

# EFFECTOS DE LA ALIMENTACIÓN DE POLLOS DE ENGORDE CON LÍPIDOS OXIDADOS Y UN EXTRACTO DE UN SUBPRODUCTO DEL ACEITE DE OLIVA, RICO EN HIDROXITIROSOLO, SOBRE EL MICROBIOMA CECAL Y LA RESPUESTA INMUNE.

J. Maldonado<sup>1</sup>, F. Sevillano<sup>1</sup>, M. Ibañez<sup>2</sup>, J.C. Martínez-Ávila<sup>1</sup>, D. Menoyo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Producción Agraria, Universidad Politécnica de Madrid, ETS Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, 28040 Madrid, España.

<sup>2</sup>Departamento de Economía Agraria, Estadística y Gestión de Empresas, Universidad Politécnica de Madrid, ETS Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de los Biosistemas, 28040 Madrid, España.

## Resumen

Este estudio tiene como objetivo examinar cómo la microbiota cecal de pollos de engorde y su respuesta inmunitaria se vieron afectadas por la alimentación con lípidos oxidados y un subproducto del aceite de oliva con una alta concentración de polifenol hidroxitiroso (HT). Un total de 360 machos Cobb 500 de un día de edad, se dividieron en 36 corrales, cada uno con 10 aves, y se alimentaron con una de las 4 dietas experimentales. Los tratamientos se organizaron en un factorial 2x2, siendo los factores: fuente de grasa (4% de aceite de soja (SO) o 4% de aceite de soja peroxidado PSO)) y HT (0 o 20 ppm). Los animales fueron alimentados con sus respectivas dietas experimentales durante 21 días y posteriormente se les practicó la eutanasia para la recolección de muestras. Se tomaron muestras del bazo y del ciego para estudiar, respectivamente, la respuesta inmunitaria mediante PCR en tiempo real y el microbioma mediante secuenciación de amplicones de ARNr 16S (Sistema Illumina NextSeq 2000). Los genes diana relacionados con la función inmunitaria incluyeron el receptor tipo Toll 4, el grupo de diferenciación 3, las interleucinas 1b y 8 (IL-8) y el factor nuclear NF-κB. La expresión de IL-8 tendió a disminuir con la HT en las aves alimentadas con SO, pero tendió a aumentar con la HT en las aves alimentadas con PSO ( $P = 0,06$  para la interacción). Se utilizó una distribución multinomial de Dirichlet para evaluar las diferencias en la composición de taxones bacterianos entre tratamientos. A nivel de filo, *Firmicutes* representó el 86,9%, *Bacteroidetes* el 10,3%, *Verrucomicrobiota* el 1,7% y *Proteobacteria* el 0,5% de la microbiota cecal total. Al comparar la distribución de *Firmicutes* con el resto de los filos, los pollos de engorde alimentados con SO mostraron una mayor proporción de *Firmicutes* que aquellos alimentados con PSO (7,80 frente a 5,76, respectivamente) ( $P = 0,02$ ). Mientras que aquellos alimentados con dietas HT (altas tasas de supervivencia) tendieron a presentar proporciones más altas (7,70 frente a 5,80, respectivamente) ( $P = 0,079$ ). Al ajustar el modelo de regresión logística multinomial LASSO a todos los recuentos de unidades taxonómicas operativas, la especie *Anaerofustis* sp. Marseille-P2832 se asoció con los pollos de engorde alimentados con PSO con dieta HT

añadida, *Clostridia* UCG-014 con las aves alimentadas con la dieta SO y el género *Roseburia* con las aves alimentadas con dietas HT. Se concluye que, en nuestras condiciones experimentales, los cambios observados en la microbiota asociados con la grasa peroxidada y la HT tuvieron un impacto mínimo en la respuesta inmunitaria.

### Abstract

This study aims to examine how the cecal microbiota of broilers and their immune response was affected by the feeding oxidised lipids and an olive oil by-product with a high concentration in the polyphenol hydroxytyrosol (HT). A total of 360-day-old male Cobb 500 were divided into 36 pens, each containing 10 birds and fed one of the 4 experimental diets. The treatments were arranged in a 2 x 2 factorial, the factors being: fat source (4% soybean oil (SO) or 4% peroxidized soybean oil (PSO)) and HT (0 or 20 ppm). Animals were fed their respective experimental diets for 21 days and then euthanised for sample collection. The spleen and cecal contents were sampled to study respectively the immune response by real time PCR, and the microbioma through 16S rRNA amplicon sequencing (Illumina NextSeq 2000 System). Target immune function related genes included the toll like receptor 4, cluster of differentiation 3, interleukins 1b and 8 (IL-8) and the nuclear factor NF-kB. The expression of IL-8 tended to decrease with HT in SO fed birds, but it tended to increase with HT in birds fed the PSO ( $P = 0.06$  for the interaction). A Dirichlet-Multinomial distribution was used to test for differences in bacterial taxa composition between treatments. At the phylum level *Firmicutes* represented the 86,9%, *Bacteroidetes* the 10,3%, *Verrucomicrobiota* the 1,7% and *Proteobacteria* the 0,5% of the total cecal microbiota. Comparing the distribution of *Firmicutes* versus the rest of the phyla, broilers fed the SO showed higher *Firmicutes* ratio than those fed the PSO 7.80 vs 5.76 respectively ( $P=0.02$ ). While those fed the HT diets tended to have higher ratios 7.70 vs. 5.80 ( $P=0.079$ ). Fitting a LASSO multinomial logistic regression model to all operational taxonomic unit counts, the species *Anaerofustis* sp. Marseille-P2832 was associated to broilers fed the PSO with added HT diet, *Clostridia* UCG-014 to birds fed the SO diet and the genus *Roseburia* to birds fed the HT diets. It is concluded that under our experimental conditions, the changes observed in the microbiota associated with the peroxidized fat and HT produced minimal impact on the immune response.

Palabras clave: microbiota, cecal, hidroxitirosol, immune.

## **Introducción**

El consumo de dietas con lípidos oxidados como aceites de soja sometidos a peroxidación se ha vinculado a una alteración de la integridad intestinal en pollos de engorde (Fries, et al., 2021). Estos lípidos generan peróxidos y aldehídos reactivos que promueven el estrés oxidativo y activan la ruta NF- $\kappa$ B alterando la respuesta inmunitaria (Kikusato & Toyomizu, 2023). Este cambio puede afectar a la modulación de la microbiota, especialmente en segmentos posteriores del intestino como el ciego, promoviendo el crecimiento de géneros patógenos afectando al animal (Tang, et al., 2025).

Por otro lado, los extractos vegetales ricos en polifenoles como el hidroxitirosol derivado de la industria de oliva o residuos del aceite de oliva, presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana (Shan & Miao, 2022). Los polifenoles actúan con la microbiota al pasar casi intactos al intestino grueso que se estima que es más del 90%, donde son metabolizados por bacterias hacia formas más bioactivas, modulando la diversidad bacteriana y, por lo tanto, promoviendo la proliferación de grupos beneficiosos que mejoran la salud intestinal de las aves (Iqbal, et al., 2020). Con todo esto, el presente estudio tiene como objetivo examinar cómo la microbiota cecal de pollos de engorde y su respuesta inmunitaria se vieron afectadas por la alimentación con lípidos oxidados y un subproducto del aceite de oliva con una alta concentración de polifenol hidroxitirosol.

## **Material y metodos**

El ensayo se llevó a cabo en las instalaciones experimentales de la Universidad Politécnica de Madrid (Departamento de Producción Agraria y ETSI Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas). Un total de 360 pollos de engorde machos Cobb 500 de un día de edad se dividieron en 36 corrales, cada uno con 10 aves. Los corrales de suelo estaban equipados con un comedero y líneas de bebederos de niple. La temperatura de las instalaciones se fijó en 33 °C al inicio del ensayo y disminuyó gradualmente hasta 23 °C a los 21 días de edad. La humedad y la ventilación se controlaron automáticamente. Se estableció un fotoperíodo de 24 L:0D durante los primeros 7 días de edad y 18 L:6D hasta el final del experimento a los 21 días de edad.

El diseño fue completamente aleatorizado. Las dietas experimentales se organizaron en un factorial 2x2, siendo los factores: fuente de grasa (4% de aceite de soja (SO) o 4% de aceite de soja peroxidado (PSO)) e hidroxitirosol (HT) (0 o 20 ppm). Los animales fueron alimentados con sus respectivas dietas experimentales durante 21 días y posteriormente las aves fueron sacrificadas en cámaras de CO<sub>2</sub> para la recolección de muestras. Se tomaron muestras de bazo y el contenido de ciego para estudiar, respectivamente, la respuesta inmunitaria mediante PCR en tiempo real y el microbioma mediante secuenciación de amplicones de ARNr 16S (Sistema Illumina NextSeq 2000). Los genes diana relacionados

con la función inmunitaria incluyeron el receptor tipo Toll 4, el grupo de diferenciación 3, las interleucinas 1b y 8 (IL-8) y el factor nuclear NF-kB.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS (versión 9.2; SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.) Las diferencias se declararon significativas en el nivel de probabilidad  $p < 0,05$ , las tendencias fueron significativas en el nivel de probabilidad  $0,05 < p < 0,10$ . Se utilizó una distribución multinomial de Dirichlet para evaluar las diferencias en la composición de taxones bacterianos entre tratamientos.

## Resultados y discusión

El gen relacionado con la función inmunitaria mostró que la expresión de IL-8 tendió a disminuir con HT en las aves alimentadas con SO, pero tendió a aumentar con HT en las aves alimentadas con PSO ( $P = 0,06$  para la interacción). Estos resultados concuerdan con otros estudios en donde indican que el HT y otros polifenoles suprimen vías inflamatorias como NF-KB reduciendo la transcripción de citocinas pro inflamatorias, incluida IL-8 (Fries, et al., 2021; Kobayashi, et al., 2020). Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo más intenso inducido por PSO, el HT podría activar respuestas antiinflamatorias promoviendo el aumento de expresión de IL-8.

En la figura 1. se muestra el microbioma de los ciegos. A nivel de filo, *Firmicutes* representó el 86,9%, *Bacteroidetes* el 10,3%, *Verrucomicrobiota* el 1,7% y *Proteobacteria* el 0,5% de la microbiota cecal total.

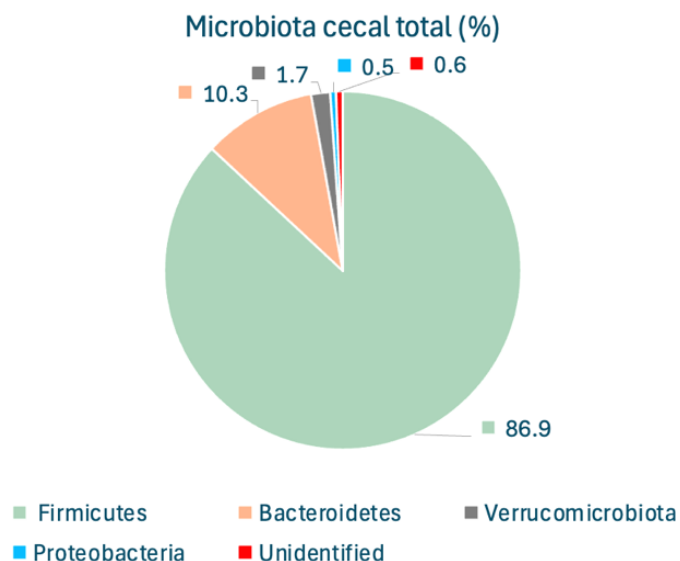


Figura 1. Poblaciones de microorganismos identificadas en el ciego de pollos de engorde a 21 días de edad.

En nuestro ensayo, en la figura 1. se muestra *Firmicutes* con mayor población en los ciegos. Investigaciones previas muestran que la proporción de *Firmicutes* en los ciegos siempre es mayor debido a que contribuye a la síntesis de ácidos grasos de cadena corta como el butirato y el ácido propiónico, que desempeñan muchas funciones como servir como suministro de energía a través de la gluconeogénesis, reducir poblaciones microbianas indeseable en el ciego (Ruan, et al., 2024; Tang, et al., 2025).

En la figura 2. se muestra el efecto que tiene el aceite fresco o peroxidado frente a *Firmicutes*. Al comparar la distribución de *Firmicutes* con el resto de los filos, los pollos de engorde alimentados con SO mostraron una mayor proporción de *Firmicutes* que aquellos alimentados con PSO (7,80 frente a 5,76, respectivamente) ( $P = 0,02$ ).

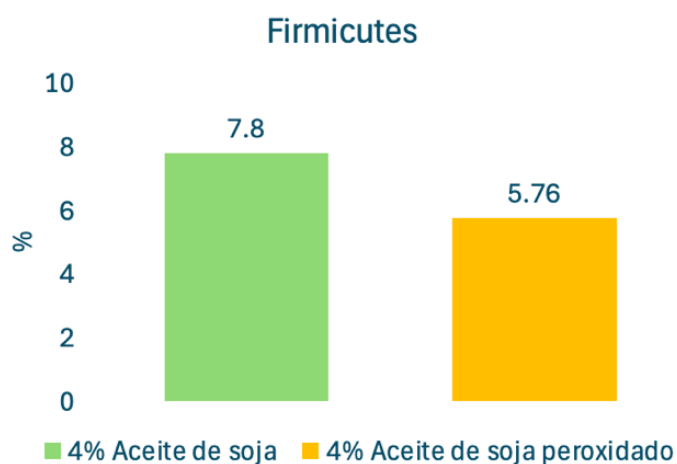


Figura 2. Porcentaje de *Firmicutes* entre aceite de soja vs. aceite de soja peroxidado.

La reducción de *Firmicutes* observada en aves alimentadas con PSO, diferentes ensayos indican que puede estar asociado con el estrés oxidativo y a la alteración de la microbiota intestinal inducida por lípidos oxidados. (Zhang, et al., 2022; Ruan, et al., 2024)

En la figura 3. Se muestra el efecto de las dietas con HT frente a *Firmicutes*. Dietas con 20 ppm de HT (altas tasas de supervivencia) tendieron a presentar proporciones más altas de *Firmicutes* (7,70 frente a 5,80, respectivamente) ( $P = 0,079$ ).

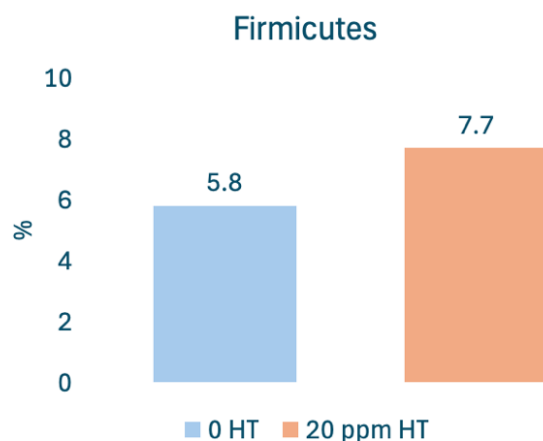


Figura 3. Porcentaje de *Firmicutes* entre 0 ppm de hidroxitirosol vs. 20 ppm de hidroxitirosol.

Al añadir HT en las dietas, reduce el estrés oxidativo intestinal, fortalece la barrera epitelial y suprime señales inflamatorias, lo que crea un entorno favorable para bacterias estrictas anaerobias como *Firmicutes* (Rebollada-Merino, et al., 2019; Dedousi, et al., 2022). Al ajustar el modelo de regresión logística multinomial LASSO a todos los recuentos de unidades taxonómicas operativas, la especie *Anaerofustis* sp. Marseille-P2832 se asoció con los pollos de engorde alimentados con PSO con dieta HT añadida, esto pone en evidencia que esta especie puede tolerar ambientes más oxidativos (Chen, et al., 2020). *Clostridia* UCG-014 con las aves alimentadas con la dieta SO, según Zhang, et al., (2023) este grupo de bacterias están presentes en pollos con dietas más saludables. Por último el género *Roseburia* con las aves alimentadas con dietas HT. Estos patrones refuerzan la idea de que HT modula el microbioma cecal de los pollos (Shan & Miao, 2022) favoreciendo géneros fermentadores útiles en condiciones no estresadas como *Clostridia* y *Roseburia* (Chen, et al., 2020). Esta diferenciación metabólica refleja cómo las dietas y aditivos influyen en la estructura microbiana.

### Conclusiones

En nuestras condiciones experimentales, los cambios observados en la composición de la microbiota cecal asociado con la inclusión de grasa peroxidada y la suplementación de hidroxitirosol tuvieron un impacto mínimo en la respuesta inmunitaria en pollos de engorde.

### Referencias

- Chen, Y., Wang, J., Yu, L., Xu, T., & Zhu, N. (2020). Microbiota and metabolome responses in the cecum and serum of broiler chickens fed with plant essential oils or virginiamycin. *Scientific reports*, 10(1), 5382.
- Dedousi, A., Kotzamanidis, C., Kritsa, M. Z., Tsourekis, A., Andreadelli, A., Patsios, S. I., & Sossidou, E. (2022). Growth performance, gut health, welfare and qualitative behavior characteristics of broilers fed diets supplemented with dried common (*Olea europaea*) olive pulp. *Sustainability*, 15(1), 501

Fries-Craft, K. A., Meyer, M. M., Lindblom, S. C., Kerr, B. J., & Bobeck, E. A. (2021). Lipid source and peroxidation status alter immune cell recruitment in broiler chicken ileum. *The Journal of nutrition*, 151(1), 223-234.

Iqbal, Y., Cottrell, J. J., Suleria, H. A., & Dunshea, F. R. (2020). Gut microbiota-polyphenol interactions in chicken: A review. *Animals*, 10(8), 1391.

Kikusato, M., & Toyomizu, M. (2023). Mechanisms underlying the effects of heat stress on intestinal integrity, inflammation, and microbiota in chickens. *The Journal of Poultry Science*, 60(2), 2023021.

Kobayashi, A., Azuma, K., Ikeda, K., & Inoue, S. (2020). Mechanisms underlying the regulation of mitochondrial respiratory chain complexes by nuclear steroid receptors. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6683.

Rebollada-Merino, A., Bárcena, C., Ugarte-Ruiz, M., Porras, N., Mayoral-Alegre, F. J., Tomé-Sánchez, I., ... & Rodríguez-Bertos, A. (2019). Effects on intestinal mucosal morphology, productive parameters and microbiota composition after supplementation with fermented defatted alperujo (FDA) in laying hens. *Antibiotics*, 8(4), 215.

Ruan, D., Jiang, J., Huang, W., Fouad, A. M., El-Senousey, H. K., Lin, X., ... & Jiang, S. (2024). Integrated metabolomics and microbiome analysis reveal blended oil diet improves meat quality of broiler chickens by modulating flavor and gut microbiota. *Animal Nutrition*, 19, 453-465

SAS. *Guía del usuario de SAS/STAT: Estadística* ; Versión 6.<sup>a</sup> ed.; SAS Inc.: Cary, NC, EE. UU., 1990.

Shan, C., & Miao, F. (2022). Immunomodulatory and antioxidant effects of hydroxytyrosol in cyclophosphamide-induced immunosuppressed broilers. *Poultry Science*, 101(1), 101516.

Tang, M., Wu, Y., Olnood, C. G., Gao, Y., Wang, F., Zhang, Z., ... & Yin, Y. (2025). Effects of peroxidized lipids on intestinal morphology, antioxidant capacity and gut microbiome in piglets. *Animal Nutrition*, 20, 430-443.

Zhang, Y., Mahmood, T., Tang, Z., Wu, Y., & Yuan, J. (2022). Effects of naturally oxidized corn oil on inflammatory reaction and intestinal health of broilers. *Poultry Science*, 101(1), 101541.

Zhang, M., Li, D., Yang, X., Wei, F., Wen, Q., Feng, Y., ... & Hu, Y. (2023). Integrated multi-omics reveals the roles of cecal microbiota and its derived bacterial consortium in promoting chicken growth. *Msystems*, 8(6), e00844-23