamisol al 4% en el agua de bebida, a una dosis de 0,25 mg/kg, y un grupo control negativo sin suplementación en la dieta. En cada tratamiento hubo 10 unidades experimentales (UE), conformadas cada una por 3 gallinas ubi-

cadadas en jaulas individuales de 20 cm x 40 cm x 30 cm, en módulo piramidal de tres niveles.

Colecta de muestras y registro de datos: las gallinas se inmovilizaron para obtener las muestras sanguíneas mediante punción en la vena metatarsiana, previa desinfección del área con alcohol etílico al 70%. Para ello, se utilizaron jeringas estériles desechables de 1 ml, 27 G x ½. La colecta se realizó en microtubos de 1,5 ml con EDTA. De la sangre entera se llenó un microcapilar que posteriormente se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos y se midió con la escala de microhematocrito. Para determinar la relación H/L se tomaron 50 µL de la sangre colectada para realizar un extendido en lámina portaobjetos, el cual fue teñido mediante kit Hemacolor® (Merck, USA). Enseguida, mediante un microscopio de luz Olympus® modelo CX21, se realizó la lectura de cantidad de heterófilos y de linfocitos para calcular la relación H/L. La prueba de inmovilidad tónica (IT) se realizó girando la gallina en decúbito dorsal sobre una mesa plana y estable, sosteniéndole el cuerpo y la cabeza durante aproximadamente 15 segundos para contabilizar y registrar el tiempo (s) de inmovilidad que presenta una vez se liberara (14).

Análisis estadístico: los datos se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn posterior al no cumplimiento de los supuestos estadísticos de normalidad distributiva, ni homoscedasticidad. Los datos de inmovilidad tónica se analizaron mediante ANOVA seguido por el test *post hoc* de Tukey. Estos análisis se realizaron mediante el software Graphpad Prism 5,03 estableciendo un valor $p < 0,05$, por debajo del cual se consideraron significativamente diferentes los valores de las variables en cada tratamiento.

Resultados

Las medianas del porcentaje del hematocrito de las gallinas suplementadas con SH en el día 8 presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) con las gallinas que no recibieron suplementación. El día 30, los grupos suplementados con SH y Levamisol presentaron un valor de hematocrito superior al que presentó el grupo no suplementado ($p < 0,05$),

y el día 60 los grupos control positivo y negativo presentaron un hematocrito menor que los grupos suplementados con SH.

Las medianas de la relación H/L de las gallinas suplementadas con 0,1% de SH y el grupo sin suplemento, en el día 8, presentaron valores significati-

vamente menores que los demás grupos ($p < 0,05$). En el día 30 y 60, los grupos suplementados presentaron una relación H/L significativamente menor que el grupo control negativo ($p < 0,05$). Las medianas y rangos de cuartiles de los porcentajes del hematocrito y la relación H/L se presentan en la Tabla I.

Tabla I. Hematocrito (%) y relación heterófilos/linfocitos de gallinas suplementadas con sustancias húmicas

	Variable		Tratamientos		K-W
	T1	T2	T3	T4	P valor
Hematocrito (%)					
Día 8	29(28-32)	28(26-31)	28(24-30)	27,5(24-31)	0,0216
Día 30	30 ^a (28-32)	30 ^a (29-30)	28 ^a (26-30)	26 ^b (26-28)	0,0001***
Día 60	31 ^a (30-32)	30 ^{ab} (27-31)	26 ^b (25-28)	26 ^b (24-28)	0,0001***
Relación Heterófilo/ Linfocito					
Día 8	0,30 ^{bc} (0,25-0,42)	0,40 ^a (0,30-0,52)	0,36 ^{ab} (0,28-0,52)	0,19 ^c (0,13-0,28)	0,0252*
Día 30	0,47 ^b (0,34-0,64)	0,68 ^b (0,48-0,85)	0,61 ^b (0,38-0,86)	1,02 ^a (0,74-1,42)	0,0001***
Día 60	0,33 ^b (0,19-0,41)	0,26 ^b (0,20-0,39)	0,30 ^b (0,20-0,41)	0,62 ^a (0,43-0,74)	0,0001***
Valores de las medianas y rango de cuartiles del Hematocrito y Relación H/L en 120 gallinas. T1: 0,1 SH%, T2: 0,2SH% T3: 0,25 mg/kg de levamisol, T4: sin suplemento. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$). * Valor $p < 0,05$. *** Valor $p < 0,01$.					

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla II, al día 30 del experimento se observó que las gallinas suplementadas con 0,1% de SH presentaron un tiempo (s) de inmovilidad tónica sig-

nificativamente menor que los demás grupos, y el día 60 las gallinas suplementadas con 0,1 y 0,2% de SH presentaron la menor inmovilidad tónica ($p < 0,05$).

Tabla II. Inmovilidad tónica (s) de gallinas suplementadas con sustancias húmicas

Muestreo	Tratamientos				Valor de P
	T1	T2	T3	T4	
Día 30					
Media (s) ± EE	0.69 ± 0.01 ^a	18.80 ± 8.65 ^b	28.18 ± 11.92 ^b	15.82 ± 7.17 ^b	<0.0001
Día 60					
Media (s) ± EE	0,74 ± 0.06 ^a	4.00 ± 1.97 ^{ab}	14.60 ± 10.67 ^b	10.55 ± 7.60 ^b	<0.0001

Valores de las medias y Error Estándar (EE) de la inmovilidad tónica (s) en 120 gallinas. T1: 0,1% SH, T2: 0,2% SH T3: 0,25 mg/kg de levamisol, T4: sin suplemento. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (p < 0,05).

Discusión

Considerando que la etapa de muda mediante ayuno prolongado de las gallinas ponedoras genera un desafío nutricional durante y posterior a dicha práctica, y que el incremento en la producción durante la etapa temprana de la posmuda compite con la recuperación de las condiciones fisiológicas de las aves, los datos obtenidos en el presente trabajo demuestran que el suplemento con SH durante la etapa posmuda genera cambios significativos en los indicadores de estrés, sugiriendo que suplementar con SH disminuye la respuesta al estrés de las gallinas en etapa temprana de la fase posmuda, de acuerdo con los indicadores estudiados en esta investigación.

Es conocido que el estrés en las aves de corral afecta la salud, debido a la secreción de corticosteroides, generados en el desencadenamiento hipotalámico hipofisiario adrenal (6), que ocasionan disminución del número de linfocitos y aumento del número de heterófilos (relación H/L), propiciando una leucocitosis fisiológica con heterofilia y linfopenia y, posteriormente, heteropenia y linfocitosis (15).

Los resultados del presente estudio demuestran que suplementando con SH, en los días 30 y 60

de la posmuda la relación H/L disminuye significativamente, lo cual indica que las SH tuvieron influencia sobre el estrés nutricional que las gallinas del experimento afrontaron durante la muda y la posmuda, debido al desafío nutricional evocado con el ayuno prolongado del período de muda y el rápido aumento de los parámetros productivos de la posmuda. De acuerdo con resultados en otras investigaciones en cuanto a los cambios en la relación H/L en gallinas ponedoras estresadas, las SH tienen efectos semejantes a los que se ocasionan suplementando la dieta con tocoferol, niacina (16), vitamina E y vitamina C (17). En concordancia con lo anterior, otra publicación (18) afirma que al suplementar la dieta de pollos de engorde con 0,5 y 1% de SH, a los 28 y 35 días de edad disminuyó la relación H/L de manera significativa.

En cuanto a los datos obtenidos con el hematocrito, no se esperaba que el día 8 de suplementación con SH fuera mejor que el grupo control, porque fisiológicamente no era tiempo suficiente para lograr un desempeño en el aumento del volumen corpuscular medio, tal como se evidencian los resultados en la Tabla I.

Los días 30 y 60, las gallinas suplementadas con SH incrementaron significativamente el hematocrito con respecto al grupo control negativo; estos da-

tos coinciden con las tendencias publicadas en pollos de engorde estresados por manipulación (7). No obstante, existen evidencias que indican que al suplementar con 3.5% de Oxihumatos en pollos desafiados con aflatoxinas, al cabo de 30 días no presentaron diferencias significativas en el hematocrito (19). Teniendo en cuenta que de acuerdo con resultados experimentales la relación H/L predice la respuesta inmune humoral (20), es conveniente evaluar variables que indiquen dicha respuesta al suplementar con SH.

La IT es considerada un indicador de respuesta al miedo y al estrés (14). Los datos obtenidos en el tiempo (s) de IT, indican que los días 30 y 60 las gallinas suplementadas con SH presentaron un menor tiempo de IT con respecto a las gallinas no suplementadas; respuesta semejante a la que presentaron gallinas de 36 semanas de edad sometidas a un régimen mayor de luminosidad diaria (21). De esta manera se infiere que la suplementación con SH disminuye la respuesta al miedo y al estrés que se genera en las aves por la naturaleza de la manipulación en la prueba de la IT. Así mismo, en pollos de engorde estresados por manipulación se observó una tendencia a superar los valores de IT del grupo control (7).

De esta forma se entiende que las SH disminuyen el estrés en la fase media de la posmuda, cuando han llegado a su máximo nivel de producción, tal como se evidencia en este trabajo cuando se evalúa la relación H/L, hematocrito e IT después de haber sido sometidas las gallinas a la muda forzada por ayuno prolongado.

En conclusión, los indicadores de estrés evaluados en la presente investigación indican que la suplementación con SH, provenientes de la biotransformación de la cachaza, hoja y vinaza de caña de azúcar, en gallinas ponedoras durante la fase temprana y media de la posmuda, puede mitigar el estrés.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Cooperativa de Colombia y a la Universidad del Tolima por

el apoyo financiero y logístico para el desarrollo de la investigación.

Referencias

- (1) El-Deek A & Al-harhi M. Post molt performance parameters of broiler breeder hens associated with molt induced by feed restriction, high dietary zinc and fasting. *Int J of Poultry Sci.* 2004; 3(7): 456-462.
- (2) Alodan M., Mashaly M. Effect and induced molting in laying hens on production and immune parameters. *Poultry Sci.* 1999; 78: 171-177.
- (3) Hassanien H. Effect of force molting programs on egg production and quality of laying hens. *Asian J of Poultry Sci.* 2011; 5(1): 13-20.
- (4) Tega E., Ibrahim T. Effect of induced molting on fertility and hatchability chickens. *Continental J. Animal and Vet Res.* 2010; 2: 31-34.
- (5) Akram M., Zia-ur-rahman C., Kim S. Effect on the induced molting on the relative weights and hormone levels of thyroid, ovary and adrenal glands in spent laying hens. *Korean J Intern Med Poultry Sci.* 2002; 29: 243-247.
- (6) Shini S, Kaiser P, Shini A, Bryden W. Biological response of chickens (*Gallus gallus domesticus*) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. *Comp Biochem Phys, part B*, 2008; 149: 324-333.
- (7) Sandoval G, Terraes J, Revidatti F, Fernández R, Gauna C, Martín G. Hematocrito, relación heterófilo linfocito e inmovilidad tónica en pollos con estrés psico-físico crónico criados en jaulas. *Comunicaciones científicas y tecnológicas*, 2003; 026: 1-3.
- (8) Eren M., Gezen S., Deniz G., Orhan F. Effects of liquid humate supplemented to drinking water on the performance and eggshell quality of hens in different laying periods. *Revue. Med vet.* 2008; 159(2): 91-95.

- (9) Ergin O., Ocak N., Turan A., Erener G., Altop A. Performance, Carcass, gastrointestinal tract and meat quality traits and selected blood parameters of broilers fed diets supplemented with humic substances. *J. Sci. Food Agr.* 2011; 92: 59-65.
- (10) Sanmiguel R, Rondón I. Suplementación con sustancias húmicas en gallinas ponedoras durante la fase postmuda. *Rev Ces MedZootec.* 2014; 9(2): 169-178.
- (11) Hy Line International. 2011. *Manual de estándares de rendimiento.*
- (12) Abo Eglá E., El-Samra H., Ismail F., Abd-El ghany F., Assar M. Effect of humic acid and BIOSUPPLEMENTATION on egg production and quality parameters in local hens. *J. Anim Poult Prod.* 2011; 2(4): 55-63.
- (13) Yoruk M, Gul M, Hayirly A, Macit M. The effects of supplementation of humate and probiotics on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. *Poult.Sci.* 2004; 83: 84-88.
- (14) Elrom. Handling and transportation of broilers - welfare, stress, fear and meat quality. Part III: fear; definitions, its relation to stress, causes of fear, responses of fear and measurement of fear. *Israel J VetMed,* 2000; 55: 3.
- (15) Tejeda A, Téllez I, Galindo F. Técnicas de medición de estrés en aves. *Vet Mex,* 1997; 28(4): 345-351.
- (16) Campos y Dávila. Changes in heterophil to lymphocyte ratios of heat-stressed chickens in response to dietary supplementation of several related stress agents. *Arch. Geflügelk,* 2002; 66(2): 80-84.
- (17) Ajakaiye J., Ayo J., Ojo S. Effect of heat stress on some blood parameters and egg production of shika brown layer chickens transported by road. *Biol Res.* 2010; 43: 183-189.
- (18) Rath N., Huff W., Huff G. Effects of humic acid on broiler chickens. *Poult.Sci.* 2010; 85: 410-414.
- (19) Van Rensburg J., Van Rensburg C., Van Rissen J. In vitro and in vivo assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. *Poult.Sci.* 2006; 5: 1576-1583.
- (20) Krams I, Vrublevska, Cirule D, Kivleniece I, Krama T. Heterophil/lymphocyte ratios predict the magnitude of humoral immune response to a novel antigen in great tits (*Parus major*). *Comp Biochem Phys. Part A* 2012; 161: 422-428.
- (21) Campos y Dávila. Effect of Photoperiod on Heterophil to Lymphocyte Ratio and Tonic Immobility Duration of Chickens. *Poult.Sci.* 2002; 81:1637-1639.