



## Efecto de la harina de ajo y cebolla sobre la respuesta inmunológica en pollos de engorde

### Effect of garlic and onion meal on the immune response in broilers

C. R. Velásquez<sup>1\*</sup> , J. F. Vega-Vilca<sup>1</sup> , H. N. Pujada<sup>1</sup> , F. E. Airahuacho<sup>1</sup> 



<https://doi.org/10.51431/par.v3i2.703>

#### Resumen

**Objetivos:** Evaluar el efecto de la harina de ajo y cebolla en la dieta sobre la respuesta inmunológica en pollos de engorde. **Metodología:** Se utilizaron 150 pollos machos de carne de la línea Cobb 500. Las aves se distribuyeron al azar en tres grupos con cinco replicaciones y cada replicación con diez pollos. Los tratamientos fueron: T<sub>0</sub>: Control negativo, sin Antibióticos Promotores del Crecimiento (APC); T<sub>1</sub>: Control positivo, con APC (Enramicina 8%); T<sub>2</sub>: Harina de ajo + cebolla (0,75% + 0,75%). Las variables de respuesta inmunológica fueron, peso de los órganos linfoides (bazo, timo y bolsa de Fabricio) y respuesta humoral (niveles de anticuerpos). Se utilizó el análisis de varianza de un diseño completamente al azar y la prueba de Tukey para evaluar los datos. **Resultados:** No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el peso de los órganos linfoides ni en la respuesta humoral, al comparar los tres tratamientos. El peso de los órganos linfoides y la respuesta humoral presentaron una gran variabilidad. **Conclusiones:** La harina de ajo y cebolla no influyó sobre el peso de los órganos linfoides y niveles de anticuerpos en pollos de engorde.

**Palabras clave:** Cebolla, harina de ajo, pollos de engorde, respuesta inmunológica

#### Abstract

**Objectives:** To evaluate the effect of garlic and onion meal in the diet on the immune response in broilers. **Methodology:** 150 male broilers of the Cobb 500 line were used. The birds were randomly distributed in three groups with five replications and each replication with ten broilers. The treatments were: T<sub>0</sub>: Negative control, without antibiotic growth promoters (APC); T<sub>1</sub>: Positive control, with APC (Enramycin 8%); T<sub>2</sub>: Garlic + onion meal (0.75% + 0.75%). The immune response variables were, weight of lymphoid organs (spleen, thymus and bursa of Fabricius) and humoral response (antibody levels). Analysis of variance of a completely randomized design and Tukey's test were used to evaluate the data. **Results:** No significant differences ( $P > 0.05$ ) were found in the weight of lymphoid organs or humoral response when comparing the three treatments. The weight of lymphoid organs and humoral response presented a great variability. **Conclusions:** Garlic and onion meal did not influence lymphoid organ weights and antibody levels in broilers.

**Keywords:** Onion, garlic meal, broilers, immune response

<sup>1</sup>Departamento Académico de Zootecnia, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Lima, Perú.

\*Autor para correspondencia: [cvelasquez@unjfsc.edu.pe](mailto:cvelasquez@unjfsc.edu.pe)

## Introducción

Los antibióticos promotores de crecimiento (APC) se vienen utilizando con éxito, desde hace décadas, para mejorar la eficiencia alimenticia y reducir la mortalidad en pollos de engorde. Sin embargo, la aparición de cepas bacterianas resistentes (Roskam et al., 2020) y los residuos de estos agentes antimicrobianos en los alimentos ha generado restricciones, por parte de las autoridades sanitarias, que limitan su uso en la alimentación del ganado (Gadde et al., 2017). Ante esta situación, es necesario buscar alternativas al uso de los APC con la finalidad de optimizar la salud y el rendimiento productivo del pollo de engorde (Bajagai et al., 2020)

Los APC tienen un efecto antibacteriano, que se manifiesta por una menor incidencia de enfermedades subclínicas, disminución del uso de nutrientes por parte de los microorganismos, mejora de la absorción intestinal y reducción de los metabolitos depresores del crecimiento provocados por las bacterias Gram positivas, cuyos efectos se expresan con la mejora del crecimiento y eficiencia de la conversión alimenticia en las aves (Kuralkar & Kuralkar, 2021; Dhama et al., 2021; Huyghebaert et al., 2011). Para ser eficaces, los promotores de crecimiento a base de hierbas medicinales, deberían tener efectos benéficos similares a los APC. Los productos fitogénicos, son una mezcla compleja de componentes bioactivos, con propiedades antibacterianas, inmunomoduladoras, antivirales, antifúngicas, antiprotazoarios y hepatoprotectores (Oladeji et al., 2019; Behl et al., 2021; Sugiharto, 2021), que al ser utilizados en la alimentación favorecen el crecimiento y la salud de los animales. Pero es necesario un mayor conocimiento sobre el modo de acción, composición química y dosis de estos productos, para que pueda usarse con éxito en la industria animal (Oladeji et al., 2019).

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie herbácea aromática anual y una de las más importantes, que se han utilizado desde la antigüedad, por poseer propiedades medicinales (Badal et al., 2019). La estructura química del ajo presenta varios compuestos orgánicos de azufre, N-acetilcisteína, S-alil-cisteína y S-alil-mercaptopcisteína, que se derivan de la aliína (Tran et

al., 2018). La S-alil-cisteína tiene capacidad antioxidante, antiinflamatoria, redox regulada, proenergética, antiapoptótica y de señalización (Souza et al., 2011; Liu et al., 2015). La alicina, el compuesto biológico más activo del ajo contiene azufre, es un tioéster del ácido sulfénico y su efecto farmacológico se atribuye a su actividad antioxidante, así como a su interacción con proteínas que contienen tiol (Miron et al., 2000). Elmowalid et al., (2019) recomienda el uso de ajo como aditivo alimentario no solo para mejorar la respuesta inmune, sino también para reemplazar los antibióticos en pollos de engorde.

La cebolla (*Allium cepa* L.) es la segunda especie de *Allium* más utilizada en el tratamiento de enfermedades comunes en el hombre (Barnes et al., 2007; Omar et al., 2020). Los bulbos de cebolla tienen numerosos compuestos de azufre, flavonoides y ácidos fenólicos con eficacia antibacteriana, antioxidante e hipolipidémica probada (An et al., 2015; Corzo-Martínez et al. 2007). LebDAH et al. (2021) demostró los efectos antivirales e inmunoestimulantes del aceite esencial de cebolla, observando reducción o eliminación de los signos clínicos letales, lesiones patológicas y mejora en la respuesta inmune del pollo de engorde.

El timo, bazo y la bolsa de Fabricio son órganos del sistema inmunitario de las aves, el estado de desarrollo y funcionalidad de estas estructuras son fundamentales para medir el grado de respuesta inmunológica en las aves (Dharmaraj et al., 2017). La bolsa de Fabricio es responsable del desarrollo y diferenciación de las células B, su deterioro por enfermedad o factores perjudiciales causa diferentes grados de deficiencia de células B y una supresión severa de la inmunidad humoral (Liu et al., 2021; Hirakawa et al., 2018; Tang et al., 2021). El timo es el órgano de producción, diferenciación y maduración de los linfocitos T, siendo vital en el mantenimiento del equilibrio inmunológico (Tian et al., 2021), mientras que el bazo, el órgano inmunitario periférico más grande del cuerpo, es la estructura de asentamiento de los linfocitos T y B, el centro de la inmunidad celular y humoral y es el principal órgano linfático que responde inmunológicamente a los antígenos que circulan en la sangre (Xue et al., 2021).

Diversos estudios demuestran que la administración de ajo y cebolla tienen un efecto en la mejora del rendimiento productivo de las aves (Mulugeta et al., 2018), mediante una acción inmunoestimulante que se manifiesta con la reducción de los signos clínicos, lesiones y una mayor protección, posterior a la aplicación experimental del virus de la enfermedad de Newcastle (Lebdah et al., 2021); además, mejoran la respuesta antiinflamatoria mediante la aliina, su principal principio bioactivo, que induce una disminución en la expresión de citosinas proinflamatorias (Sánchez-Sánchez et al., 2020; Arreola et al., 2015) y ; presentan propiedades antibacterianas contra Gram positivos y Gram negativos, principalmente *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Pseudomonas* y *Helicobacter* (Obi et al., 2020). Sin embargo, se necesita mayor información sobre los efectos del uso de ajo y cebolla en la alimentación animal que la respalden como alternativa viable de reemplazo a los APC. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de la harina de ajo y cebolla en la dieta alimenticia sobre la respuesta inmunológica en pollos de engorde.

## Materiales y métodos

La investigación se realizó en la granja experimental de aves de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootécnica; distrito, Huacho; provincia, Huaura; departamento, Lima, a 27 m s. n. m. ; durante los meses de diciembre 2020 a enero 2021. La temperatura y humedad relativa en el galpón, durante la crianza, fluctuó entre 19 - 26 °C y 60 -70%, respectivamente (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología, 2021).

Se trabajó en un galpón con piso de cemento,

enmallado en los alrededores, corrales de 1m<sup>2</sup> y cama de viruta. Se utilizaron 150 pollos machos de carne de la línea Cobb 500. Las aves se distribuyeron al azar en tres tratamientos; cada tratamiento con cinco replicaciones y cada replicación con diez pollos.

Los pollos fueron vacunados de acuerdo al programa de vacunación que se muestra en la Tabla 1.

El alimento, de presentación física en polvo, se suministró en bandejas circulares hasta los tres días, luego se cambió a tolvas. El agua fue suministrada en bebederos tipo tolva (etapa inicial) y bebederos chupones (etapa de crecimiento y acabado). La altura de las cortinas se graduó de acuerdo al crecimiento del pollo.

Se elaboraron dietas para cada etapa productiva del pollo de engorde, considerando la etapa inicial de uno a siete días, etapa de crecimiento de ocho a 21 días y etapa de acabado de 22 a 42 días. Las dietas experimentales o tratamientos (Tabla 2) aplicados a los grupos experimentales fueron: T<sub>0</sub>: Control negativo, sin APC; T<sub>1</sub>: Control positivo, con APC (Enramicina 8%); T<sub>2</sub>: Harina de ajo + cebolla (0,75% + 0,75%).

La harina de ajo y la cebolla, por separado, se adquirieron de una empresa comercializadora de dicho producto. Los análisis químicos se realizaron de acuerdo a los métodos de la Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemist, (2005) en el laboratorio de evaluación nutricional de la Universidad Nacional Agraria la Molina, los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 1  
Programa de vacunación

Día	Vacuna	Cepa	Laboratorio	Vía aplicación
1	Mareck	HVT	Merial	S.C.
	Newcastle	B1	Hipra	Spray
	Bronquitis Infecciosa	Mass H120	Hipra	Spray
12	Newcastle	CL/179	Hipra	Ocular
	Bronquitis infecciosa	Mass H120	Hipra	Ocular
	Gumboro	CH80	Hipra	Ocular

Tabla 2

*Dietas alimenticias suministradas según etapa de desarrollo, para cada tratamiento (sin APC, con APC, ajo + cebolla) en pollos de engorde*

Insumos	Inicio (0-7 días)			Crecimiento (8-21 días)			Acabado (22-42 días)		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
Maíz	64,15	64,08	62,65	60,89	60,83	59,39	63,91	63,85	62,43
Torta de soya 45	17,90	17,90	17,50	25,30	25,30	24,80	27,00	27,30	27,20
Soya integral extruida	13,60	13,60	14,00	5,20	5,20	5,70	0,00	0,00	0,00
Harina de cebolla	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,75
Harina de ajo	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00	0,75
Aceite de soya	0,00	0,00	0,00	4,00	4,00	4,00	4,44	4,44	4,52
Carbonato de calcio	0,87	0,87	0,87	0,60	0,60	0,60	0,53	0,53	0,53
Fosfato bicálcico	1,52	1,52	1,52	2,20	2,20	2,20	1,98	1,98	1,98
DL metionina 99	0,37	0,37	0,37	0,33	0,33	0,33	0,34	0,34	0,34
Lisina 78	0,42	0,42	0,42	0,31	0,31	0,31	0,35	0,35	0,36
Treonina	0,16	0,16	0,16	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
Sal	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,30	0,30	0,29
APC*	0,00	0,015	0,00	0,00	0,015	0,00	0,00	0,015	0,00
Coccidiostato	0,00	0,050	0,00	0,00	0,050	0,00	0,00	0,050	0,00
Aditivos **	0,695	0,695	0,695	0,720	0,720	0,720	0,720	0,720	0,720
Contenido nutricional									
Energía Metabol,, Mcal/kg	3,00	3,00	3,00	3,05	3,05	3,05	3,05	3,05	3,05
Proteína bruta, %	19,00	19,00	19,00	18,50	18,50	18,50	17,50	17,50	17,50
Lisina digest,, %	1,15	1,15	1,15	1,07	1,07	1,07	1,02	1,02	1,02
Met + Cis digest,, %	0,87	0,87	0,87	0,83	0,83	0,83	0,80	0,80	0,80
Treonina digest,, %	0,75	0,75	0,75	0,70	0,70	0,70	0,66	0,66	0,66
Triptófano digest,, %	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,16	0,16	0,16
Grasa, %	5,30	5,30	5,34	7,60	7,70	7,64	7,20	7,20	7,24
Fibra, %	3,28	3,28	3,29	3,03	3,00	3,03	3,08	3,08	3,09
Calcio, %	0,90	0,90	0,90	0,86	0,86	0,86	0,76	0,76	0,76
Fósforo digest,, %	0,45	0,45	0,45	0,43	0,43	0,43	0,38	0,38	0,38
Sodio, %	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Balance electrolítico, mEq/kg	227	227	224	219	219	218	228	228	225

<sup>1</sup> T<sub>0</sub>: Control negativo, sin APC.

<sup>2</sup> T<sub>1</sub>: Control positivo, con APC.

<sup>3</sup> T<sub>2</sub>: Harina de ajo+cebolla (0,75% + 0,75%).

\* APC= Antibiótico promotor de crecimiento (Enramicina 8%).

\*\* 0,1% cloruro de colina 60%; 0,2% bicarbonato de sodio; 0,02% vitamina C; 0,1% antifúngico; 0,2% secuestrante de micotoxinas; 01% premezcla de vitaminas y minerales.

La harina de ajo y la cebolla, por separado, se adquirieron de una empresa comercializadora de dicho producto. Los análisis químicos se realizaron de acuerdo a los métodos de la Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemist, (2005) en el laboratorio de evaluación nutricional de la Universidad

Nacional Agraria la Molina, los resultados se muestran en la Tabla 3. Las muestras de sangre (5 ml) se obtuvieron mediante punción alar de cinco aves de cada grupo experimental, los días uno, 21 y 42 y se colectaron en tubos de vidrio con anticoagulante (EDTA), de inmediato se trasladaron al laboratorio de patología aviar de

Tabla 3

Análisis químico proximal de la harina de ajo y cebolla

Composición	Harina de cebolla	Harina de ajo
Humedad, %	18.55	12.19
Proteína total (N x 6,25), %	10.34	10.03
Grasa, %	0.51	0.53
Fibra cruda, %	4.97	0.88
Ceniza, %	3.10	1.62
ELN <sup>1</sup> , %	2.53	74.75

<sup>1</sup>ELN = Extracto Libre de Nitrógeno

la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde se realizó la prueba de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) para determinar los niveles de anticuerpos contra las enfermedades de NC y DBI.

En el día 42, se seleccionaron cinco aves de cada tratamiento y se les aplicó la eutanasia mediante dislocación cervical, luego de abrir el abdomen, se extrajeron el bazo, timo y bolsa de Fabricio y se pesaron con una balanza electrónica de 200 g de capacidad (precisión= 0,01g).

El índice morfométrico, que determina la relación entre el peso de los órganos linfoides con el peso corporal del ave se calculó utilizando las fórmulas propuestas por Rajput et al. (2019).

Índice bursal (IBF):

$$IBF = (\text{Peso de Bolsa de Fabricio (g)} \times 100) / (\text{Peso vivo ave (g)})$$

Índice Timo (IT):

$$IT = (\text{Peso de timo (g)} \times 100) / (\text{Peso vivo ave (g)})$$

Índice Bazo (IB):

$$IB = (\text{Peso de Bazo (g)} \times 100) / (\text{Peso vivo ave (g)})$$

Los datos se evaluaron mediante el Análisis de varianza (ANVA) de un diseño completamente al azar (DCA), utilizando el programa estadístico Minitab v. 18. Las diferencias entre promedios se evaluaron mediante la prueba de tukey. El coeficiente de variación (CV) se calculó para determinar el grado de dispersión de los datos. Los resultados se presentaron en tablas como Promedio  $\pm$  DE.

## Resultados

La Tabla 4 muestra los pesos del bazo, timo y bolsa de Fabricio. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0,05$ ) y se observó gran variación en el peso de los órganos linfoides. En el T<sub>2</sub> se observó una menor variación del bazo y bolsa de Fabricio en comparación a los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>0</sub>; mientras que en el T<sub>1</sub> se registró un menor peso y variación del timo en comparación al T<sub>0</sub> y T<sub>2</sub>.

La Tabla 5 muestra los índices morfométricos (IM) de los órganos linfoides. No hubo diferencias significativas en el IM entre los tratamientos ( $P > 0,05$ ). En el T<sub>2</sub> el IB e IBF tuvo una menor variabilidad en comparación a lo registrado en T<sub>0</sub> y T<sub>1</sub>, mientras que en T<sub>1</sub> el IT presentó una menor variación en comparación a T<sub>0</sub> y T<sub>2</sub>.

La Tabla 6 muestra los promedios geométricos de titulación de anticuerpos (PGT) contra IBD y NC. No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el PGT de los tres tratamientos evaluados los días uno, 21 y 42 de crianza. En el día uno el PGT corresponde a los anticuerpos

Tabla 4

Peso (g) del timo, bazo y bolsa de Fabricio en pollos de engorde, a los 42 días de edad

Variables	T <sub>0</sub> : Sin APC <sup>1</sup>		T <sub>1</sub> : Con APC		T <sub>2</sub> : Ajo + cebolla <sup>2</sup>	
	Prom. $\pm$ DE	CV <sup>3</sup>	Prom. $\pm$ DE	CV	Prom. $\pm$ DE	CV
Timo (g)	14,40 $\pm$ 6,88	49,14	13,80 $\pm$ 2,39	17,31	15,00 $\pm$ 3,08	20,53
Bazo (g)	5,80 $\pm$ 5,26	90,68	3,20 $\pm$ 1,30	59,09	3,60 $\pm$ 0,54	15,00
Bolsa Fabricio (g)	6,00 $\pm$ 1,41	23,50	5,00 $\pm$ 1,73	34,60	5,80 $\pm$ 0,44	7,58

<sup>1</sup>APC: Antibiótico promotor del crecimiento (Enramicina 8%).

<sup>2</sup>Harina de ajos + cebolla (0,75 + 0,75%).

<sup>3</sup>CV = Coeficiente de variación (%).



Tabla 5

Valores de los índices morfométricos de los tratamientos en pollos de engorde, a los 42 días de edad

Variables	T <sub>0</sub> : Sin APC <sup>1</sup>		T <sub>1</sub> : Con APC		T <sub>2</sub> : Ajo + cebolla <sup>2</sup>	
	Prom. ± DE	CV <sup>3</sup>	Prom. ± DE	CV	Prom. ± DE	CV
Índice Timo (IT)	0,496 ± 0,248	50,00	0,515 ± 0,085	16,50	0,483 ± 0,137	28,36
Índice Bazo (IB)	0,199 ± 0,188	94,47	0,118 ± 0,046	38,98	0,119 ± 0,005	4,20
Índice Bursal (IBF)	0, 203 ± 0,049	24,13	0,186 ± 0,062	33,33	0,186 ± 0,030	16,12

<sup>1</sup>APC: Antibiótico promotor del crecimiento (Enramicina 8%).<sup>2</sup>Harina de ajo + cebolla (0,75 + 0,75%).<sup>3</sup>CV = Coeficiente de variación (%).

Tabla 6

Título medios geométricos de anticuerpos (GMT) contra DBI y NC, a los 01, 21 y 42 días

Día	Tratamiento	DBI <sup>1</sup>		NC <sup>2</sup>	
		Prom ± D.E.	CV	Prom ± D.E.	CV
1	T <sub>0</sub> :Control sin APC	4621,67 ± 951,55	20,58	1806,33 ± 643,88	35,64
	T <sub>1</sub> :con APC	5623,00 ± 378,50	6,73	1837,33 ± 521,10	28,36
	T <sub>2</sub> :Ajo + Cebolla	3981,33 ± 709,78	17,82	1951,00 ± 1416,14	72,58
21	T <sub>0</sub> :Control sin APC	153,25 ± 119,70	78,10	202,25 ± 129,54	64,04
	T <sub>1</sub> :Con APC	117,25 ± 32,66	27,85	1557,00 ± 910,36	58,46
	T <sub>2</sub> :Ajo + Cebolla	184,50 ± 136,47	73,96	210,00 ± 97,58	46,46
42	T <sub>0</sub> :Control sin APC	46,60 ± 12,12	26,00	927,00 ± 672,52	72,54
	T <sub>1</sub> :Con APC	51,20 ± 46,81	91,42	510,00 ± 648,58	127,17
	T <sub>2</sub> :Ajo + Cebolla	45,40 ± 23,54	51,85	616,40 ± 445,13	68,86

<sup>1</sup>Infección Bursal (Enfermedad de Gumboro).<sup>2</sup>Enfermedad de Newcastle.

maternales; en esa fecha, el PGT contra DBI en los tres tratamientos se caracterizó por su baja variación (menor 20%) en comparación a la mayor variación observada en el PGT contra NC (mayor 28%).

En el día 21 se observó una disminución de los PGT contra DBI y NC en todos los tratamientos, con excepción del PGT del T<sub>1</sub> en NC, que se mantuvo elevado; en todos los tratamientos se incrementó la variación del PGT. En el día 42 el PGT contra IBD en todos los tratamientos fue menor al obtenido en el día 21; mientras que el PGT contra NC en T<sub>0</sub> y T<sub>2</sub> fueron ligeramente mayores a los registrados en el día 21, con excepción del T<sub>1</sub> que fue menor; además, la variabilidad de los PGT fue menor en T<sub>2</sub> en comparación a T<sub>0</sub> y T<sub>1</sub>.

## Discusión

La inclusión de ajo + cebolla (0,75% + 0,75%) equivalente a 7,5g + 7,5g/ kg en la dieta, no incrementó el peso de la bolsa de Fabricio, timo y bazo; un resultado similar fue logrado por Toghyani et al. (2011) quienes no aumentaron el peso de los órganos linfoides cuando incorporaron 4g/kg de ajo y especularon que se requeriría una dosis más alta para provocar una respuesta inmune. La suplementación con dosis mayores en la dieta si tuvo efectos favorables en el peso de los órganos linfoides; tal como lo consiguieron Goodarzi et al. (2013) luego de administrar 30g/kg de cebolla; Kothari et al., (2019) suministrando ajos a razón de 10g/kg y; Hanieh et al. (2010) al incorporar ajo y cebolla 10 y 30g/kg. El mayor peso de los órganos

linfoides estaría relacionado con un mayor recuento de leucocitos, esplenocitos, timocitos y en especial los linfocitos, lo que favorecería una mejor respuesta inmunológica (Navidshad et al., 2018).

Se observó una variabilidad elevada en el peso de los órganos linfoides de los tratamientos  $T_0$  y  $T_1$  en comparación a la menor variabilidad del  $T_2$  en especial la bolsa de Fabricio (CV=7,58%). Resultados de trabajos experimentales realizados en condiciones de campo, han demostrado la elevada variabilidad del peso de los órganos linfoides, tal como el realizado por Cazaban et al. (2015) en pollos machos de la línea Cobb 500, quienes encontraron una mayor variación en el peso de la bolsa de Fabricio (CV=21,4%), concluyeron que el incremento de la variación sería consecuencia de la fuerte variabilidad individual, relacionados con la línea genética, sexo, infecciones virales, sin vacunación contra Gumboro y presencia de micotoxinas en los alimentos. La menor variabilidad en el peso de los órganos linfoides observada en  $T_2$  podría ser por el efecto inmunomodulador de los Alliums en la secreción de citoquinas, promoción de la fagocitosis y la activación de macrófagos, producción de inmunoglobulinas, reacciones alérgicas y la proliferación de linfocitos (Arreola et al., 2015).

El IBF obtenido en el tratamiento  $T_2$  de 0,18 fue similar al registrado por Wehner (1999) (0,18), menor al obtenido por An et al. (2015) (0,31) en mini pollos de engorde blancos; mayor al conseguido por Cazaban et al. (2015) (0,11) y Alloui et al. (2020) (0,15). El IBF informa sobre el estado de salud de las granjas y el bienestar de los mismos; Cazaban et al. (2015) considera un IBF bueno cuando es superior a 0,11; mientras que Alloui et al. (2020) en un estudio reciente consideran un IBF bueno cuando es mayor a 0,18 y lo relacionan con el buen estado de inmunocompetencia de las aves.

El IT de 0,483 registrado en el  $T_2$  fue mayor a los obtenidos por Perozo-Marín et al. (2004) en pollos de la línea Ross (0,349) y Wehner (1999) (0,33). Asimismo, el IB de 0,119 fue mayor al registrado por Perozo-Marín et al. (2004) (0,108) y menor al reportado por Wehner

(1999) (0,204). El mayor IB e IT obtenidos se debería a la relación directa que existe entre el peso corporal y el peso de los órganos linfoides (Rajput et al., 2019) y se asocia con una mejor respuesta humoral y celular (Xue et al., 2021).

Los tratamientos  $T_0$ ,  $T_1$  y  $T_2$  estimularon una respuesta humoral pobre y se caracterizó por su gran variación. Estos resultados difieren de los obtenidos por Hanieh et al. (2010), quienes lograron una mayor formación de anticuerpos al incluir el ajo en niveles de 1% en la dieta, pero cuando incrementaron a 3% no lograron mayor estimulación, la respuesta fue menor; mientras que Jafari et al. (2008) no encontraron respuesta en ambos niveles.

En el día uno, en  $T_2$  el PGT de anticuerpos maternos contra DBI (3981) alcanzaron el nivel intermedio (3000-5000) y se caracterizó por su elevada variación (CV=78,5%); además, el PGT contra DBI fue mayor al obtenido en NC (1951). El PGT contra DBI fue similar a los logrados por Hassan et al. (2018) y Ray et al. (2021) e inferior al logrado por Thomrongsuwannakij et al. (2021), Luyo (2014) y (Lucas (2010) quienes reportaron un PGT mayor de 4000. Los menores PGT en los pollitos recién nacidos se relacionaría con los bajos niveles de anticuerpos circulantes en las gallinas reproductoras (Gharaibeh et al., 2008); el mayor PGT en DBI en comparación a NC es consecuencia de la mayor tasa de transferencia de anticuerpos contra DBI (73,6%) en comparación a NC (29,2%), como consecuencia del modo de replicación del virus del DBI, que se dirige directamente a las células linfoides especialmente los linfocitos B circulantes y los que se encuentran en la bolsa de Fabricio, donde estimulan una mayor producción de anticuerpos (Gharaibeh et al., 2008; Hamal et al., 2004).

En el día 21, nueve días posteriores a la aplicación de la segunda vacuna contra IBD y NC, se esperaba un incremento de los niveles de anticuerpos en la aves por efecto de la vacunación, pero se obtuvo una deficiente respuesta humoral en todos los tratamientos, Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Eid & Iraqi (2014) luego de administrar ajo en polvo incrementó ( $P<0,01$ ) el PGT para NC a los 7, 14 y 21 días post vacunación;

resultados similares fueron obtenidos por Hanieh et al. (2010), Sheoran et al. (2017), Kothari et al. (2019) y Arreola et al. (2015). En la investigación, la respuesta post vacunación fue pobre por múltiples factores que estarían relacionados con la técnica de vacunación, presencia de cepas virales de campo, tipo de vacuna, momento de vacunación (Quach et al., 2018) y niveles altos de anticuerpos maternos en los pollitos que pudieron neutralizar la cepa vacunal (Baksi et al. 2018).

En el día 42, los niveles de anticuerpos contra DBI disminuyeron aún más en todos los tratamientos, lo que evidencia la pobre respuesta humoral; sin embargo, se observó un incremento leve del PGT contra NC ( $T_0 = 927$ ,  $T_1 = 510$  y  $T_2 = 616$ ), por encima del nivel básico considerado como positivo a la vacunación (PGT=396) (Baksi et al., 2018) y se podría considerar como una respuesta postvacunal a NC. En esta fecha, la variabilidad de la respuesta humoral se incrementó más en relación al día 21, lo que concuerda con lo mencionado por Cazaban et al. (2018) quienes mencionan que la variabilidad de la respuesta humoral se incrementa a medida que el ave envejece.

## Conclusiones

La administración de harina de ajo y cebolla (0,75% + 0,75%) en la dieta no incrementó el peso del timo, bazo, bolsa de Fabricio ni estimuló la respuesta humoral, se caracterizó por su elevada variabilidad y fue similar a las obtenidas con dietas con APC y sin APC.

## Referencias

- Alloui, N., Sellaoui, S., Bennoune, O., & Ayachi, A. (2020). Relation between the bursa of Fabricius evolution and the weight of broiler chickens in intensive poultry flocks in Algeria. *Livestock Research for Rural Development*, 32(8). <http://www.lrrd.org/lrrd32/8/alooa32124.html>
- An, B. K., Kim, J. Y., Oh, S. T., Kang, C. W., Cho, S., & Kim, S. K. (2015). Effects of onion extracts on growth performance, carcass characteristics and blood profiles of white mini broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(2), 247–251. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0492>
- Arreola, R., Quintero-Fabián, S., López-Roa, R. I., Flores-Gutiérrez, E. O., Reyes-Grajeda, J. P., Carrera-Quintanar, L., & Ortuño-Sahagún, D. (2015). Immunomodulation and Anti-Inflammatory Effects of Garlic Compounds. *Journal of Immunology Research*, 401630. <https://doi.org/10.1155/2015/401630>
- Badal D. S., Dwivedi A. K., Kumar V., Singh S., Prakash A., Verma S., & Kumar J. (2019). Effect of organic manures and inorganic fertilizers on growth, yield and its attributing traits in garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8, 587–590. <https://www.phytojournal.com/archives/2019.v8.i3?page=12>
- Bajagai, Y. S., Alseemgeest, J., Moore, R. J., Van, T. T. H., & Stanley, D. (2020). Phytogetic products, used as alternatives to antibiotic growth promoters, modify the intestinal microbiota derived from a range of production systems: an in vitro model. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 10631–10640. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10998-x>
- Baksi, S., Rao, N., & Khan, M. (2018). Evaluation of Specific Antibody Response in Backyard Chickens to Infectious Bursal Disease Live Vaccine. *PSM Veterinary Research*, 3(1), 1–5. <https://journals.pspublishers.org/index.php/vetres/article/view/176>
- Barnes J., Anderson L. A., & Phillipson J. D. (2007). Herbal Medicines (3rd ed.). Pharmaceutical Press. [https://www.academia.edu/11956513/HERBAL\\_MEDICINES\\_3rd\\_EDITION?auto=download&email\\_work\\_card=download-paper](https://www.academia.edu/11956513/HERBAL_MEDICINES_3rd_EDITION?auto=download&email_work_card=download-paper)
- Behl, T., Kumar, K., Brisc, C., Rus, M., Nistor-Cseppento, C., Bustea, C., Corb, R. A., Pantis, C., Zengin, G., Shegal, A., Kaur, R., Kumar, A., Arora, S., Setia, D., Chandel, D., & Bungau, S. (2021). Exploring the multifocal role of phytochemicals as immunomodulators. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 110959. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110959>
- Cazaban, C., Majó, N., Dolz, R., Nofrarias, M., Costa, T.A., & Gardin, Y. (2015). Proposed bursa of Fabricius weight to body weight ratio standard in commercial broilers. *Poultry Science*, 94(9), 2088–2093. <https://doi.org/10.3382/ps/pev230>
- Corzo-Martínez, M., Corzo, N., & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*, 18(12), 609–625. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.011>
- Dhama, K., Karthik, K., Khandia, R., Munjal, A., Tiwari, R., Rana, R., Khurana, S. K., Ullah, S., Khan, R.U., Alagawany, M., Farag, M. R.,



- Dadar, M., & Joshi, S. K. (2018). Medicinal and therapeutic potential of herbs and plant metabolites/extracts countering viral pathogens—Current knowledge and future prospects. *Current Drug Metabolism*, 19(3), 236–263. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180129145252>
- Dharmaraj, G. Y., Jayanaik, H. C., Indresh, & Munegowda, T. (2017). Effect of Herbal Immunomodulator on Immune Organ and Immunological Parameters in Giriraja Birds. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 3740–3746. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2017.608.451>
- Elmowalid, G. A., Abd El-Hamid, M. I., Abd El-Wahab, A. M., Atta, M., Abd El-Naser, G., & Ahmad, A. A. (2019). Garlic and ginger extracts modulated broiler chicks innate immune responses and enhanced multidrug resistant Escherichia coli O78 clearance. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 66, 101334. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101334>
- Eid, K. M., & Iraqi, M. M. (2014, 8-12 abril). Effect of garlic powder on growth performance and immune response for newcastle and avian influenza virus diseases in broiler of chickens. *2nd International Conference On Biotechnology Applications In Agriculture (ICBAA)*, Moshtohor and Hurgada, Egipto. <https://www.researchgate.net/publication/262566919>
- Gadde, U., Kim, W. H., Oh, S., & Lillehoj, H. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: A review. *Animal Health Research Reviews*, 18(1), 26–45. <https://doi.org/10.1017/S1466252316000207>
- Gharaibeh, S., Mahmoud, K., & Al-Natour, M. (2008). Field Evaluation of Maternal Antibody Transfer to a Group of Pathogens in Meat-Type Chickens. *Poultry Science*, 87(8), 1550–1555. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00119>
- Goodarzi, M., Landy, N., & Nanekarani, S. (2013). Effect of onion (Allium cepa L) as an antibiotic growth promoter substitution on performance, immune responses and serum biochemical parameters in broiler chicks. *Health*, 5(8), 1210–1215. <https://doi.org/10.4236/health.2013.58164>
- Hamal, K. R., Burgess, S. C., Pevzner, I. Y., & Erf, G. F. (2004). Maternal Antibody Transfer from Dams to Their Egg Yolks, Egg Whites and Chicks in Meat Lines of Chickens. *Poultry Science*, 85(8), 1364–1372. <https://doi.org/10.1093/ps/85.8.1364>
- Hanieh, H., Narabara, K., Piao, M., Gerile, C., Abe, A., & Kondo, Y. (2010). Modulatory effects of two levels of dietary Alliums on immune response and certain immunological variables, following immunization, in White Leghorn chickens. *Animal Science Journal*, 81(6), 673–680. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00798.x>
- Hassan, F. B., Abdul, P. A., Saidu, L., & Bawa, E. K. (2018). Maternal antibody titre as a monitoring tool for vaccination against infectious bursal disease. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 16(3), 18–23. <https://doi.org/10.4314/sokjvs.v16i3.3>
- Hirakawa, R., Nurjanah, S., Furukawa, K., Murai, A., Kikusato, M., Nochi, T., & Toyomizu, M. (2020). Heat Stress Causes Immune Abnormalities via Massive Damage to Effect Proliferation and Differentiation of Lymphocytes in Broiler Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 46. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00046>
- Huyghebaert, G., Ducatelle, R., & Immerseel, F. V. (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal*, 187(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.003>
- Jafari, R. A., Jalali, M.R., Ghorbanpoor, M., & Saraei, S. M. (2008). Effect of dietary Garlic on Immune Response of Broilers chick to Live Newcastle Disease Vaccine. *Pakistan Journal Biology Science*, 11(14), 1848–1851. <https://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2008.1848.1851>
- Kothari, D., Lee, W.- D., Niu, K.- M., & Kim, S.- K. (2019). The genus Allium as poultry feed additive: A review. *Animals*, 9(12), 1032. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6940947/>
- Kuralkar, P., & Kuralkar, S. V. (2021). Role of herbal products in animal production – An updated review. *Journal of Ethnopharmacology*, 278, 114246. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114246>
- Lebdah, M., Tantawy, L., Elgamal, A.M., Abdelaziz, A.M., Yehia, N., Alyamani, A.A., Al moshadak, A. S., & Mohamed, M. E. (2021). The natural antiviral and immune stimulant effects of Allium cepa essential oil onion extract against virulent Newcastle disease virus. *Saudi Journal of Biological Sciences (in press)*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.033>
- Liu, L., Liu, X., Zhao, L., & Liu, Y. (2021). 1,8-cineole alleviates bisphenol A-induced apoptosis and necroptosis in bursa of Fabricius in chicken through regulating oxidative stress and PI3K/AKT pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226(2021), 112877.

- <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112877>
- Liu, Y., Yan, J., Han, X., & Hu, W. (2015). Garlic-derived compound S-allylmercaptocysteine (SAMC) is active against anaplastic thyroid cancer cell line 8305C (HPACC). *Technology and Health Care: official journal of the European Society for Engineering and Medicine*, 23 (Suppl. 1), S89–S93. <https://doi.org/10.3233/thc-150936>
- Lucas, J., Icochea, E., Valdivia, R., Carcelén, F., & Guzmán, J. (2011). Efecto del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis*) en la dieta de reproductoras de pollos de engorde sobre el desempeño productivo de su progenie. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(4), 283–289. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172011000400001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000400001&lng=es&tlng=es).
- Luyo, H. (2014). *Evaluación sanitaria en pollos de engorde (ross 308), criados en cama nueva vs. cama reciclada (7 reusos/flameado) en granjas comerciales*. [tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos] repositorio UNMSM. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/4715>
- Miron, T., Rabinkov, A., Mirelman, D., Wilchek, M., & Weiner, L. (2000). The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1463(1), 20–30. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00174-1)
- Mulugeta, M. (2018). Review on Efficacy of Garlic and Onion on Performances, Blood Profile and Health Status of Broiler Chickens. *Global Journal of Science Frontier Research*, 18(6-D). <https://journalofscience.org/index.php/GJSFR/article/view/2357>
- Navidshad, B., Darabighane, B., & Malecky, M. (2018). Garlic: An alternative to antibiotics in poultry production, a review. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 8(1), 9–17. [https://www.researchgate.net/publication/323725178\\_Garlic\\_An\\_alternative\\_to\\_antibiotics\\_in\\_poultry\\_production\\_a\\_review](https://www.researchgate.net/publication/323725178_Garlic_An_alternative_to_antibiotics_in_poultry_production_a_review)
- Obi, G. C., Lawanson, A. A., & Akiniade, O. O. (2020). Potentials of Garlic as a Feed additive and Alternative to Antibiotics in poultry Production, A Review. In: Proceedings of 25th Annual Conference of ASAN 2020, Abuja, Nigeria. <http://eprints.federalpolyilaro.edu.ng/id/eprint/1257>
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemist. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (J. William Horwitz, George W. Latimer (ed.); 18th Ed. [https://kupdf.net/download/aoac-2005\\_59b90b0808bbc57f21894ca4\\_pdf](https://kupdf.net/download/aoac-2005_59b90b0808bbc57f21894ca4_pdf)
- Oladeji, I. S., Abegbenro, M., Osho, I. B., & Olarotimi, O. J. (2019). The efficacy of phitogenic feed additives in poultry production: a review. *Turkey Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(12), 2038–2041. <http://agrifoodscience.com/index.php/TURJAF/article/view/2365>
- Omar, A. E., Al-Khalaifah, H. S., Mohamed, W. A. M., Gharib, H. S. A., Osman, A., & Amer, S. A. (2020). Efectos del extracto de cebolla rica en fenólicos (*Allium cepa* L.) sobre el rendimiento del crecimiento, el comportamiento, la histología intestinal, la digestibilidad de los aminoácidos, la actividad antioxidante y el estado inmunológico de los pollos de engorde. *Frontiers en Ciencias Veterinarias*, 7, 582612. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.582612>
- Quach, A. T., Le, H. T., Nguyen, H. M., & Le, A. T. T. (2018). Field assessment of the efficacy of M.B., LIBDV and Winterfield 2512 strain vaccines against infectious bursal disease in chickens. *The Journal of Agriculture and Development* 17(6), 15–23. <https://jad.hcmuaf.edu.vn/index.php/jad/article/view/23>
- Perozo-Marín, F., Nava, J., Mavárez, Y., Arens, E., Serja, P., & Briceño, M. (2004). Caracterización morfológica de los órganos linfoides en pollos de engorde de la línea Ross criados bajo condiciones de campo en el estado de Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, 14(3), 1–18. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95914305.pdf>
- Rajput, S. A., Zhang, C., Feng, Y., Wei, X. T., Khalil, M. M., Rajput, I. R., Baloch, D. M., Shaukat, A., Rajput, N., Qamar, H., Hassan, M., & Qi, D. (2019). Proanthocyanidins Alleviates AflatoxinB<sub>1</sub>-Induced Oxidative Stress and Apoptosis through Mitochondrial Pathway in the Bursa of Fabricius of Broilers. *Toxins*, 11(3), 157. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6468869/>
- Ray, S. M., Ashash, U., & Muthukumar, S. (2021). A field study on the evaluation of day-of-hatch and in grow-out application of live infectious bursal disease virus vaccine in broiler chickens. *Poultry Science*, 100(8), 101252. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2021.101252>
- Roskam, J. L., Lansink, A. G. J. M., & Saatkamp, H. W. (2020). The relation between technical farm performance and antimicrobial use of broiler farms. *Poultry Science*, 99(3), 1349–1356. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.054>

- Sánchez-Sánchez, M. A., Zepeda-Morales, A., Carrera-Quintanar, L., Viveros-Paredes, J. M., Franco-Arroyo, N. N., Godínez-Rubí, M., Ortuño-Sahagun, D., & López-Roa, R. I. (2020). Alliin, an *Allium sativum* Nutraceutical, Reduces Metaflammation Markers in DIO Mice. *Nutrients*, 12(3), 624. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/issues/355738>
- Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología. (2021). Estación de Alcantarilla, provincia Huaura, departamento Lima. <https://www.senamhi.gob.pe/?p=estaciones>
- Sheoran, N., Kumar, R., Kumar, A., Batra, K., Sihag, S., Maan, N. S., & Maan, N. S. (2017). Nutrigenomic evaluation of garlic (*Allium sativum*) and holy basil (*Ocimum sanctum*) leaf powder supplementation on growth performance and immune characteristics in broilers. *Veterinary World*, 10(1), 121–129. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.121-129>
- Souza, G. A., Ebaid, G. X., Seiva, F. R. F., Rocha, K. H. R., Galhardi, C. M., Mani, F., & Novelli, E. L. B. (2011). N-acetylcysteine an allium plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 643269. <https://doi.org/10.1093/ecam/nen070>
- Sugiharto, S. (2021). Herbal supplements for sustainable broiler production during post antibiotic era in Indonesia-an overview. *Livestock Research for Rural Development*, 33(8). [http://www.lrrd.org/lrrd33/8/33103sgh\\_u.html](http://www.lrrd.org/lrrd33/8/33103sgh_u.html)
- Tang, L- P., Liu, Y- L., Ding, K-N., Hou, X- J., Qin, J- J., Zhang, Y- A., Liu, H- X., Shen, X- L., & He, Y- M. (2021). Chai Hu oral liquid enhances the immune functions of both spleen and bursa of Fabricius in heat-stressed broilers through strengthening TLR4-TBK1 signaling pathway. *Poultry Science*, 100(9), 101302. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101302>
- Tian, H., Guo, Y., Ding, M., Su, A., Li, W., Tian, Y., Li, K., Sun, G., Jiang, R., Han, R., Yan, F., & Kang, X. (2021). Identification of genes related to stress affecting thymus immune function in a chicken stress model using transcriptome analysis. *Research in Veterinary Science*, 138, 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.06.006>
- Thomrongsuwannakij, T., Charoenvisal, N., & Chansiripornchai, N. (2021). Comparison of two attenuated infectious bursal disease vaccine strains focused on safety and antibody response in commercial broilers. *Veterinary World*, 14(1), 70–77. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.70-77>
- Tran, G-B., Dam, S-M., & Le, N-T. T. (2018). Amelioration of Single Clove Black Garlic Aqueous Extract on Dyslipidemia and Hepatitis in Chronic Carbon Tetrachloride Intoxicated Swiss Albino Mice. *International Journal of Hepatology*, 2018, 9383950. <https://doi.org/10.1155/2018/9383950>
- Toghyani, M., Toghyani, M., Gheisari, A., Ghalamkari, G., & Eghbalsaid, S. (2011). Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. *Livestock Science*, 138(1), 167–173. <https://www.researchgate.net/publication/251707698>
- Wehner, R. O. (1999). *Caracterización del desarrollo de la bolsa de Fabricio, Timo y Bazo en pollos broilers comerciales*. [tesis de grado, Universidad Austral de Chile] Repositorio de UACH. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/1999/fvw413c/doc/fvw413c.pdf>
- Xue, G., Yin, J., Zhao, N., Liu, Y., Fu, Y., Zhang, R., Bao, J., & Li, J. (2021). Intermittent mild cold stimulation improves the immunity and cold resistance of spleens in broilers. *Poultry Science*, 100(12), 101492. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101492>
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165–5170. <https://doi.org/10.1021/jf010697n>