

P-2017/13827

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2017/0007058**Solicitud de patente a nombre de **DSM IP ASSETS B.V**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad DSM IP ASSETS B.V, domiciliada en Heerlen, Holanda, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **689** notificado electrónicamente el 23 de enero de 2020, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Modificaciones presentadas

El examinador establece que *"La modificación de las reivindicaciones 1-3, radicada mediante escrito N° NC2017/0007058, del 30 de noviembre de 2018, no es aceptable porque incluye los rangos de proporciones en que se pueden usar los componentes de la "combinación" por cada kilogramo del pienso (Dosis pág. 6, líneas 15-21); dichas proporciones de cada componente formando parte de la "combinación" no habían sido consideradas inicialmente en la descripción ni en las reivindicaciones, por lo que se amplía el objeto de la solicitud; además, estos rangos no corresponden a las proporciones de cada componente formando parte de la "combinación", es decir, de 25-OH D3, vitamina E, ácido ascórbico y ácido ascórbico. De manera que el capítulo reivindicatorio aportado con el radicado NC2017/0007058, del 30 de noviembre de 2018 no será tenido en cuenta y en su lugar, en el presente examen de patentabilidad, se estudiarán las reivindicaciones 1 a 4 del radicado N° NC2017/0007058 del 2 de octubre de 2017."*. En este respecto, el solicitante desea manifestar respetuosamente su

desacuerdo con dicha objeción ya que, como el examinador lo admite *"los rangos de proporciones en que se pueden usar los componentes de la "combinación" por cada kilogramo del pienso (Dosis pág. 6, líneas 15-21)"*, se encuentran claramente divulgados en la descripción como fue presentada originalmente. Por tanto, lo indicado por el examinador *"dichas proporciones de cada componente formando parte de la "combinación" no habían sido consideradas inicialmente en la descripción ni en las reivindicaciones"*, no es cierto porque los piensos preferidos de la presente invención se divulgan claramente en la sección de "Dosis" de la Página 6, líneas 15 a 54 y Página 7, líneas 1 a 28, y adicionalmente estas características fueron incluidas en respuesta a la objeción del Oficio No. 8993 notificado el 24 de julio de 2018, en donde el examinador indicaba *"Las reivindicaciones 1 y 2 no mencionan las proporciones de los componentes de la combinación. Se requiere al solicitante incluir dichas proporciones"*, con lo cual se evidencia claramente que dichas características fueron incluidas con el fin de superar la objeción realizada por el examinador y no constituyen una ampliación de materia. En este sentido, se solicita amablemente sea retirada dicha objeción.

2. Reivindicaciones relativas a un uso

Respecto a lo indicado por el examinador, amablemente se informa que dicha reivindicación ya había sido eliminada en las modificaciones presentadas en la anterior respuesta. Por tanto, se supera dicha objeción.

3. Modificación a las Reivindicaciones y Claridad

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de tres (3) reivindicaciones y reemplaza completamente el capítulo presentado anteriormente. Las modificaciones realizadas se presentan a continuación:

3.1 Se ha modificado la reivindicación 1, incluyendo la característica *"en donde el pienso mantiene los niveles de beta-estradiol en aves de corral, y prolonga la vida de puesta, mientras se alimenta ad libitum"*, lo cual corresponde a una

característica funcional del pienso, la cual fue incluida con el fin de definir más claramente la materia a proteger y superar las objeciones del examinador.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad y patentabilidad planteadas por el examinador en su concepto técnico.

En consecuencia, nos permitimos indicar que el presente capítulo reivindicatorio, que incluye tres (3) reivindicaciones, se ajusta a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486/00.

4. Pago de tasas

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene un menor número de reivindicaciones a las presentadas anteriormente, y en esencia es el mismo objeto, pero definido con mayor claridad.

5. Nivel Inventivo

El examinador establece que la reivindicación 1 a 3 carecen de nivel inventivo a la luz de las enseñanzas descritas en los documentos WO2014/191153 (D2) y Guidelines for Optimum Vitamin Nutrition (D3).

A este respecto, me permito decir que el artículo 18 de la Decisión 486 establece que *"Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica"*.

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

De acuerdo con lo anterior, la solicitante desea manifestar respetuosamente su desacuerdo, ya que teniendo en cuenta las modificaciones presentadas en el nuevo capítulo reivindicatorio, se superan las objeciones realizadas, por cuanto **dichas características no se encuentran divulgadas en los documentos citados por el examinador.**

Ahora bien, se presentan junto con este memorial los documentos **Dietary Supplementation of 25-Hydroxycholecalciferol Improves Livability In Broiler Breeder Hens-Ovarian Morphology and Plasma 17-β Estradiol Level** y **Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens**, junto con su traducción al español, los cuales contienen datos adicionales sobre los niveles de 17-Beta estradiol y la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde. Estas son las mismas condiciones experimentales que se describen en los ejemplos de esta solicitud. Debe tenerse en cuenta que algunos de estos documentos se publican en revistas científicas y algunos se encuentran aún en preparación para publicación.

El propósito de los aditivos para piensos es permitir que las aves de corral sean alimentadas ad libitum y se mantengan saludables. En general, las aves de corral comerán continuamente y sufrirán los efectos de la obesidad. Un efecto de la obesidad es afectar negativamente la cantidad de 17 beta estradiol que circula. Esto reduce la productividad de las gallinas y, por lo tanto, limita su vida útil comercial (así como su vida biológica). En la avicultura comercial, este riesgo se reduce mediante la alimentación de solo una cantidad restringida de alimentos a la bandada. Si bien esto ayuda a mantener sano a toda la bandada, algunos animales pueden volverse obesos y también ser agresivos con las otras gallinas de la bandada. Se ha descubierto que la adición de la combinación reclamada puede permitir que las aves coman ad libitum (lo que reduce el estrés/agresión

en aves individuales), y al mismo tiempo mantenerse tan saludables como las aves con una dieta restringida, mejorando así el bienestar animal.

Como puede apreciarse en el documento **Dietary Supplementation of 25-Hydroxycholecalciferol Improves Livability In Broiler Breeder Hens-Ovarian Morphology and Plasma 17- β Estradiol Level** se realizan pruebas a gallinas reproductoras de pollos de engorde de 45 a 55 semanas de edad como se presenta a continuación:

A las 45 semanas de edad, las aves continuaron con la ingesta de alimento restringida recomendada (R) o se liberaron para ingesta de alimento ad libitum (Ad) durante 10 semanas. A las aves se les permitió dieta basal o con un suplemento adicional que contenía vitamina D (HyD) y otros antioxidantes/inflamatorios (Ad+HyD+otros). Durante las 10 semanas, se registraron la ingesta diaria de alimento y la producción de huevos y las gallinas que murieron súbitamente se sometieron a necropsia por causa de la mortalidad dentro de las 24 horas. A la edad de 55 semanas, las gallinas que sobrevivieron (n = 6, 6, 8 para R, Ad y Ad+HyD+otros) se sacrificaron para determinación de la concentración de 17 β estradiol en plasma.

Tabla 1. Efecto de la inclusión dietética de vitamina D en combinación con antioxidantes sobre la mortalidad, rendimiento reproductivo y fuerza tibial.

		Restringido (R) (n = 7)	Ad libitum (Ad) (n = 10)	Ad+HyD+otros (n = 10)	
Mortalidad (muerte/total)		1/7	4/10	2/10	
Producción de huevos (huevo/día/gallina, %)		36.8 $\pm$ 3.8 ^a	17.6 $\pm$ 4.2 ^b	28.5 $\pm$ 3.6 ^a	DE agrupada 6.72
Incidencia degenerada (ovario/total)	ovárica	2/7	6/10	5/10	
Incidencia morfología de tipo	de	0/7	3/10	1/10	

tumor ovárico
(ovario/total)

Nivel de 17β-estradiol en plasma (nmol/mL)	0.78±0.05 ^a	0.34±0.03 ^c	0.61±0.04 ^b	DE agrupada 0.07
---	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

Los resultados se expresaron con media ± DEM.

Las medias con letras superíndice diferentes dentro del período de tratamiento de la misma fila son significativamente diferentes ($P < 0.05$).



Efecto de la suplementación dietética de la mezcla HyD sobre la morfología ovárica de gallinas reproductoras de pollos de engorde con ingesta de alimento restringida o ad libitum.

Ahora bien, en el documento **Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens**, se presenta un estudio que tuvo como objetivo examinar los efectos del 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D3) sobre el rendimiento reproductivo y la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde. Las gallinas a la edad de 26 semanas continuaron con raciones restringidas (R) o se les permitió alimento ad libitum (Ad) hasta las 60 semanas de edad. La ingesta de alimento AD perjudicó enormemente la producción de huevos y la viabilidad de las gallinas. Se mejoró la tasa de supervivencia en gallinas R y Ad (86.7 vs. 78.9% y 48.2 vs. 29.1%, respectivamente) al igual que la producción de huevos en gallinas R ($P < 0.05$) mediante la inclusión de 69 µg de 25-OH-D3/kg alimentándose de la dieta basal. La muerte súbita (SD) fue la causa de la mortalidad de gallinas; las gallinas murieron antes con un BW (peso corporal) más pesado y mayores pesos absolutos y relativos de grasa abdominal que las gallinas sobrevivientes. Curiosamente, la ingesta de alimento de las gallinas SD

se volvió menor que el de las gallinas sobrevivientes después de 37 y 42 semanas en los grupos Ad y R, respectivamente, y condujo a una disminución progresiva del BW de la gallina SD con una relación (en relación con las gallinas sobrevivientes de la misma edad) equivalía a 1 alrededor de 34 a 38 semanas en los grupos Ad y 52 a 53 semanas en los grupos R. La suplementación de 25-OH-D3 mejoró los cambios adversos de la frecuencia cardíaca y respiratoria de las sobrevivientes de Ad después de 29 semanas ($P < 0.05$), pero no tuvo efectos significativos sobre las gallinas SD AD. En contraste con las contrapartes sobrevivientes, todas las gallinas SD experimentaron frecuencias respiratorias persistentemente más altas junto con la disminución de las frecuencias cardíacas ($P < 0.05$), lo que sugiere una función cardíaca comprometida como la causa de la SD, en la cual las gallinas aumentaron la frecuencia cardíaca y respiratoria para más suministro de sangre y oxígeno para satisfacer la necesidad de ganancia de BW y/o adiposidad rápida en respuesta a la ingesta de alimento Ad o debido a una mejor eficiencia de alimento genéticamente incluso bajo la ingesta de alimento R. A medida que avanzaban los trastornos cardiorrespiratorios, la función cardíaca comprometida finalmente condujo a insuficiencia cardíaca y muerte súbita a pesar de las reducciones espontáneas en la ingesta de alimento y la pérdida de BW en todas las gallinas SD. La provisión de 69 μg de 25-OH-D3/kg de alimento es un método efectivo y práctico para mejorar la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde.

Como resultados se obtuvieron que, la ingesta de alimento Ad redujo notablemente la viabilidad y la suplementación de las gallinas con 25-OH-D3 y aumentó en gran medida la tasa de supervivencia en los grupos R y Ad (78.9 vs. 86.7% y 29.1 vs. 48.2%, respectivamente) (Figura 1). La ingesta de alimento de las gallinas SD y las contrapartes sobrevivientes en los grupos R divergieron después de 42 semanas y las diferencias fueron aún mayores después de 52 semanas, de modo que las gallinas SD limitaron voluntariamente su ingesta de alimento a 110 a 120 g/día/gallina al final en lugar del nivel recomendado alrededor de 156 g/día/gallina (Figura 2, panel A). Después de la liberación de la restricción de alimento, tanto las gallinas SD como las sobrevivientes de los grupos Ad mostraron un aumento abrupto en la ingesta de alimento que alcanzó un máximo de 210 a 220 g/día/gallina dentro de 1 semana (Figura 2, panel B). Posteriormente, la ingesta de alimento disminuyó

gradualmente por debajo de los 160 g/día/gallina recomendados después de las 36 semanas de edad, 10 semanas después de levantar la restricción de alimento. Desde la edad de 45 a 60 semanas, los patrones de ingesta de alimento de las gallinas sobrevivientes y SD de los grupos Ad divergieron aún más. La ingesta de gallinas SD disminuyó a 110 a 130 g/día/gallina cuando tenía 45 semanas de edad, después de lo cual la ingesta de alimento de las gallinas sobrevivientes aumentó lentamente a 160 g/día/gallina a 60 semanas, mientras que la ingesta de gallinas SD disminuyó a 50 g/día/gallina. La ingesta de alimento comenzó a divergir a las 42 semanas y se desvió adicionalmente después de 50 semanas en grupos R con gallinas R que experimentaron SD consumiendo menos alimento que las sobrevivientes.

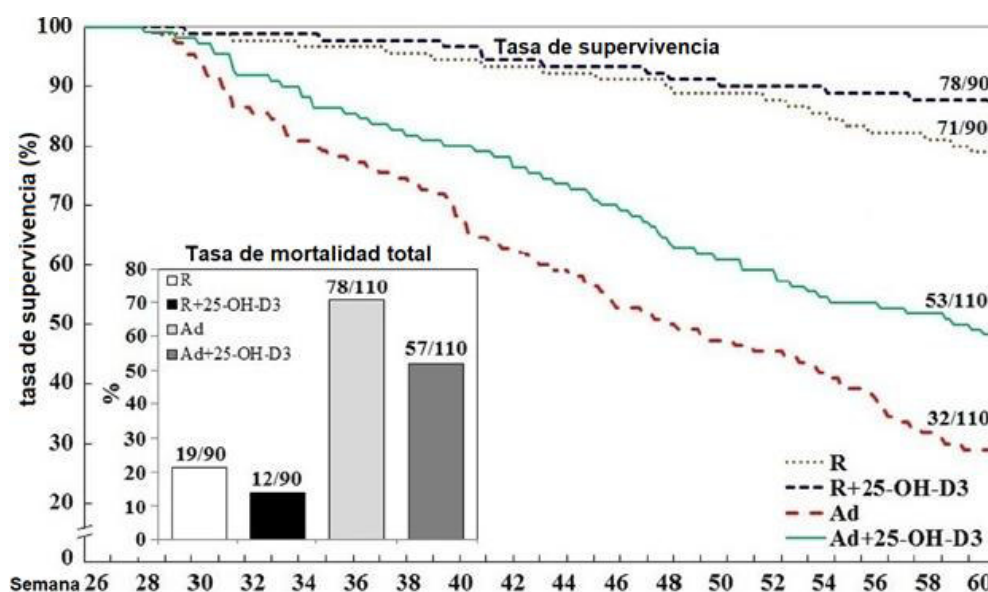


Figura 1. Efecto de suplementación dietética de 25-OH-D3 sobre la tasa de supervivencia de las gallinas reproductoras de pollos de engorde provistas de ingesta de alimento restringida o ad libitum. Los resultados se expresaron como un porcentaje de las gallinas sobrevivientes restantes del número de gallinas inicialmente asignadas al grupo. Los valores sobre las barras en el panel incorporado indican el número total de gallinas (numerador) que murieron por muerte súbita, siendo el denominador el número inicial de gallinas en el grupo. R; restricción, Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hidroxicolecalciferol.

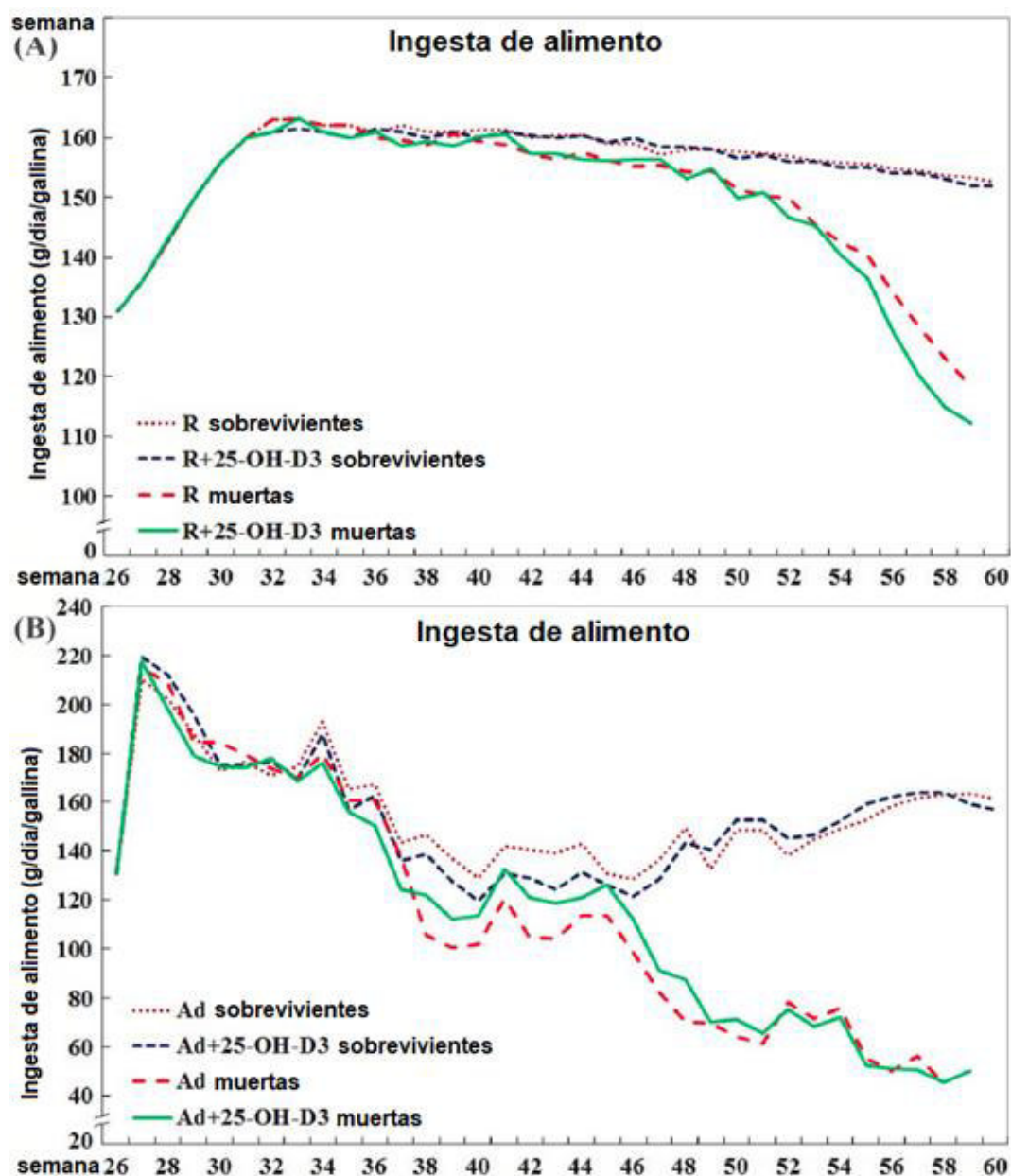


Figura 2. Efecto de la suplementación dietética de 25-OH-D3 en la ingesta de alimento y producción de huevos de gallinas reproductoras de pollos de engorde provistas de ingesta de alimento restringida o ad libitum. Los resultados se separaron en aquellos de las gallinas que sobrevivieron a 60 semanas (para el grupo R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3, $n = 71, 78, 32$ y 53 antes de las 29 semanas, $n = 67, 74, 28$ y 49 durante 30–35 semanas, $n = 60, 66, 21$ y 41 durante 36–47 semanas, y $n = 53, 60, 14$ y 35 después de 48 semanas debido a 3, 7, 7 gallinas muestreadas a las 29, 35 y 45 semanas para recolección de

tejido, respectivamente) etiquetadas como "sobrevivientes", y las gallinas que experimentaron muerte súbita etiquetadas como "muertas" a lo largo del ensayo (para grupo R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3, $n = 19, 12, 78$ y 57 , respectivamente, al comienzo del ensayo). Las muertes en edades posteriores se pueden calcular al restar los números de muerte del número total de gallinas inicialmente asignadas a los grupos. R; Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hidroxicolecalciferol.

La cantidad de huevos puestos durante la prueba de alimento se redujo significativamente por la ingesta de alimento Ad tanto en gallinas sobrevivientes como SD (Tabla 1, $P < 0.05$). La reducción en el rendimiento total del huevo debido a la ingesta de alimento Ad fue más pronunciada en las gallinas que sobrevivieron hasta las 60 semanas de edad. En estas gallinas, la tasa de producción de huevos se redujo en 33 y 37% en gallinas Ad- y Ad+25-OH-D3, respectivamente ($P < 0.05$). Entre las gallinas que experimentaron SD, la producción de huevos en gallinas R fue aproximadamente un 26% menor que la de sus contrapartes sobrevivientes, independientemente de la provisión de 25-OH-D3 y la ingesta de alimento Ad provocó una reducción adicional, no significativa, de 8 a 10% en la tasa de producción de huevos. La suplementación con 25-OH-D3 aumentó la tasa de producción de huevos de la parvada entera en gallinas R en un 8% (Tabla 1, $P < 0.05$) debido a los aumentos en las gallinas SD. Este efecto no se observó en otros grupos de tratamiento. En general, la suplementación con 25-OH-D3 aumentó el rendimiento total del huevo al reducir la mortalidad y aumentar la tasa de puesta de huevos entre las gallinas que sobrevivieron hasta 60 semanas. En contraste con sus contrapartes sobrevivientes, las gallinas SD tuvieron una producción de huevos temprana pero baja en los grupos R y Ad con una fuerte caída después de 46 semanas en los grupos R (Suplemento Figura 1, panel A y B) que condujeron a un promedio menor de la tasa de producción de huevos y el rendimiento total de huevos en los grupos R y el rendimiento total de huevos en los grupos Ad (Tabla 1, $P < 0.05$).

Tabla 1. Efecto de la suplementación dietética de 25-OH-D3 sobre la producción de huevos de gallinas reproductoras de pollos de engorde provistas de ingesta de alimento restringida o ad libitum

	Restricción	Restricción + 25-OH-D3	Ad libitum	Ad libitum + 25-OH-D3
Tasa de producción de huevos de la parvada completa (huevos/día/gallina, %)	51.2 ± 1.7	55.4 ± 1.3 ⁺	36.9 ± 1.9*	39.3 ± 1.8*
Tasa de producción de huevos de sobrevivientes (huevos/día/gallina, %)	56.5 ± 1.4	58.1 ± 1.3	37.9 ± 3.0*	36.3 ± 4.1*
Tasa de producción de huevos de gallinas que mueren de muerte súbita (huevos/día/gallina, %)	40.0 ± 4.1 [#]	44.4 ± 4.3 [#]	36.8 ± 2.5	39.6 ± 2.6
Rendimiento total de huevos de parvada completa (huevos/gallina)	105.3 ± 4.6	118.3 ± 4.7 ⁺	47.7 ± 2.7*	52.1 ± 2.9*
Rendimiento total de huevos de sobrevivientes (huevos/gallina)	127.5 ± 3.4	133.0 ± 3.7	89.7 ± 3.7*	86.2 ± 4.7*
Rendimiento total de huevos de gallinas que mueren de muerte súbita (huevos/gallina)	57.9 ± 7.7 [#]	57.7 ± 7.5 [#]	44.1 ± 3.2*, [#]	45.7 ± 3.3*, [#]

Los resultados se expresaron como media ± DEM (para toda la parvada, n = 90, 90, 110 y 110, para gallinas que sobrevivieron a 60 semanas, n = 71, 78, 32 y 53, para gallinas que murieron incidentalmente por muerte súbita, n = 19, 12, 78 y 57 en el grupo R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3, respectivamente).

*; diferencia significativa por alimento Ad (frente a las gallinas R correspondientes, $P < 0.05$).

+; diferencia significativa por inclusión de 25-OH-D3 (frente a gallinas R o Ad, correspondientes, $P < 0.05$).

#; diferencia significativa entre gallinas muertas versus las correspondientes que sobreviven a 60 semanas ($P < 0.05$).

R; restricción, Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hidroxicolecalciferol.

Adicionalmente y como se aprecia en las Figuras 3 y 4 del documento adjunto, las gallinas Ad mostraron una ganancia rápida de BW alcanzando 4.6 kg/gallina a la edad de 38 semanas. El peso corporal disminuyó a 42 semanas, y luego aumentó constantemente para alcanzar 5.1 kg/gallina a 60 semanas. En contraste, las gallinas R mostraron un aumento lento en el peso corporal para alcanzar 3.9 kg/gallina a 60 semanas (Figura 3, panel A). Entre las gallinas muestreadas para recolecciones de tejidos, la ingesta de alimento Ad aumentó significativamente el BW y el peso y fracción de grasa abdominal a las 29, 35 y 47 semanas en comparación con las gallinas R y la inclusión de 25-OH-D3 no tuvo efectos sobre el peso corporal en ninguna de las gallinas R- o Ad, pero disminuyeron significativamente el BW y peso y la fracción de grasa abdominal a las 35 y 47 semanas ($P < 0.05$; Figura 3, panel B; Figura 4, panel A y B, parte derecha) (interacción de Ad $\times$ 25-OH-D3, $P < 0.003$). En las gallinas SD, los grupos Ad tuvieron un mayor promedio de BW y peso y fracción de grasa abdominal en comparación con los grupos R, y la suplementación con 25-OH-D3 no tuvo efecto en las gallinas R, pero aumentó el BW y disminuyó el peso y fracción de grasa abdominal en gallinas Ad ($P < 0.05$, Figura 3 panel B; Figura 4 panel A y B, parte media) (interacción de Ad $\times$ 25-OH-D3, $P < 0.016$).

Como puede apreciarse en dicho documento, la ingesta de alimento a voluntad aumentó la incidencia de SD de gallinas reproductoras en asociación con patogénesis cardíaca en un ensayo de alimentación de 10 semanas (Chen et al., 2017a, b). La provisión de alimentación a voluntad indujo un crecimiento hipertrófico cardíaco en asociación con inflamación tisular, lipotoxicidad, apoptosis celular, fibrosis intersticial y patologías periféricas que incluyen hipertensión, afecciones diabéticas, dislipidemia, que conducen a una patogénesis manifiesta, patrones ECG irregulares y contractilidad comprometida (Chen et al., 2006; Pan et al., 2012; Chen et al., 2017a, b). Los resultados actuales son consistentes con estos hallazgos anteriores y mostraron además

que la inclusión de 25-OH-D3 adicional en la dieta basal rescató efectivamente la viabilidad en gallinas Ad y gallinas R durante todo el ciclo de producción. La elevación persistente observada en la frecuencia respiratoria en combinación con una disminución de la frecuencia cardíaca en gallinas SD indica que la función cardíaca comprometida provocó la muerte. Estudios anteriores mostraron que la vitamina D tenía efectos beneficiosos sobre la salud del corazón, como la hipertrofia desadaptativa y la disfunción contráctil (Chen et al., 2011; Glenn et al., 2016; Lee et al., 2015) y sobre las señales patológicas sistémicas, incluida la hipoxia, hipertensión, obesidad y morbilidades relacionadas (Li et al., 2002; Cozzolino et al., 2010; Pilzet et al., 2010).

Por lo tanto, se propone 25-OH-D3 para mejorar la viabilidad de las gallinas reproductoras de pollos de engorde a través de sus acciones en el sistema cardiovascular y las señales fisiológicas sistémicas. Se están realizando más estudios sobre los mecanismos de los efectos beneficiosos del 25-OH-D₃ sobre la viabilidad. Sin embargo, estos resultados sugieren que, en última instancia, las gallinas reproductoras de pollos de engorde que sucumben a SD aumentan sus tasas de corazón y respiración para mejorar su suministro de oxígeno. Sin embargo, como la progresión de los trastornos cardiovasculares, la función cardíaca se compromete y finalmente conduce a insuficiencia cardíaca y SD.

La susceptibilidad de los pollos de engorde modernos a la muerte súbita se ha atribuido a una mayor incidencia de ascitis en asociación con cardiomiopatía (Wideman et al., 2013). A diferencia de los pollos con ingesta de alimentación R (reducción del 20%) o contrapartes sanas bajo la ingesta Ad, los pollos de engorde que desarrollaron ascitis se caracterizaron por hipoxia e insuficiencia cardíaca, como lo demuestra una frecuencia respiratoria más alta pero latidos cardíacos más bajos, relación de ATP cardíaco/ADP y ATP/CrP (fosfato de creatina) (Olkowski et al., 2007; Nain et al., 2008). El presente estudio mostró que las gallinas reproductoras de pollos de engorde con mejor eficiencia alimenticia, como lo indica un mayor aumento de peso temprano que las contrapartes sobrevivientes, tenían más probabilidades de sucumbir a SD que sus contrapartes menos eficientes. Esta asociación incluso se encontró entre las gallinas en los grupos de alimentación restringida. Parece que, a pesar de invocar inicialmente cambios compensatorios para aumentar el flujo sanguíneo

y el suministro de oxígeno a los tejidos, las gallinas que experimentan SD finalmente progresan patológica e irreversiblemente, lo que lleva a un compromiso de la función cardíaca y la muerte. La provisión de alimentación Ad exacerba en gran medida la progresión patogénica cardíaca al provocar señales patológicas sistémicas y trastornos metabólicos y la suplementación con 25-OH-D3 limita la progresión patogénica al mejorar la obesidad y los trastornos relacionados. Antes de la muerte, el compromiso cardíaco parece producir morbilidad que conduce a la anorexia y, por lo tanto, a la pérdida de BW; aunque el monitoreo conductual de la deambulación fortalecería la afirmación y permitiría distinguirla del letargo inducido por hipoxia.

Al igual que las gallinas Ad SD, las gallinas SD de los grupos R murieron con un BW más alto (con una relación de BW decreciente igual a 1 alrededor de 34 a 38 semanas en los grupos Ad y 52 a 53 semanas en las gallinas R) a pesar de la función cardíaca comprometida a pesar de una tasa de mortalidad mucho menor. Por lo tanto, vale la pena examinar la interrelación entre la ganancia de BW y la patogénesis cardíaca dentro de la etapa de cría mientras está bajo la ingesta de alimento R, así como el rendimiento de crecimiento de la progenie producida por las gallinas R antes del ataque por SD. Además, puede ser necesaria una reevaluación y optimización de la asignación creciente de alimento para maximizar el rendimiento del huevo durante el inicio de la puesta hasta el pico para evitar la ganancia rápida de peso corporal y la progresión patogénica cardíaca, y así prevenir la SD prematura. En contraste con la curva de crecimiento estándar recomendada, una leve diferencia de ganancia de BW (20% mayor o menor) por diferentes asignaciones de alimento durante la cría hasta la etapa de puesta temprana no tuvo efectos sobre la mortalidad de las gallinas reproductoras de pollos de engorde antes de la edad de 45 semanas (Ekmy et al. al., 2012).

Curiosamente, la inclusión adicional de 25-OH-D3 no alteró los niveles plasmáticos de 25-OH-D3 tanto en la gallina R como en la gallina A. Sin embargo, el efecto del 25-OH-D3 como agente antiobesidad (Kienreich et al., 2013) fue pronunciado en las gallinas bajo el consumo de alimento Ad. La circulación 1, 25-OH-D3 está altamente regulada para mantener un nivel constante, sin embargo, las concentraciones de su precursor, 25-OH-D3,

fluctúan de 10 a 100 ng/ml, aproximadamente, 100 veces más que 1,25- OH-D₃ (Fullmer, 1990; Pilz et al., 2010). La producción de 25-OH-D₃ a partir del hígado y las acciones in situ, a saber, la conversión de 25-OH-D₃ en 1,25OH-D₃ bioactivo por CYP27B1 y la activación de VDR en los tejidos diana explican la mayoría de los efectos de la vitamina D (Pilz et al., 2010). Por lo tanto, los efectos in situ de 25-OH-D₃ per se necesitan ser evaluados para posibles acciones que apoyen la mejora de la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde como se demostró aquí. A pesar de los efectos beneficiosos, se ha demostrado que la vitamina D₃ en exceso ejerce un efecto hipertensivo nocivo (Bas et al., 2006). El exceso de 25-OH-D₃, 80,000 UI/kg de alimento (2,000 µg/kg de alimento), tuvo efectos negativos y condujo a una mayor incidencia de arritmia y SD en pollos de engorde en crecimiento (Nain et al., 2007). Según los resultados actuales, la formulación regular con una dieta de 2500 UI de vitamina D/kg en forma de colecalciferol es aparentemente insuficiente para mantener la salud de las gallinas reproductoras de pollos de engorde durante la etapa de puesta. El suplemento alimenticio de 69 µg de 25-OH-D₃/kg proporcionaría 414 UI adicionales de 25-OH-D₃ por día sobre el colecalciferol de 375 UI (basado en 150 g de ingesta diaria de alimento), por lo tanto, se concluye como una dosis efectiva y segura para aliviar la patología cardíaca y rescatar la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde. El estudio informó por primera vez que la inclusión adicional de 25-OH-D₃ en la dieta basal mejora efectivamente la viabilidad tanto en gallinas Ad como en gallinas R. Las gallinas con una tasa de metabolismo más alta para la ganancia de BW y/o adiposidad por la ingesta de alimento o debido a una mejor eficiencia alimenticia genéticamente desarrollan un compromiso más rápido de la función cardíaca incluso bajo la ingesta de alimento R, y por lo tanto sufren SD temprana a pesar de sufrir una pérdida de BW.

De acuerdo con lo anterior y con lo publicado en los documentos adjuntos, se demuestra **el efecto del 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D₃) sobre el rendimiento reproductivo y la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde**, con lo cual se superas claramente las objeciones emitidas por el examinador.

De esta forma, teniendo en cuenta que los documentos D2 y D3 **no mencionan, describen o sugieren**, en forma individual o en combinación, todas las características técnicas reclamadas en el capítulo reivindicatorio presentado, **dichas reivindicaciones son novedosas, e inventivas sobre el estado del arte**.

En este sentido, y siguiendo el Manual Andino de Patentes, la presente invención tal y como se encuentra definida en las reivindicaciones 1 a 3, tiene diferencias con el estado del arte e implicó un nivel inventivo durante su desarrollo, por lo cual debe ser considerada como novedosa e inventiva según las disposiciones de los artículos 16 y 18 de la Decisión 486.

6. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) La presente solicitud es clara, concisa y está debidamente soportada en la descripción, cumpliendo con los requerimientos del Artículo 30 de la Decisión 486; y
- ii) Las reivindicaciones actuales son patentables sobre D2 y D3, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 18 de la Decisión 486.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486/00.

En consecuencia, solicitamos a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

7. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 3 reivindicaciones.
- Dietary Supplementation of 25-Hydroxycholecalciferol Improves Livability In Broiler Breeder Hens-Ovarian Morphology and Plasma 17- β Estradiol Level.
- Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens.

Señora Directora,



CAROLINA DAZA MONTALVO

C.C. 66.783.790 de Palmira Valle

TP-141563 CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Una combinación que comprende:

- 25-Hidroxi vitamina D en una cantidad de 35-150 µg/kg de pienso,
- ácido ascórbico en una cantidad de 40-400 mg/kg de pienso,
- Vitamina E en una cantidad de 40-400 mg/kg de pienso, y
- Cantaxantina en una cantidad de 1-15 mg/kg de pienso

en donde el pienso mantiene los niveles de beta-estradiol en aves de corral, y prolonga la vida de puesta, mientras se alimenta ad libitum.

2. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además al menos un ingrediente bioactivo seleccionado del grupo que consiste en Vitamina D, Vitamina B2, Vitamina B6, niacina, Ácido Pantoténico, Ácido Fólico, Biotina, Zinc, Cobre, Manganeseo y Selenio.

3. Un pienso o premezcla que comprende una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

[Unpublished; Manuscript Preparation in Progress for Submission]

Dietary Supplementation of 25-Hydroxycholecalciferol Improves Livability In Broiler Breeder Hens-Ovarian Morphology and Plasma 17- β Estradiol Level

Thau Kiong Chung¹ and Shuen Ei Chen²

¹DSM Nutritional Products Asia Pacific, Singapore; ²National Chung Hsing University, Taiwan

A. 45-to-55-week-old broiler breeder hens

At age of 45 wks, birds were continued with recommended restricted feed intake (R) or released for ad libitum feed intake (Ad) for 10 weeks. Birds were allowed the basal diet or with an additional supplement containing vitamin D (HyD) and other antioxidants/inflammatories (Ad+HyD+others). During the 10 weeks, daily feed intake and egg production were recorded and hens died suddenly were necropsied for cause of mortalities within 24 hr. At age of 55 wks, the survival hens (n=6, 6, 8 for R, Ad, and Ad+HyD+others) were sacrificed for plasma 17 β estradiol concentration determination.

Table 1. Effect of dietary inclusion of Vitamin D in combination with antioxidants on mortality, reproductive performance and tibial strength.

	Restricted (R) (n=7)	Ad libitum (Ad) (n=10)	Ad+HyD+others (n=10)	
Mortality (death/total)	1/7	4/10	2/10	
Egg production (egg/day/hen, %)	36.8 $\pm$ 3.8 ^a	17.6 $\pm$ 4.2 ^b	28.5 $\pm$ 3.6 ^a	Pooled SE 6.72
Incidence of degenerated ovary (ovary/total)	2/7	6/10	5/10	
Incidence of ovarian tumor-like morphology (ovary/total)	0/7	3/10	1/10	
plasma 17β-estradiol level (nmole/mL)	0.78 $\pm$ 0.05 ^a	0.34 $\pm$ 0.03 ^c	0.61 $\pm$ 0.04 ^b	Pooled SE 0.07

Results were expressed with mean $\pm$ SEM.

Means with different superscript letters within the treatment period of the same row are significantly different ($P < 0.05$).



Effect of dietary supplementation of HyD mixture on ovarian morphology of broiler breeder hens with restricted or ad libitum feed intake.

B. 26-to-60-week-old broiler breeder hens

The following results are part of the series of papers listed below:

Lin, H. Y., **T. K. Chung**, Y. H. Chen, R. L. Walzem and S. E. Chen. 2019. Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens. Poultry Sci. 98:6108-6116.

Lin, H. Y., P. C. Chou, Y. H. Chen, L. S. Lai, **T. K. Chung**, R. L. Walzem, S. Y. Huang and S. E. Chen. 2019. Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens-amelioration of cardiac pathogenesis and hepatopathology. Animals 9, 770; doi:10.3390/ani9100770

At age 26 wk, 138 birds were continued with restricted rations (R-hens) as recommendation by the breeder company, while another 159 birds were provided with sufficient feed for consumption to appetite (Ad-hens). The feeding trial was lasted for when birds reached 60 wks of age (duration 35 wks). Within each feed intake treatment, half of hens were provided with a basal breeder diet containing additional vitamin D (HyD) and other antioxidants/inflammatories (DSM Nutritional Products Ltd., Netherlands). Final numbers of hens in each group were 68 and 70 in R and R+ HyD+others group and 80 and 79 in Ad and Ad+ HyD+others group. The higher number of hens in the Ad-groups anticipated a greater mortality rate. During the 35 weeks, daily feed intake

and egg production were recorded and hens died suddenly were necropsied for cause of mortalities within 24 hr. At age of 35 and 50 wks, 6 birds from each group were sampled for tissue collection for analyses.

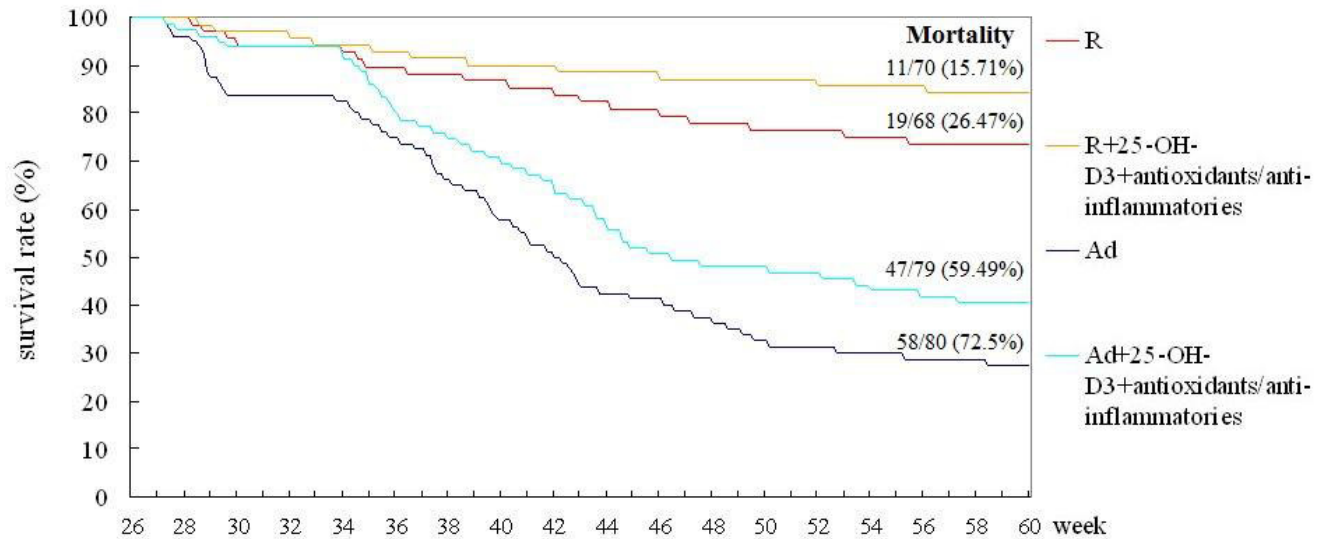


Figure 1. Effect of dietary supplementation of HyD mixture on the survival rate of broiler hens with restricted or ad libitum feed intake

Table 1. Effect of dietary supplementation of HyD mixture on egg production of broiler hens with restricted or ad libitum feed intake

	Restriction		Restriction +HyD mixture		Ad libitum		Ad libitum + HyD mixture	
	Whole flock (n=68)	Dead bird flock (19)	Whole flock (n=70)	Dead bird flock (n=11)	Whole flock (n=80)	Dead bird flock (n=58)	Whole flock (n=79)	Dead bird flock (n=47)
Egg production rate (eggs/day/hen, %)	51.4±2.5 ^a	47.2±1.9 ^a	51.3±2.7 ^a	40.2±1.8 ^b	32.0±2.9 ^b	43.4±1.7 ^{ab}	34.8±2.7 ^b	45.8±2.1 ^{ab}
Egg yield (eggs/hen)	129.0±5.5 ^b	47.9±2.5 ^b	143.2±5.7 ^a	33.3±1.9 ^b	41.1±5.3 ^d	41.5±2.1 ^b	54.7±5.9 ^c	41.1±2.0 ^b

Results were expressed with mean ± SEM.

Means with different superscript letters are significantly different within the same flock ($P < 0.05$).

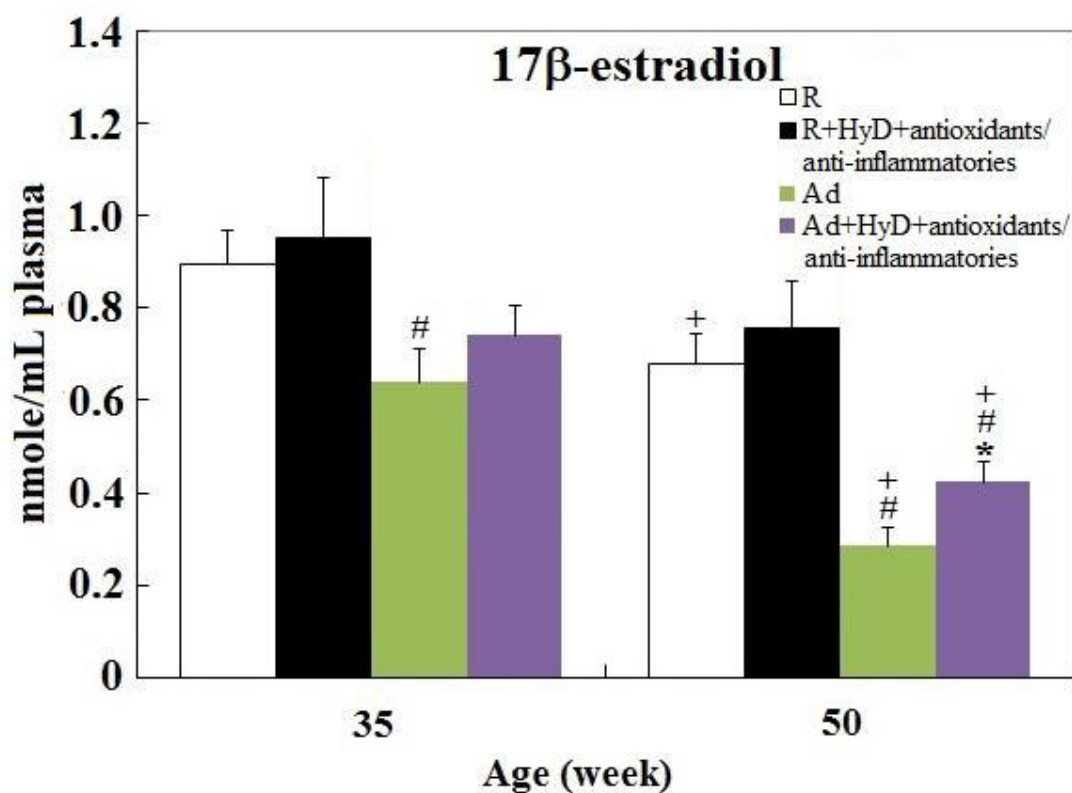


Fig. 2. Effect of dietary supplementation of HyD mixture on plasma 17β-estradiol levels of broiler breeder hens with restricted or ad libitum feed intake. At age of 35 and 50 wks, 6 birds from each group were sampled for tissue collection for analyses.

*; significant effects by HyD+antioxidants/anti-inflammatories

#; significant effects by Ad-feed intake

+; significant effects by age (50 wks)

Table 3. Effect of dietary supplementation of HyD mixture on ovarian morphology of broiler hens with restricted or ad libitum feed intake

Hens sampled at age of 35 and 50 wks	Restriction (n=6)	Restriction +HyD mixture (n=6)	Ad libitum (n=6)	Ad libitum + HyD mixture (n=6)
Degeneration				
at 35 wks	0/6	1/6	2/6	2/6
at 50 wks	2/6	0/6	5/6	3/6
Tumor-like morphologies				
at 35 wks	0/6	0/6	0/6	0/6
at 50 wks	1/6	0/6	3/6	1/6
Hens died suddenly along the trial	Restriction (n=19)	Restriction +HyD mixture (n=11)	Ad libitum (n=58)	Ad libitum + HyD mixture (n=47)
Degeneration	7/19	5/11	37/58	25/47
Tumor-like morphologies	1/19	1/11	8/58	5/47

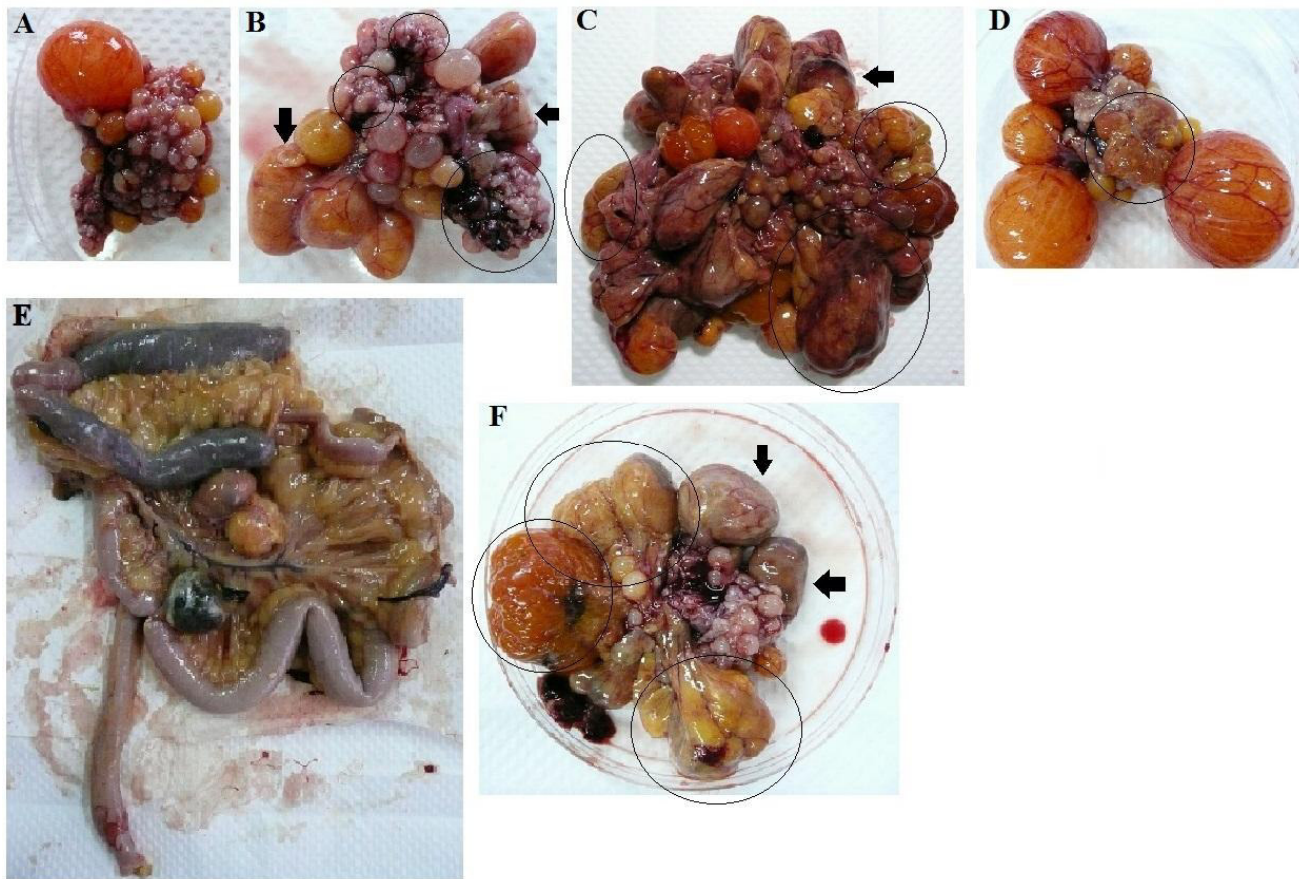


Fig. 3. Effect of dietary supplementation of HyD mixture on ovarian morphology of broiler breeder hens with restricted or ad libitum feed intake. A; a degenerated ovary. B, C and F; complications of ovary degeneration and presence of tumor-like follicles (circle), arrows indicating atretic hierarchical follicles. D; a ovary with tumor-like follicles (circle), E; metastatic ovarian tumors into the mesentery. Ovarian tumors were characterized by the multilobulated nodules on the surface of follicles (panel C, D, F, circle). Nodules coalesce giving a cauliflower-like appearance in small follicles was also observed in degenerated ovaries (panel B, circle).

Lin, H. Y., T. K. Chung, Y. H. Chen, R. L. Walzem and S. E. Chen. 2019. Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens. *Poultry Sci.* 98:6108-6116.

Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens

Hsuan-Yu Lin,^{*} Thau Kiong Chung,[†] Yu-Hui Chen,^{*} Rosemary L. Walzem,[‡] and Shuen-Ei Chen^{*,§,¶,||,1}

^{*}Department of Animal Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; [†]DSM Nutritional Products Asia Pacific, Singapore; [‡]Department of Poultry Science, Texas A&M University, College Station, TX, USA; [§]Innovation and Development Center of Sustainable Agriculture (IDCSA), National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; [¶]The iEGG and Animal Biotechnology Center, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; and ^{||}Research Center for Sustainable Energy and Nanotechnology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan

ABSTRACT The study aimed to examine the effects of 25-hydroxycholecalciferol (25-OH-D3) on reproductive performance and livability in broiler breeder hens. Hens at age of 26 wk were continued on restricted rations (R) or allowed ad libitum feeding (Ad) to 60 wk of age. Ad-feed intake greatly impaired egg production and hens' livability. The survival rate in both R- and Ad-hens was improved (86.7 vs. 78.9% and 48.2 vs. 29.1%, respectively) as was egg production in R-hens ($P < 0.05$) by inclusion of 69 μg 25-OH-D3/kg feed in the basal diet. Sudden death (SD) was the cause of hen mortality; hens died earlier with heavier BW and greater absolute and relative abdominal fat weights than surviving hens. Interestingly, feed intake of SD hens became less than that of surviving hens after 37 and 42 wk in Ad- and R-groups, respectively, and led to a progressive decline in SD hen BW with a ratio (relative to surviving hens of the same age) equaled 1 around 34 to 38 wk in Ad-groups and 52

to 53 wk in R-groups. Supplementation of 25-OH-D3 ameliorated untoward changes of heart and respiratory rate of Ad-survivors after 29 wk ($P < 0.05$), but had no significant effects on SD AD-hens. In contrast to the surviving counterparts, all SD hens experienced persistently higher respiratory rates in conjunction with declining heart rates ($P < 0.05$), suggesting compromised cardiac function as the cause of SD, in which hens increased heart and respiratory rate for more blood and oxygen supply to meet the need for rapid BW gain and/or adiposity in response to Ad-feed intake or due to genetically better feed efficiency even under R-feed intake. As the cardiorespiratory derangements advanced, compromised cardiac function ultimately led to heart failure and sudden death despite spontaneous reductions in feed intake and BW loss in all SD hens. Provision of 69 μg 25-OH-D3/kg feed is an effective and practical method to improve livability in broiler breeder hens.

Key words: broiler breeder hens, 25-hydroxycholecalciferol, sudden death, heart failure, obesity

2019 Poultry Science 98:6108–6116
<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez330>

Lin, H. Y., P. C. Chou, Y. H. Chen, L. S. Lai, **T. K. Chung**, R. L. Walzem, S. Y. Huang and S. E. Chen. 2019. Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens-amelioration of cardiac pathogenesis and hepatopathology. *Animals* 9, 770; doi:10.3390/ani9100770



animals



Article

Dietary Supplementation of 25-Hydroxycholecalciferol Improves Livability in Broiler Breeder Hens-Amelioration of Cardiac Pathogenesis and Hepatopathology

Hsuan-Yu Lin ¹, Pao-Chia Chou ² , Yu-Hui Chen ¹, Lih-Shiuh Lai ² , Thau Kiong Chung ³, Rosemary L. Walzem ⁴ , San-Yuan Huang ^{1,5,6,*} and Shuen-Ei Chen ^{1,5,6,7,*} 

¹ Department of Animal Science, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan; believeandtry@hotmail.com (H.-Y.L.); cute5409@yahoo.com.tw (Y.-H.C.)

² Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan; paochia88@yahoo.com.tw (P.-C.C.); ls Lai@dragon.nchu.edu.tw (L.-S.L.)

³ DSM Nutritional Products Asia Pacific, Singapore 117440, Singapore; thau-kiong.chung@dsm.com

⁴ Department of Poultry Science, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA; rwalzem@tamu.edu

⁵ The iEGG and Animal Biotechnology Center, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan

⁶ Research Center for Sustainable Energy and Nanotechnology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan

⁷ Innovation and Development Center of Sustainable Agriculture (IDCSA), National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan

* Correspondence: syhuang@dragon.nchu.edu.tw (S.-Y.H.); shueneic@dragon.nchu.edu.tw (S.-E.C.)

Received: 27 August 2019; Accepted: 2 October 2019; Published: 8 October 2019



Animals **2019**, *9*, 770; doi:10.3390/ani9100770

www.mdpi.com/journal/animals

[No publicado; Preparación del manuscrito en curso para su presentación]

La suplementación dietética de 25-hidroxicolecalciferol mejora la viabilidad en morfología ovárica de gallinas reproductoras de pollos de engorde y nivel de 17-β estradiol en plasma

5 Thau Kiong Chung¹ y Shuen Ei Chen²

¹DSM Nutritional Products Asia Pacific, Singapur; ²National Chung Hsing University, Taiwán

A. Gallinas reproductoras de pollos de engorde de 45 a 55 semanas de edad

10 A las 45 semanas de edad, las aves continuaron con la ingesta de alimento restringida recomendada (R) o se liberaron para ingesta de alimento ad libitum (Ad) durante 10 semanas. A las aves se les permitió dieta basal o con un suplemento adicional que contenía vitamina D (HyD) y otros antioxidantes/inflamatorios (Ad+HyD+otros). Durante las 10 semanas, se registraron la ingesta diaria de alimento y la producción de huevos y las gallinas que murieron súbitamente se sometieron a necropsia por causa de la mortalidad dentro de las 24 horas. A la edad de 55 semanas, las gallinas que sobrevivieron (n = 6, 6, 8 para R, Ad y Ad+HyD+otros) se sacrificaron para determinación de la concentración de 17β estradiol en plasma.

Tabla 1. Efecto de la inclusión dietética de vitamina D en combinación con antioxidantes sobre la mortalidad, rendimiento reproductivo y fuerza tibial.

	Restringido (R) (n = 7)	Ad libitum (Ad) (n = 10)	Ad+HyD+otros (n = 10)	
Mortalidad (muerte/total)	1/7	4/10	2/10	
Producción de huevos (huevo/día/gallina, %)	36.8±3.8 ^a	17.6±4.2 ^b	28.5±3.6 ^a	DE agrupada 6.72
Incidencia ovárica degenerada (ovario/total)	2/7	6/10	5/10	
Incidencia de morfología de tipo tumor ovárico (ovario/total)	0/7	3/10	1/10	
Nivel de 17β-estradiol en plasma (nmol/mL)	0.78±0.05 ^a	0.34±0.03 ^c	0.61±0.04 ^b	DE agrupada 0.07

20 Los resultados se expresaron con media ± DEM.

Las medias con letras superíndice diferentes dentro del período de tratamiento de la misma fila son significativamente diferentes ($P < 0.05$).



Efecto de la suplementación dietética de la mezcla HyD sobre la morfología ovárica de gallinas reproductoras de pollos de engorde con ingesta de alimento restringida o ad libitum.

B. Gallinas reproductoras de pollos de engorde de 26 a 60 semanas de edad

Los siguientes resultados hacen parte de la serie de documentos enumerados a continuación:

- 10 Lin, H. Y., **T.K. Chung**, Y. H. Chen, R. L. Walzem and S. E. Chen Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens. Poultry Sci. 98:6108-6116.

- 15 Lin, H. Y., P. C. Chou, Y. H. Chen, L. S. Lai, **T.K. Chung**, R. L. Walzem, S. Y. Huang and S. E. Chen. 2019. Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens-amelioration of cardiac pathogenesis and hepatopathology. Animals 9, 770; doi:10.3390/ani9100770

- 20 138 aves de 26 semanas de edad, continuaron con raciones restringidas (gallinas R) como recomendación de la compañía de reproductores, mientras que a las otras 159 aves se les proporcionó alimento suficiente para el consumo hasta satisfacer el apetito (gallinas). La prueba de alimento duró hasta cuando las aves alcanzaron las 60 semanas de edad (duración 35 semanas). Dentro de cada tratamiento de ingesta de alimento, a la mitad de las gallinas se les proporcionó una dieta reproductora basal que contenía vitamina D (HyD) adicional y otros antioxidantes/inflamatorios (DSM Nutritional Products Ltd., Países Bajos). La cantidad final de gallinas en cada grupo fue 68 y 70 en el grupo R y R+HyD+otros y 80 y 79 en el grupo Ad y Ad+HyD+otros. El mayor número de gallinas en los grupos AD anticiparon una mayor tasa de mortalidad. Durante las 35 semanas, se registraron la ingesta diaria de alimento y la producción de huevos y las gallinas que murieron súbitamente se sometieron a necropsis por causa de mortalidad dentro de las 24 horas. A la edad de 35 y 50 semanas, se tomaron muestras de 6 aves de cada grupo para la recolección de tejido para análisis.
- 30

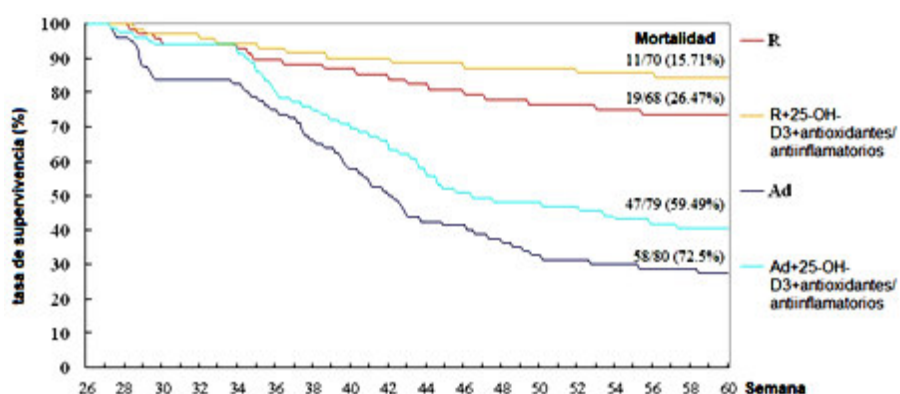


Figura 1. Efecto de la suplementación dietética de la mezcla HyD sobre la tasa de supervivencia de las gallinas de pollos de engorde con ingesta de alimento restringida o ad libitum

5 Tabla 1. Efecto de la suplementación dietética de la mezcla HyD sobre la producción de huevos de gallinas de pollos de engorde con ingesta de alimento restringida o ad libitum

	Restricción		Restricción+HyD mezcla		Ad libitum		Ad libitum + HyD mezcla	
	Parvada completa (n = 68)	Parvada de aves muertas (19)	Parvada completa (n = 70)	Parvada de aves muertas (n = 11)	Parvada completa (n = 80)	Parvada de aves muertas (n = 58)	Parvada completa (n = 79)	Parvada de aves muertas (n = 47)
Tasa de producción de huevos (huevos/día/gallina, %)	51.4±2.5 ^a	47.2±1.9 ^a	51.3±2.7 ^a	40.2±1.8 ^b	32.0±2.9 ^b	43.4±1.7 ^{ab}	34.8±2.7 ^b	45.8±2.1 ^{ab}
Rendimiento del huevo (huevos/gallina)	129.0±5.5 ^b	47.9±2.5 ^b	143.2±5.7 ^a	33.3±1.9 ^b	41.1±5.3 ^d	41.5±2.1 ^b	54.7±5.9 ^c	41.1±2.0 ^b

Los resultados se expresaron con media ± DEM.

10 Las medias con letras superíndice diferentes son significativamente diferentes dentro de la misma parvada (P < 0.05).

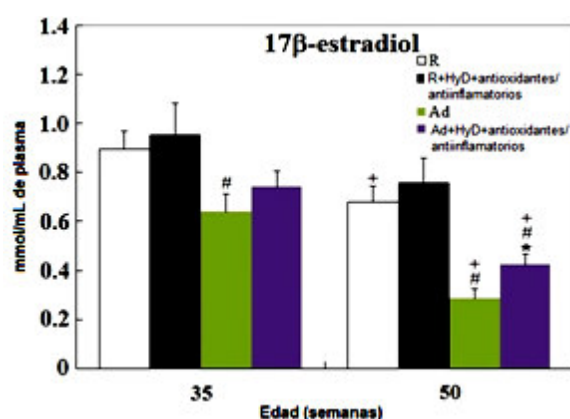


Figura 2. Efecto de la suplementación dietética de la mezcla HyD sobre los niveles de 17β-estradiol en plasma de gallinas reproductoras de pollos de engorde con ingesta de alimento restringida o ad libitum. A la edad de 35 y 50 semanas, se tomaron muestras de 6 aves de cada grupo para la recolección de tejido para análisis.

*; efectos significativos por HyD+antioxidantes/antiinflamatorios

#; efectos significativos por ingesta de alimento Ad

+; efectos significativos por edad (50 semanas)

Tabla 3. Efecto de la suplementación dietética de la mezcla HyD en la morfología ovárica de gallinas de pollos de engorde con ingesta de alimento restringida o ad libitum

Gallinas muestreadas a la edad de 35 y 50 semanas	Restricción (n = 6)	Restricción + mezcla HyD (n = 6)	Ad libitum (n = 6)	Ad libitum + mezcla HyD (n = 6)
Degeneración				
a las 35 semanas	0/6	1/6	2/6	2/6
a las 50 semanas	2/6	0/6	5/6	3/6
Morfologías de tipo tumoral				
a las 35 semanas	0/6	0/6	0/6	0/6
a las 50 semanas	1/6	0/6	3/6	1/6
Gallinas muertas súbitamente durante la prueba	Restricción (n = 19)	Restricción+m ezcla HyD (n = 11)	Ad libitum (n = 58)	Ad libitum + mezcla HyD (n = 47)
Degeneración	7/19	5/11	37/58	25/47

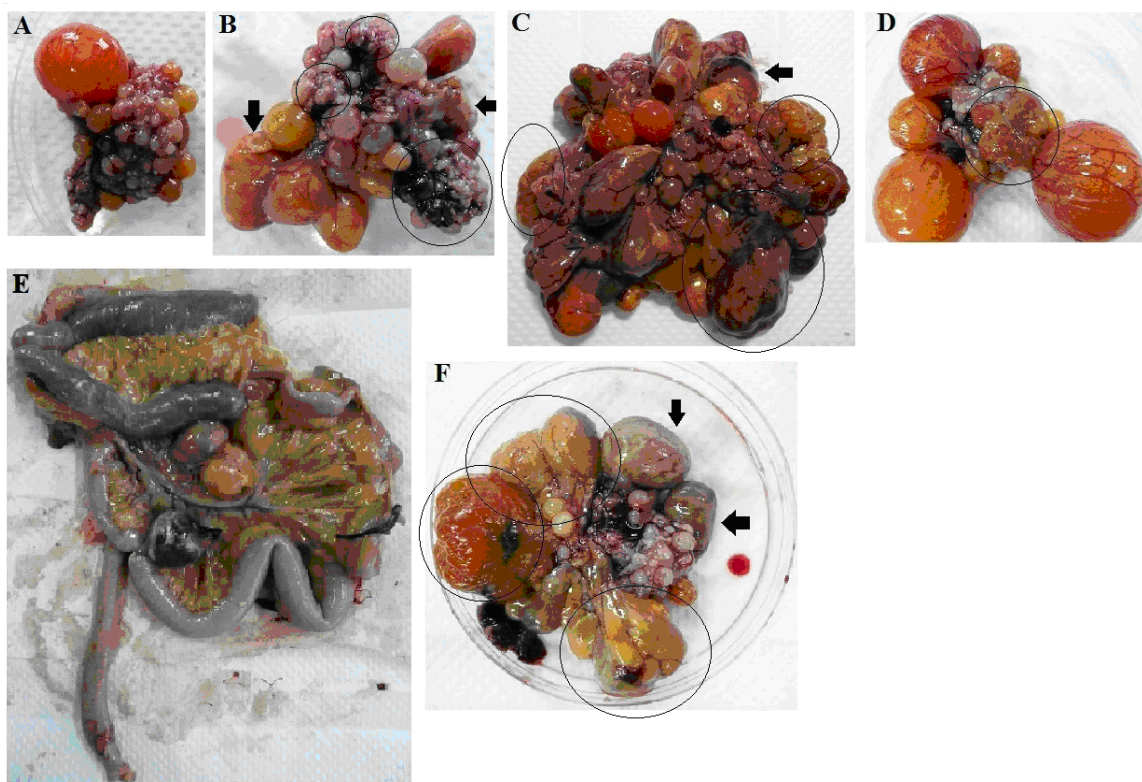


Figura 3. Efecto de la suplementación dietética de la mezcla HyD sobre la morfología ovárica de gallinas reproductoras de pollos de engorde con ingesta de alimento restringida o ad libitum. A; un ovario degenerado. B, C y F; complicaciones de degeneración ovárica y presencia de folículos de tipo tumoral (círculo), las flechas indican folículos jerárquicos atrésicos. D; un ovario con folículos de tipo tumoral (círculo), E; tumores ováricos metastásicos en el mesenterio. Los tumores ováricos se caracterizaron por ganglios multilobulados sobre la superficie de los folículos (panel C, D, F, círculo). Los ganglios se fusionan dando una apariencia de tipo coliflor en los folículos pequeños también se observó en ovarios degenerados (panel B, círculo).

Lin, H. Y., T.K. Chung, Y. H. Chen, R. L. Walzem and S. E. Chen Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens. Poultry Sci. 98:6108-6116.

La suplementación dietética de 25-hidroxicolecalciferol mejora la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde

Hsuan-Yu Lin,^{*} Thau Kiong Chung,[†] Yu-Hui Chen,^{*} Rosemary L. Walzem,[‡] y Shuen-Ei Chen^{*,§,||,1}

^{*} Departamento de Ciencia Animal, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwán; [†] DSM Nutricional Products Asia Pacific, Singapur; [‡] Departamento de Ciencia Avícola, Texas A&M University, College Station, TX, EE.UU.; [§] Centro de Innovación y Desarrollo de Agricultura Sostenible (IDCSA), National Chung Hsing Universidad, Taichung, Taiwán; [#] El iEGG y el Centro de Biotecnología Animal, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; y ^{||} Centro de Investigación de Energía Sostenible y Nanotecnología, National Chung Hsing Universidad, Taichung, Taiwán

RESUMEN El estudio tuvo como objetivo examinar los efectos del 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D3) sobre el rendimiento reproductivo y la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde. Las gallinas a la edad de 26 semanas continuaron con raciones restringidas (R) o se les permitió alimento ad libitum (Ad) hasta las 60 semanas de edad. La ingesta de alimento AD perjudicó enormemente la producción de huevos y la viabilidad de las gallinas. Se mejoró la tasa de supervivencia en gallinas R y Ad (86.7 vs. 78.9% y 48.2 vs. 29.1%, respectivamente) al igual que la producción de huevos en gallinas R ($P < 0.05$) mediante la inclusión de 69 µg de 25-OH-D3/kg alimentándose de la dieta basal. La muerte súbita (SD) fue la causa de la mortalidad de gallinas; las gallinas murieron antes con un BW (peso corporal) más pesado y mayores pesos absolutos y relativos de grasa abdominal que las gallinas sobrevivientes. Curiosamente, la ingesta de alimento de las gallinas SD se volvió menor que el de las gallinas sobrevivientes después de 37 y 42 semanas en los grupos Ad y R, respectivamente, y condujo a una disminución progresiva del BW de la gallina SD con una relación (en relación con las gallinas sobrevivientes de la misma edad) equivalía a 1 alrededor de 34 a 38 semanas en los grupos Ad y 52 a 53 semanas en los grupos R. La suplementación de 25-OH-D3 mejoró los cambios adversos de la frecuencia cardíaca y respiratoria de las sobrevivientes de Ad después de 29 semanas ($P < 0.05$), pero no tuvo efectos significativos sobre las gallinas SD AD. En contraste con las contrapartes sobrevivientes, todas las gallinas SD experimentaron frecuencias respiratorias persistentemente más altas junto con la disminución de las frecuencias cardíacas ($P < 0.05$), lo que sugiere una función cardíaca comprometida como la causa de la SD, en la cual las gallinas aumentaron la frecuencia cardíaca y respiratoria para más suministro de sangre y oxígeno para satisfacer la necesidad de ganancia de BW y/o adiposidad rápida en respuesta a la ingesta de alimento Ad o debido a una mejor eficiencia de alimento genéticamente incluso bajo la ingesta de alimento R. A medida que avanzaban los trastornos cardiorrespiratorios, la función cardíaca comprometida finalmente condujo a insuficiencia cardíaca y muerte súbita a pesar de las reducciones espontáneas en la ingesta de alimento y la pérdida de BW en todas las gallinas SD. La provisión de 69 µg de 25-OH-D3/kg de alimento es un método efectivo y práctico para mejorar la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde.

Palabras clave: gallinas reproductoras de pollos de engorde, 25-hidroxicolecalciferol, muerte súbita, insuficiencia cardíaca, obesidad

<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez330>

Lin, H. Y., P. C. Chou, Y. H. Chen, L. S. Lai, **T.K. Chung**, R. L. Walzem, S. Y. Huang and S. E. Chen. 2019. Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens-amelioration of cardiac pathogenesis and hepatopathology. *Animals* 9, 770; doi:10.3390/ani9100770



animals



5

Artículo

La Suplementación Dietética de 25-Hidroxicolecalciferol Mejora la Viabilidad en Gallinas Reproductoras de Pollos de Engorde-Mejora de la Patogénesis Cardíaca y Hepatopatología

10 Hsuan-Yu Lin¹, Pao-Chia Chou² , Yu-Hui Chen¹, Lih-Shiuh Lai² , Thau Kiong Chung³, Rosemary L. Walzem⁴ , San-Yuan Huang^{1,5,6,*} y Shuen-Ei Chen^{1,5,6,7,*} 

¹ Departamento de Ciencia Animal, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwán; believeandtry@hotmail.com (H.-Y.L.); cute5409@yahoo.com.tw (Y.-H.C.)

15 ² Departamento de Ciencia y Biotecnología de Alimentos, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwán; paochia88@yahoo.com.tw (P.-C.C.); Islai@dragon.nchu.edu.tw (L.-S.L.)

³ DSM Nutritional Products Asia Pacific, Singapur 117440, Singapur; thau-kiong.chung@dsm.com

20 ⁴ Departamento de Ciencia Avícola, Texas A&M University, College Station, TX 77843, EE.UU.; rwalzem@tamu.edu

⁵ El iEGG y el Centro de Biotecnología Animal, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwán

⁶ Centro de Investigación de Energía Sostenible y Nanotecnología, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwán

25 ⁷ Centro de Innovación y Desarrollo de Agricultura Sostenible (IDCSA), National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwán

* Correspondencia: syhaun@dragon.nchu.edu.tw (S.-Y.H.); shueneic@dragon.nchu.edu.tw (S.-E.C.)

30 Recibido: 27 de agosto de 2019; Aceptado: 2 de octubre de 2019; Publicado: 8 de octubre de 2019

Animals **2019**, 9(10), 770; <https://doi.org/10.3390/ani9100770>

www.mdpi.com/journal/animals

Dietary supplementation of 25-hydroxycholecalciferol improves livability in broiler breeder hens

Hsuan-Yu Lin,^{*} Thau Kiong Chung,[†] Yu-Hui Chen,^{*} Rosemary L. Walzem,[‡] and Shuen-Ei Chen^{*,§,#,||,1}

^{*}Department of Animal Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; [†]DSM Nutritional Products Asia Pacific, Singapore; [‡]Department of Poultry Science, Texas A&M University, College Station, TX, USA; [§]Innovation and Development Center of Sustainable Agriculture (IDCSA), National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; [#]The iEGG and Animal Biotechnology Center, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; and ^{||}Research Center for Sustainable Energy and Nanotechnology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan

ABSTRACT The study aimed to examine the effects of 25-hydroxycholecalciferol (25-OH-D3) on reproductive performance and livability in broiler breeder hens. Hens at age of 26 wk were continued on restricted rations (R) or allowed ad libitum feeding (Ad) to 60 wk of age. Ad-feed intake greatly impaired egg production and hens' livability. The survival rate in both R- and Ad-hens was improved (86.7 vs. 78.9% and 48.2 vs. 29.1%, respectively) as was egg production in R-hens ($P < 0.05$) by inclusion of 69 μg 25-OH-D3/kg feed in the basal diet. Sudden death (SD) was the cause of hen mortality; hens died earlier with heavier BW and greater absolute and relative abdominal fat weights than surviving hens. Interestingly, feed intake of SD hens became less than that of surviving hens after 37 and 42 wk in Ad- and R-groups, respectively, and led to a progressive decline in SD hen BW with a ratio (relative to surviving hens of the same age) equaled 1 around 34 to 38 wk in Ad-groups and 52

to 53 wk in R-groups. Supplementation of 25-OH-D3 ameliorated untoward changes of heart and respiratory rate of Ad-survivors after 29 wk ($P < 0.05$), but had no significant effects on SD AD-hens. In contrast to the surviving counterparts, all SD hens experienced persistently higher respiratory rates in conjunction with declining heart rates ($P < 0.05$), suggesting compromised cardiac function as the cause of SD, in which hens increased heart and respiratory rate for more blood and oxygen supply to meet the need for rapid BW gain and/or adiposity in response to Ad-feed intake or due to genetically better feed efficiency even under R-feed intake. As the cardiorespiratory derangements advanced, compromised cardiac function ultimately led to heart failure and sudden death despite spontaneous reductions in feed intake and BW loss in all SD hens. Provision of 69 μg 25-OH-D3/kg feed is an effective and practical method to improve livability in broiler breeder hens.

Key words: broiler breeder hens, 25-hydroxycholecalciferol, sudden death, heart failure, obesity

2019 Poultry Science 98:6108–6116
<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez330>

INTRODUCTION

Intensive genetic selection for early rapid growth has resulted in modern strains of broiler susceptible to sudden death (SD) (Griffin and Goddard, 1994; Julian, 2000; Olkowski et al., 2007; Hocking, 2010). A component of this susceptibility is impaired appetite regulation; with spontaneous intakes in apparent excess of requirements for optimal adult health and performance

(Yu et al., 1992; Chen et al., 2006; Richards and Proszkowiec-Weglarz, 2007). Feed restriction is typically used during the growth phase of broiler breeders to limit metabolic dysfunction and improve reproductive performance and livability (Yu et al., 1992; Griffin and Goddard, 1994; McGovern et al., 1999). To date, however, the etiology of SD in adult broiler breeders despite early feed restriction remains elusive and so limits development of effective interventions to support improved livability and production. While increasingly severe feed restriction can increase livability, this approach is under increasing scrutiny due to the concern of undue hunger for animal welfare.

Vitamin D and its receptor (VDR) are most strongly associated with calcium/phosphorous homeostasis and bone biology. The VDR and 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase (CYP27B1), the enzyme responsible for conversion of 25-OH-D3

© 2019 Poultry Science Association Inc.

Received March 15, 2019.

Accepted May 22, 2019.

¹Corresponding author: shueneic@dragon.nchu.edu.tw

All authors listed have contributed to the work and have agreed to submit the manuscript to Pout Sci. No part of the work has been published before and all animal studies have been approved by the appropriate ethics committees.

Author disclosure: Lin S.Y., Chung T.K., Chen Y.H., Walzem R.L., and Chen S.E.; no conflicts of interest.

(25-hydroxycholecalciferol) to the bioactive 1,25-(OH)₂-D₃ (1, 25-dihydroxycholecalciferol) form are present in a variety of tissues (Pilz et al., 2010; Kienreich et al., 2013). Interestingly, VDR activation by vitamin D plays a critical role in the regulation of cardiovascular system, inflammatory and fibrotic pathways. Studies strongly suggested that vitamin D treatment suppresses obesity and related disorders by repressing adipogenic gene expressions and lipid accumulation (Vanlint, 2013) and improve cardiovascular health (Cozzolino et al., 2010; Pilz et al., 2010).

We recently demonstrated that adult broiler breeder hens provided with ad libitum access to feed were highly susceptible to compromised heart function that resulted in SD (Chen et al., 2017a, b). The present study sought to further delineate the performance and frequency of SD in hens reared to the point of lay according to the recommendations by breeder company for body weight gain and subsequently either continued with recommended feed intake (R-hens) or allowed to consume feed to appetite (Ad-hens) during an entire laying cycle. Moreover, the effects of 25-OH-D₃ supplementation into the basal diet on egg production and livability were evaluated in both R- and Ad-hens.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Strategy

Planned flock samplings and record of sudden death mortalities and tissue parameters were used to assess specific metabolic features and livability impacts, respectively, of excess energy intake and 25-OH-D₃ supplementation.

Animal Management

The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of National Chung Hsing University, Taiwan reviewed and approved all bird husbandry and procedures (IACUC Permit NO. 102-113). Cobb 500 broiler breeder hens at age of 22 wk were purchased from a local breeder farm. Feed intake up to 26 wk of age followed breeder company recommendations to achieve a targeted body weight through weekly adjustment of amounts of a regular soy and corn-based breeder mash (105 to 120 g/day/hen, Supple. Table 1). The composition of the diet was formulated based on the past records of optimal performances from the local breeder farm. All birds were caged individually to facilitate precise daily feed intake measurements and individual egg production data in all groups while providing equivalent ambulatory opportunities in a house under negative pressure by ventilation with water spray cooling system and ambient temperatures were maintained between around 24 to 28°C. Relative humidity varied with weather from 55 to 85%. Birds were provided with free access to water throughout the experiment.

Feed was placed at 08:30 AM in conjunction with a 14L:10D (lights on at 05:00 AM) photoschedule. At age 26 wk, 180 birds were continued with restricted rations (R-hens) as recommendation by the breeder company, while another 220 birds were provided with sufficient feed for consumption to appetite (Ad-hens). Within each feed intake treatment, half of the hens were provided with a basal breeder diet containing additional 69 µg/kg feed of 25-OH-D₃ (DSM Nutritional Products Ltd., Netherlands). Final numbers of hens in each group were 90 in R and R+25-OH-D₃ group and 110 in Ad and Ad+25-OH-D₃ group.

Necropsy and Tissue Collection

Planned tissue collections were conducted at ages 29, 35, and 47 wk, when 4, 7, and 7 hens, respectively, from each group were randomly selected for tissue collection for additional studies. Hens were studied following an overnight fast and necropsied under anesthesia as described previously (Chen et al., 2006). Age of SD mortalities was recorded and necropsy studies were completed within 24 h of death. Heart, liver, and abdominal fat were collected for body composition analysis. Some of SD hens were diagnosed by a veterinarian and infectious causes were excluded. Details of cardiorespiratory pathologies were presented separately (manuscript in review). Briefly, cardiac pathogenesis was assessed by the presence of ascites, pericardial effusion, cardiac ventricular dilation, and hypertrophy as described previously (Chen et al., 2017a, b).

Morbidity and Mortality Indices

Mortality was reported as a survival rate calculated as percentage of birds originally assigned to the treatment group that were alive on any given day. Morbidity was assessed by spontaneous changes in feed intake, bodyweight (BW), and heart and respiratory rate. For spontaneous feed intake, actual amounts of feed consumed by SD and surviving hens within each group were plotted individually to allow for visual examination of graph shape. Bodyweights of SD hens were expressed as a ratio of the average weight of hens surviving to the day of an individual SD hen's death. In these calculations values greater or less than 1.0 indicate that BW of SD hens were greater or lower than those of corresponding surviving hens at the same age.

Plasma 25-OH-D₃ Concentration Determination, Heart, and Respiratory Rate Measurement

Plasma from hens sampled at 29, 35, and 47 wk was used for 25-OH-D₃ concentration determination using a commercial ELISA kit (Item; 9000683, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Ten additional

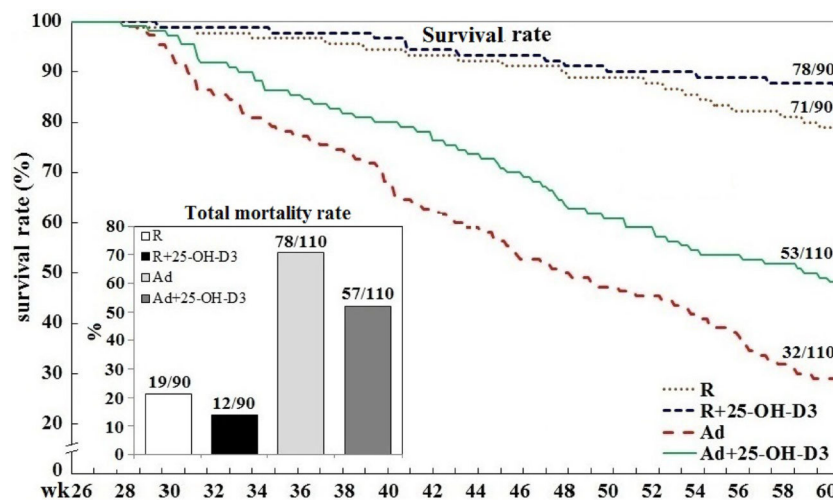


Figure 1. Effect of dietary supplementation of 25-OH-D3 on survival rate of broiler breeder hens provided with restricted or ad libitum feed intake. Results were expressed as a percentage of surviving hens remaining from the number of hens initially allocated to the group. Values above the bars in the embedded panel indicate the total number of hens (numerator) that died by sudden death with the denominator being the initial number of hens in the group. R; restriction, Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hydroxycholecalciferol.

hens from each group were randomly selected when 29 wk old for heart and respiratory rate measurement using a portable monitor (SureSigns VM6, Philips India Limited, Kolkata, India) as described previously (Chen et al., 2017a, b). Hen selections were recorded in order to repeat heart and respiratory rate measurements in those hens surviving to age of 35, 47, or 60 wk.

Statistics

Data were analyzed by 2-way ANOVA, in which feed intake manipulation (Ad or R) and 25-OH-D3 treatment were the classifying variables. Differences between group means were tested using Bonferroni *t* test when the main effect was significant. If an interaction between feed intake and 25-OH-D3 treatment was found, a mean comparison was performed. Values were expressed as means $\pm$ SEM. Mean differences were considered significant at $P < 0.05$. All statistical procedures were carried out using SPSS for Windows 13.0.

RESULTS

Ad-feed intake remarkably lowered hens' livability and supplementation with 25-OH-D3 greatly increased the survival rate in both R- and Ad-group (78.9 vs. 86.7% and 29.1 vs. 48.2%, respectively) (Figure 1). Feed intake of SD hens and surviving counterparts in R-groups diverged after 42 wk and differences were even greater after 52 wk such that SD hens voluntarily limited their feed intake to 110 to 120 g/day/hen at the end rather than the recommended level around 156 g/day/hen (Figure 2, panel A). After release from feed restriction, both the SD hens and survivors of Ad-groups showed an abrupt increase in feed intake that peaked at 210 to 220 g/day/hen within 1 wk

(Figure 2, panel B). Subsequently, feed intake gradually declined below the recommended 160 g/day/hen after 36 wk of age, 10 wk after lifting of the feed restriction. From age 45 to 60 wk feed intake patterns of surviving and SD hens of Ad-groups further diverged. The intake of SD hens declined to 110 to 130 g/day/hen when 45 wk old, after which the feed intake of surviving hens slowly climbed to 160 g/day/hen at 60 wk, whereas intakes of SD-hens declined to 50 g/day/hen. Feed intake started to diverge at 42 wk and further deviated after 50 wk in R-groups with R-hens experiencing SD consuming less feed than the survivors.

Total numbers of eggs laid during the feeding trial was significantly reduced by Ad-feed intake in both surviving and SD hens (Table 1, $P < 0.05$). The reduction in total egg yield due to Ad-feed intake was more pronounced in hens that survived to 60 wk of age. In these hens, the egg production rate was reduced by 33 and 37% in Ad- and Ad+25-OH-D3-hens, respectively ($P < 0.05$). Among hens experiencing SD, egg production in R-hens was about 26% lower than their surviving counterparts irrespective of 25-OH-D3 provision and Ad-feed intake caused a further, non-significant, 8 to 10% reduction in egg production rate. Supplementation with 25-OH-D3 increased whole flock egg production rate in R-hens by 8% (Table 1, $P < 0.05$) due to increases in SD hens. This effect was not seen in other treatment groups. Overall, 25-OH-D3 supplementation increased total egg yield by reducing mortality and increasing egg-laying rate among hens surviving up to 60 ws. In contrast to their surviving counterparts, SD hens had an early, but lower peak egg production in both R- and Ad-groups with a sharp drop after 46 wk in R-groups (Supple. Figure 1, panel A and B) leading to a lower average of egg production rate and total egg yield in R-groups and total egg yield in Ad-groups (Table 1, $P < 0.05$).

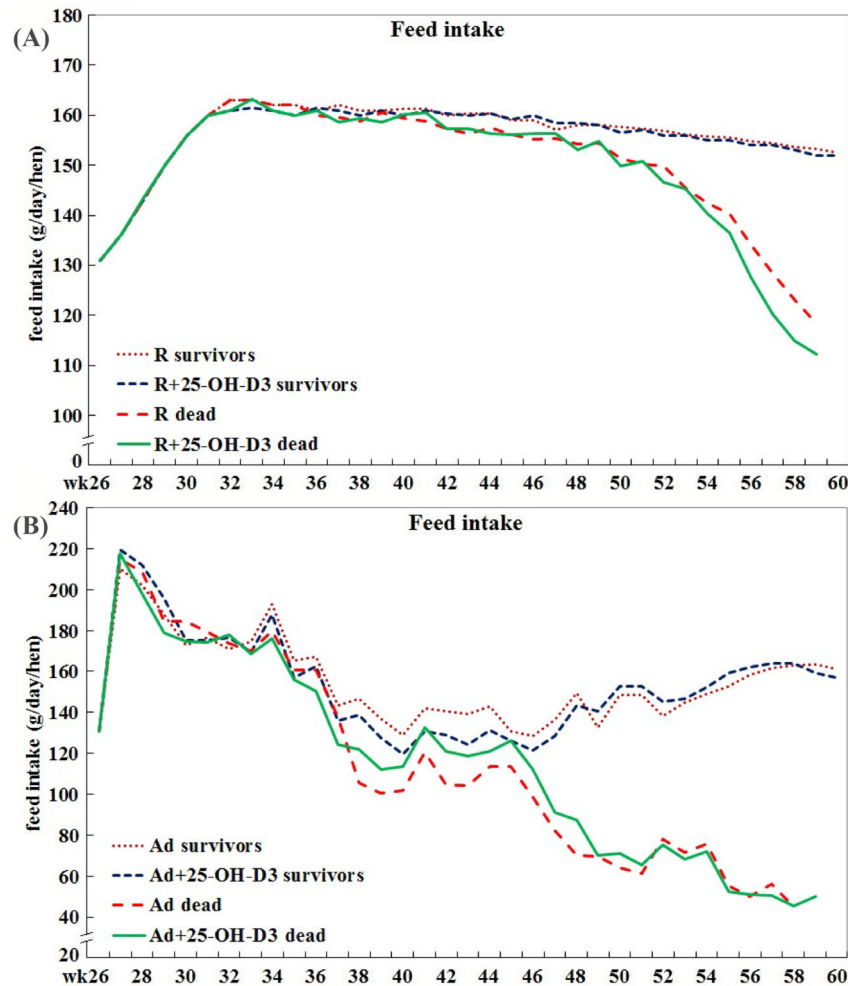


Figure 2. Effect of dietary supplementation of 25-OH-D3 on feed intake and egg production of broiler breeder hens provided with restricted or ad libitum feed intake. Results were separated into those for hens surviving to 60 wk (for R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3 group, $n = 71, 78, 32,$ and 53 before 29 wk, $n = 67, 74, 28,$ and 49 during 30 – 35 wk, $n = 60, 66, 21,$ and 41 during 36 – 47 wk, and $n = 53, 60, 14,$ and 35 after 48 wk due to $3, 7, 7$ hens sampled at $29, 35,$ and 45 wk for tissue collection, respectively) labeled “survivors,” and hens experiencing sudden death labeled as “dead” along the trial (for R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3 group, $n = 19, 12, 78,$ and $57,$ respectively, at the beginning of trial). Deaths at later ages can be calculated by subtracting death numbers from the total numbers of hens initially assigned to the groups. R; restriction, Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hydroxycholecalciferol.

Ad-hens showed a rapid BW gain achieving 4.6 kg/hen at age 38 wk. Bodyweight declined to 42 wk, and then steadily increased to achieve 5.1 kg/hen at 60 wk. In contrast, R-hens showed a slow increase in BW to reach 3.9 kg/hen at 60 wk (Figure 3, panel A). Among hens sampled for tissue collections, Ad-feed intake significantly increased BW and abdominal fat weight and fraction at $29, 35,$ and 47 wk as compared to R-hens and inclusion of 25-OH-D3 had no effects on BW in either R- or Ad-hens but significantly decreased abdominal fat weight and fraction at 35 and 47 wk ($P < 0.05$; Figure 3, panel B; Figure 4, panel A and B, right part)(interaction of Ad $\times$ 25-OH-D3, $P < 0.003$). In SD hens, Ad-groups had a higher average of BW and abdominal fat weight and fraction compared to those of R-groups, and 25-OH-D3 supplementation had no effect on R-hens, but increased BW and decreased abdominal fat weight and fraction in Ad-hens ($P < 0.05$, Figure 3 panel B;

Figure 4 panel A and B, middle part)(interaction of Ad $\times$ 25-OH-D3, $P < 0.016$).

Hens experiencing SD in R-groups had a higher average of BW at $29, 35,$ and 47 wk, compared to surviving R-group hens. Ad-group SD hens had higher BW at 29 wk but lower BW at 47 wk, compared to those of corresponding survivors sampled for tissue collection ($P < 0.05$, Figure 3 panel B, middle and left part). Except a lower actual level at 47 wk in R-group, the death of all groups had a higher abdominal weight and fraction at $29, 35,$ and/or 47 wk ($P < 0.05$, Figure 4, panel A and B, middle and left part). Regression analysis with BW of SD hens following normalization to their surviving counterparts at the same age (BW ratio) showed a progressive decline along the trial with the ratio equal to 1 around 34 to 38 wk in Ad-groups and 52 to 53 wk in R-groups (Figure 3 panel B, left part). In Ad-groups, SD hens also showed a decrease in abdominal fat weights and fraction with time, whereas, SD-hens

Table 1. Effect of dietary supplementation of 25-OH-D3 on egg production of broiler breeder hens provided with restricted or ad libitum feed intake

	Restriction	Restriction +25-OH-D3	Ad libitum	Ad libitum +25-OH-D3
Egg production rate of the whole flock (eggs/day/hen, %)	51.2 ± 1.7	55.4 ± 1.3 ⁺	36.9 ± 1.9 [*]	39.3 ± 1.8 [*]
Egg production rate of survivors (eggs/day/hen, %)	56.5 ± 1.4	58.1 ± 1.3	37.9 ± 3.0 [*]	36.3 ± 4.1 [*]
Egg production rate of hens dying of sudden death (eggs/day/hen, %)	40.0 ± 4.1 [#]	44.4 ± 4.3 [#]	36.8 ± 2.5	39.6 ± 2.6
Total egg yield of the whole flock (eggs/hen)	105.3 ± 4.6	118.3 ± 4.7 ⁺	47.7 ± 2.7 [*]	52.1 ± 2.9 [*]
Total egg yield of survivors (eggs/hen)	127.5 ± 3.4	133.0 ± 3.7	89.7 ± 3.7 [*]	86.2 ± 4.7 [*]
Total egg yield of hens dying of sudden death (eggs/hen)	57.9 ± 7.7 [#]	57.7 ± 7.5 [#]	44.1 ± 3.2 ^{*,#}	45.7 ± 3.3 ^{*,#}

Results were expressed as mean ± SEM (for the whole flock, n = 90, 90, 110, and 110, for hens surviving to 60 wk, n = 71, 78, 32, and 53, for hens died incidentally by sudden death, n = 19, 12, 78, and 57 in R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3 group, respectively).

*; significant difference by Ad feeding (vs. corresponding R-hens, $P < 0.05$).

+; significant difference by 25-OH-D3 inclusion (vs. corresponding R or Ad-hens, $P < 0.05$).

#; significant difference between dead vs. corresponding hens surviving to 60 wk ($P < 0.05$).

R; restriction, Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hydroxycholecalciferol.

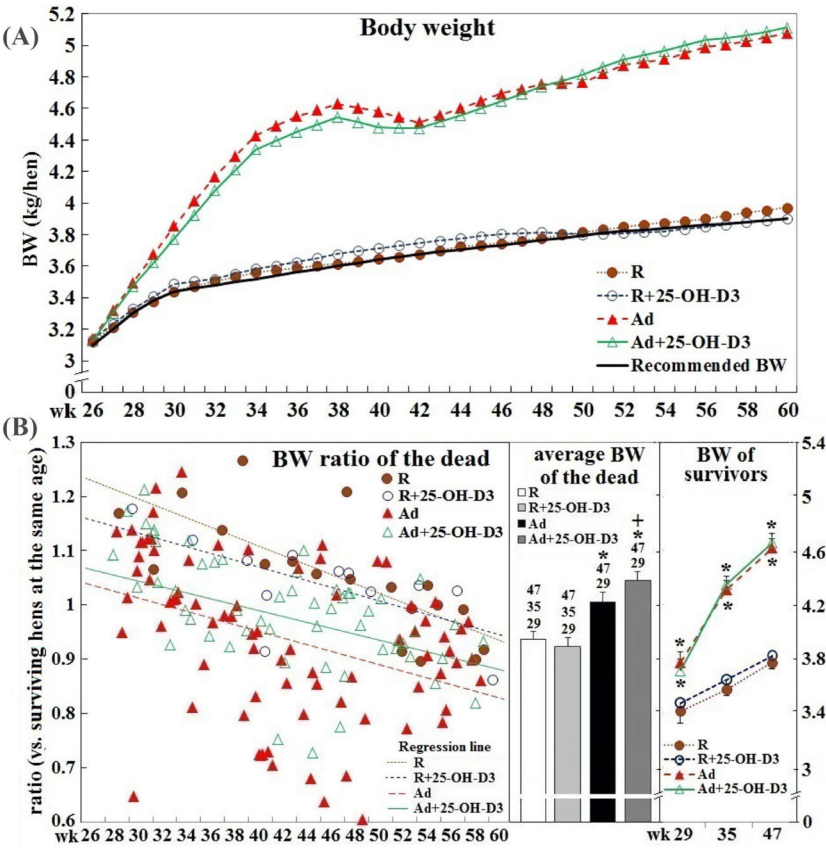


Figure 3. Effect of dietary supplementation of 25-OH-D3 on body weight gain of broiler breeder hens provided with restricted or ad libitum feed intake. Panel A shows weekly mean $\pm$ SEM of bodyweight from 10 hens selected at random to monitor body weight gain in each group. Panel B (left part) shows body weight ratio of hens experiencing sudden death relative to that of those hens remaining alive within the group at the same age. Values for individual hens are shown as data points. Individual data points from a treatment group were used to calculate trend line for the group using linear regression. Panel B (middle and right parts); Mean $\pm$ SEM of actual bodyweight of hens experiencing sudden death (n = 19, 12, 78, and 57 in R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3 group, middle part) are shown in comparison with those of hens sampled for tissue collection at 29, 35 and 47 wk (n = 4, 7, 7 hens from each group, respectively, right part). *; significant difference due to feed intake level (vs. corresponding R hens, $P < 0.05$). +; significant difference by 25-OH-D3 inclusion (vs. R or Ad hens, $P < 0.05$). Numbers shown above means in middle panels (29, 35, or 47) indicate significant difference between dead vs. corresponding surviving hens sampled of the indicated age ($P < 0.05$). R; restriction, Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hydroxycholecalciferol.

of R-groups showed a slow increase (Figure 4 panel A and B, left part). However, all groups of hens used for planned tissue collections showed an age-dependent increase of BW and abdominal fat weight and fraction (Figure 3 panel B, Figure 4 panel A and B, right part). These results suggest that hens with higher BW gain

and/or adiposity suffer early SD albeit they may exhibit a BW loss prior to succumbing.

Supplementation of 25-OH-D3 significantly relieved heart and respiratory rate at 35 and 47 wk in Ad-hens surviving to 60 wk ($P < 0.05$, Figure 5)(interaction of Ad $\times$ 25-OH-D3, $P < 0.032$ for heart rate and

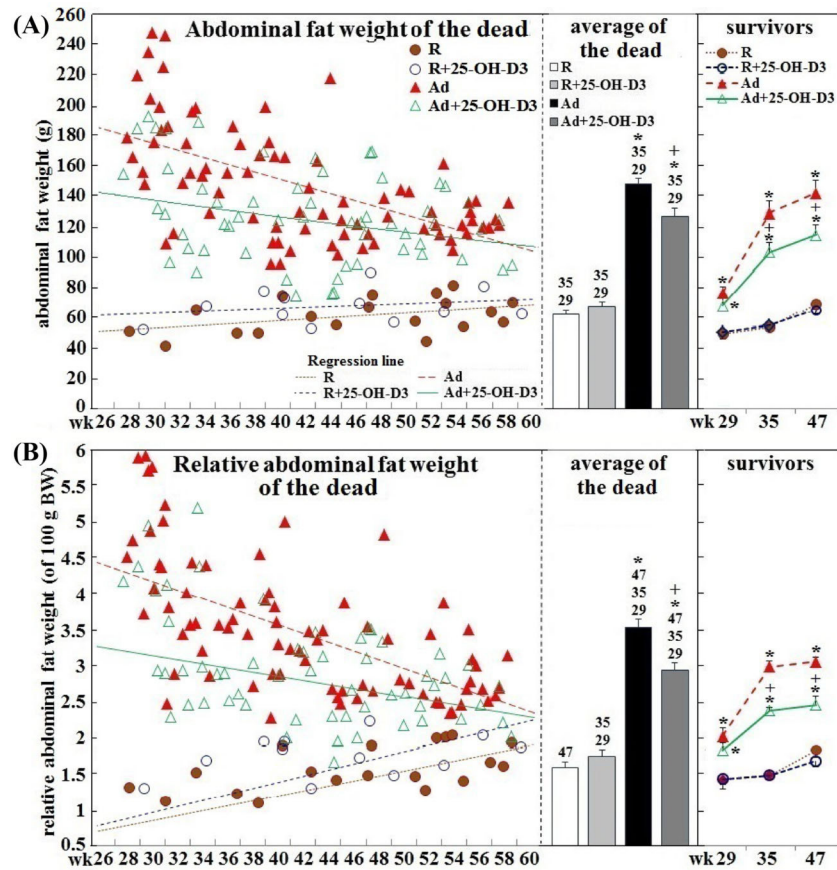


Figure 4. Effect of dietary supplementation of 25-OH-D₃ on abdominal fat weight of broiler breeder hens provided with restricted or ad libitum feed intake. Hens experiencing sudden death were necropsied within 24 h to determine body composition including actual and relative (to their own bodyweight) abdominal fat pad weight as a continuous variable (panel A and B, left part). Values for individual hens are shown as data points. Individual data points from a treatment group were used to calculate trend line for the group using linear regression. Panel A and B (middle and right parts); Mean $\pm$ SEM of actual (panel A) and relative (panel B) abdominal fat pad weight of hens experiencing sudden death ($n = 19, 12, 78$, and 57 in R, R+25-OH-D₃, Ad, Ad+25-OH-D₃ groups, respectively, middle part) are shown in comparison with those of hens sampled for tissue collection at 29, 35, and 47 wk ($n = 4, 7$, and 7 hens from each group, respectively, right part). *: significant difference due to feeding level (vs. corresponding R hens, $P < 0.05$). +: significant difference by 25-OH-D₃ inclusion (vs. R or Ad hens, $P < 0.05$). Numbers shown above means in middle panels (29, 35, or 47) indicate significant difference between dead vs. corresponding surviving hens sampled at the indicated age ($P < 0.05$). R; restriction, Ad; ad libitum, 25-OH-D₃; 25-hydroxycholecalciferol.

$P < 0.038$ for respiratory rate), but had no significant effects on the variables in SD hens of Ad- and R-groups and R-survivors. In contrast to surviving counterparts, all groups of SD hens experienced a persistently higher respiratory rate throughout the trial in combination with heart rates that decreased significantly along the experimental course. Among SD-hens, those from the Ad-groups had higher respiratory rates but lower heart rates at 29, 35, and/or 47 wk compared to those from the R-group ($P < 0.05$).

Supplementation of 25-OH-D₃ had no significant effects on plasma 25-OH-D₃ level in both R- and Ad-hens sampled at 29, 35, and 47 wk (Figure 6). Ad-hens exhibited a higher plasma 25-OH-D₃ level at 35 wk relative to concentrations at 29 and 47wk ($P < 0.05$, Figure 6).

DISCUSSION

Recently, we reported that Ad-feed intake increased the incidence of SD of broiler hens in association with cardiac pathogenesis in a 10-wk feeding trial (Chen

et al., 2017a, b). Ad-feed provision induced cardiac hypertrophic growth in association with tissue inflammation, lipotoxicity, cellular apoptosis, interstitial fibrosis, and peripheral pathologies including hypertension, diabetic conditions, dyslipidemia, leading to overt pathogenesis, irregular ECG patterns and compromised contractility (Chen et al., 2006; Pan et al., 2012; Chen et al., 2017a, b). The present results are consistent with these earlier findings and further showed that inclusion of additional 25-OH-D₃ into the basal diet effectively rescued livability in both Ad-hens and R-hens throughout a production cycle. The observed persistent elevation in respiratory rate in combination with a declining heart rate in SD hens indicates that compromised cardiac function caused death. Previous studies showed that vitamin D had beneficial effects on heart health such as maladaptive hypertrophy and contractile dysfunction (Chen et al., 2011; Glenn et al., 2016; Lee et al., 2015) and on the systemic pathological cues including hypoxia, hypertension, obesity, and related morbidities (Li et al., 2002; Cozzolino et al., 2010; Pilzet et al., 2010).

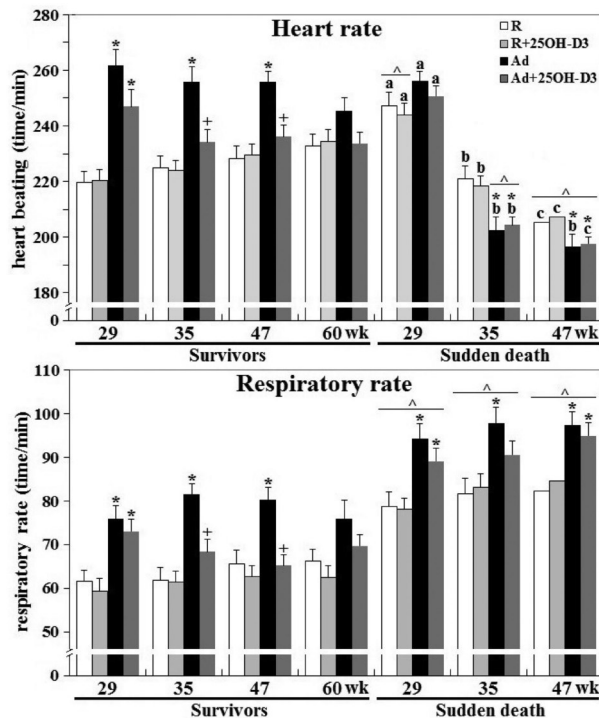


Figure 5. Longitudinal effects of dietary supplementation of 25-OH-D₃ on heart and respiratory rate of broiler breeder hens provided with restricted or ad libitum feed intake. At age of 29 wk, 10 hens from each group were selected for heart and respiratory rate monitoring. The measurements were continued with the selected hens surviving to 35, 47, or 60 wk of age (for R, R+25-OH-D₃, Ad, Ad+25-OH-D₃, $n = 8, 8, 3$, and 5 respectively) and those of hens experiencing sudden death ($n = 2, 2, 7$, and 5 at 29 wk, $n = 2, 2, 5$, and 4 at 35 wk, and $n = 1, 1, 2$, and 2 at 47 wk, respectively). *: significant difference due to feeding level (vs. corresponding R hens, $P < 0.05$). +: significant difference by 25-OH-D₃ inclusion (vs. R or Ad hens, $P < 0.05$). ^: significant difference between dead vs. hens survived at the same age with the same treatment ($P < 0.05$). Means with different superscript letters within the same treatment are significantly different among ages ($P < 0.05$). R; restriction, Ad; ad libitum, 25-OH-D₃; 25-hydroxycholecalciferol.

Thus, 25-OH-D₃ is proposed to improve broiler breeder hen livability through its actions in the cardiovascular system and systemic physiological cues. Further studies regarding to the mechanisms of beneficial effects by 25-OH-D₃ on livability are ongoing. Nevertheless, these results suggest that broiler breeder hens ultimately succumbing to SD initially increase their heart and respiration rates in order to improve their oxygen supply. However, as the progression of cardiovascular derangements, cardiac function compromises and finally leads to heart failure and SD.

The susceptibility of modern broilers to sudden death has been attributed to a higher incidence of ascites in association of cardiomyopathy (Wideman et al., 2013). In contrast to chicks with R-feed intake (20% reduction) or to healthy counterparts under Ad-feed intake, growing broilers that developed ascites were characterized by hypoxia and heart failure as evidenced by a higher respiratory rate but lower heart beating, cardiac ATP/ADP, and ATP/CrP (creatine phosphate) ratio

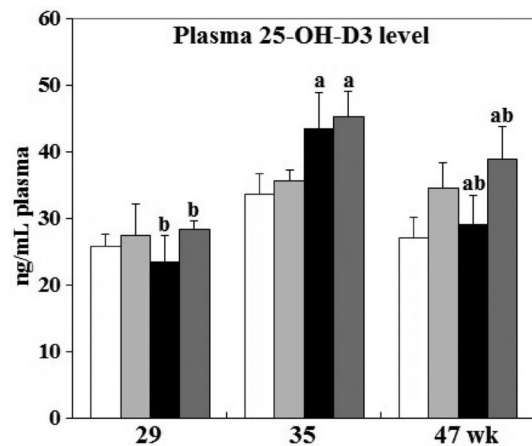


Figure 6. Effect of dietary supplementation of 25-OH-D₃ on plasma 25-OH-D₃ levels of broiler breeder hens provided with restricted or ad libitum feed intake. Values are means $\pm$ SEM for hens sampled at the age of 29, 35, and 47 wk ($n = 4, 7$, and 7 hens randomly selected from each group at respective sampling times). Means with different superscript letters within the same treatment are significantly different among ages ($P < 0.05$). R; restriction, Ad; ad libitum, 25-OH-D₃; 25-hydroxycholecalciferol.

(Olkowski et al., 2007; Nain et al., 2008). The present study showed that broiler breeder hens with better feed efficiency, as indicated by greater early weight gain than surviving counterparts, were most likely to succumb to SD than their less efficient counterparts. This association was even found among hens in the feed restricted groups. It seems that despite initially invoking compensatory changes to increase blood flow and tissue oxygen supply, hens experiencing SD eventually progress pathologically and irreversibly leading to cardiac function compromise and death. Ad-feed provision greatly exacerbates cardiac pathogenic progression by provoking systemic pathological cues and metabolic derangements and 25-OH-D₃ supplementation limits the pathogenic progression by ameliorating obesity and related disorders. Prior to death, cardiac compromise seems to produce morbidity leading to anorexia and thus BW loss; albeit behavioral monitoring of ambulation would strengthen the assertion and allow it to be distinguished from hypoxia induced lethargy.

Similar to SD Ad-hens, SD hens of R-groups died with higher BW (with a declining BW ratio equal to 1 around 34 to 38 wk in Ad-groups and 52 to 53 wk in R-hens) by compromised cardiac function despite a much lower mortality rate. Thus, it is worthwhile to examine the inter-relationship between BW gain and cardiac pathogenesis within the rearing stage while under R-feed intake, as well as the growth performance of the progeny produced by R-hens before the attack by SD. Also, re-evaluation and optimization of the increasing feed allocation for maximizing egg yield during the onset of lay to the peak may be required to avoid rapid BW gain and cardiac pathogenic progression, and thus prevent premature SD. In contrast to the recommended standard growth curve, a mild difference of BW gain (20% higher or lower) by different feed allocations

during rearing to early laying stage had no effects on the mortality of broiler breeder hens before age of 45 wk (Ekmy et al., 2012).

Interestingly, additional inclusion of 25-OH-D3 failed to alter plasma 25-OH-D3 levels in both R- and A-hen. The effect of 25-OH-D3 as an anti-obesity agent (Kienreich et al., 2013), however, was pronounced in the hens under Ad-feed intake. Circulating 1, 25-OH-D3 is highly regulated to maintain a constant level, however, concentrations of its precursor, 25-OH-D3, fluctuate from 10 to 100 ng/mL, approximately, 100-fold higher than 1,25-OH-D3 (Fullmer, 1990; Pilz et al., 2010). Production of 25-OH-D3 from the liver and in situ actions, namely, conversion of 25-OH-D3 into bioactive 1,25-OH-D3 by CYP27B1 and activation of VDR in target tissues account for most of the effects by vitamin D (Pilz et al., 2010). Thus, in situ effects by 25-OH-D3 per se need to be evaluated for possible actions supporting the improved livability in broiler breeder hens as were demonstrated here. Despite the beneficial effects, vitamin D3 in excess, however, has been shown to exert a harmful hypertensive effect (Bas et al., 2006). Excessive 25-OH-D3, 80,000 IU/kg feed (2,000 µg/kg feed), had negative effects and led to a higher incidence of arrhythmia and SD in growing broilers (Nain et al., 2007). Based on the present results, the regular formulation with 2500 IU vitamin D/kg diet in the form of cholecalciferol is apparently insufficient to sustain broiler breeder hen health along the laying stage. The 69 µg 25-OH-D3/kg feed supplement would provide an additional 414 IU 25-OH-D3 per day over the 375 IU cholecalciferol (based on 150 g daily feed intake), therefore is concluded as an effective and safe dosage to relieve cardiac pathogenesis and rescue the livability in broiler breeder hens.

The study first reported that additional inclusion of 25-OH-D3 into the basal diet effectively improves livability in both Ad-hens and R-hens. Hens with higher metabolism rate for BW gain and/or adiposity by Ad-feed intake or due to genetically better feed efficiency develop faster compromise of cardiac function even under R feed intake, and thereby suffer early SD despite enduring a loss of BW.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at *Poultry Science* online.

Supple. Table 1. Ingredient composition of the basal broiler breeder laying diets

Supple. Figure 1. Effect of dietary supplementation of 25-OH-D3 on feed intake and egg production of broiler hens provided with restricted or ad libitum feed intake. Results were separated into those for hens surviving upto 60 wk (for R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3 group, n = 71, 78, 32, and 53 before 29 wk, n = 67, 74, 28, and 49 during 30 to 35 wk, n = 60, 66, 21, and 41 during 36 to 47wk, and n = 53, 60,

14, and 35 after 48wk due to 3, 7, 7 hens sampled at 29, 35, and 45 wk for tissue collection, respectively) labeled “survivors,” and hens experiencing sudden death labeled as “dead” along the trial (for R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3 group, n = 19, 12, 78, and 57, respectively at the beginning of trial). Deaths at later ages can be calculated by subtracting death numbers from the total numbers of hens initially assigned to the groups. R; restriction, Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hydroxycholecalciferol.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the grant of the Ministry of Science and Technology, Taiwan; MOST 107-2313-B-005-036-MY3, the iEGG and Animal Biotechnology Center and the Innovation and Development Center of Sustainable Agriculture from The Featured Areas Research Center Program within the framework of the Higher Education Sprout Project by the Ministry of Education (MOE) in Taiwan. DSM Nutritional Products Asia Pacific, Singapore, and Texas AgriLife Research project number 8738.

REFERENCES

- Bas, A., I. Lopez, J. Perez, M. Rodriguez, and E. Aguilera-Tejero. 2006. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J. Bone Miner. Res.* 21:484–490.
- Chen, S. E., J. P. McMurtry, and R. L. Walzem. 2006. Overfeeding-induced ovarian dysfunction in broiler breeder hens is associated with lipotoxicity. *Poult. Sci.* 85:70–81.
- Chen, C. Y., H. Y. Lin, Y. W. Chen, Y. J. Ko, Y. J. Liu, Y. H. Chen, R. L. Walzem, and S. E. Chen. 2017. Obesity-associated cardiac pathogenesis in broiler breeder hens: pathological adaptation of cardiac hypertrophy. *Poult. Sci.* 96:2428–2437.
- Chen, C. Y., Y. F. Huang, Y. J. Ko, Y. J. Liu, Y. H. Chen, R. L. Walzem, and S. E. Chen. 2017. Obesity-associated cardiac pathogenesis in broiler breeder hens: development of metabolic cardiomyopathy. *Poult. Sci.* 96:2438–2446.
- Chen, S., C. S. Law, C. L. Grigsby, K. Olsen, T. T. Hong, Y. Zhang, Y. Yeghiazarians, and D. G. Gardner. 2011. Cardiomyocyte-specific deletion of the vitamin D receptor gene results in cardiac hypertrophy. *Circulation* 124:1838–1847.
- Cozzolino, M., M. Ketteler, and D. Zehnder. 2010. The vitamin D system: a crosstalk between the heart and kidney. *Eur. J. Heart Fail.* 12:1031–1041.
- Ekmy, R. D., C. Salas, J. England, S. Cerrate, and C. N. Coon. 2012. The effects of pullet body weight, dietary nonphytate phosphorus intake, and breeder feeding regimen on production performance, chick quality, and bone remodeling in broiler breeders. *Poult. Sci.* 91:948–964.
- Fullmer, C. S. 1990. Intestinal lead and calcium absorption: effect of 1, 25-dihydroxycholecalciferol and lead status. *Exp. Biol. Med.* 194:258–264.
- Glenn, D. J., M. C. Cardema, and D. G. Gardner. 2016. Amplification of lipotoxic cardiomyopathy in the VDR gene knockout mouse. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 164:292–298.
- Griffin, H. D., and C. Goddard. 1994. Rapidly growing broiler (meat-type) chickens. Their origin and use for comparative studies of the regulation of growth. *Int. J. Biochem.* 26:19–28.
- Hocking, P. M. 2010. Developments in poultry genetic research 1960–2009. *Br. Poult. Sci.* 51(sup1):44–51.
- Julian, R. J. 2000. Physiological, management and environmental triggers of the ascites syndrome: a review. *Avian Pathol.* 29:519–527.

- Kienreich, K., A. Tomaschitz, N. Verheyen, T. Pieber, M. Gaksch, M. R. Gröbler, and S. Pilz. 2013. Vitamin D and cardiovascular disease. *Nutrients* 5:3005–3021.
- Lee, T. W., T. I. Lee, C. J. Chang, G. S. Lien, Y. H. Kao, T. F. Chao, and Y. J. Chen. 2015. Potential of vitamin D in treating diabetic cardiomyopathy. *Nutr. Res.* 35:269–279.
- Li, Y. C., J. Kong, M. Wei, Z. F. Chen, S. Q. Liu, and L. P. Cao. 2002. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 110:229–238.
- McGovern, R. H., J. J. Feddes, F. E. Robinson, and J. A. Hanson. 1999. Growth performance, carcass characteristics, and the incidence of ascites in broilers in response to feed restriction and litter oiling. *Poult. Sci.* 78:522–528.
- Nain, S., B. Laarveld, C. Wojnarowicz, and A. A. Olkowski. 2007. Excessive dietary vitamin D supplementation as a risk factor for sudden death syndrome in fast growing commercial broilers. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 148:828–833.
- Nain, S., B. Ling, J. Alcorn, C. M. Wojnarowicz, B. Laarveld, and A. A. Olkowski. 2008. Biochemical factors limiting myocardial energy in a chicken genotype selected for rapid growth. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 149:36–43.
- Olkowski, A. A., S. Nain, C. Wojnarowicz, B. Laarveld, J. Alcorn, and B. B. Ling. 2007. Comparative study of myocardial high energy phosphate substrate content in slow and fast growing chicken and in chickens with heart failure and ascites. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 148:230–238.
- Pan, Y. E., Z. C. Liu, C. J. Chang, Y. L. Xie, C. Y. Chen, C. F. Chen, R. L. Walzem, and S. E. Chen. 2012. Ceramide accumulation and upregulation of proinflammatory interleukin-1 β exemplify lipotoxicity to mediate declines of reproductive efficacy of broiler hens. *Domest. Anim. Endocrinol.* 42:183–194.
- Pilz, S., A. Tomaschitz, C. Drechsler, J. M. Dekker, and W. März. 2010. Vitamin D deficiency and myocardial diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* 54:1103–1113.
- Richards, M. P., and M. Proszkowiec-Weglarz. 2007. Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. *Poult. Sci.* 86:1478–1490.
- Vanlint, S. 2013. Vitamin D and obesity. *Nutrients* 5:949–956.
- Yu, M. W., F. E. Robinson, and A. R. Robblee. 1992. Effect of feed allowance during rearing and breeding on female broiler breeders.: 1. Growth and carcass characteristics. *Poult. Sci.* 71:1739–1749.
- Wideman, R. F., D. D. Rhoads, G. F. Erf, and N. B. Anthony. 2013. Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: a review. *Poult. Sci.* 92:64–83.

La suplementación dietética de 25-hidroxicolecalciferol mejora la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde

Hsuan-Yu Lin,^{*} Thau Kiong Chung,[†] Yu-Hui Chen,^{*} Rosemary L. Walzem,[‡] y Shuen-Ei Chen^{*,§,||,1}

^{*} Departamento de Ciencia Animal, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwán; [†] DSM Nutricional Products Asia Pacific, Singapur; [‡] Departamento de Ciencia Avícola, Texas A&M University, College Station, TX, EE.UU.; [§] Centro de Innovación y Desarrollo de Agricultura Sostenible (IDCSA), National Chung Hsing Universidad, Taichung, Taiwán; [#] El iEGG y el Centro de Biotecnología Animal, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; y ^{||} Centro de Investigación de Energía Sostenible y Nanotecnología, National Chung Hsing Universidad, Taichung, Taiwán

RESUMEN El estudio tuvo como objetivo examinar los efectos del 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D3) sobre el rendimiento reproductivo y la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde. Las gallinas a la edad de 26 semanas continuaron con raciones restringidas (R) o se les permitió alimento ad libitum (Ad) hasta las 60 semanas de edad. La ingesta de alimento AD perjudicó enormemente la producción de huevos y la viabilidad de las gallinas. Se mejoró la tasa de supervivencia en gallinas R y Ad (86.7 vs. 78.9% y 48.2 vs. 29.1%, respectivamente) al igual que la producción de huevos en gallinas R ($P < 0.05$) mediante la inclusión de 69 µg de 25-OH-D3/kg alimentándose de la dieta basal. La muerte súbita (SD) fue la causa de la mortalidad de gallinas; las gallinas murieron antes con un BW (peso corporal) más pesado y mayores pesos absolutos y relativos de grasa abdominal que las gallinas sobrevivientes. Curiosamente, la ingesta de alimento de las gallinas SD se volvió menor que el de las gallinas sobrevivientes después de 37 y 42 semanas en los grupos Ad y R, respectivamente, y condujo a una disminución progresiva del BW de la gallina SD con una relación (en relación con las gallinas sobrevivientes de la misma edad) equivalía a 1 alrededor de 34 a 38 semanas en los grupos Ad y 52 a 53 semanas en los grupos R. La suplementación de 25-OH-D3 mejoró los cambios adversos de la frecuencia cardíaca y respiratoria de las sobrevivientes de Ad después de 29 semanas ($P < 0.05$), pero no tuvo efectos significativos sobre las gallinas SD AD. En contraste con las contrapartes sobrevivientes, todas las gallinas SD experimentaron frecuencias respiratorias persistentemente más altas junto con la disminución de las frecuencias cardíacas ($P < 0.05$), lo que sugiere una función cardíaca comprometida como la causa de la SD, en la cual las gallinas aumentaron la frecuencia cardíaca y respiratoria para más suministro de sangre y oxígeno para satisfacer la necesidad de ganancia de BW y/o adiposidad rápida en respuesta a la ingesta de alimento Ad o debido a una mejor eficiencia de alimento genéticamente incluso bajo la ingesta de alimento R. A medida que avanzaban los trastornos cardiorrespiratorios, la función cardíaca comprometida finalmente condujo a insuficiencia cardíaca y muerte súbita a pesar de las reducciones espontáneas en la ingesta de alimento y la pérdida de BW en todas las gallinas SD. La provisión de 69 µg de 25-OH-D3/kg de alimento es un método efectivo y práctico para mejorar la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde.

© 2019 Poultry Science Association Inc.

Recibido 15 de marzo de 2019.

Aceptado 22 de mayo de 2019

¹Autor para correspondencia: shueneic@dragon.nchu.edu.tw

Todos los autores enumerados han contribuido al trabajo y han acordado enviar el manuscrito a Pout Sci. Ninguna parte del trabajo ha sido publicada antes y todos los estudios en animales han sido aprobados por los comités de ética apropiados.

Divulgación del autor: Lin S.Y., Chung T.K., Chen Y.H., Walzem R.L. y Chen S.E.; sin conflictos de intereses

Palabras clave: gallinas reproductoras de pollos de engorde, 25-hidroxicolecalciferol, muerte súbita, insuficiencia cardíaca, obesidad

2019 Poultry Science 98:6108–6116

<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez330>

5

INTRODUCCIÓN

La selección genética intensiva para el crecimiento rápido temprano ha resultado en cepas modernas de pollos de engorde susceptibles a muerte súbita (**SD**) (Griffin and Goddard, 1994; Julian, 2000; Olkowski et al., 2007; Hocking, 2010). Un componente de esta susceptibilidad es la regulación alterada del apetito; con ingesta espontánea en
10 aparente exceso de requisitos para la salud y el rendimiento óptimos de los adultos (Yu et al., 1992; Chen et al., 2006; Richards and Proszkowiec-Weglarz, 2007). La restricción de alimento se utiliza normalmente durante la fase de crecimiento de los reproductores de pollos de engorde para limitar la disfunción metabólica y mejorar el rendimiento reproductivo y la viabilidad (Yu et al., 1992; Griffin and Goddard, 1994; McGovern et al.,
15 1999). Hasta la fecha, sin embargo, la etiología de la SD en los reproductores adultos de pollos de engorde a pesar de la restricción temprana del alimento sigue siendo difícil y limita el desarrollo de intervenciones efectivas para respaldar la mejora de la viabilidad y la producción. Si bien la restricción de alimento cada vez más severa puede aumentar la viabilidad, este enfoque está bajo un escrutinio creciente debido a la preocupación por el
20 hambre indebida por el bienestar animal.

La vitamina D y su receptor (**VDR**) están más fuertemente asociados con la homeostasis de calcio/fósforo y la biología ósea. El VDR y la 25-hidroxivitamina D 1 α -hidroxilasa (CYP27B1), la enzima responsable de la conversión de 25-OH-D3 (25-hidroxicolecalciferol) en la forma bioactiva 1,25-(OH)2-D3 (1,25-dihidroxicolecalciferol)
25 están presentes en una variedad de tejidos (Pilz et al., 2010; Kienreich et al., 2013). Curiosamente, la activación del VDR por la vitamina D desempeña una función crítica en la regulación del sistema cardiovascular, rutas inflamatorias y fibróticas. Los estudios sugirieron fuertemente que el tratamiento con vitamina D suprime la obesidad y los trastornos relacionados al reprimir las expresiones de genes adipogénicos y la
30 acumulación de lípidos (Vanlint, 2013) y mejorar la salud cardiovascular (Cozzolino et al., 2010; Pilz et al., 2010).

Recientemente demostramos que las gallinas reproductoras de pollos de engorde adultas proporcionadas con acceso ad libitum al alimento eran altamente susceptibles a función cardíaca comprometida que resultó en SD (Chen et al., 2017a, b). El presente estudio
35 buscó delinear adicionalmente el rendimiento y la frecuencia de SD en gallinas criadas hasta el punto de puesta según las recomendaciones de la compañía de reproductores para el aumento de peso corporal y posteriormente se continuó con la ingesta de alimento recomendada (gallinas R) o se le permitió consumir alimento hasta satisfacer el apetito (gallinas Ad) durante un ciclo completo de puesta. Más aún, se evaluaron los
40 efectos de la suplementación con 25-OH-D3 en la dieta basal sobre la producción de huevos y la viabilidad en gallinas R y Ad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental

Se utilizaron muestras de parvadas planificadas y registros de mortalidad por muerte
45 súbita y parámetros de tejido para evaluar las características metabólicas específicas y

los impactos de viabilidad, respectivamente, de la ingesta excesiva de energía y la suplementación con 25-OH-D3.

Manejo de animales

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de la National Chung Hsing University, Taiwán revisó y aprobó todos los procedimientos y cría de aves (Permiso IACUC NO. 102-113). Las gallinas reproductoras de pollos de engorde Cobb 500 con edad de 22 semanas se compraron en una granja reproductora local. La ingesta de alimento hasta las 26 semanas de edad siguió las recomendaciones de la compañía de reproductores para lograr un peso corporal específico a través del ajuste semanal de las cantidades de un afrecho de criador a base de soya y maíz regular (105 a 120 g/día/gallina, Tabla Suplementaria 1). La composición de la dieta se formuló en base a los registros anteriores de rendimientos óptimos desde la granja reproductora local. Todas las aves fueron enjauladas individualmente para facilitar mediciones precisas de la ingesta diaria de alimento y datos de producción de huevos individuales en todos los grupos, al tiempo que brindaban oportunidades ambulatorias equivalentes en una casa bajo presión negativa por ventilación con sistema de enfriamiento por aspersión de agua y la temperatura ambiente se mantuvo entre 24 y 28°C. La humedad relativa varió con el clima del 55 al 85%. A las aves se les proporcionó acceso libre al agua durante todo el experimento. El alimento se colocó a las 08:30 a.m. junto con un programa fotográfico 14L:10D (luces encendidas a las 05:00 a.m.). A la edad de 26 semanas, 180 aves continuaron con raciones restringidas (gallinas-R) como recomendación de la compañía de reproductores, mientras que otras 220 aves recibieron alimento suficiente hasta satisfacer el apetito (gallinas Ad). Dentro de cada tratamiento de ingesta de alimento, a la mitad de las gallinas se les proporcionó una dieta reproductora basal que contenía 69 µg/kg de alimento adicional de 25-OH-D3 (DSM Nutritional Products Ltd., Países Bajos). Las cantidades finales de gallinas en cada grupo fueron 90 en el grupo R y R+25-OH-D3 y 110 en el grupo Ad y Ad+25-OH-D3.

Necropsia y recolección de tejidos

Las recolecciones de tejidos planificadas se realizaron a las edades de 29, 35 y 47 semanas, cuando se seleccionaron al azar 4, 7 y 7 gallinas, respectivamente, de cada grupo para la recolección de tejidos para estudios adicionales. Las gallinas se estudiaron después de un ayuno nocturno y se sometieron a necropsia bajo anestesia como se describió anteriormente (Chen et al., 2006). Se registró la edad de las muertes por SD y los estudios de necropsia se completaron dentro de las 24 h de la muerte. El corazón, hígado y grasa abdominal se recogieron para análisis de la composición corporal. Algunas de las gallinas SD fueron diagnosticadas por un veterinario y se excluyeron las causas infecciosas. Los detalles de las patologías cardiorrespiratorias se presentaron por separado (manuscrito en revisión). Brevemente, la patogenia cardíaca se evaluó para la presencia de ascitis, derrame pericárdico, dilatación ventricular cardíaca e hipertrofia como se describió anteriormente (Chen et al., 2017a, b).

Índices de morbilidad y mortalidad

La mortalidad se informó como una tasa de supervivencia calculada como el porcentaje de aves originalmente asignadas al grupo de tratamiento que estaban vivas en un día determinado. La morbilidad se evaluó mediante cambios espontáneos en la ingesta de alimento, el peso corporal (**BW**) y la frecuencia cardíaca y respiratoria. Para la ingesta espontánea de alimento, las cantidades reales de alimento consumidas por las gallinas SD y sobrevivientes dentro de cada grupo se trazaron individualmente para permitir el examen visual de la forma del gráfico. El peso corporal de las gallinas SD se expresó

como una relación del peso promedio de las gallinas que sobrevivieron hasta el día de la muerte de una gallina SD individual. En estos cálculos, los valores mayores o menores a 1.0 indican que BW de las gallinas SD fue mayor o menor que el de las gallinas sobrevivientes correspondientes a la misma edad.

5 ***Determinación de la concentración de 25-OH-D3 en plasma, medición de la frecuencia cardíaca y respiratoria***

El plasma de las gallinas muestreadas a las 29, 35 y 47 semanas se utilizó para la determinación de la concentración de 25-OH-D3 utilizando un kit comercial ELISA (Artículo; 9000683, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU.). Se seleccionaron al azar diez gallinas adicionales de cada grupo cuando tenían 29 semanas de edad para la medición de la frecuencia cardíaca y respiratoria utilizando un monitor portátil (SureSigns VM6, Philips India Limited, Kolkata, India) como se describió anteriormente (Chen et al., 2017a, b). Se registraron las selecciones de gallinas para repetir las mediciones de frecuencia cardíaca y respiratoria en las gallinas que sobrevivieron hasta las 35, 47 o 60 semanas.

Estadísticas

Los datos se analizaron mediante ANOVA de 2 vías, en el que la manipulación de la ingesta de alimento (Ad o R) y el tratamiento con 25-OH-D3 fueron las variables de clasificación. Las diferencias entre las medias grupales se probaron utilizando la prueba *t* Bonferroni cuando el efecto principal fue significativo. Si se encontró una interacción entre la ingesta de alimento y el tratamiento con 25-OH-D3, se realizó una comparación de medias. Los valores se expresaron como medias $\pm$ DEM. Las diferencias de medias se consideraron significativas a $P < 0.05$. Todos los procedimientos estadísticos se llevaron a cabo utilizando SPSS para Windows 13.0.

25 **RESULTADOS**

La ingesta de alimento Ad redujo notablemente la viabilidad y la suplementación de las gallinas con 25-OH-D3 y aumentó en gran medida la tasa de supervivencia en los grupos R y Ad (78.9 vs. 86.7% y 29.1 vs. 48.2%, respectivamente) (Figura 1). La ingesta de alimento de las gallinas SD y las contrapartes sobrevivientes en los grupos R divergieron después de 42 semanas y las diferencias fueron aún mayores después de 52 semanas, de modo que las gallinas SD limitaron voluntariamente su ingesta de alimento a 110 a 120 g/día/gallina al final en lugar del nivel recomendado alrededor de 156 g/día/gallina (Figura 2, panel A). Después de la liberación de la restricción de alimento, tanto las gallinas SD como las sobrevivientes de los grupos Ad mostraron un aumento abrupto en la ingesta de alimento que alcanzó un máximo de 210 a 220 g/día/gallina dentro de 1 semana (Figura 2, panel B). Posteriormente, la ingesta de alimento disminuyó gradualmente por debajo de los 160 g/día/gallina recomendados después de las 36 semanas de edad, 10 semanas después de levantar la restricción de alimento. Desde la edad de 45 a 60 semanas, los patrones de ingesta de alimento de las gallinas sobrevivientes y SD de los grupos Ad divergieron aún más. La ingesta de gallinas SD disminuyó a 110 a 130 g/día/gallina cuando tenía 45 semanas de edad, después de lo cual la ingesta de alimento de las gallinas sobrevivientes aumentó lentamente a 160 g/día/gallina a 60 semanas, mientras que la ingesta de gallinas SD disminuyó a 50 g/día/gallina. La ingesta de alimento comenzó a divergir a las 42 semanas y se desvió adicionalmente después de 50 semanas en grupos R con gallinas R que experimentaron SD consumiendo menos alimento que las sobrevivientes.

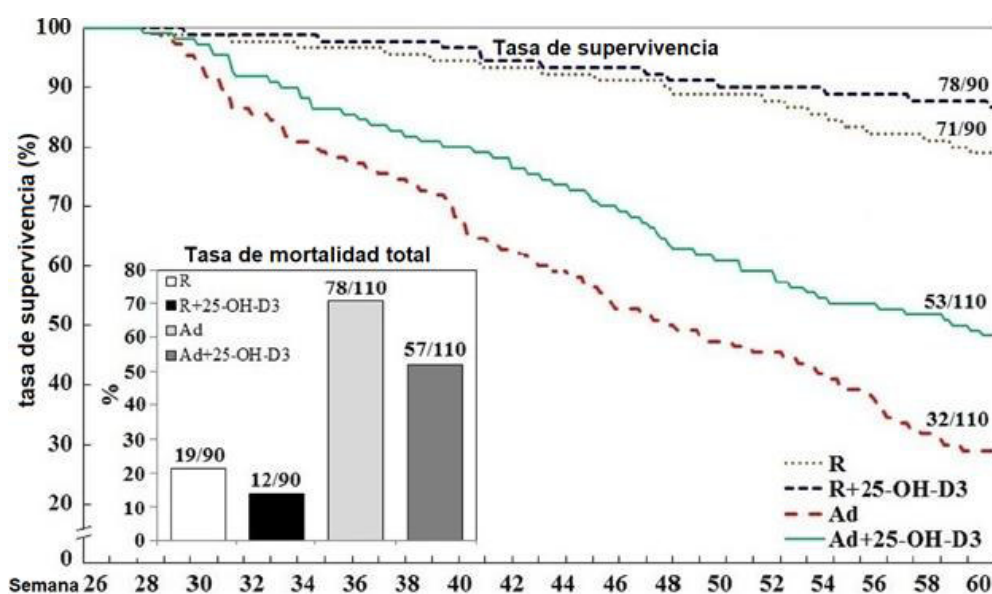


Figura 1. Efecto de suplementación dietética de 25-OH-D3 sobre la tasa de supervivencia de las gallinas reproductoras de pollos de engorde provistas de ingesta de alimento restringida o ad libitum. Los resultados se expresaron como un porcentaje de las gallinas sobrevivientes restantes del número de gallinas inicialmente asignadas al grupo. Los valores sobre las barras en el panel incorporado indican el número total de gallinas (numerador) que murieron por muerte súbita, siendo el denominador el número inicial de gallinas en el grupo. R; restricción, Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hidroxicolecalciferol.

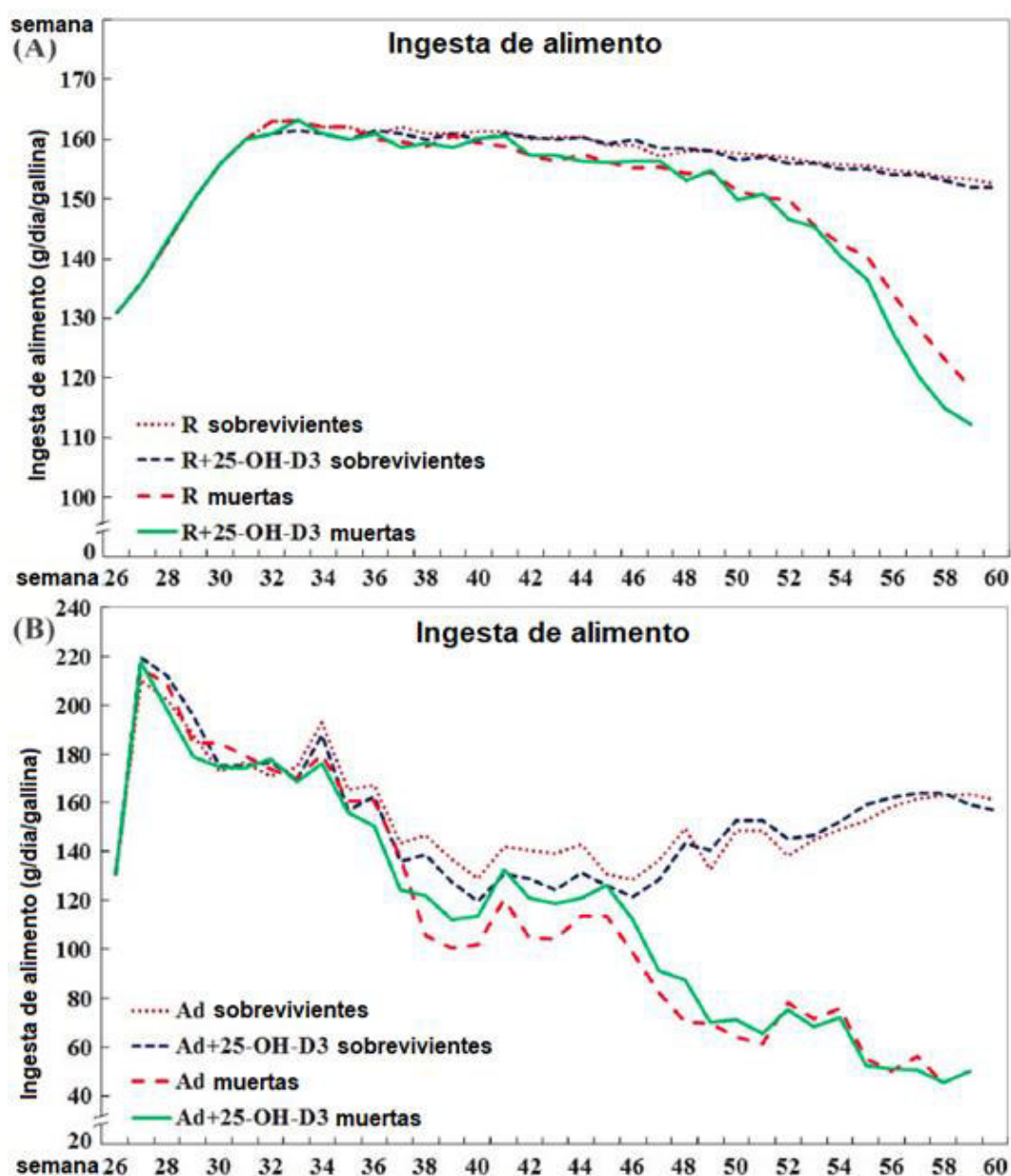


Figura 2. Efecto de la suplementación dietética de 25-OH-D3 en la ingesta de alimento y producción de huevos de gallinas reproductoras de pollos de engorde provistas de ingesta de alimento restringida o ad libitum. Los resultados se separaron en aquellos de las gallinas que sobrevivieron a 60 semanas (para el grupo R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3, n = 71, 78, 32 y 53 antes de las 29 semanas, n = 67, 74, 28 y 49 durante 30–35 semanas, n = 60, 66, 21 y 41 durante 36–47 semanas, y n = 53, 60, 14 y 35 después de 48 semanas debido a 3, 7, 7 gallinas muestreadas a las 29, 35 y 45 semanas para recolección de tejido, respectivamente) etiquetadas como “sobrevivientes”, y las gallinas que experimentaron muerte súbita etiquetadas como “muertas” a lo largo del ensayo (para grupo R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3, n = 19, 12, 78 y 57, respectivamente, al comienzo del ensayo). Las muertes en edades posteriores se pueden calcular al restar los números de muerte del número total de gallinas inicialmente asignadas a los grupos. R; Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hidroxicolecalciferol.

La cantidad de huevos puestos durante la prueba de alimento se redujo significativamente por la ingesta de alimento Ad tanto en gallinas sobrevivientes como SD

(Tabla 1, $P < 0.05$). La reducción en el rendimiento total del huevo debido a la ingesta de alimento Ad fue más pronunciada en las gallinas que sobrevivieron hasta las 60 semanas de edad. En estas gallinas, la tasa de producción de huevos se redujo en 33 y 37% en gallinas Ad- y Ad+25-OH-D3, respectivamente ($P < 0.05$). Entre las gallinas que experimentaron SD, la producción de huevos en gallinas R fue aproximadamente un 26% menor que la de sus contrapartes sobrevivientes, independientemente de la provisión de 25-OH-D3 y la ingesta de alimento Ad provocó una reducción adicional, no significativa, de 8 a 10% en la tasa de producción de huevos. La suplementación con 25-OH-D3 aumentó la tasa de producción de huevos de la parvada entera en gallinas R en un 8% (Tabla 1, $P < 0.05$) debido a los aumentos en las gallinas SD. Este efecto no se observó en otros grupos de tratamiento. En general, la suplementación con 25-OH-D3 aumentó el rendimiento total del huevo al reducir la mortalidad y aumentar la tasa de puesta de huevos entre las gallinas que sobrevivieron hasta 60 semanas. En contraste con sus contrapartes sobrevivientes, las gallinas SD tuvieron una producción de huevos temprana pero baja en los grupos R y Ad con una fuerte caída después de 46 semanas en los grupos R (Suplemento Figura 1, panel A y B) que condujeron a un promedio menor de la tasa de producción de huevos y el rendimiento total de huevos en los grupos R y el rendimiento total de huevos en los grupos Ad (Tabla 1, $P < 0.05$).

Tabla 1. Efecto de la suplementación dietética de 25-OH-D3 sobre la producción de huevos de gallinas reproductoras de pollos de engorde provistas de ingesta de alimento restringida o ad libitum

	Restricción	Restricción + 25-OH-D3	Ad libitum	Ad libitum + 25-OH-D3
Tasa de producción de huevos de la parvada completa (huevos/día/gallina, %)	51.2 ± 1.7	55.4 ± 1.3 ⁺	36.9 ± 1.9 [*]	39.3 ± 1.8 [*]
Tasa de producción de huevos de sobrevivientes (huevos/día/gallina, %)	56.5 ± 1.4	58.1 ± 1.3	37.9 ± 3.0 [*]	36.3 ± 4.1 [*]
Tasa de producción de huevos de gallinas que mueren de muerte súbita (huevos/día/gallina, %)	40.0 ± 4.1 [#]	44.4 ± 4.3 [#]	36.8 ± 2.5	39.6 ± 2.6
Rendimiento total de huevos de parvada completa (huevos/gallina)	105.3 ± 4.6	118.3 ± 4.7 ⁺	47.7 ± 2.7 [*]	52.1 ± 2.9 [*]
Rendimiento total de huevos de sobrevivientes (huevos/gallina)	127.5 ± 3.4	133.0 ± 3.7	89.7 ± 3.7 [*]	86.2 ± 4.7 [*]
Rendimiento total de huevos de gallinas que	57.9 ± 7.7 [#]	57.7 ± 7.5 [#]	44.1 ± 3.2 ^{*,#}	45.7 ± 3.3 ^{*,#}

mueren de muerte súbita (huevos/gallina)				
--	--	--	--	--

Los resultados se expresaron como media $\pm$ DEM (para toda la parvada, $n = 90$, 90 , 110 y 110 , para gallinas que sobrevivieron a 60 semanas, $n = 71$, 78 , 32 y 53 , para gallinas que murieron incidentalmente por muerte súbita, $n = 19$, 12 , 78 y 57 en el grupo R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3, respectivamente).

5 *; diferencia significativa por alimento Ad (frente a las gallinas R correspondientes, $P < 0.05$).

+; diferencia significativa por inclusión de 25-OH-D3 (frente a gallinas R o Ad, correspondientes, $P < 0.05$).

10 #; diferencia significativa entre gallinas muertas versus las correspondientes que sobreviven a 60 semanas ($P < 0.05$).

R; restricción, Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hidroxicolecalciferol.

15 Las gallinas Ad mostraron una ganancia rápida de BW alcanzando 4.6 kg/gallina a la edad de 38 semanas. El peso corporal disminuyó a 42 semanas, y luego aumentó constantemente para alcanzar 5.1 kg/gallina a 60 semanas. En contraste, las gallinas R mostraron un aumento lento en el peso corporal para alcanzar 3.9 kg/gallina a 60 semanas (Figura 3, panel A). Entre las gallinas muestreadas para recolecciones de tejidos, la ingesta de alimento Ad aumentó significativamente el BW y el peso y fracción de grasa abdominal a las 29, 35 y 47 semanas en comparación con las gallinas R y la inclusión de 25-OH-D3 no tuvo efectos sobre el peso corporal en ninguna de las gallinas R- o Ad, pero disminuyeron significativamente el BW y peso y la fracción de grasa abdominal a las 35 y 47 semanas ($P < 0.05$; Figura 3, panel B; Figura 4, panel A y B, parte derecha) (interacción de Ad $\times$ 25-OH-D3, $P < 0.003$). En las gallinas SD, los grupos Ad tuvieron un mayor promedio de BW y peso y fracción de grasa abdominal en comparación con los grupos R, y la suplementación con 25-OH-D3 no tuvo efecto en las gallinas R, pero aumentó el BW y disminuyó el peso y fracción de grasa abdominal en gallinas Ad ($P < 0.05$, Figura 3 panel B; Figura 4 panel A y B, parte media) (interacción de Ad $\times$ 25-OH-D3, $P < 0.016$).

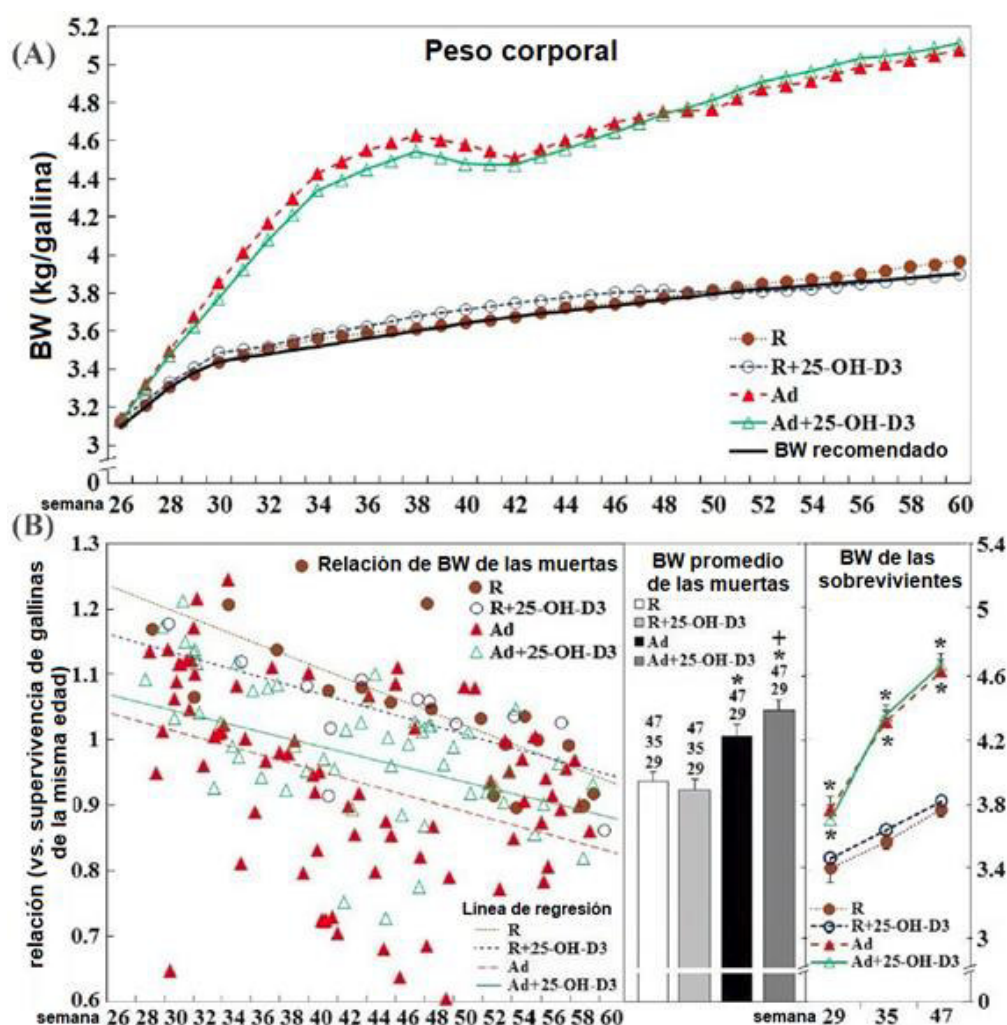


Figura 3. Efecto de la suplementación dietética de 25-OH-D3 sobre la ganancia de peso corporal de las gallinas reproductoras de pollos de engorde provistas de ingesta de alimento restringida o ad libitum. El panel A muestra la media semanal $\pm$ DEM de peso corporal de 10 gallinas seleccionadas al azar para monitorizar la ganancia de peso corporal en cada grupo. El panel B (parte izquierda) muestra la relación de peso corporal de las gallinas que experimentan muerte súbita en relación con aquel de las gallinas que permanecen vivas dentro del grupo a la misma edad. Los valores para gallinas individuales se muestran como puntos de datos. Se utilizaron puntos de datos individuales de un grupo de tratamiento para calcular la línea de tendencia para el grupo mediante regresión lineal. Panel B (partes media y derecha); La media $\pm$ DEM del peso corporal real de las gallinas que experimentan muerte súbita ($n = 19, 12, 78$ y 57 en el grupo R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3, parte media) se muestra en comparación con las de gallinas muestreadas para la recolección de tejidos a las 29, 35 y 47 semanas ($n = 4, 7, 7$ gallinas de cada grupo, respectivamente, parte derecha). *; diferencia significativa debido al nivel de ingesta de alimento (frente a las gallinas R correspondientes, $P < 0.05$). +; diferencia significativa por inclusión de 25-OH-D3 (frente a gallinas R o Ad, $P < 0.05$). Los números mostrados anteriormente medias en los paneles centrales (29, 35 o 47) indican una diferencia significativa entre las gallinas muertas frente a las sobrevivientes correspondientes muestreadas de la edad indicada ($P < 0.05$). R; restricción, Ad; ad libitum, 25-OH-D3; 25-hidroxicolecalciferol.

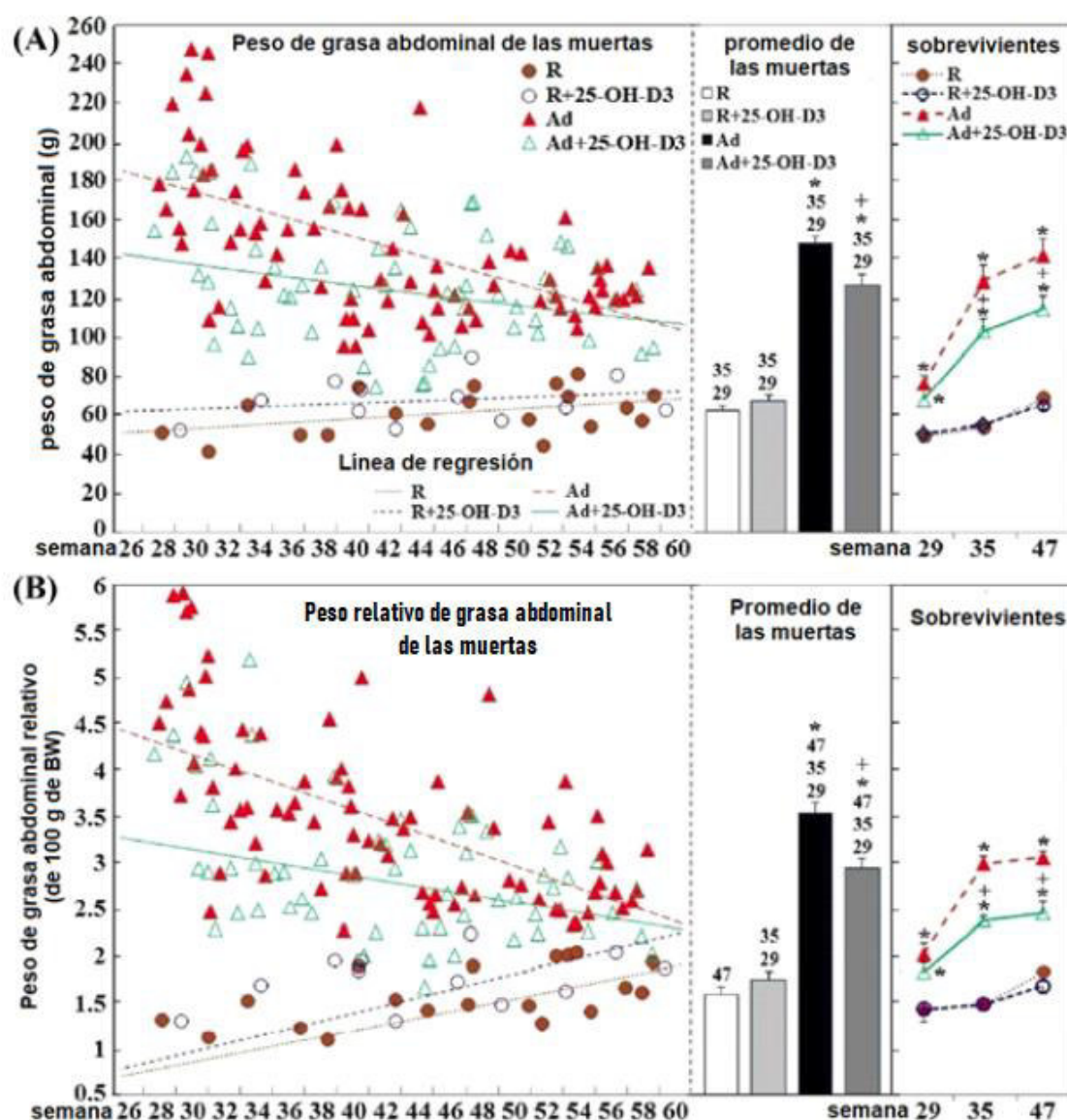


Figura 4. Efecto de suplementación dietética de 25-OH-D3 sobre el peso de la grasa abdominal de las gallinas reproductoras de pollos de engorde provistas de ingesta de alimento restringida o ad libitum. Las gallinas que sufrieron muerte súbita se sometieron a necropsia dentro de las 24 horas para determinar la composición corporal, incluyendo el peso de la almohadilla grasa abdominal real y relativo (con su propio peso corporal) de grasa abdominal como una variable continua (panel A y B, parte izquierda). Los valores para gallinas individuales se muestran como puntos de datos. Se utilizaron puntos de datos individuales de un grupo de tratamiento para calcular la línea de tendencia para el grupo mediante regresión lineal. Panel A y B (partes media y derecha); Media $\pm$ DEM del peso de almohadilla grasa abdominal real (panel A) y relativo (panel B) de las gallinas que experimentan muerte súbita ($n = 19, 12, 78$ y 57 en los grupos R, R+25-OH-D3, Ad, Ad+25-OH-D3, respectivamente, en la parte media) se muestran en comparación con aquellos de las gallinas muestreadas para la recolección de tejidos a las 29, 35 y 47 semanas ($n = 4, 7$ y 7 gallinas de cada grupo, respectivamente, en la parte derecha) *; diferencia significativa debido al nivel de alimento (frente a las gallinas R correspondientes, $P < 0.05$). +; diferencia significativa por inclusión de 25-OH-D₃ (frente a las gallinas R o Ad, $P < 0.05$). Los números mostrados anteriormente medianos en los paneles

centrales (29, 35 o 47) indican una diferencia significativa entre las gallinas muertas y las sobrevivientes correspondientes muestreadas a la edad indicada ($P < 0.05$). R; restricción, Ad; ad libitum, 25-OH-D₃;25-hidroxicolecalciferol.

5 Las gallinas que experimentaron SD en los grupos R tuvieron un promedio más alto de BW a las 29, 35 y 47 semanas, en comparación con las gallinas sobrevivientes del grupo R. Las gallinas SD del grupo AD tuvieron un BW más alto a las 29 semanas pero un BW más bajo a las 47 semanas, en comparación con aquel de las sobrevivientes correspondientes muestreadas para recolección de tejido ($P < 0.05$, Figura 3, panel B, parte media e izquierda). Excepto un nivel real más bajo a las 47 semanas en el grupo R, la muerte de todos los grupos tuvo un mayor peso y fracción abdominal a las 29, 35 y/o 10 47 semanas ($P < 0.05$, Figura 4, panel A y B, medio y parte izquierda). El análisis de regresión con BW de gallinas SD después de la normalización a sus contrapartes sobrevivientes a la misma edad (relación BW) mostró una disminución progresiva a lo largo del ensayo con una relación igual a 1 alrededor de 34 a 38 semanas en grupos de 15 Ad y 52 a 53 semanas en grupos R (Figura 3 panel B, parte izquierda). En los grupos Ad, las gallinas SD también mostraron una disminución en los pesos y fracción de grasa abdominal con el tiempo, mientras que las gallinas SD de los grupos R mostraron un aumento lento (Figura 4, panel A y B, parte izquierda). Sin embargo, todos los grupos de gallinas utilizadas para las recolecciones de tejidos planificadas mostraron un aumento dependiente de la edad del BW y el peso y fracción de grasa abdominal (Figura 3, panel 20 B, Figura 4, panel A y B, parte derecha). Estos resultados sugieren que las gallinas con mayor ganancia de BW y/o adiposidad sufren SD temprana aunque pueden exhibir una pérdida de BW antes de sucumbir.

25 La suplementación de 25-OH-D₃ alivió significativamente la frecuencia cardíaca y respiratoria a las 35 y 47 semanas en gallinas Ad que sobrevivieron a 60 semanas ($P < 0.05$, Figura 5) (interacción de Ad $\times$ 25-OH-D₃, $P < 0.032$ para la frecuencia cardíaca y $P < 0.038$ para la frecuencia respiratoria), pero no tuvo efectos significativos sobre las variables en las gallinas SD de los grupos Ad y R y sobrevivientes R. A diferencia de las contrapartes sobrevivientes, todos los grupos de gallinas SD experimentaron una 30 frecuencia respiratoria persistentemente más alta durante todo el ensayo en combinación con frecuencias cardíacas que disminuyeron significativamente a lo largo del curso experimental. Entre las gallinas SD, aquellas de los grupos Ad tenían frecuencias respiratorias más altas pero frecuencias cardíacas más bajas a las 29, 35 y/o 47 semanas en comparación con aquellas del grupo R ($P < 0.05$).

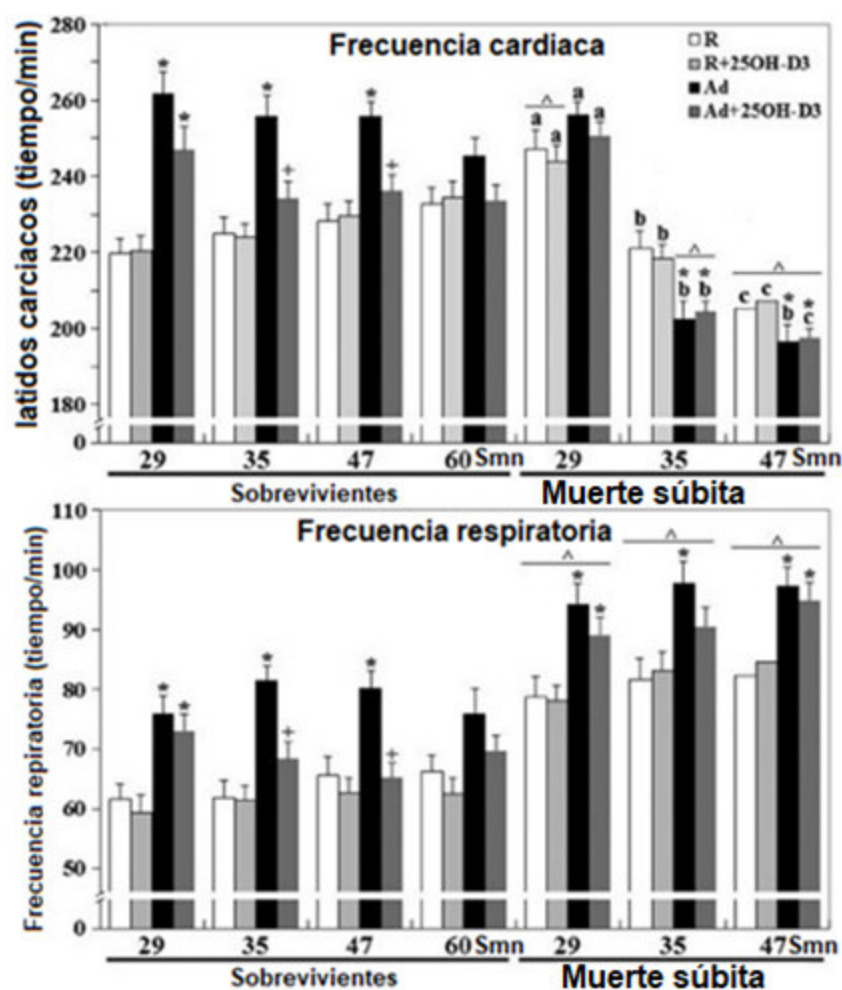


Figura 5. Efectos longitudinales de la suplementación dietética de 25-OH-D₃ en la frecuencia cardíaca y respiratoria de gallinas reproductoras de pollos de engorde provistas de ingesta restringida o ad libitum. A la edad de 29 semanas, se seleccionaron 10 gallinas de cada grupo para la monitorización de la frecuencia cardíaca y respiratoria. Las mediciones continuaron con las gallinas seleccionadas que sobrevivieron hasta los 35, 47 o 60 semanas de edad. Los resultados se separaron para proporcionar resultados para las gallinas que sobrevivieron hasta las 60 semanas de edad (para R, R+25-OH-D₃, Ad, Ad+25-OHD₃, n = 8, 8, 3 y 5 respectivamente) y las de gallinas que sufrieron muerte súbita (n = 2, 2, 7 y 5 a las 29 semanas, n = 2, 2, 5 y 4 a las 35 semanas, y n = 1, 1, 2 y 2 a las 47 semanas, respectivamente). *: diferencia significativa debido al nivel de alimentación (frente a las gallinas R correspondientes, P < 0.05). +; diferencia significativa por la inclusión de 25-OH-D₃ (vs. R o gallinas Ad, P < 0.05). ^; diferencia significativa entre gallinas muertas versus gallinas que sobrevivieron a la misma edad con el mismo tratamiento (P < 0.05). Las medias con diferentes letras superíndice dentro del mismo tratamiento son significativamente diferentes entre las edades (P < 0.05). R; restricción, anuncio; ad libitum, 25-OH-D₃; 25-hidroxicolecalciferol.

La suplementación de 25-OH-D3 no tuvo efectos significativos en el nivel de 25-OH-D3 en plasma en las gallinas R y Ad muestreadas a las 29, 35 y 47 semanas (Figura 6). Las

gallinas Ad exhibieron un mayor nivel de 25-OH-D₃ en plasma a las 35 semanas en relación con las concentraciones a las 29 y 47 semanas ($P < 0.05$, Figura 6).

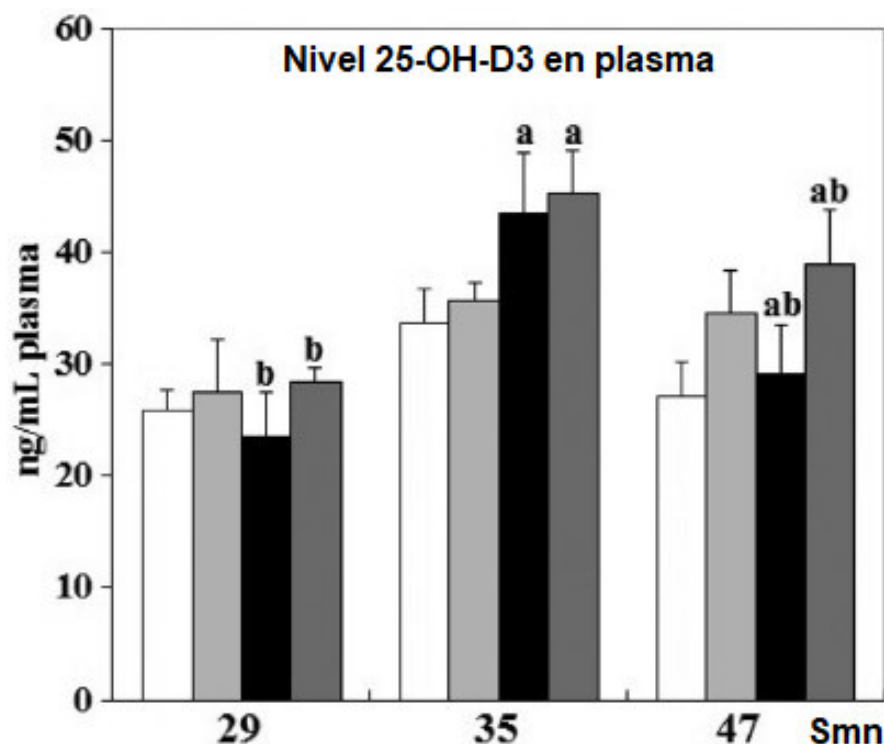


Figura 6. Efecto de la suplementación dietética de 25-OH-D₃ en los niveles plasmáticos de 25-OH-D₃ de gallinas reproductoras de pollos de engorde provistas de una ingesta de alimento restringida o ad libitum. Los valores son medias $\pm$ EEM para gallinas muestreadas a la edad de 29, 35 y 47 semanas ($n = 4, 7$ y 7 gallinas seleccionadas al azar de cada grupo en los tiempos de muestreo respectivos). Las medias con diferentes letras superíndice dentro del mismo tratamiento son significativamente diferentes entre las edades ($P < 0.05$). R; restricción, Ad; ad libitum, 25-OH-D₃; 25hidroxicolecalciferol.

DISCUSIÓN

Recientemente, informamos que la ingesta de alimento a voluntad aumentó la incidencia de SD de gallinas reproductoras en asociación con patogénesis cardíaca en un ensayo de alimentación de 10 semanas (Chen et al., 2017a, b). La provisión de alimentación a voluntad indujo un crecimiento hipertrófico cardíaco en asociación con inflamación tisular, lipotoxicidad, apoptosis celular, fibrosis intersticial y patologías periféricas que incluyen hipertensión, afecciones diabéticas, dislipidemia, que conducen a una patogénesis manifiesta, patrones ECG irregulares y contractilidad comprometida (Chen et al., 2006; Pan et al., 2012; Chen et al., 2017a, b). Los resultados actuales son consistentes con estos hallazgos anteriores y mostraron además que la inclusión de 25-OH-D₃ adicional en la dieta basal rescató efectivamente la viabilidad en gallinas Ad y gallinas R durante todo el ciclo de producción. La elevación persistente observada en la frecuencia respiratoria en combinación con una disminución de la frecuencia cardíaca en gallinas SD indica que la función cardíaca comprometida provocó la muerte. Estudios anteriores mostraron que la vitamina D tenía efectos beneficiosos sobre la salud del corazón, como la hipertrofia desadaptativa y la disfunción contráctil (Chen et al., 2011; Glenn et al., 2016; Lee et al., 2015) y sobre las señales patológicas sistémicas, incluida la hipoxia,

hipertensión, obesidad y morbilidades relacionadas (Li et al., 2002; Cozzolino et al., 2010; Pilzet et al., 2010).

Por lo tanto, se propone 25-OH-D3 para mejorar la viabilidad de las gallinas reproductoras de pollos de engorde a través de sus acciones en el sistema cardiovascular y las señales fisiológicas sistémicas. Se están realizando más estudios sobre los mecanismos de los efectos beneficiosos del 25-OH-D₃ sobre la viabilidad. Sin embargo, estos resultados sugieren que, en última instancia, las gallinas reproductoras de pollos de engorde que sucumben a SD aumentan sus tasas de corazón y respiración para mejorar su suministro de oxígeno. Sin embargo, como la progresión de los trastornos cardiovasculares, la función cardíaca se compromete y finalmente conduce a insuficiencia cardíaca y SD.

La susceptibilidad de los pollos de engorde modernos a la muerte súbita se ha atribuido a una mayor incidencia de ascitis en asociación con cardiomiopatía (Wideman et al., 2013). A diferencia de los pollos con ingesta de alimentación R (reducción del 20%) o contrapartes sanas bajo la ingesta Ad, los pollos de engorde que desarrollaron ascitis se caracterizaron por hipoxia e insuficiencia cardíaca, como lo demuestra una frecuencia respiratoria más alta pero latidos cardíacos más bajos, relación de ATP cardíaco/ADP y ATP/CrP (fosfato de creatina) (Olkowski et al., 2007; Nain et al., 2008). El presente estudio mostró que las gallinas reproductoras de pollos de engorde con mejor eficiencia alimenticia, como lo indica un mayor aumento de peso temprano que las contrapartes sobrevivientes, tenían más probabilidades de sucumbir a SD que sus contrapartes menos eficientes. Esta asociación incluso se encontró entre las gallinas en los grupos de alimentación restringida. Parece que, a pesar de invocar inicialmente cambios compensatorios para aumentar el flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno a los tejidos, las gallinas que experimentan SD finalmente progresan patológica e irreversiblemente, lo que lleva a un compromiso de la función cardíaca y la muerte. La provisión de alimentación Ad exacerba en gran medida la progresión patogénica cardíaca al provocar señales patológicas sistémicas y trastornos metabólicos y la suplementación con 25-OH-D3 limita la progresión patogénica al mejorar la obesidad y los trastornos relacionados. Antes de la muerte, el compromiso cardíaco parece producir morbilidad que conduce a la anorexia y, por lo tanto, a la pérdida de BW; aunque el monitoreo conductual de la deambulación fortalecería la afirmación y permitiría distinguirla del letargo inducido por hipoxia.

Al igual que las gallinas Ad SD, las gallinas SD de los grupos R murieron con un BW más alto (con una relación de BW decreciente igual a 1 alrededor de 34 a 38 semanas en los grupos Ad y 52 a 53 semanas en las gallinas R) a pesar de la función cardíaca comprometida a pesar de una tasa de mortalidad mucho menor. Por lo tanto, vale la pena examinar la interrelación entre la ganancia de BW y la patogénesis cardíaca dentro de la etapa de cría mientras está bajo la ingesta de alimento R, así como el rendimiento de crecimiento de la progenie producida por las gallinas R antes del ataque por SD. Además, puede ser necesaria una reevaluación y optimización de la asignación creciente de alimento para maximizar el rendimiento del huevo durante el inicio de la puesta hasta el pico para evitar la ganancia rápida de peso corporal y la progresión patogénica cardíaca, y así prevenir la SD prematura. En contraste con la curva de crecimiento estándar recomendada, una leve diferencia de ganancia de BW (20% mayor o menor) por diferentes asignaciones de alimento durante la cría hasta la etapa de puesta temprana no tuvo efectos sobre la mortalidad de las gallinas reproductoras de pollos de engorde antes de la edad de 45 semanas (Ekmy et al. al., 2012).

Curiosamente, la inclusión adicional de 25-OH-D3 no alteró los niveles plasmáticos de 25-OH-D3 tanto en la gallina R como en la gallina A. Sin embargo, el efecto del 25-OH-

D3 como agente antiobesidad (Kienreich et al., 2013) fue pronunciado en las gallinas bajo el consumo de alimento Ad. La circulación 1, 25-OH-D3 está altamente regulada para mantener un nivel constante, sin embargo, las concentraciones de su precursor, 25-OH-D3, fluctúan de 10 a 100 ng/ml, aproximadamente, 100 veces más que 1,25-OH-D3 (Fullmer, 1990; Pilz et al., 2010). La producción de 25-OH-D3 a partir del hígado y las acciones in situ, a saber, la conversión de 25-OH-D3 en 1,25OH-D3 bioactivo por CYP27B1 y la activación de VDR en los tejidos diana explican la mayoría de los efectos de la vitamina D (Pilz et al., 2010). Por lo tanto, los efectos in situ de 25-OH-D3 per se necesitan ser evaluados para posibles acciones que apoyen la mejora de la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde como se demostró aquí. A pesar de los efectos beneficiosos, se ha demostrado que la vitamina D₃ en exceso ejerce un efecto hipertensivo nocivo (Bas et al., 2006). El exceso de 25-OH-D₃, 80,000 UI/kg de alimento (2,000 µg/kg de alimento), tuvo efectos negativos y condujo a una mayor incidencia de arritmia y SD en pollos de engorde en crecimiento (Nain et al., 2007). Según los resultados actuales, la formulación regular con una dieta de 2500 UI de vitamina D/kg en forma de colecalciferol es aparentemente insuficiente para mantener la salud de las gallinas reproductoras de pollos de engorde durante la etapa de puesta. El suplemento alimenticio de 69 µg de 25-OH-D₃/kg proporcionaría 414 UI adicionales de 25-OH-D₃ por día sobre el colecalciferol de 375 UI (basado en 150 g de ingesta diaria de alimento), por lo tanto, se concluye como una dosis efectiva y segura para aliviar la patología cardíaca y rescatar la viabilidad en gallinas reproductoras de pollos de engorde.

El estudio informó por primera vez que la inclusión adicional de 25-OH-D₃ en la dieta basal mejora efectivamente la viabilidad tanto en gallinas Ad como en gallinas R. Las gallinas con una tasa de metabolismo más alta para la ganancia de BW y/o adiposidad por la ingesta de alimento o debido a una mejor eficiencia alimenticia genéticamente desarrollan un compromiso más rápido de la función cardíaca incluso bajo la ingesta de alimento R, y por lo tanto sufren SD temprana a pesar de sufrir una pérdida de BW.

DATO SUPLEMENTARIO

Los datos suplementarios están disponibles en línea en Poultry Science.

Suplementación. Tabla 1. Composición de ingredientes de las dietas de ponedoras de reproductoras de pollos de engorde iniciales

Suplementación. Figura 1. Efecto de la suplementación dietética de 25-OH-D₃ sobre el consumo de alimento y la producción de huevos de gallinas de pollos de engorde provistas de un consumo de alimento restringido o ad libitum. Los resultados se separaron en los de las gallinas que sobrevivieron hasta 60 semanas (para el grupo R, R + 25-OH-D₃, Ad, Ad + 25-OH-D₃, n = 71, 78, 32 y 53 antes de las 29 semanas, n = 67, 74, 28 y 49 durante 30 a 35 semanas, n = 60, 66, 21 y 41 durante 36 a 47 semanas, yn = 53, 60, 14 y 35 después de 48 semanas debido a 3, 7, 7 gallinas muestreadas en 29, 35 y 45 semanas para la recolección de tejido, respectivamente) etiquetados como “sobrevivientes”, y las gallinas que experimentan muerte súbita etiquetadas como “muertas” a lo largo del ensayo (para R, R + 25-OH-D₃, Ad, Ad + 25-OH-D₃ grupo, n = 19, 12, 78 y 57, respectivamente al comienzo del ensayo). Las muertes en edades posteriores se pueden calcular restando los números de muerte del número total de gallinas inicialmente asignadas a los grupos. R; restricción, Ad; ad libitum, 25-OH-D₃; 25-hidroxicolecalciferol.

RECONOCIMIENTOS

- 5 Este trabajo fue apoyado financieramente por la subvención del Ministerio de Ciencia y Tecnología, Taiwán; MOST 107-2313-B-005-036-MY3, el Centro de Biotecnología iEGG y Animal y el Centro de Innovación y Desarrollo de Agricultura Sostenible del Programa del Centro de Investigación de Áreas Destacadas en el marco del Proyecto de Educación Superior Sprout del Ministerio de Educación (MOE) en Taiwán. DSM Nutritional Products Asia Pacífico, Singapur y Texas AgriLife Research número de proyecto 8738.

REFERENCIAS

- Bas, A., I. Lopez, J. Perez, M. Rodriguez, and E. Aguilera-Tejero. 2006. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J. Bone Miner. Res.* 21:484–490.
- 5 Chen, S. E., J. P. McMurtry, and R. L. Walzem. 2006. Overfeeding-induced ovarian dysfunction in broiler breeder hens is associated with lipotoxicity. *Poult. Sci.* 85:70–81
- Chen, C. Y., H. Y. Lin, Y. W. Chen, Y. J. Ko, Y. J. Liu, Y. H. Chen, R. L. Walzem, and S. E. Chen. 2017. Obesity-associated cardiac pathogenesis in broiler breeder hens: pathological adaption of cardiac hypertrophy. *Poult. Sci.* 96:2428–2437.
- 10 Chen, C. Y., Y. F. Huang, Y. J. Ko, Y. J. Liu, Y. H. Chen, R. L. Walzem, and S. E. Chen. 2017. Obesity-associated cardiac pathogenesis in broiler breeder hens: development of metabolic cardiomyopathy. *Poult. Sci.* 96:2438–2446.
- Chen, S., C. S. Law, C. L. Grigsby, K. Olsen, T. T. Hong, Y. Zhang, Y. Yeghiazarians, and D. G. Gardner. 2011. Cardiomyocyte-specific deletion of the vitamin D receptor gene results in cardiac hypertrophy. *Circulation* 124:1838–1847.
- 15 Cozzolino, M., M. Ketteler, and D. Zehnder. 2010. The vitamin D system: a crosstalk between the heart and kidney. *Eur. J. Heart Fail.* 12:1031–1041.
- Ekmay, R. D., C. Salas, J. England, S. Cerrate, and C. N. Coon. 2012. The effects of pullet body weight, dietary nonphytate phosphorus intake, and breeder feeding regimen on production performance, chick quality, and bone remodeling in broiler breeders. *Poult. Sci.* 91:948–964.
- 20 Fullmer, C. S. 1990. Intestinal lead and calcium absorption: effect of 1, 25-dihydroxycholecalciferol and lead status. *Exp. Biol. Med.* 194:258–264.
- Glenn, D. J., M. C. Cardema, and D. G. Gardner. 2016. Amplification of lipotoxic cardiomyopathy in the VDR gene knockout mouse. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 164:292–298.
- 25 Griffin, H. D., and C. Goddard. 1994. Rapidly growing broiler (meat-type) chickens. Their origin and use for comparative studies of the regulation of growth. *Int. J. Biochem.* 26:19–28
- 30 Hocking, P. M. 2010. Developments in poultry genetic research 1960–2009. *Br. Poult. Sci.* 51(sup1):44–51.
- Julian, R. J. 2000. Physiological, management and environmental triggers of the ascites syndrome: a review. *Avian Pathol.* 29:519–527
- Kienreich, K., A. Tomaschitz, N. Verheyen, T. Pieber, M. Gaksch, M. R. Grubler, and S. Pilz. 2013. Vitamin D and cardiovascular disease. *Nutrients* 5:3005–3021.
- 35 Lee, T. W., T. I. Lee, C. J. Chang, G. S. Lien, Y. H. Kao, T. F. Chao, and Y. J. Chen. 2015. Potential of vitamin D in treating diabetic cardiomyopathy. *Nutr. Res.* 35:269–279.
- Li, Y. C., J. Kong, M. Wei, Z. F. Chen, S. Q. Liu, and L. P. Cao. 2002. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 110:229–238.
- 40

- McGovern, R. H., J. J. Feddes, F. E. Robinson, and J. A. Hanson. 1999. Growth performance, carcass characteristics, and the incidence of ascites in broilers in response to feed restriction and litter oiling. *Poult. Sci.* 78:522–528.
- 5 Nain, S., B. Laarveld, C. Wojnarowicz, and A. A. Olkowski. 2007. Excessive dietary vitamin D supplementation as a risk factor for sudden death syndrome in fast growing commercial broilers. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 148:828– 833
- Nain, S., B. Ling, J. Alcorn, C. M. Wojnarowicz, B. Laarveld, and A. A. Olkowski. 2008. Biochemical factors limiting myocardial energy in a chicken genotype selected for rapid growth. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 149:36–43.
- 10 Olkowski, A. A., S. Nain, C. Wojnarowicz, B. Laarveld, J. Alcorn, and B. B. Ling. 2007. Comparative study of myocardial high energy phosphate substrate content in slow and fast growing chicken and in chickens with heart failure and ascites. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 148:230–238.
- 15 Pan, Y. E., Z. C. Liu, C. J. Chang, Y. L. Xie, C. Y. Chen, C. F. Chen, R. L. Walzem, and S. E. Chen. 2012. Ceramide accumulation and upregulation of proinflammatory interleukin-1 β exemplify lipotoxicity to mediate declines of reproductive efficacy of broiler hens. *Domest. Anim. Endocrinol.* 42:183–194
- Pilz, S., A. Tomaschitz, C. Drechsler, J. M. Dekker, and W. Mařrz. 2010. Vitamin D deficiency and myocardial diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* 54:1103–1113.
- 20 Richards, M. P., and M. Proszkowiec-Weglarz. 2007. Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. *Poult. Sci.* 86:1478–1490
- Vanlint, S. 2013. Vitamin D and obesity. *Nutrients* 5:949–956.
- 25 Yu, M. W., F. E. Robinson, and A. R. Robblee. 1992. Effect of feed allowance during rearing and breeding on female broiler breeders.: 1. Growth and carcass characteristics. *Poult. Sci.* 71:1739–1749
- Wideman, R. F., D. D. Rhoads, G. F. Erf, and N. B. Anthony. 2013. Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: a review. *Poult. Sci.* 92:64–83.