

01674

29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO DEL ACIDO LIPOICO EN INDICADORES  
PRODUCTIVOS Y DEL ESTRES OXIDATIVO EN EL  
POLLO DE ENGORDA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS  
P R E S E N T A ;  
MARIA GUADALUPE RAMIREZ FUENTES

TUTOR: MC. ERNESTO AVILA GONZALEZ  
COMITE TUTORIAL: DR. ENRIQUE PIÑA  
MC. ANTONIO DIAZ CRUZ



MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2003

1

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**

## DECLARACIÓN

Doy mi consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis sea disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario

MVZ MA. GUADALUPE RAMÍREZ FUENTES

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo excepcional.

NOMBRE: Guadalupe Ramírez Fuentes

FECHA: 5-11-03

Guadalupe R

1

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DEDICATORIA

A mis padres Gabriel Ramírez Balderas y María Fuentes Cervantes a los que siempre me han apoyado y querido, a quien siempre amare y procurare por velar su otelo. Y si bien él no esta entre nosotros se que recibe con beneplácito esta misiva

A mis hermanos Herlinda, Javier, Lourdes, Esther, Arturo, Enriqueta, Concepción, Francisco y Patricia una gran familia que junto con mis cuñados y cuñadas me apoyan incondicionalmente y por la que me siento orgullosa, pues son tan diferentes y a la vez tan unidos.

A mi esposo Gerardo el cual siempre me ha apoyado y al que quiero seguir apoyando, su amor y su vida me motivaron para poder llevar a cabo este logro.

A mis hijas Alejandra y Maria del Carmen, pues fueron el principal motivo, por el cual me embarque en esta travesía. Si bien mi amor no les puede subsanar todos sus problemas, el empeño y la tenacidad podran ayudar.

En especial a la memoria de una gran amiga Ma. Antonieta Aguirre, por su amistad y apoyo, los cuales permanecen en mi corazón.

Es un logro que no creia, solo al verlo impreso puedo decir:  
Gracias Dios mío por que sin ti, no lo hubiera logrado.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Al centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Avícola

Al laboratorio 34 de la Unidad de Posgrado e Investigación de Medicina

Al Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica

A mis asesores al MVZ MC Ernesto Ávila González, por su valiosos conocimientos y por estar siempre atento para la realización de este estudio, gracias por todo el apoyo que me dio y por su comprensión, al MVZ MC Antonio Díaz Cruz el cual me brindó la oportunidad de superarme, al Dr. Enrique Piña por el tiempo dedicado a este proyecto, a la Dra. Raquel Guinzberg por el apoyo y sus consejos.

A mi honorable jurado por el tiempo y los consejos aportados a este trabajo En especial al Dr. Rene Rosiles por sus sugerencias al trabajo escrito.

Al personal que labora en el CEIEPA los cuales me brindaron su ayuda y amistad, en especial al Dr. Benjamín Fuentes por su apoyo y conocimientos, al MVZ Ezequiel Sánchez, Elizabeth Posadas, Jaime Esquivel, Tomas Jines y Arturo Cortes por el tiempo que me regalaron para la realización de este estudio, Al MVZ Marcos Gamez segundo grumete de la pavera y sin el cual la faena hubiera sido agotadora, A los Sres. Jorge Ovilla y Jorge Martínez por su ayuda en el trabajo diario.

A Cuauhtemoc Nava por su amistad a lo largo de estos años y el apoyo que me brindo para la impresión de la tesis, a Fermina Palma por levantarme el animo en los momentos críticos, a los chicos del centro de computo por su valiosa ayuda.

Al Dr. Miguel Beltrán por la asesoría en la fase de laboratorio.

A la División de Estudios de Posgrado en especial al MVZ Javier Flores Cobarruvias por procurar que los alumnos de posgrado no pierdan la brújula.  
Al Dr. Francisco Trigo por darme esta oportunidad.

A todas las personas que me apoyaron para que se cumpliera esta meta.

## CONTENIDO

	PAGINA
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN	
Situación actual del pollo.....	3
Alteraciones metabólicas.....	6
Estrés oxidativo.....	9
Antioxidantes .....	14
Acido lipoico.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	27
OBJETIVOS.....	28
HIPÓTESIS.....	28
MATERIAL Y METODOS	
Fase de Campo.....	29
Fase de laboratorio.....	34
Análisis estadístico.....	36
RESULTADOS	
Fase de campo.....	38
Fase de laboratorio.....	42
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	48
LITERATURA CITADA.....	49



## RESUMEN

RAMÍREZ FUENTES MA. GUADALUPE. Efecto del ácido lipoico en indicadores productivos y del estrés oxidativo en el pollo de engorda (Comité tutorial: MVZ MC Ernesto Ávila González, Dr. Enrique Piña y MVZ MC Antonio Díaz Cruz).

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la suplementación del ácido lipoico (AL) en la dieta de pollos de engorda, criados a 2235 m.s.n.m. Un total de 1008 pollitos mixtos de la línea (Ross x Ross) de un día de nacidos fueron alimentados, con una dieta a libre acceso, la energía en la etapa de inicio fue de 3100 kcal/kg EM, y en la de finalización de 3200 kcal/kg EM. Distribuyéndose en 4 tratamientos, con 6 repeticiones, cada una de ellas con 42 pollitos. Los tratamientos fueron : T1 -Dieta basal sin ácido lipoico en los 49 días. T2- dieta basal adicionada con AL de 1 – 21 días. T3- dieta basal con AL de 22 – 49 días y T4- dieta basal con AL de 1 –49 días. Se midieron indicadores productivos, mortalidad general y por síndrome ascítico (SA): en hígado del pollo la concentración de radicales  $\text{OH}^{\cdot}$  y cambios en el perfil electroforético de la catalasa, por presencia del oxígeno singulete. En la etapa de *iniciación* no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) en los parámetros productivos entre los tratamientos, a excepción de la conversión alimenticia, la cual fue mejor para el T4 ( $P < 0.05$ ). En la etapa de *finalización* se encontró en la ganancia de peso que el T4 obtuvo el mejor peso ( $P < 0.05$ ) en comparación al control y en conversión alimenticia lo tres tratamientos adicionados con AL presentaron la mejor conversión ( $P < 0.05$ ). En mortalidad por SA se encontró una disminución en el T4 con relación al control, sin diferencia con el T2 y T3. En el análisis de las 7 semanas, en ganancia de peso el T4 fue el mejor ( $P < 0.05$ ) con respecto al control y similar al T2 y T3 y en la conversión alimenticia el T2, T3, T4 presentaron diferencia ( $P < 0.05$ ) con respecto al control. La mortalidad general no presentó diferencia ( $P > 0.05$ ), mas en mortalidad por SA se disminuyó en un 41.6% en el T4 respecto al control. En la determinación de radicales  $\text{OH}^{\cdot}$ , se encontró que el T4 presentó los niveles más bajos durante las 7 semanas con respecto al control y T3 ( $P < 0.05$ ). El T2 se comportó igual que el T4 en la etapa de iniciación, aumentando los niveles en la etapa de finalización con respecto al T4 ( $P < 0.05$ ). El T3 fue similar al control en la etapa de iniciación ( $P > 0.05$ ), siendo diferentes en la etapa de finalización ( $P < 0.05$ ). Por lo que respecta a la catalasa, su perfil electroforético no se modificó en ningún tratamiento. Se manifiesta nuevamente el poder antioxidante del AL en estudio in vivo con un aumento de energía y los beneficios en el pollo en relación a los parámetros productivos y la reducción en la mortalidad por SA.

Palabras clave: Radicales libres, estrés oxidativo, ácido lipoico, antioxidantes, pollo de engorda, síndrome ascítico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## SUMMARY

RAMÍREZ FUENTES MA. GUADALUPE. Effect of lipoic acid in productives parameters and of oxidative stress. Tutorial Committee: MVZ MC Ernesto Ávila González. Dr Enrique Piña y MVZ MC Antonio Díaz Cruz.)

The objective of this study was to evaluate the addition of  $\alpha$  lipoic acid (LA) .40 ppm in diets of broilers raised at 2253 m above sea level. A total of 1008 unsexed chicks of one day age (Ross x Ross), were fed *ad libitum*, with 3100 EM kcal/kg in starting and 3200 EM kcal/kg in the finishing period. The design were 4 treatments, with 6 replicates each one with 42 birds. The treatments were: T1 control diet without LA. T2 control diet plus LA of 1-21 days, T3 control diet plus LA of 22-49 days and T4 control diet plus LA of 1-49 days of age. Productives parameters, total mortality, ascites mortality, radicals  $\text{OH}^\cdot$  and electrophoretic mobility of catalase were measure. In the starting period there were no differences ( $P > 0.05$ ) on performance, except in feed conversion that was better ( $P < 0.05$ ) in T4. In finishing period, best results ( $P < 0.05$ ) on weight gain were in T4 in relation to T1, but similar to T2 and T3. Feed conversion was better ( $P < 0.05$ ) for T2, T3 and T4. General mortality was similar among treatments ( $P > 0.05$ ), but in ascites mortality there was a reduction ( $P < 0.05$ ) of 41.6% in comparison a T1 There was a decrease ( $P < 0.05$ ) in radicals  $\text{OH}^\cdot$  in the T4 during the seven weeks similar to T2 in starter period. The treatment 3 was similar to the control, but with decrease in the radicals  $\text{OH}^\cdot$  in the finisher period ( $P < 0.05$ ). Changes of electrophoretic mobility of catalase were not observed in liver samples. This study showed the antioxidant effect of LA in tissues and the beneficial effect in broiler performance and reduction on ascites mortality.

Keywords: Free Radicals, Liver lipoperoxidation, Lipoic acid, Antioxidants, Broilers, Ascitic Syndrome.

## INTRODUCCIÓN

### SITUACIÓN ACTUAL DEL POLLO DE ENGORDA

La industria avícola en todo el mundo ha tenido un desarrollo importante en las últimas 5 décadas debido a la gran aceptación en el ámbito mundial de la carne de ave y huevo por el consumidor. La producción mundial de la carne de pollo de 1994 a 2001, tuvo un crecimiento promedio anual de 5.3%. Este continuo incremento se ha dado por las características que ostenta la carne de pollo, como son las de proporcionar una proteína de buena calidad, con un contenido calórico bajo, un costo accesible para la mayoría de la población, facilidad de importar y exportar además de estar libres de impedimentos religiosos.<sup>1</sup>

México es el sexto país productor de huevo y el cuarto productor mundial de pollo. Con una producción de más de 4 millones de toneladas de alimento al año. Existen diversas causas que favorecen el consumo de carne de pollo en nuestro país, entre las principales están: confianza en la calidad de los productos, frescura, tendencia de consumo hacia carnes con bajo contenido de grasa y con un bajo costo.<sup>1</sup>

La avicultura en México en los últimos 5 años, ha participado en el Producto Interno Bruto (PIB) en el sector agropecuario con un incremento anual del 5.2%. El sector avícola participa alrededor con un 60% de la producción pecuaria: el 29% lo aporta el pollo, 30% el huevo y 0.2% el pavo. La avicultura en México llegó en 2002 a producir 2, 261 millones de toneladas de carne de pollo. En el año 2001, el consumo per cápita de pollo fue de 20.06 kg, para el 2002 se espera que llegue a 20.09 Kg. por habitante, lo que representa un incremento de 3.5%.<sup>1</sup>

El incremento en la producción de pollo ha reforzado las investigaciones en el área de nutrición, sanidad y genética en las líneas de aves para mejorar la productividad. A

su vez el productor se ha visto en la necesidad de someter al pollo de engorda a un manejo zootécnico más intenso con el fin de sacarlo más rápido al mercado.

La exigencia comercial en la producción del pollo de engorda, en la actualidad está enfocada hacia una máxima ganancia de peso corporal. En los últimos 30 años el potencial de crecimiento de los pollos de engorda se ha manifestado con una ganancia de 25 a 45 gramos diarios, con un notable crecimiento en la primera semana, donde un pollo macho es capaz de incrementar su peso corporal en un 300%, y al usar dietas especiales llegar a un incremento de 400%; esto es extraordinario comparándolo con otras especies domésticas. Si bien el crecimiento en las siguientes semanas es un poco diferente, el pollo llega a pesar 70 veces su peso inicial en 49 días, el pollo de engorda actual es mucho más pesado en comparación a un pollo de los años 70<sup>o</sup> (Cuadro 1). Esta ganancia de peso en periodos de tiempo tan cortos, fue un éxito de las investigaciones en el área de la nutrición y la genética donde se buscó un incremento de peso en el menor tiempo del ave.<sup>2,3</sup>

Los parámetros productivos han ido incrementándose (Cuadro 1) y aunque se espera seguir mejorándolos, el pollo de engorda al aparecer esta llegando a su límite fisiológico; aun más la intensa selección genética para mejorar estos parámetros productivos, así como las condiciones de manejo y ambientales ha provocado en estos animales el evidenciar desórdenes metabólicos o funcionales.<sup>2</sup>

Diversos investigadores han hecho hincapié sobre la relación entre el continuo incremento en los niveles de producción promovido por los programas zootécnicos y la aparición de cambios patológicos en las aves. Numerosas enfermedades están relacionadas a cambios no deseables en el metabolismo, los cuales se han incrementado, amenazando la salud y el bienestar de los animales de granja. Tales trastornos se podrían explicar como una incapacidad anatomofisiológica en el caso del ave para adaptarse a una sobrecarga de estrés, al cual es sometido para su explotación.<sup>4</sup>

Ejemplo de estos trastornos son: Síndrome Ascítico (SA), Síndrome de Muerte Súbita y Problemas Locomotores entre otros. En una encuesta realizada en 29 países de los 6 continentes, la incidencia mundial de mortalidad ocasionada por el SA en el pollo de engorda para el año de 1999 fue de 3.8%, rebasando las pérdidas en producción anual de mil millones de dólares.<sup>5</sup> En México durante 1997, se produjeron cerca de 1.8 millones de pollos de engorda, de los cuales se estima que el 70 %, se ubicaron en zonas donde el SA representó el 3% de la mortalidad en granja, ocasionando una pérdida económica aproximadamente de 14.7 millones de dólares, que la convierte en uno de los principales problemas en la Avicultura Nacional.<sup>6</sup>

La aplicación de algunas medidas paliativas para prevenir la presentación del SA, como es la restricción alimenticia, que en general provoca una reducción de 100 a 150 gramos en la ganancia de peso, y el alargamiento en los días de ciclo en las parvadas, ocasiona pérdidas para el productor.<sup>7,8</sup>

Cuadro 1. Avances en el mejoramiento genético del pollo de engorda en los Estados Unidos así como proyección futura para el año 2000.<sup>2</sup>

Año	Peso (g)	Edad (días)	Ganancia diaria (g)	Conversión alimenticia	Viabilidad %
1943	1360	84	16.2	4	90.0
1963	1590	67	23.7	2.4	94.3
1983	1930	49	39.4	1.96	95.5
1993	2040	42	48.6	1.82	95.7
Proyección para el 2000	2270	38	59.7	1.7	95.5

Reddy<sup>2</sup>

## ALTERACIONES METABOLICAS

El Síndrome ascítico es el resultado de la presión de selección que han ejercido los genetistas para obtener más carne en menos tiempo, originando un desequilibrio entre las necesidades para el crecimiento de tejidos y la capacidad de los sistemas respiratorio y cardiovascular para cubrir las demandas del organismo. Esta patología es caracterizada por presentar: hidropericardio, cardiomegalia, hipertrofia cardiaca derecha, congestión crónica pasiva generalizada, aumento de la presión hidrostática venosa, edema pulmonar, hipertensión pulmonar y fluido con baja gravedad específica. <sup>9</sup> En la presentación del SA los signos pueden estar relacionados con un consumo y transporte deficiente de oxígeno ( $O_2$ ), en respuesta a una insuficiencia cardiopulmonar, aunado a los factores ambientales que pueden predisponer su presentación.<sup>10</sup>

Durante la fase de crecimiento, los tejidos del cuerpo se pueden diferenciar con respecto a las necesidades de energía, en aquellos órganos que demandan una mayor aporte de esta (músculos, plumaje) y los que se encargan de proveer el requerimiento de energía (aparato digestivo, hígado y pulmones). Ambos tejidos se caracterizan por su alta demanda de  $O_2$  para llevar a cabo esta intensa actividad. Por lo que un desequilibrio entre estos sistemas provocaría una disfunción en el aporte de oxígeno.<sup>11</sup>

Los pulmones de los pollos de engorda anatómicamente son poco eficientes para el intercambio gaseoso, esto se pudo percibir en un estudio morfométrico realizado en aves rojas silvestres, un ancestro de las gallinas domésticas, y líneas actuales de pollos. En las cuales se encontró con respecto a estas una disminución del 20- 30% del volumen pulmonar en los pollos, teniendo un aumento de 28% en la barrera aerohemática tisular y por lo tanto una capacidad de difusión de  $O_2$  de la barrera tisular aerohemática inferior (25%) en el pollo de engorda con respecto al gallo silvestre. Al parecer el incremento de la masa muscular no ha sido directamente proporcional al incremento del aparato cardiopulmonar del ave. El pollo de engorda es la especie más susceptible a la hipoxia, por lo que la capacidad cardiopulmonar puede estar funcionando muy cerca de sus límites

fisiológicos, ya que cualquier alteración en la pared de los capilares aéreos y hemáticos hará más difícil la difusión del oxígeno.<sup>12,13,14</sup>

Además de estos aspectos anatomofisiológicos en la patología del síndrome ascítico participan diversas etiologías que están interligadas con aspectos genéticos,<sup>6,15</sup> nutricionales,<sup>16,17</sup> toxicológicos,<sup>19</sup> condiciones ambientales y de manejo<sup>18,19</sup>. Algunos de estos factores que pueden predisponer a una deficiencia respiratoria relacionados al manejo zootécnico y al medioambiente donde se desarrolla el ave son:

- Al nacimiento una inadecuada tensión de oxígeno en incubadoras y nacedoras.<sup>20</sup>
- Pollitos que provienen de reproductoras con Mycoplasma o con malformaciones genéticas cardíacas.<sup>19,21</sup>
- Expuestos a la inhalación de polvo y otros irritantes como formol, o en las casetas, sometidos a programas intensos de iluminación, o criados a bajas temperaturas.<sup>22,23</sup>
- Casetas con mala ventilación y /o alta densidad poblacional.<sup>22,23</sup>
- Dietas ricas en grasas poliinsaturadas.<sup>21</sup>
- Dietas en forma granulada o peletizada.<sup>23</sup>
- Crianza en casetas en altitudes arriba de los 1500m.s.n.m.<sup>21</sup>

Las bajas temperaturas, el consumo de alimento, las enfermedades respiratorias y la demanda de O<sub>2</sub> incrementan el metabolismo basal. En resumen la suma de los factores externos e internos acentúan en el pollo de engorda un efecto de hipoxemia, condición que favorecen la presencia de diversos procesos patológicos.<sup>7,13,15</sup>

Bajo esta situación, en donde la disponibilidad de O<sub>2</sub> esta limitada, se pueden activar a nivel tisular, las enzimas fosfolipasas A y C encargadas de la producción de mediadores químicos de la inflamación, como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos a partir del ácido araquidónico. Dichos mediadores atraen células blancas, principalmente neutrófilos, las cuales son liberadoras de **radicales libres** (RL), moléculas parcialmente tóxicas para la célula, y que pueden ocasionar daño celular, provocando la entidad patológica conocida como **estrés oxidativo**.<sup>24,25</sup>

Recientemente diversos investigadores encontraron un cuadro de estrés oxidativo en pollos de engorda con síndrome ascítico. Al respecto Díaz et al. <sup>26</sup> reportaron un incremento significativo en los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés), principalmente en la sexta semana y disminución en los niveles de glutatión (G1) en la tercera semana, observable en hígado, corazón y pulmón, con diagnóstico clínico y patológico de S.A., en comparación con sus respectivos testigos (pollos clínicamente sanos). A su vez Villar et al. <sup>27</sup> administraron antioxidantes en la dieta del pollo de engorda observando una disminución en los TBARS en pollos predispuestos a SA.

De acuerdo a estas observaciones, el pollo de engorda desarrolla un cuadro de estrés oxidativo y el uso de moléculas con actividad antioxidante, modifica parcialmente los valores de algunos indicadores del estado oxidativo en el que se encuentra el ave, similar a lo observado por varios investigadores.<sup>25,26,28</sup>



## ESTRÉS OXIDATIVO

La funcionalidad de los sistemas orgánicos depende de la energía. Los organismos aeróbicos obtienen su energía de la oxidación, en este proceso los electrones son removidos de las moléculas y subsecuentemente transferidos en una cadena de reacciones a otras moléculas hasta que finalmente los electrones alcanzan su último aceptor: el oxígeno ( $O_2$ ).<sup>29</sup>

Uno de los procesos enzimáticos dependiente de oxígeno más importante es la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) vía fosforilación oxidativa, molécula que aporta la energía requerida para el organismo. Aproximadamente el 80% de ATP que utilizamos se forma en las mitocondrias en donde se consume entre el 85 y el 90% del oxígeno. La fotosíntesis y la respiración forman un circuito continuo de oxidación del agua y reducción del  $O_2$ . El oxígeno es una molécula con características paradójicas, pues si bien es necesario para la vida, también puede ser precursor de enfermedad. A menudo el estrés oxidativo se origina de un inadecuado control por la reducción del oxígeno.<sup>29</sup>

En el metabolismo del oxígeno, este puede sufrir diferentes modificaciones produciéndose especies de oxígeno altamente reactivas, las que se pueden dividir en: especies que son producto de la ruptura o de la excitación del oxígeno, o sea, el oxígeno atómico, el ozono y el oxígeno singulete y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas; esto es, el radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) los cuales al parecer también tienen un papel importante en procesos metabólicos.<sup>29</sup>

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados, ya sea por pérdida por ganancia de ellos. Las especies derivadas del oxígeno y que pueden causar daño a biomoléculas son conocidas como especies de oxígeno reactivas (ROS por sus siglas en inglés).<sup>29</sup>

La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva que su correspondiente "no radical". Los radicales libres generados por el metabolismo normal existen en concentraciones bajas de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-9}$  M. no viajan muy lejos de los sitios en donde se forman, debido a que su vida media es muy corta.<sup>29</sup>

La forma más reactiva del oxígeno es el **oxígeno singulete** ( $^1\text{O}_2$ ), que se forma cuando uno de los dos electrones libres capta energía y cambia de giro. Cuando esto sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre. Por eso hay dos especies de oxígeno en singulete, el **Ag**  $^1\text{O}_2$  que tiene los dos electrones desapareados, pero con giros opuestos y el **Eg**  $^1\text{O}_2$  en el que estos electrones se han apareado, con 22.4 y 37.5 Kcal respectivamente más que el estado basal del oxígeno. Se producen en presencia de compuestos fotocolorimétricos, los cuales pueden captar energía luminosa, estos son capaces de transferir su energía al oxígeno y formar  $^1\text{O}_2$ , también se forma en la dismutación espontánea del oxígeno, de la descomposición del ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). También los lipoperóxidos generados por algunos radicales, pueden liberar  $^1\text{O}_2$ .<sup>29</sup>

El  $^1\text{O}_2$  es muy reactivo y es capaz de reaccionar con la mayoría de compuestos celulares. Si bien este radical no se considera un radical, por no tener electrones desapareados. El  $^1\text{O}_2$  producido fuera de las células reacciona fundamentalmente con las membranas plasmáticas; el producido dentro de las células reacciona con el ADN, las proteínas y los lípidos y otros compuestos celulares, cerca de donde se produce.<sup>29</sup>

El **superóxido** ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) es un radical libre, el cual se genera cuando el oxígeno acepta un electrón en el último orbital, con lo que un electrón se encuentra desapareado. Este proceso ocurre en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria, salen de ésta y son capturados por el oxígeno.<sup>32</sup>. Esto ocurre principalmente a nivel de la semiubiquinona o del ubiquinol y también del complejo I (NADH coenzima - Qreductasa). La ubiquinona puede aceptar con

facilidad uno o dos electrones y cederlos al oxígeno. Alrededor del 1% de oxígeno consumido en la respiración genera superóxido.<sup>29</sup>

Otro lugar donde se generan es el transporte de electrones del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear. en los citocromos P<sub>450</sub>. También puede ser producido por algunas oxidasas como la NADH oxidasa de la xantina y algunas peroxidasas inespecíficas. En la oxidación de la hemoglobina, se ha calculado que la concentración del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en la célula está en el intervalo de pico a nanomolar.<sup>29</sup>

Contrariamente a lo que se piensa el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es poco reactivo. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> inhibe algunas enzimas como la deshidrogenasa del 6-fosfogluconato, la aconitasa y la fumarasa entre otras más. Reduce el Fe (III) en Fe (II). La adición de un electrón más al O<sub>2</sub><sup>•-</sup> da la formación a un no radical, el ion hidroperoxilo (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) , el cual en presencia de protones se transforma en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>29</sup>

La mayor parte del **peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** proviene de la dismutación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, aun que también algunas oxidasas lo producen como la oxidasa de la xantina. Las concentraciones del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células varían mucho dependiendo del organismo o del tejido y va desde pico o nanomolar hasta cerca del 100 mM. Es poco reactivo y se puede difundir a través de los compartimientos celulares.<sup>30</sup>

Puede formar aductos con carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Su toxicidad radica en que se pueden formar <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>). Los segundos se producen en presencia de metales de transición como el Fe<sup>2+</sup> o el Cu<sup>+</sup> (reacción de Fenton):



Si bien estos metabolitos están involucrados en procesos benéficos para el organismo, también se conoce que al haber una mayor producción de Especies de Oxígeno Reactivas (EOR), que llegan a sobrepasar a los antioxidantes para su transformación o eliminación se produce un estado patológico conocido como estrés oxidativo. En el cual se rompe el equilibrio entre los EOR y los sistemas de defensa del organismo provocando daño a diversas moléculas orgánicas.<sup>31</sup> El estrés oxidativo no es causado solo por una reacción, es debido a una serie de reacciones que llevan una secuencias entre moléculas radicales y no radicales. Finalmente el estrés oxidativo puede resultar en el daño a proteínas, DNA o lípidos.<sup>29</sup>

El proceso oxidativo más estudiado es la lipoperoxidación. este proceso puede ser dividido en 4 eventos. la reacción inicial consiste en la salida de un  $H^+$  de un ácido graso poliinsaturado en la membrana lipídica. Cuando un radical libre (RL) reacciona con un no radical, pueden formarse otros radicales libres, como sucede en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, en donde un RL iniciador remueve un átomo de hidrógeno de un metileno de la cadena de carbonos y se forma un radical de ácido graso; éste, después de varios arreglos internos, reacciona con oxígeno molecular y produce un radical peroxil lipídico que a su vez sustrae un segundo hidrógeno de otras moléculas de ácido graso.<sup>30</sup>

Así se establece una reacción en cadena autocatalítica, de manera que aunque el radical libre iniciador produce sólo efectos locales y limitados, el radical secundario y los productos de la degradación oxidativa, ocasionan la formación de radicales libres con efectos amplificados a distancia del sitio donde se formó el primer radical libre.

Subsecuentemente, en una cadena de reacciones, más y más lípidos se derivan en radicales. Finalmente la cadena de reacciones pueden pararse cuando dos radicales forman un producto estable.<sup>30</sup>

La tensión oxidativa se ha asociado con diversas entidades patológicas en humanos, como el alcoholismo, la diabetes mellitus, la artritis reumatoide, intoxicaciones con metales

pesados etc. y más recientemente hay mayor atención a este proceso patológico en otras especies.<sup>25,26</sup>

Como se explicó anteriormente en el SA se presenta un cuadro de estrés oxidativo, observándose un incremento en los lipoperóxidos, y disminución de algunos antioxidantes en hígado, pulmón y corazón, como es el caso del glutatión total. Razón por la cual diversos investigadores se han avocado en probar como influye la suplementación de antioxidantes en la prevención del estrés oxidativo. Villar et al.<sup>27</sup>, Arrieta et al.<sup>31</sup> y Valle et al.<sup>32</sup> encontraron un incremento drástico de TBARS de una semana a otra en hígado de pollo sin tratamiento alguno con un pico máximo en la tercera semana; reportando una disminución en los niveles de TBARS en hígado o pulmón o corazón del pollo de engorda (aunque no de forma constante, durante el ciclo productivo) a favor de la adición extra en la dieta de vitamina E y C y del piroxicam.

## ANTIOXIDANTES

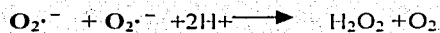
A lo largo de su evolución el cuerpo humano, ha desarrollado mecanismos de defensa para disminuir la presencia de especies de oxígeno reactivas bajo la forma de enzimas y compuestos llamados antioxidantes; estas desempeñan una importante función para la prevención de numerosas patologías, incluyendo las cardiovasculares y cerebro vasculares, cierto tipo de tumores y numerosas afecciones relacionadas con el envejecimiento. Los antioxidantes son sustancias que directamente o indirectamente protegen a las células contra los efectos adversos de xenobióticos, drogas y carcinogénicos. Una característica importante del sistema de defensa antioxidante radica en la interacción de los antioxidantes con el sistema redox (oxidoreducción) y no redox, que actúan en forma sinérgica. Los mecanismos de defensa antioxidante están localizados tanto en el medio acuoso como en el lipídico.<sup>30</sup>

Diversos compuestos biológicos importantes han sido reportados por tener funciones antioxidantes. Entre los antioxidantes liposolubles se encuentran: la vitamina E, ubiquinol o coenzina Q-10, vitamina A, Beta carotenos, fitoestrógenos y compuestos hidrosolubles como la vitamina C, melatoninas, NADH, adenosina, uratos, polifenoles, flavonoides, cisteína, homocisteína, taurina, metionina, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, tioredoxin reductasa, entre otros más.<sup>30</sup>

Varios de estos antioxidantes son atrapadores de superóxido y de otros radicales libres, o estimulan los mecanismos de desintoxicación dentro de la célula, promoviendo la prevención de muchos procesos patológicos, relacionados con la producción de radicales libres. Entre los más importantes podremos hablar de:

**SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD).** La enzima pertenece a la familia de las metaloenzimas, es la encargada de la dismutación del radical superóxido para convertirlo en peróxido de hidrogeno. Una cantidad baja de superóxido, es constantemente generada en

superóxido reduce al Fe III a Fe II y si se libera del medio donde se encuentra, éste puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno y producir radicales hidroxilo.<sup>30</sup>



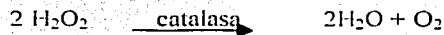
Cuatro clases de SOD han sido identificadas conteniendo SODCuZn, SODFe, SODMn. En los humanos se han identificado tres formas de SOD: La citosólica, la mitocondrial y la extracelular.<sup>30</sup>

**GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX).** Esta enzima es selenio- dependiente, ya que un residuo de selenio-cisteína, esencial para la actividad de esta enzima, está presente en el sitio activo de la misma. Esta enzima es el ejemplo más importante de este tipo de peroxidasa, cataliza la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de una variedad de hidroperóxidos, a expensas del glutatión de tal modo que protege las células contra el daño oxidativo.<sup>29</sup>



Por lo menos se han encontrado 5 isoenzimas de GPX en mamíferos. En diferente proporción dependiendo de los diferentes tejidos.<sup>30</sup>

**CATALASA.** Es una enzima que está formada de cuatro tetrameros idénticos, por lo tanto tiene cuatro grupos ferriprotoporfirínicos por molécula. La catalasa es una de las más eficientes enzimas conocidas. En animales la catalasa y la glutatión peroxidasa detoxifican el  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>31</sup> La catalasa reacciona con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando agua y una molécula de oxígeno, donando un  $\text{H}^+$ .<sup>29</sup>



**VITAMINA C.** Es un cofactor esencial en diversas hidroxilasas, agregando estabilidad a la triple hélice de colágeno, pero además es un antioxidante ya que actúa sobre los radicales libres, neutralizando especies como el  $H_2O_2$ , el  $O_2$  y el ácido hipocloroso, y como regenerador de la vitamina E. En el curso de estas reacciones, la vitamina C se transforma en ácido dihidroascórbico, el cual puede ser reciclado nuevamente a ácido ascórbico por diversos mecanismos, entre ellos la acción del glutatión (GSH) que es, de por sí un antioxidante fundamental involucrado en la destrucción de hidroperóxidos.<sup>30</sup>

**VITAMINA E.** Compuesto esencial, tiene 3 carbonos asimétricos por lo que hay estereoisómeros. Las células incorporan el tocoferol de las lipoproteínas a las membranas plasmáticas. Como se sabe la vitamina E es el mejor protector antioxidante de la lipoperoxidación de las membranas y si bien la poza de esta vitamina es menos de 0.1 nmol/mg de proteína de membrana y la lipoperoxidación de la membrana puede ser generada a un ritmo de 1/5 nmol/mg de pm, la actividad antioxidante puede ser explicada por la habilidad de otros antioxidantes que están involucrados en su regeneración, no permitiendo la lipoperoxidación de dichas membranas.<sup>30</sup>

**CAROTENOIDES.** El interés hacia los carotenoides se ha incrementado, debido a que algunos de estos pigmentos, además de ser provitamínicos, han demostrado tener capacidad de protección contra el daño fotooxidativo en tejidos de humanos. Debido a las dobles ligaduras coordinadas que tienen son excelentes desactivadores del  $^1O_2$ . En los organismos fotosintéticos sirven para absorber la luz y para desactivar el  $^1O_2$  que se genera en este proceso. En el hombre puede tener esa función pues en la piel se disminuyen los niveles de carotenos con la exposición a la luz. Los carotenos también reaccionan con los radicales peróxido y el  $NO_2$ , generando un radical estable que puede ser reducido por el ascorbato. Algunos de los carotenoides utilizados como antioxidantes son el  $\beta$ -caroteno, licopeno y la cantaxantina entre otros.<sup>33</sup>



## ANTIOXIDANTES EN LA ALIMENTACIÓN DE AVES

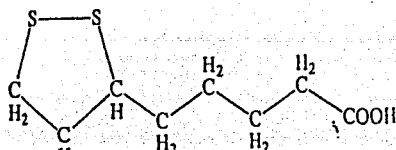
Se conocen diversos antioxidantes para prevenir la tensión oxidativa, los cuales se han utilizado en diversas investigaciones para determinar su eficiencia antioxidante en humanos y ratas, como son las vitaminas, enzimas y drogas. En pollos el uso de antioxidantes es de rutina, ya sea para la prevención del enranciamiento del alimento o para la prevención de patologías donde se encuentra involucrado la lipoperoxidación. Como es el caso de degeneración del músculo, hemorragias del hígado en pollas productoras de huevo. Algunos de estos oxidantes utilizados son: vitamina E, selenio y caroteno.<sup>28,31,33</sup>

Botje et al.<sup>28</sup> utilizaron vitamina E en aves para disminuir algunos indicadores del estrés oxidativo presentes en el síndrome de hipertensión pulmonar (PHS) nombre con el que también se describe al SA. Y en forma reciente Serret<sup>34</sup> administró ácido lipoico en dietas para pollo de engorda observando una disminución en algunos indicadores del estrés oxidativo.

El ácido lipoico es una molécula que ha mostrado ser un excelente atrapador de radicales OH\* y que además potencializa el efecto antioxidante de la vitamina E: así como también, se le atribuyen los siguientes efectos: actúa sobre otros radicales como el oxígeno singulete, superóxido, radicales peróxilo, además de tener acción quelante sobre minerales de transición, y promueve la regeneración de otros antioxidantes, por lo que se le da el nombre de antioxidante universal.<sup>35</sup>

## ACIDO LIPOICO (AL)

$\alpha$ -ácido lipoico



ácido dihidrolipoico

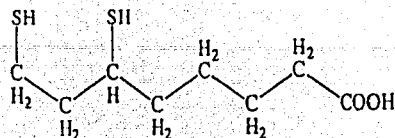


Figura 1. Estructura molecular del  $\alpha$  ácido lipoico

También conocido como alfa lipoato, ácido thiotico, y ácido 1,2-dithiolane-3-pentanoico, esta presente en células procariontes y eucariontes. Se conoce desde 1950 como un factor esencial en el metabolismo oxidativo, y se purificó en 1951.<sup>36</sup> El ácido lipoico (Figura 1) fue clasificado tentativamente como vitamina después de su aislamiento, pero posteriormente se encontró que era sintetizado en plantas y animales. El ácido lipoico (AL) esta formado por una cadena de 8 carbonos, conteniendo un grupo thiol. En forma libre es insoluble en agua, y soluble en solventes orgánicos como el benceno, éter etílico y metanol.<sup>35</sup>

El ácido lipoico se encuentra unido como una lipoamina a las proteínas en el residuo lisil, actuando como un cofactor en varias enzimas del complejo de las 2-oxoácido deshidrogenasas que están involucradas en la formación de energía.<sup>35</sup> Al unirse el grupo acil y transferir de un complejo enzimático a otro, el ácido lipoico es reducido ácido dihidrolipoico (DHLA por sus siglas en inglés), el cual es subsecuentemente reoxigenado por la lipoamina desdihidrogenasa (Lip-DH) con la formación de NADH. Por lo que el ácido lipoico y el DHLA actúan acoplados como acarreadores de electrones del sustrato a la deshidrogenasa y al  $\text{NAD}^+$ . Como lipoamina funciona como un cofactor en diversos

procesos (Figura 2). En el complejo que cataliza la descarboxilación oxidativa de piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato y cadena de ramificación de los cetoácidos. Los complejos enzimáticos que catalizan estas reacciones comparten estructuras similares.<sup>35</sup>

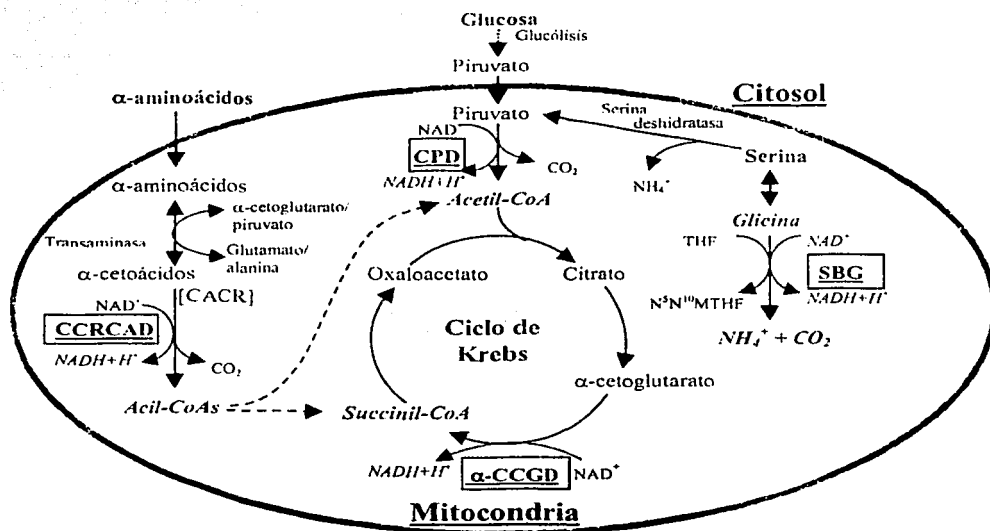


Figura 2. Sitios de acción del ácido lipoico en el metabolismo energético. CPD, complejo piruvato deshidrogenasa;  $\alpha$ -CCGD, complejo  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa; CCRCAD, complejo cadena ramificada del  $\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa; SBG, sistema barredor de la glicina; CACR,  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada; THF, tetrahidrofolato;  $N^5N^{10}$ MTHF,  $N^5N^{10}$ -metilen tetrahidrofolato.

#### DISPONIBILIDAD DEL ÁCIDO LIPOICO

El AL se encuentra en diversos alimentos, especialmente alimentos de origen animal y la relación de AL está en función a la actividad metabólica del tejido, por lo que,

ha mayor actividad más alto el contenido de AL. por ejemplo el corazón de cerdo contiene de 1.1 – 1.6 mg/Kg. mientras que el músculo del becerro contiene de 0.07- 0.15 mg/kg. <sup>37</sup>

En el proceso digestivo las enzimas proteolíticas no rompen efectivamente la unión entre el AL y la lisina . Por lo tanto se ha sugerido que el AL se absorbe como lipoilisina . El ácido lipoico que se consume es fácilmente absorbido en el intestino y transportado a varios tejidos para su catabolismo y convertido en los tejidos en ácido dihidrolipoico en el metabolismo intracelular <sup>35</sup>

Dos diferentes medios de transporte han sido reportados para el AL; mediante un transporte con acarreador en concentraciones bajas y por difusión pasiva cuando las concentraciones son altas. Se ha demostrado que el ácido octanoico fue directamente precursor del ácido lipoico. 6 thiooctanoano y 8 thiooctanoato, lo cual es posible como un intermediario en la biosíntesis del ácido lipoico. La thiolacion puede estar a cargo de los residuos de cisteína, y se reportó que se sintetizaba en unión a una proteína sin embargo no ha sido posible conocer completamente la vía metabólica para la biosíntesis de novo del ácido lipoico. <sup>35</sup>

Las dosis terapéuticas que se han administrado tanto en animales como humanos exceden por mucho las del consumo por alimentos. En ratas se han administrado dosis intravenosas de 10 mg/kg. y en humanos de 1200 mg/kg. Cuando el ácido lipoico es oralmente administrado, es rápidamente absorbido y transportado a los tejidos y tomado por las células para ser reducido a ácido dihidrolipoico (ADHL) y liberado fuera de las células. <sup>38</sup>

Baker et al. <sup>38</sup> compararon las concentraciones de lipoato en fluidos biológicos y en tejidos obtenidos de humanos sanos, a los cuales se administró 200 mg de DL- $\alpha$  ácido lipoico, encontrando que el pico máximo de concentración, se daba a las 2 hrs. descendiendo en forma regular hasta llegar a un nivel basal a las 24 hrs. de haber sido administrado. La vida media en el plasma es de aproximadamente de 30 min.

Como el ácido lipoico se encuentra unido a proteínas como una lipoamina en 5 complejos multienzimáticos, que se encuentran en la mitocondria (Figura3), la forma libre del ácido lipoico no se ha detectado en forma natural. Sin embargo, después de una aplicación terapéutica, el ácido lipoico puede ser encontrado en la circulación. Por lo que es probable que sus efectos terapéuticos se originan de la forma libre y no del complejo.

35,38,39

#### METABOLISMO DEL ACIDO LIPOICO :

El AL puede ser reducido al ditiol DHLA, y se ha observado que la forma reducida contribuye mayormente a la actividad antioxidante del AL en vivo. Por lo que se han estudiado los mecanismo de reducción. Se ha encontrado que la reducción del ácido lipoico es específica de cada tejido ya sea en el citosol o en la mitocondria y aparentemente la actividad reductora está correlacionada con las cantidades relativas y de las enzimas involucradas y también con el contenido de mitocondrias.<sup>40</sup>

La reducción del AL se lleva a cabo, por la lipoideshidrogenasa (LD) que se encuentra en la mitocondria y la glutatión reductasa (GR) en el citosol, ambas enzimas a expensas del NADPH.<sup>40,41</sup>

Recientemente, se ha encontrado que la thioredoxina reductasa (TR), una enzima citosólica que cataliza la reducción de la thioredoxina oxidada dependiente de NADH, reduce eficientemente al AL.<sup>42</sup> En hígado parece que la reducción del lipoato esta a cargo de la glutatión reductasa. En contraste en el corazón la reducción esta casi completamente a cargo del la dihidrolipoamin reductasa.<sup>41</sup> En la Figura 3 se reseña la forma en que el ácido lipoico es reducido.

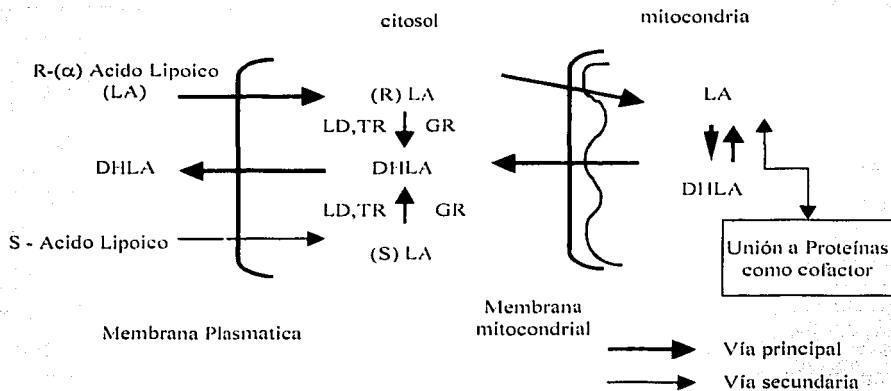


Figura 3 Vías enzimáticas involucradas en la reducción ácido lipoico. LA ácido lipoico; DHLA ácido dihidrolipoico; LD lipoideshidrogenasa; TR thioredoxina reductasa; GR glutation reductasa.

## QUELACIÓN DE METALES

El AL puede proveer actividad antioxidante debido a la quelación del hierro. Esta conclusión está basada en resultados que probaron la actividad del AL en un medio conteniendo desoxirribosa y hierro, en ausencia de AL se inducía la degradación de desoxirribosa al adicionar el Fe, con la consiguiente producción de  $\text{OH}^+$ . En presencia de AL se encontró que este removía la desoxirribosa del complejo desoxirribosa - Fe.<sup>43</sup>

En solventes polares pero no acuosos, han demostrado que el AL forma complejos con  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , y  $\text{Pb}^{2+}$ . Más no con el  $\text{Fe}^{3+}$ . Así mismo la forma reducida puede quelar al  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  resultando en un complejo soluble en agua. Evidencias muestran que la forma reducida DHLA forma complejos más estables con el  $\text{Fe}^{3+}$  que con el  $\text{Fe}^{2+}$ .<sup>44</sup>

En intoxicaciones por metales pesados, la forma libre del AL y sus metabolitos son capaces de atrapar los metales en la circulación, de tal forma que previene el daño causado por el metal. En la polineuropatía diabética el ácido lipoico libre puede entrar al tejido nervioso y prevenir el daño oxidativo relacionado con la glucosa. En vivo hay indicaciones de la actividad antioxidante a través de la quelación de metales; en ratas el AL previno la lipoperoxidación inducida por  $Cd^{2+}$  en cerebro, corazón y testículos.<sup>30</sup>

### CAPACIDAD DEL AL COMO ATRAPADOR DE RADICALES LIBRES

Matsugo et al.<sup>45</sup> confirmaron la función de barredor de radicales hidroxilo por el DHAL, el cual a una concentración de 0.5 mM eliminó completamente los radicales hidroxilo producto de dimetil pirolino oxidado DMPO, medidos por resonancia del Spin (ESR). Así de manera similar se encontró que las dos formas del ácido lipoico disminuyen la concentración de ácido hipocloroso (HOCL), aunque se observó que la forma reducida era más efectiva.<sup>35</sup>

Como barredor del oxígeno singulete, se probó en un medio con solventes orgánicos demostrando su efectividad, en un experimento realizado por autoxidación del Rubreno, o por oxidación del metileno.<sup>46</sup> También se observó que el ácido lipoico disminuye la producción de óxido nítrico en macrófagos, con diferentes dosis, mostrando significancia con una dosis de 200  $\mu$ M.<sup>47</sup>

Se han desarrollado pruebas para determinar la actividad antioxidante del AL y DHLA in vivo. En ratas adultas se ha suplementado el DL- $\alpha$ -l ácido lipoico, mostrando un decremento en los niveles de lipoperoxidación, con un incremento del glutatión, vitaminas C y E; como también, en la actividad de algunas enzimas mitocondriales como la isocitrato deshidrogenasa, alfa cetoglutarato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa,

NADH deshidrogenasa y citocromo oxidasa, por lo que se presume pueden disminuir el riesgo de daño oxidativo ocurrido por la edad.<sup>48</sup>

Williams et al.<sup>49</sup> administraron ácido lipoico como antioxidante en caballos maduros castrados. Los resultados mostraron que 10 mg/Kg, redujeron moderadamente el estrés oxidativo. En todas estas pruebas fue imposible determinar específicamente los mecanismos de la actividad antioxidante esto es, si fue por quelación de metales, como barrido de ROS, como regenerador de antioxidantes endógenos, o reparador del daño oxidativo.

## INTERACCIONES CON OTROS ANTIOXIDANTES

Los atrapadores de ROS especialmente de radicales, son eficientes solo cuando la forma relativamente estable del producto oxidativo puede ser fácilmente regenerado o degradado a través de un conjunto de reacciones cooperativas, donde los diferentes antioxidantes interactúan unos con otros. Por ejemplo: El glutatión y la vitamina C, son moléculas endógenas que toman parte en la regeneración de antioxidantes oxidados, después de que la vitamina C atrapa el radical esta se transforma en un radical ascorbilo, el cual es regenerado por otros antioxidantes, interviniendo el GSH y el NADH para su restablecimiento.<sup>30</sup>

La vitamina E es el principal antioxidante en las membranas biológicas y si bien se encuentra en baja proporción molar en comparación a la producción de radicales lipoperoxilos, su poder antioxidante se puede explicar gracias al "reciclaje" del cual es objeto por parte de otros antioxidantes (Figura 4).<sup>29,30</sup>

En diversos estudios realizados con el AL, se observó que después de la regeneración del DHLA, éste es capaz de contribuir a la regeneración no enzimática del GSH y vit. C.<sup>30</sup>



Xu et al.<sup>50</sup> estudiaron la regeneración de vitamina C en mitocondria de hígado de rata, observando que en presencia de NADH y con la adición de AL, se mostró un incremento en los niveles de vitamina C. Se ha observado que al combinar DHAL mas glutatión oxidado se prevenía la lipoperoxidación por el supuesto reciclamiento de la vitamina E. También se demostró que el ácido lipoico causa un aumento intracelular del glutatión.<sup>51,52</sup>

Se han diseñado diferentes experimentos para observar los efectos del AL como regenerador de antioxidantes in vivo. En cerdos de guinea, se observó que se prevenían los síntomas de escorbuto, en animales deficientes en vitamina C, con la administración de AL en la dieta.<sup>35</sup> En un estudio realizado por Maitra et al.<sup>53</sup> para probar la actividad regeneradora del AL sobre la vitamina C en ratas sanas recién nacidas, se mostró que la administración de AL no afectaba los niveles de vitamina C, los cuales se cuantificaron en el cristalino del ojo. Sin embargo cuando se suministró BSO, compuesto que disminuye los niveles de vitamina C, se observó que al incluir AL, éste restableció los niveles de la vitamina. De igual forma sucedió con la vitamina E.

La regeneración de GSH por el AL también ha sido evaluada tanto en sujetos sanos como sometidos a estrés oxidativo. Se midieron los niveles de GSH en hígado, riñón y pulmón, de ratas sanas y después de la administración de AL, se encontró que los niveles de GSH se incrementaban. Y en animales sometidos a estrés oxidativo, el AL previno la depleción de GSH.<sup>35</sup>

Serret<sup>34</sup> administró AL a pollos de engorda, encontrando que los niveles de GSH aumentaban en comparación al testigo, disminuyendo la presentación del Síndrome Ascítico; patología como ya se mencionó presenta un cuadro de estrés oxidativo. De lo anterior se deduce que el AL es un buen regenerador in vivo de la vitamina C, vitamina E y el GSH.

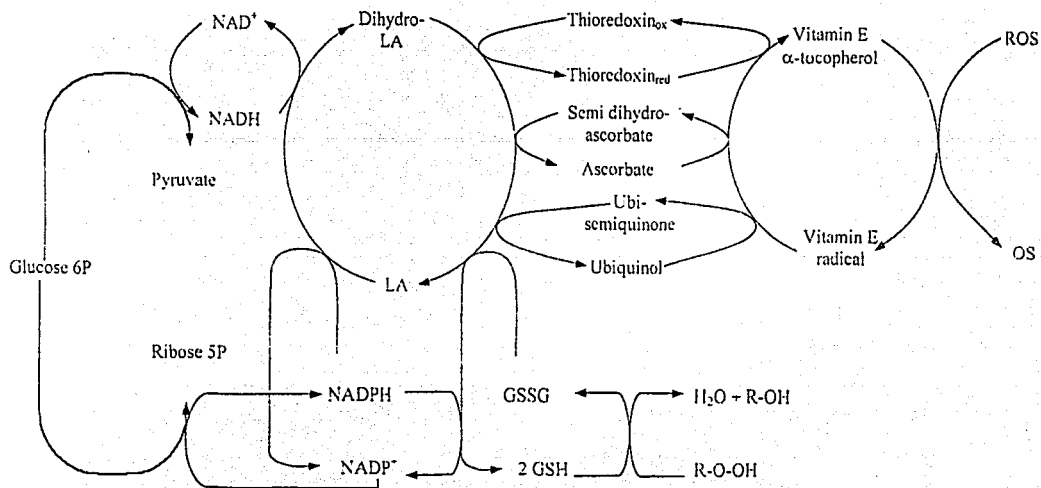


Figura 4. Participación del ácido lipoico en el sistema de regeneración de antioxidantes, involucrados en la eliminación de especies de oxígeno reactivas (ROS) (Modelo propuesto Por Parker<sup>35</sup> y adaptado por Piña E.)

Mucho del interés actual del ácido lipoico se centra en sus propiedades antioxidantes; las cuales han sido demostradas desde 1959, considerándose a la fecha como un antioxidante universal por sus características, entre las que se encuentran la fácil absorción, conversión rápida a su forma reducida, funciona en solución acuosa, tiene actividad quelante con algunos metales y actúa sinérgicamente con otros antioxidantes regenerándolos y finalmente hay evidencia de que puede tener efecto en genes y proteínas reguladoras del crecimiento y metabolismo.

## JUSTIFICACIÓN

Con base en las ventajas que posee el ácido lipoico sobre la condición del estrés oxidativo y tomando en cuenta que el pollo de engorda desarrolla durante su ciclo productivo un estado de estrés oxidativo, se decidió evaluar la influencia antioxidante del ácido lipoico sobre la producción de radicales  $\text{OH}^\cdot$ ; así como su posible repercusión en los parámetros de productividad comercial del pollo de engorda, además de determinar si la inclusión del ácido lipoico en la dieta del ave puede ser parcial (etapa de iniciación o finalización) o total (ciclo completo).

## **OBJETIVOS**

Evaluar la participación del ácido lipoico, sobre la producción de especies reactivas al oxígeno (radicales hidroxilo y oxígeno singulete).

Evaluar el uso del ácido lipoico como un suplemento alimenticio, a través de los parámetros de productividad comercial en el pollo de engorda.

Evaluar en el pollo de engorda el efecto del ácido lipoico, en la incidencia del cuadro de síndrome ascítico.

Evaluar si el ácido lipoico, posee un efecto preventivo o correctivo sobre el estrés oxidativo en el pollo de engorda.

## **HIPÓTESIS**

El ácido lipoico suplementado en la dieta, disminuye la concentración de radicales hidroxilo en el hígado de las aves.

La inclusión del ácido lipoico en la dieta para pollo de engorda, representa una ventaja sobre los parámetros de productividad, así como la disminución del síndrome ascítico.

## MATERIAL Y METODOS

El trabajo se realizó en dos partes: una de campo y otra de laboratorio.

### FASE DE LABORATORIO

La prueba de campo se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en Santiago Zapotitlán, Delegación de Tlahuac en el Distrito Federal, a una altura de 2250 metros sobre el nivel del mar. El clima de la región esta clasificado como templado subhúmedo, con bajo grado de humedad, con una precipitación anual de 747 mm, siendo Enero el mes más frío y Mayo el más caluroso.<sup>54</sup> Las determinaciones analíticas, se realizaron en el Departamento de Bioquímica, laboratorio 34 de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Se utilizó una caseta de ambiente natural con piso de cemento, cortina de lona, que fue encalada y desinfectada una semana antes del arribo del pollo. En las dos primeras semanas se utilizaron bebederos de 4 litros y comederos de plato. Posteriormente se cambiaron por comederos tipo tolva y bebederos automáticos de campana, los cuales se utilizaron durante el resto del ciclo.

Se emplearon criadoras de gas infrarrojas que se prendieron el día antes de la llegada de los pollos, iniciando con una temperatura de 32°C. en la primera semana. En las siguientes semanas (2,3,4), se fue reduciendo 2°C. semanalmente, retirando la criadora al final de la cuarta semana; posteriormente se reguló la temperatura con las cortinas hasta el final de la crianza. El acceso al alimento y agua de bebida fue *ad libitum*.

Las dietas se elaboraron en la planta de alimentos del CEIEPA, preparando el alimento a base de dietas sorgo-soya (Cuadro 2), que cubren las necesidades de nutrientes

del pollo de engorda (Cuca et al, 1996). tanto en la etapa de iniciación (0-3 semanas) con 3100 kcal/kg EM y la de finalización (4-7 semanas) con 3200 kcal/kg. EM. Estos niveles de EM, respectivamente fueron para promover un rápido crecimiento y mayor mortalidad por Síndrome Ascítico. En el Cuadro 3 se muestra el análisis calculado de las dietas. Las premezclas mineral y vitamínica de la dieta basal se indican en los Cuadros 4 y 5.

Cuadro2. Composición de las dietas empleadas para iniciación y finalización.

<i>INGREDIENTES</i>	<i>INICIACIÓN %</i>	<i>FINALIZACIÓN %</i>
Sorgo	549.40	590.55
Pasta de Soya	360.90	307.86
Aceite vegetal	47.00	57.96
Fosfato de calcio	18.65	16.48
Carbonato de calcio	14.40	13.06
Sal (NaCl)	4.40	3.88
DL-Metionina	2.14	1.78
Minerales	1.00	1.00
Cloruro de colina 60%	1.00	0.80
Cocciostato	0.50	0.50
Vitaminas	0.25	0.25
Antioxidante	0.15	0.15
Bacitracina de cinc	0.10	0.30
L-lisina HCl	0.092	0.1
Pigmento amarillo	0.00	5.33
<b>Total de Kg</b>	<b>1000.0</b>	<b>1000.0</b>

Cuadro 3 Análisis calculado de las dietas en las dos etapas

NUTRIENTE	INICIACION	FINALIZACION
Proteína cruda (%)	22	20
Energía metabolizable (Kcal/Kg)	3100	3200
Lisina (%)	1.2	1.1
Metionina (%)	0.58	0.57
Metionina + Cistina (%)	0.90	0.85
Treonina (%)	0.82	0.77
Calcio total (%)	1.00	.90
Fósforo disponible (%)	0.5	0.45

Cuadro 4 .Composición de la premezcla mineral utilizada en las dietas por tonelada de alimento.

MINERALES	CANTIDAD	FUENTE
Hierro	110.0g	Sulfato ferroso
Zinc	50.0g	Oxido de Zinc
Manganeso	110.0g	Oxido de Manganeso
Cobre	12.0g	Sulfato Cúprico
Yodo	0.3g	EDDÍ
Selenio	0.1g	Selenito de Sodio
Cobalto	0.2g	Carbonato de Cobalto
Excipiente c.b.p.	1,000.00g	Carbonato de Calcio

Cuadro5 Composición de la premezcla vitamínica utilizada en las dietas por tonelada de alimento

VITAMINA	CANTIDAD	FUENTE
Vitamina A	12,000.000 UI	Acetato de retinilo blindado
Vitamina D <sub>3</sub>	2,500.000 UI	Colecalciferol irradiado y blindado
Vitamina E	30,000 UI	Acetato de DL $\alpha$ - tocoferilo ascorbato
Vitamina K	2.00 g	Bisulfito sódico de menadiona
Vitamina B1	2.25g	Clorhidrato ó mononitrato de tiamina
Vitamina B2	7.50g	Riboflavina
Vitamina B6	3.50g	Clorhidrato ó mononitrato de piridoxina
Vitamina B12	20.00mg	Cianocobalamina
Niacina	45.00g	Nicotinamida
Acido pantoténico	12.50g	D- pantotenato de calcio
Biotina	125.00mg	D- biotina
Acido fólico	1.50g	Folacina
Antioxidante	25.00g	TBHQ, BHT y ETQ
Vehículo e.b.p.	2,500.00	Vegetal y mineral

A estas dietas se adicionó el ácido lipoico, para contar con los 4 tratamientos indicados a continuación:

Tratamientos	Fase de iniciación (0 – 21 días)	Fase de finalización ( 22 –49 días)
T1 Dieta control	sin ácido lipoico	sin ácido lipoico
T2 Inclusión de 1-21 días	con ácido lipoico*	sin ácido lipoico
T 3 Inclusión 22-49 días	sin ácido lipoico	con ácido lipoico*
T4 Inclusión de 1-49 días	con ácido lipoico*	con ácido lipoico*

Dosis de ácido lipoico 40 ppm -\*



El trabajo biológico se realizó de Febrero a Marzo del 2002 con una duración de 49 días. Se emplearon 1008 pollitos mixtos de un día de edad ( Línea Ross x Ross ) provenientes de una incubadora comercial; los cuales fueron recibidos el primer día con vitaminas y electrolitos en el agua de bebida. Los pollos se distribuyeron en forma aleatoria, pesándolos antes de su traslado a los 24 corrales (unidades experimentales), las cuales tenían cama de viruta. Cada tratamiento estuvo conformado por 252 pollos, repartido en 6 repeticiones con 42 animales cada repetición. La asignación de los tratamientos a las unidades experimentales fue completamente aleatoria. El manejo sanitario consistió en la inmunización contra la enfermedad de Newcastle (vacuna vía ocular y emulsionada vía subcutánea, en el primer tercio posterior del cuello) a los 10 días de edad.

El comportamiento productivo fue obtenido con los datos obtenidos , en la semana 1,3 y 7 en cada lote tomando en cuenta :

La ganancia de peso corporal la cual se determinó pesando a los animales por lote y dividiéndolo entre el número de animales pesados.

El consumo de alimento se realizó restando la cantidad de alimento suministrado por semana menos el sobrante en el comedero.

La conversión alimenticia se calculó dividiendo el consumo de alimento semanal entre el peso final de semana menos el peso inicial de la semana.

El programa de mortalidad general y por SA se determinó al dividir el número de los pollos muertos entre el número total en los dos periodos (iniciación y finalización).

## FASE DE LABORATORIO

En forma semanal de cada tratamiento, se tomaron 4 pollos al azar para su sacrificio, utilizados para la evaluación de radicales  $\text{OH}^\cdot$  y para la electroforesis de la catalasa fue cada 15 días. La parte del análisis de las muestras se realizó en el laboratorio 34 de la Unidad de Posgrado e investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la obtención de los órganos, primero se sacrificó al pollo por desangramiento e inmediatamente se procedió a la obtención del hígado, del cual se tomaron 2 porciones, las cuales se sometían a lavado en agua destilada y fría, eliminando la sangre pegada e inmediatamente una porción del hígado se congelaba en nitrógeno líquido, para posteriormente trabajarla en la electroforesis de la catalasa. Otra porción de hígado se utilizó para la determinación de radicales  $\text{OH}^\cdot$ .

### DETERMINACIÓN DE RADICALES $\text{OH}^\cdot$ \*

Las técnicas para la determinación de radicales hidroxilo se basan principalmente en determinaciones indirectas, por las reacciones que se forman entre el radical hidroxilo y el compuesto barredor de esta especie y su posterior análisis por espectrofotometría y HPLC etc. En el presente estudio la cuantificación de radicales  $\text{OH}^\cdot$  se llevó a cabo por la técnica descrita por Nash.<sup>56</sup>

Después de sacrificado el pollo, se procedió a tomar un gramo del hígado, se lavó de inmediato en agua fría, y se maceró en 5 ml. de ácido tricloroacético al 20%. posteriormente se tomó una alícuota (.5ml) de macerado y se agregó a una solución de Krebs Ringer adicionado con 0.1 mM de  $\text{FeCl}_3$  + EDTA 0.2 mM a pH 7.4 para evitar la formación de superóxido, y 33 mM dimetilsulfóxido como sustrato reaccionando con los radicales  $\text{OH}^\cdot$ , con la consecuente producción de formaldehído (Hallinan<sup>57</sup>). Se procedió a centrifugar a 10.000 rpm durante 7 min. para la obtención de un sobrenadante, del cual

se tomó 1 ml adicionándose 1 ml de mezcla del reactivo de Nash <sup>56</sup>, dejándolos durante 10 min a baño María a una temperatura de 60 grados centígrados. Al término se cuantifica a una absorbancia de 412 nm, calculándose los resultados con un coeficiente de extinción de  $800 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ .

## DETERMINACION DE CATALASA

Para determinar la presencia del radical oxígeno singlete, se utilizó una técnica indirecta basada en el cambio del perfil electroforético de la catalasa. Basándonos en estudios que realizaron Leidas et al <sup>58</sup>, los cuales observaron que el oxígeno singlete modificaba el perfil electroforético de la catalasa de la *Necrospora crassa* bajo condiciones de estrés. Esta modificación se realiza en el perfil electroforético, por un incremento en las cargas netas modificando sus puntos isoelectricos ácidos, todo esto sin alterar su actividad enzimática. Esta modificación también se observó en otras catalasas de diferentes organismos que fueron sometidas a un estado de estrés oxidativo.

Para la determinación de catalasa, se utilizó la muestra de hígado (0.5 a 1 g) almacenada en nitrógeno líquido, procediendo a macerarlo inmediatamente con 5ml de una solución de Hepes 20mM, pH 7.2, conteniendo 1 mM phenilmetilsulfonilfluoride; 1 mM dithiothreitol; 0.1 mM desferroxamine B mesilato (desferal). Con este homogenado se realizaron diluciones para desarrollar el gel de poliacrilamida, determinando también la cantidad de proteína por el método de Bradford. <sup>59</sup>

Para la electroforesis se prepararon geles de poliacrilamida (8 x 9 y 0.75 mm grosor) mezcla de 8% poliacrilamida, 0.2% bis-acrilamida, usando el procedimiento de Laemmli <sup>60</sup>, sin adicionar mercaptoethanol ni calentar la muestra. Se realizaron varios geles con diferentes cantidades de muestra hasta encontrar una buena resolución en las diferentes bandas en el gel (18 µg de proteína en 10 µl de muestra.) Los geles fueron corridos con la muestra por 2.5 hrs a 105 volts e inmediatamente fueron teñidos para observar el corrimiento de la catalasa.

Después de la electroforesis el gel se incubó por 5 minutos en metanol al 5% lavando con agua corriente tres veces, en seguida se adicionó 50 ml de  $H_2O_2$  por 10 minutos, con incubación por 10 min. Posteriormente el gel se lavó con agua corriente y se le agregó una mezcla 1/1 recién preparada de cianuro de potasio férrico al 2% y cloruro férrico 2%, desarrollándose un color azul en el gel, excepto en las zonas donde el  $H_2O_2$  fue descompuesto por la catalasa. La reacción fue parada lavando la mezcla y agregando una solución de ácido acético 10% y metanol 5%.

Se procedió primero a comparar si había algún cambio en el perfil electroforético de la catalasa por tratamiento en la semana 1<sup>ra</sup>, 3<sup>ra</sup>, 5<sup>ta</sup> y 7<sup>ma</sup>. Se corrieron 2 geles, para cada tratamiento. El segundo paso fue comparar por semanas el control y los tratamientos. Y como tercer paso se comparó el tratamiento de dieta control contra el tratamiento 4 en la semana 1, 3, 5 y 7.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó un diseño estadístico completamente aleatorizado con los cuatro tratamientos con 6 repeticiones. Los datos de consumo de alimento, ganancia de peso, conversión alimenticia, mortalidad general y por síndrome ascítico se analizaron con el siguiente modelo <sup>61</sup>:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{(i)j} \quad (i = 1, 2, \dots, \tau; j = 1, 2, \dots, r)$$

Donde:

Y = variable de respuesta

$\mu$  = media general

$\tau_i$  = efecto del i-ésimo tratamiento  $1 \leq i \leq 4$

$\varepsilon_{(i)j}$  = error experimental  $1 \leq j \leq 6$

Un modelo estadístico similar fue utilizado para los resultados de las determinaciones de OH<sup>-</sup>. El análisis estadístico se realizó conforme al diseño utilizado, con

un análisis de varianza (ANDEVA) y aplicando la prueba de Tukey para comparación de medias en casos donde se encontró diferencia significativa ( $P < 0.5$  o  $P < 0.1$ ).<sup>62</sup> A continuación se indican los parámetros analizados:

### **INDICADORES PRODUCTIVOS**

1. Consumo de alimento
2. Ganancia de peso
3. Conversión alimenticia
4. % de mortalidad general y por Síndrome Ascítico

### **INDICADORES DEL ESTRES OXIDATIVO**

1. Cambio en el perfil electroforético de la catalasa provocado por la presencia de oxígeno singulete. Técnica de Lledías et al.<sup>58</sup>
2. Determinación de producción de radicales hidroxilo por la Técnica de Nasch.<sup>56</sup>

## RESULTADOS

Los resultados que se presentan a continuación se dividen en dos fases; los que corresponden a los parámetros productivos, y los del estrés oxidativo.

1. Fase de campo. Datos productivos en pollos obtenidos a la 3 y 7 semanas de edad
2. Fase de laboratorio. Datos clínicos obtenidos de las muestras de hígado, de la primera a la séptima semana.

### FASE DE CAMPO

Los resultados de los parámetros productivos, mortalidad general y por SA obtenidos en las dos etapas iniciación, finalización y ciclo completo se muestran en el Cuadro 6.

Como se puede apreciar en consumo de alimento entre los diferentes tratamientos, no se encontró diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos, en las etapas productivas. Con respecto a la variable ganancia de peso en la etapa de inicio no hubo diferencia estadística, si bien numéricamente el tratamiento 4 mostró un mejor peso. En la etapa de finalización la mejor ganancia se manifestó en el tratamiento 4 (1 – 49 días) con diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) en comparación a la dieta control, y los tratamientos 2 (1-21 días) y tratamiento 3 (22-49 días) no se encontró diferencia estadística ( $P > 0.05$ ). En el ciclo completo la ganancia de peso se manifestó de igual manera que la de finalización apreciándose mejor en la Figura 5.

En los datos de la conversión alimenticia, se observa en la etapa de inicio una mejor eficiencia de este parámetro, en los pollos alimentados con ácido lipoico, en el tratamiento 4 (1 – 49 días), con diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). Este mismo efecto benéfico siguió manifestándose en la etapa de finalización para los tratamientos 2 (1-21 días), tratamiento 3 (22-49 días) y tratamiento 4 (1 – 49 días) en comparación al

Cuadro 6. Efecto del ácido lipoico (40 ppm) en la etapa de inicio, finalización y ciclo completo sobre los indicadores de productividad, mortalidad general y por síndrome ascítico en pollos de engorda.

Variable	Etapa	Días de inclusión del ácido lipoico			
		T1 0	T2 1-21	T3 22-49	T4 1-49
Consumo alimenticio (g)	Inicio	949 ± 6.79 a	924 ± 11.78 a	944 ± 9.85a	923 ± 8.14 a
	Finalización	4109 ± 12.27 a	4041 ± 27.20 a	4029 ± 2 4.03 a	4044 ± 40.68 a
	Ciclo completo	5058 ± 12.85 a	4966 ± 22.02 a	4970 ± 30.64 a	4967 ± 24.51 a
Ganancia de peso (g)	Inicio	649 ± 5.45 a	655 ± 2.25 a	659 ± 3.51 a	664 ± 4.75 a
	Finalización	2160 ± 27.34 b	2205 ± 25.75 ab	2219 ± 21.38 ab	2269 ± 26.65 a
	Ciclo completo	2809 ± 17.77 b	2873 ± 19.82 ab	2877 ± 24.56 ab	2933 ± 25.70 a
Conversión alimenticia (g)	Inicio	1.46 ± 0.017 a	1.41 ± 0.018 ab	1.43 ± 0.016 ab	1.39 ± 0.011b
	Finalización	1.9 ± 0.014 a	1.83 ± 0.016 b	1.82 ± 0.020 b	1.78 ± 0.009 b
	Ciclo completo	1.80 ± 0.010 a	1.73 ± 0.013 b	1.73 ± 0.007 b	1.69 ± 0.007 b
Mortalidad general (%)	Inicio	4.37 ± 2.16 a	3.57 ± 1.46 a	1.59 ± 0.48 a	3.57 ± 0.53 a
	Finalización	12.69 ± 1.70 a	11.11 ± 2.00 a	11.90 ± 1.87 a	9.52 ± 1.94 a
	Ciclo completo	17.06 ± 2.97 <sup>a</sup>	14.68 ± 2.16 a	16.66 ± 1.62 a	13.09 ± 2.01a
Mortalidad SA (%)	Inicio	0.4 ± 0.39. a	0 a	0 a	0 a
	Finalización	9.12 ± 1.67 a	5.55 ± 1.0ab	6.74 ± 1.29 ab	3.96 ± 1.00 b
	Ciclo completo	9.52 ± 1.62 <sup>a</sup>	5.55 ± 1.00ab	6.74 ± 1.29ab	3.96 ± 1.00 b

control con diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) y lo mismo se refleja en el ciclo completo, con diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) en la Figura 6 esto queda de manifiesto.

Como se observa en el Cuadro 6, los datos de mortalidad general entre los diferentes tratamientos y en las tres etapas no mostraron diferencia estadística ( $P > 0.05$ ). Con respecto a la mortalidad por SA en la etapa de iniciación, no se muestra diferencia estadística ( $P > 0.05$ ), y en la etapa de finalización se manifiesta una disminución en el tratamiento 4 (1-49 días) en un 41.6%, con relación al control con diferencia estadística ( $P < 0.05$ ), y con respecto a los tratamientos 2 (1-21 días) y 3 (22-49 días) no hubo diferencia estadística ( $P > 0.05$ ). Esta diferencia estadística se manifiesta similar en el ciclo completo. Lo anterior se evidencia en la Figura 7.

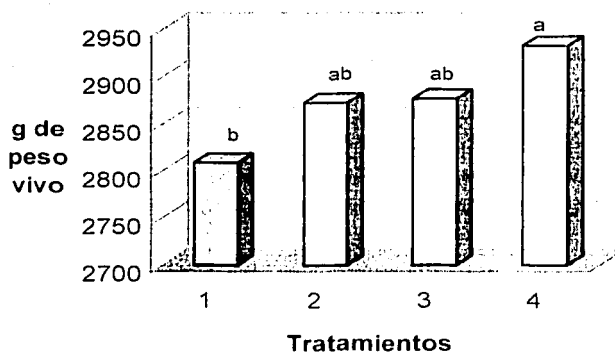


Figura 5. Efecto del ácido lipoico en ganancia de peso en pollos durante el ciclo completo (1-49 días). Valores con distinta literal son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ )



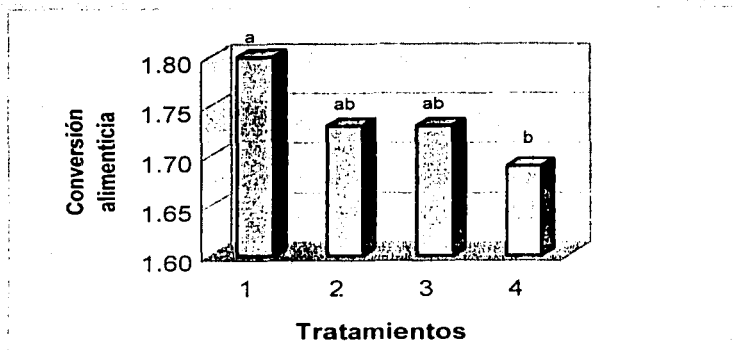


Figura 6. Conversión alimenticia en ciclo completo de pollos alimentados con ácido lipoico. Valores con distinta literal son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ )

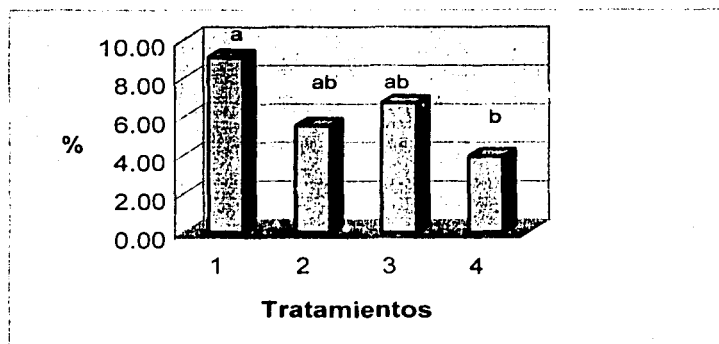


Figura 7. Mortalidad por síndrome ascítico en el ciclo completo (1-49 días) de pollos alimentados con ácido lipoico. Valores con distinta literal son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ )

## FASE DE LABORATORIO

### CONCENTRACIÓN DE RADICALES HIDROXILO

La concentración de radicales  $\text{OH}^{\cdot}$  que se midieron desde la primera semana hasta la séptima de edad en hígados de pollo aparece en Cuadro 7. Los resultados de la concentración de radicales  $\text{OH}^{\cdot}$  en el tratamiento 4 (1-49 días), fueron siempre menores en las 7 semanas en estudio, en comparación al control y con el tratamiento 3 (22-49 días); Con respecto al tratamiento 2 (1-21 días), este se comportó de la misma manera que el tratamiento 4 (1-49 días) en las tres primeras semanas con diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) con respecto al control.

Se aprecia en la cuarta semana que el tratamiento 2 (1-21 días), al cual se le quitó el AL, la concentración de radicales  $\text{OH}^{\cdot}$  aumentaron en comparación al tratamiento 4 con diferencia estadística ( $P < 0.05$ ), aunque los valores siempre fueron menores ( $P < 0.05$ ), con respecto al control, e igualándose al tratamiento 3 (22-49 días). Para la quinta semana se manifestó la misma tendencia que en la cuarta semana.

Para la sexta y séptima semana la concentración de radicales  $\text{OH}^{\cdot}$  fueron iguales en el tratamiento 2 (1-21 días) y tratamiento 4 (1-49 días), siendo menores con respecto al tratamiento 3 (22-49 días) y al control los cuales tuvieron valores más altos, diferencia estadística ( $P < 0.05$ ). En la Figura 8, se puede apreciar mejor la tendencia de radicales  $\text{OH}^{\cdot}$  en las 7 semanas.

**Cuadro 7. Resumen de la concentración de OH<sup>-</sup> en hígado de pollo durante las 7 semanas.**

	T1	T2	T3	T4
<i>SEMANA</i>	<i>Dieta control</i>	<i>Inclusión 1-21 días</i>	<i>Inclusión 22-49 días</i>	<i>Inclusión 1-49 días</i>
1	81.83±1.70 a	58.84±3.95 b	82.42±6.81 a	63.94± 2.78 b
2	82.45±2.17 a	55.50±2.59 c	74.57± 1.41 b	48.57±30.4 c
3	65.65± 2.00 a	42.75±2.66 b	65.65± 4.03 a	42.82± 4.36 b
4	78.50±1.89 a	66.4± 2.71 b	65.19±4.53 b	43.52±0.87 c
5	105.28±4.08 a	83.45±1.04 b	73.96±6.09 b	57.47±4.99 c
6	101.72±2.46 a	70.59±1.27 c	80.43±2.40 b	68.62±3.00 c
7	101.62±3.27 a	70.70±2.39 b	96.20±7.25 a	71.97±5.21 b

Valores con distinta literal en el mismo renglón son estadísticamente diferentes (p<0.05)  
n=4.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

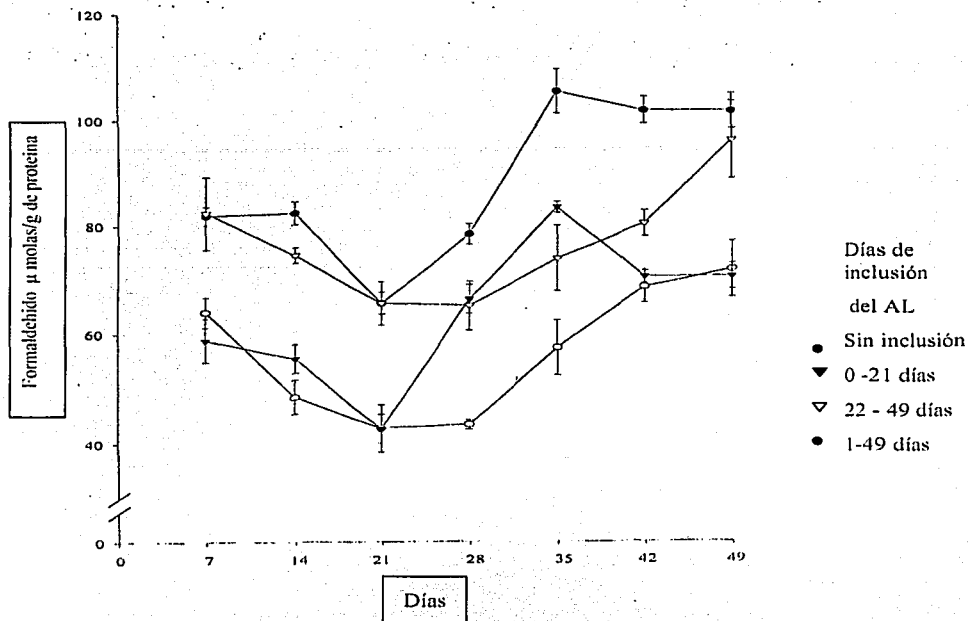


Figura 8. Efecto del ácido lipoico sobre la producción del radical OH en hígado de pollo durante su ciclo productivo. Medias  $\pm$  error estandar.

## DETERMINACIÓN DE OXÍGENO SINGULETE

Como se mencionó, esta metodología se basa en el posible cambio que puede ejercer el oxígeno singulete sobre el perfil electroforético de la catalasa; en una corrida se compararon la catalasa de un mismo tratamiento para la semana 1, 3, 5 y 7 de edad, esto se realizo para el control, tratamiento 2, 3 y 4, en los cuales no se observó ningún cambio.

En los geles donde se compararon por semana el control y los tres tratamientos no se encontró cambio aparente en el perfil electroforético.

También se procedió a desarrollar geles comparando el control contra el tratamiento 4 en la semana 1, 3, 5, y 7, en los cuales no se observó ningún cambio en la electroforesis de la catalasa, como no hubo cambio solo se muestra el gel de la séptima semana con los cuatro tratamientos Figura 9.

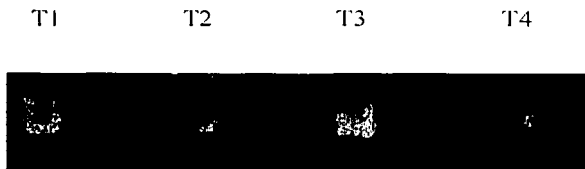


Figura 9. Electroforesis de la catalasa de hígado de pollo a las 7 semanas de edad. T1: control, T2 : ácido lipoico( 1-21 días), T3 :ácido lipoico ( 22 -49 días), T4 ácido lipoico (1-49 días).

## DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue el poner de manifiesto el poder antioxidante del ácido lipoico en el pollo de engorda, el cual fue sometido a condiciones que favorecieran la presentación de un estrés oxidativo aunado a la presentación del Síndrome ascítico.

Una de las condiciones fue la crianza a 2,235 m sobre el nivel del mar, la cual provoca una baja tensión de oxígeno, por lo que la disponibilidad del oxígeno atmosférico decrece hasta en un 10%. Un rápido crecimiento incrementa los requerimientos de oxígeno, lo que conlleva a crear condiciones de hipoxia en los tejidos y favorecer el brote de síndrome ascítico.<sup>13</sup> La otra condición que predispuso la presentación del SA fue un aumento en la densidad energética del alimento con 3100 kcal/kgEM en la etapa de iniciación y 3200 kcal/kgEM en la finalización.<sup>17</sup>

Bajo este panorama se observó que al incluir el ácido lipoico durante todo el ciclo productivo del pollo las concentraciones de radicales OH<sup>•</sup> disminuyeron sustancialmente en comparación al control. Al ácido lipoico se le confieren propiedades antioxidantes entre las que destacan la capacidad de disminuir las concentraciones de radicales OH<sup>•</sup>,<sup>55</sup> efecto que se manifestó en el presente trabajo. Al eliminar de la dieta el AL en la etapa de finalización se observó un aumento en los valores hepáticos del radical OH<sup>•</sup>, lo que nos indica la necesidad de incluir en la dieta ácido lipoico para controlar la sobreproducción de estos. En un estudio realizado por Teicher y Preib<sup>39</sup> manifiestan, que es probable que sus efectos terapéuticos se originen de la forma libre y no del complejo, situación que pudo haber ocurrido en el presente trabajo. Aunque es difícil especificar con los datos obtenidos en este estudio, si el ácido lipoico disminuyó la presencia de los radicales OH<sup>•</sup> por acción directa,<sup>45</sup> por su participación en el sistema de antioxidantes endógenos,<sup>62</sup> o por su acción quelante de los metales de transición.<sup>53</sup>

Los pollos que recibieron el ácido lipoico durante todo el ciclo productivo alcanzaron la mayor ganancia de peso, y su conversión alimenticia fue más eficiente. Estos datos corroboran lo encontrado por Serret <sup>36</sup> del efecto benéfico del ácido lipoico. También se notó que al ser adicionado el ácido lipoico en la etapa de iniciación (1-22 días,) o en la de finalización (22-49 días) se manifestó la misma eficiencia en la conversión alimenticia al final del ciclo productivo, en comparación al control; indicando que la presencia de ácido lipoico en la dieta mejora este parámetro. Esto nos hace dilucidar que la presencia del ácido lipoico a dosis de 40 ppm en la dieta del pollo ayuda a contrarrestar los efectos nocivos de las especies de oxígeno reactivas, ventaja que aprovecha el ave para manifestar su potencial productivo lo que corrobora lo encontrado por Serret. <sup>3</sup>

En esta prueba en particular, al aumentar la energía en 100 kcal/kg de EM en las dos etapas de producción, muestra que el pollo no presenta impedimento alguno para manifestar su potencial productivo, siempre y cuando exista ácido lipoico en la dieta.

La suplementación continua con ácido lipoico tuvo un efecto significativo al reducir la mortalidad por síndrome ascítico en un 41.6%, con respecto a los pollos que no recibieron ácido lipoico durante todo el ciclo. Esto nos indica una relación directa del SA con la condición de estrés oxidativo y a su vez el papel protector del ácido lipoico. Este efecto sobre la presentación del síndrome ascítico (ciclo completo) fue igual a la reportada por Serret. <sup>36</sup>

Los puntos idénticos a los descritos por Serret <sup>36</sup> nos permiten corroborar, los efectos protectores del AL contra las especies de oxígeno reactivas

Si bien en el presente trabajo no se observó cambio alguno en el corrimiento de la catalasa del hígado de pollo por la presencia del oxígeno singulete, no se puede concluir que esta especie, pueda jugar un papel importante en el proceso del estrés oxidativo.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados bajo las condiciones empleadas se puede concluir que:

1. La adición de ácido lipoico a una dosis de 40ppm en el alimento del pollo, mejoró favorablemente la ganancia de peso y conversión alimenticia.
2. El consumo de ácido lipoico durante el ciclo productivo disminuyó significativamente la mortalidad por síndrome ascítico en un 41.6%.
3. Aun con un aumento en la densidad energética del alimento, en comparación a la empleada por Serret<sup>36</sup>, no se modificaron las ventajas que mostró el ácido lipoico sobre los parámetros productivos.
4. Se confirma una vez más lo encontrado por Serret<sup>36</sup> en la acción del lipoico sobre la disminución del estrés oxidativo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## LITERATURA CITADA

1. Unión Nacional de Avicultores. Avicultura Mexicana 2003 <http://www.una.com.mx>
2. Reddy PR. Situación actual y desarrollos futuros en la mejora y potencial genético de reproductoras pesadas. Temas de actualidad para la industria avícola. Midia relaciones SA de CV. 1995 México DF, 73-90.
3. Leeson S. The future of broiler Production . 18<sup>th</sup> Annual Alltech Symposium.1 –10 (2002)
4. Scheele CW. Pathological changes in metabolism of poultry related to increasing production levels. Vet. Quar. 1997;19:127-130.
5. Maxwell MH, Robertson CW. Cardiovascular Disease in Poultry. Epidemiology -- Current trend and correlates. Congress World of poultry breeding. 2000.1-10; Montreal, Canadá.
6. López CC. Susceptibilidad al Síndrome ascítico de diferentes estirpes genéticas de pollos de engorda (tesis de doctorado). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1997.
7. Arce MJ, Lopez CC, Berger M. Control of ascites syndrome and feed restriction techniques. J. Apply Poult. Re. 1992; 1:1-5.
8. López CC . Arce MJ, Ávila GE, Vázquez PC. Investigaciones sobre el Síndrome ascítico en pollos de engorda. Cien. Vet. 1991;5:13-48.

9. Wideman RF Jr, Kirby K, Evidence of a ventilation-perfusion mismatch during acute unilateral pulmonary artery occlusion in broiler. *Poult.Sci.* 1995;74:1209-1217.
10. Wideman RF Jr, and French H, Ongoing improvement in the ascites resistance of progeny from the second generation of broiler breeders selected using the chronic unilateral pulmonary artery occlusion technique. *Poult. Sci.* 2000; 79: 396-401.
11. Lilja CA. A comparative study of postnatal growth and organ development in some species of birds. *Growth* 1983;47:317-339.
12. Olander HJ, Burton RR, Adder HE. The pathophysiology of chronic hypoxia in chickens. *Avi. Dis.* 1967;11:609-620.
13. Julian RJ. Ascites in poultry. *Avi. Pathol.* 1993; 22: 419-454.
14. Feddle MR. Respiration In: Sturkie, PD, editors *Avian Physiology* New York: Springer-Verlog, 1986: 191-220.
15. Sheele C, Wit W, Frankenhuis MT y VereijKen PFG. Ascites in broilers. I Experimental factors evoking symptoms related to ascites. *Poult Sci.* 1991;70:1069-1083.
16. Enkvetchakul B, Bottje GW, Moore NA, W.R., Huff W. Compromised antioxidant status associated with ascites in broilers. *Poult Sci.* 1993;72:2272-2280.
17. Flores CE, Ávila GE. Mortalidad de pollos de engorda con el síndrome ascítico y su relación con fuentes concentradas de energía. *Memorias de la VII Convención Anual de ANECA; 1983 Iztapa- Zihuatanejo (Guerrero) México (DF): Asociación Nacional de Especialistas AC.* 1983: 230-235.

18. López CC, Vázquez PC. Análisis de la incidencia del síndrome ascítico en pollos de engorda en el valle de México. Tec. Pec. Mex. 1987; 25(3): 338-339.
19. Julian RJ, Gorio M. Pulmonary aspergillosis causing right ventricular failure and ascites in meat-type chickens. Avi. Pathol. 1990;19:643-654.
20. Arce MJ. Consideraciones para reducir el síndrome ascítico en pollos de engorda. Memorias de la IV Ronda Latinoamericana de Biotecnología:1994; México DF 1994: 1-20.
21. López CC, Arce MJ, Pro MA, Ávila GE, Vázquez PC, Wideman FA y Odom WR.: Manual del productor para el control del síndrome ascítico. U.S. Feed Grains Council, México DF. 1994.
22. López CC, Arce MJ, Avila GE, Vázquez PC. Investigaciones sobre el síndrome ascítico en pollos de engorda. Cien. Vet.1991;5:13-48.
23. López CC, Charles NL, Camacho FD, Arce MJ and Peñalba GG. Effect of controlling feed consumption as related to pelleted or mash diets on the incidence of ascites syndrome Poulit.Sci.1997.Suppl 1: 76.
24. Rubin IS, Papich MG. Nonesteroidal anti-inflammatory drugs. In : Kirk Editors. Current Veterinary therapy X Small animal practice. USA. 1992 47-53.
25. Botje GW, Enkvetchakul-B. Potential role of antioxidants and lipid peroxidation in ascites syndrome. AFlA. 1994; 5

26. Díaz CA, Nava C, Villanueva R, Serret GM, Guinzberg R, Piña E. Hepatic and cardiac oxidative stress and other metabolic changes in broiler with the ascites syndrome. *Poult. Sci.* 1996; 75: 900-903.
27. Villar-Patiño G, Díaz-Cruz A, Ávila E, Guinzberg R, Pablos J, Piña E. Effects of dietary supplementation with vitamin C or vitamin E on cardiac lipid peroxidation and growth performance in broilers at risk of developing ascites syndrome. *Ame. J of Vet.Res.* 2002; 63: 673-676.
28. Bottje GW, Enkvetchakul-B, Moore-R. Effect of alpha-tocopherol on antioxidants, lipid peroxidation, and the incidence of pulmonary hypertension syndrome (ascites) in broilers. *Poult.Sci.* 1995; 74:1356-1369.
29. Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free Radicals in biology and medicine.* 3<sup>era</sup> ed. Oxford: Clarendon Press, 2002.
30. Biewenga G, Haenen M, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmac.* 1997;29:315-331.
31. Arrieta AM, Díaz-Cruz A, Ávila E, Guinzberg R, Piña E. Estado oxidativo hepático y comportamiento productivo en pollo de engorda, alimentado con dos fuentes de selenio y niveles altos de vitamina E y C. *Vet Méx* 2002; 31:113-119.
32. Valle A, Díaz-Cruz A, Ávila E, Guinzberg R, Piña E. Antioxidant action of piroxicam on liver, heart and lung in broiler chicks. *J.Vet.Pharmacol. therap* 2001; 24:291-293.
33. Rodríguez R, Ruiz B, Sánchez S. Los carotenoides en la salud. *Boletín de Educación Bioquímica. UNAM México* 1998 ;17: 115 –121.

34. Serret MG.: Efecto del ácido lipoico sobre algunos indicadores del estrés oxidativo en pollos de engorda (tesis de maestría). México (DF)México; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.2002.
35. Lodge K, Packer L.  $\alpha$ -Lipoic Acid. In: Gershwin ME, German BJ, editors. Nutrition and Immunology : Principles and practice. New Jersey : Human Press, 2000:97-106.
36. Reed LJ. Mulienzyme complexes. Acc Chem Res 1974; 7:40-46
37. Mattulat A. And Baltos W. Determination of lipoic acid in meat of commercial quality. Z Lebnsn- Unters Forssch. 1992. 194: 326-29.
38. Baker H, Deangelis B, Baker ER, Hunter SH. A practical assay of lipouate in biologic fluids and liver in health and disease. Free Radic Biol and Med.1998; 25:473-479.
39. Teichert J. And Preib R. Determination of lipoic acid in human plasma by high - performance liquid chromatography with electrochemical detection . J. Chromatogr. B. 1995; 672: 277-81.
40. Biewenga GP, Dorstijn MA, Verhagen JV, Haenen GRMM, Bast A. Reduction of lipoic acid by lipoamide deshydrogenase. Biochem Pharmac. 1996a; 51: 233-238.
41. Pick U, Haramaky N, Constantinescu A, Handelsman G, TritschlerHJ, and PackerL. Glutathione reductase and lipoamide dehydrogenase have opposite stereospecificities for  $\alpha$  lipoic acid enantiomers. Biochem Biophys Res Commun. 1995; 206:724-30.

42. Arner ESJ, Nordberg J, Holmgren A. Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 225: 268-74.
43. Cornaro U, Cariati F, Bonomi F. Evidences for the formation of complexes of DL-dihydrothioctic acid (reduced lipoic acid) with  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  salts. *Rev. Port Quim.* 1985; 27: 273,274.
44. Sigel H, Prijs B. Stability and structure of binary and ternary complexes of  $\alpha$ -lipoate and lipoate derivatives with  $M^{2+}$ ,  $Cu^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  in solution. *Arch Biochem Biophys.* 1978; 187:208-214.
45. Matsugo S, Yan L-J, Han D, Tritschler HJ, Packer L. Elucidation of antioxidant activity of dihydrolipoic acid toward hydroxyl radical using a novel hydroxyl radical generator NP-III. *Biochem Mol. Biol. Int.* 1995; 37:375-83.
46. Stevens B, Perez SR, Small RD. The photo peroxidation of unsaturated organic molecules IX: lipoic acid inhibition of rubrene autoperoxidation. *Photochem. Photobiol* 1974; 19: 315-316.
47. Packer L, Roy S, Sen CK.  $\alpha$ -Lipoic Acid: A metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. In: Sies H, editor. *Advances in pharmacology* vol. 38. San Diego Academic Press, 1997: 79-101
48. Arivazhagan P, Ramanathan K, Panneerselvam C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. *Chem-Biol Interactions.* 2001;138:189-98.
49. Williams CA, Hoffman RM, Kronfeld DS, Hess TM, Saker KE, Harris PA. Institution. Lipoic acid as an antioxidant in mature thoroughbred geldings: a preliminary study. *J of Nutri.* 2002 ; 132(6 Suppl 2):1628-1631

50. Xu LJ, Traber MG, Kobuchi H, Matsugo S, Tritschler HJ, Packer L.  $\alpha$  lipoic acid dependent regeneration of ascorbic acid from dehydroascorbic acid in rat liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1996; 28: 77-85.
51. Bast A, Haenen GRMM. Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Acta* 1988; 963: 558-561.
52. Peinado J, Sies .. Akerbomm T. Hepatic lipoate uptake. *Arch Biochem Biophys* 1989; 273: 389-395.
53. Maitra I, Serbinova E, Tritschler HJ, Packer L.:  $\alpha$ -Lipoic acid prevents burthione sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats. *Free Radical Biol. Med.* 1995:18,823-829.
54. INEGI. Tlahauc. Cuaderno de información básica delegacional. INEGI. México. 1992.
55. Cuca GM, Ávila GE, Pro MA. Alimentación de las aves. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo. México 1990.
56. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch Reaction. *Biochem.* 1953;55 :416-421.
57. Hallinan T, Gor J, Rice-Evans CA, Stanley R, O Reilly. R& Brown D. Lipid peroxidation in electroporated hepatocytes occurs much more readily than does hydroxyl-radical formation. *Biochemical Journal*, 1991; 277: 767-771.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

58. Lleidas F, Hansberg W. Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol.* 2000; 319: 110-119.
59. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyth Biochem* 1976; 72: 248-254.
60. Laemmli UK. Cleavage of structural proins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 : 680-683.
61. Gill JL. Design and analysis of experiments in the animal and medical sciences. Vol 1 Iowa: The Iowa State University Press. 1978.
62. Statistical Analysis System (Computer program) Manual of SAS. Institute Inc. 1995.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN