



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“EMPLEO DE ACIDO ALFA LIPOICO PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO Y
MEJORAR LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS DEL POLLO DE ENGORDA EN
CONDICIONES DE GRANJA COMERCIAL”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Carlos Jovito Alvarez Alonso

TUROR Dr. Armando Miyasaka

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTOR

Dra. Ofelia Mora Izaguirre

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

M en A José Luis Dávalos Flores

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MEXICO, D.F. MAYO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Gracias al apoyo recibido de mi familia.

Con especial cariño a mi madre.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por hacerme parte del posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias de Salud y de la Producción Animal.

Al Dr. Armando Shimada Miyasaka director de esta Tesis, por brindarme su apoyo y confianza a lo largo de estos últimos años y por brindarme la aceptación en su grupo de trabajo y formar parte del Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RUMEN).

A la Doctora Ofelia Mora Izaguirre por su valiosa asesoría, por el apoyo constantemente brindado en el Laboratorio de RUMEN, por ser pilar fundamental en la elaboración de este trabajo y miembro de mi comité tutorial y sobre todo por la gran paciencia y confianza que ha tenido en mi.

Al Dr. Enrique Piña Garza por brindarme siempre las mejores atenciones, por su gran paciencia y su siempre disponible entereza y colaboración en este importante proyecto.

Con el apoyo del proyecto PAPIIT-UNAM IT-201912

A la Universidad Nacional Autónoma de México campus Querétaro, Instituto de Neurobiología, en especial al Laboratorio de Diferenciación Neural y Axogénesis A-03.

Al MVZ MEA José Luis Dávalos Flores director del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) por ser miembro de este comité tutorial; así como por su valiosa atención brindada durante mi estancia en el CEIEPAA.

A los miembros del H. jurado Dr. Armando Shimada Miyasaka, Dr. Enrique Piña Garza, Dr. Ernesto Ávila González, Dra. Anaid Antaramián Salas y en especial al Dr. Antonio Díaz Cruz por su fundamental participación y asesoría.

A la Unidad de Secuenciación Masiva del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM Campus Cuernavaca.

A la Unidad de Proteogenómica en especial a la M en C Adriana González por su valiosa asesoría y el apoyo siempre brindado.

A la M en C Laura González por la atención, colaboración y amistad brindada.

Al personal de pollos Querétaro que es filial del Corporativo Grupo Abrego, ya que sin su valioso apoyo no habría sido posible la elaboración de este trabajo, particularmente al MVZ Héctor Aguilera González adscrito a la división pollo de engorda del mismo corporativo que me brindo siempre la facilidad y apoyo para lograr satisfactoriamente las encomiendas durante la fase de campo de esta investigación, de igual manera al MVZ Trinidad Jiménez Monroy Medico responsable del rastro TIF 393 por las gratas atenciones.

A todos mis compañeros del laboratorio A-03, cuyas aportaciones a lo largo de mi estancia en RuMeN ha sido siempre integrativa y formativa.

A mis compañeros y amigos a lo largo de la vida.

En especial a mi familia por el constante apoyo brindado.

INDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| Resumen | 1 |
| Summary | 2 |
| I. Introducción | 3 |
| 1.1 Contexto Nacional Agropecuario | 3 |
| 1.2 Contexto Nacional Avícola | 5 |
| 1.3 Evolución de la avicultura | 7 |
| 1.3.1 Mejoramiento genético del pollo de engorda | 8 |
| 1.4 Implicaciones metabólicas en el pollo de engorda | 12 |
| 1.5 Ácido Alfa Lipoico | 14 |
| 1.5.1 Biosíntesis de Ácido Alfa Lipoico | 16 |
| 1.6 Cambios en la expresión génica | 17 |
| 1.6.1 PCR en tiempo real | 18 |
| 1.6.2 Secuenciación Masiva y RNA-seq | 19 |
| 2. Antecedentes | 20 |
| 3. Justificación | 21 |
| 4. Hipótesis | 22 |
| 5. Objetivos | 22 |
| 5.1 Objetivo general | 22 |
| 5.2 Objetivos particulares | 22 |
| 6. Materiales y métodos | 22 |
| 6.1 Fase de Campo | 22 |
| 6.1.1 Descripción física de la granja | 23 |
| 6.1.2 Registros de producción | 24 |

| | |
|--|----|
| 6.1.3 Alimento empleado | 25 |
| 6.1.4 Sacrificio y toma de muestras | 26 |
| 6.2 Análisis de laboratorio | 26 |
| 6.2.1 ARN _T | 27 |
| 6.2.2 ADN _g | 27 |
| 6.2.3 Cuantificación del ARN _T y ADN _g | 28 |
| 6.2.4 Cuantificación de proteína | 29 |
| 6.2.5 Cuantificación materia seca muscular | 29 |
| 6.2.6 Cuantificación de AAL en el alimento | 29 |
| 6.3 Secuenciación Masiva de ARN hepático (RNA-seq) | 30 |
| 6.4 Análisis Estadístico | 32 |
| 6.4.1 Variable de respuesta ganancia de peso | 32 |
| 6.4.2 Variable de respuesta ARN _T , ADN _g , Proteína, Actividad Celular y Tamaño Celular | 33 |
| 6.4.3 Variable de respuesta contenido de agua tisular total | 33 |
| 6.4.4 Análisis estadístico de RNA-seq | 34 |
| 6.5 Análisis de estados financieros | 34 |
| 7. Resultados | 35 |
| 7.1 Resultados variable de respuesta ARN _T , ADN _g , Proteína, Actividad Celular y Tamaño Celular | 35 |
| 7.2 Resultados variable de respuesta contenido de agua tisular total en TMEP | 35 |
| 7.3 Resultados variable de respuesta ganancia de peso | 36 |

| | |
|--|----|
| 7.4 Análisis Financiero | 38 |
| 7.5 Resultados Cambios en la expresión génica | 39 |
| 8. Discusión | 39 |
| 8.1 ARNT, ADN _g , Proteína, Actividad Celular, Tamaño Celular | 39 |
| 8.2 Ganancia de peso | 39 |
| 8.3. Cambios en la expresión génica | 40 |
| 8.3.1 Aislamiento ARNT hepático y Secuenciación de ARN (EdgeR o DESeq) | 40 |
| 8.3.2 ARNm de las enzimas hepáticas analizadas por PCR cuantitativa (PCRq) | 43 |
| 9. Conclusiones | 46 |
| 10. Literatura citada | 47 |
| 11. Anexo | 53 |
| 11.1 Perspectivas | 53 |
| 11.2 Artículo científico “Lipoic acid enhances broiler metabolic parameters by downregulating gene expression of enzymes in liver” | 53 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Consumo <i>pér capita</i> 2007 | 4 |
| Cuadro 2. Tasa de crecimiento demográfico y producción de carne | 8 |
| Cuadro 3. Mejoramiento genético del pollo de engorda | 10 |
| Cuadro 4. Composición nutrimental del alimento empleado | 25 |
| Cuadro 5. Variable de respuesta ARNT, ADN _g , Proteína, Actividad Celular y Tamaño Celular | 35 |

| | |
|---|----|
| Cuadro 6. Contenido de agua tisular total en TMEP | 36 |
| Cuadro 7. Peso vivo de la parvada en gramos del grupo control y AAL | 36 |
| Cuadro 8. Parámetros productivos | 37 |
| Cuadro 9. Costos de alimentación | 38 |
| Cuadro 10. Estado financiero entre la parvada control y parvada AAL | 38 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Principales entidades federativas productoras de pollo en 2013 | 5 |
| Figura 2. Producción de carne de pollo en México | 7 |
| Figura 3. Estructura funcional del Ácido Alfa Lipoico | 14 |
| Figura 4. Secuencia de óxido - reducción del AAL | 15 |
| Figura 5. Estructuras de diversas formas de AAL | 16 |
| Figura 6. Incorporación de AAL en el organismo | 17 |
| Figura 7. Distribución de aves en el grupo control y grupo experimental | 24 |
| Figura 8. Efecto del tratamiento sobre la variable ganancia de peso | 37 |
| Figura 9. Efecto del AAL en el hepatocito | 46 |

RESUMEN

El Ácido Alfa Lipoico (AAL) es una molécula organosulfurada, derivada del ácido graso caprílico. Actúa como un regulador del equilibrio redox, también es una coenzima de diversos complejos multi enzimáticos que intervienen en el metabolismo energético mitocondrial, debido a que presenta la cualidad de disolverse tanto en el medio acuoso, así como en un lípido. Posee dos isómeros, R-enantiómero (R-LA) y S-enantiómero (S-LA) que con el tiempo se han empleado nutricional y clínicamente para el tratamiento de enfermedades y diversas condiciones patológicas. Sólo el isómero R es sintetizado de manera endógena, se encuentra como un grupo prostético de origen natural en el complejo de la enzima piruvato deshidrogenasa, entre otras. La exposición de las aves al estrés es un hecho inevitable en la producción avícola. Por lo tanto, la capacidad del AAL para modificar el estado redox de las células e interactuar con otros antioxidantes resulta en un potencial terapéutico, atractivo en condiciones en las que está implicado el estrés oxidativo. Esta investigación demostró que las dietas para pollo de engorda, suplementadas con 40 partes/10⁶ de AAL durante 7 semanas mejoró significativamente la conversión alimenticia, redujo la mortalidad en general y la mortalidad atribuible a SA, así mismo disminuyó las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y radicales hidroxilo en el hígado, y aumentó las reservas de glutatión. Para ello se emplearon un total de 387,620 aves alojadas en naves con características propias de producción industrial, las cuales fueron divididas en dos grupos; un grupo control de 188,400 animales alojados en ocho casetas y otro grupo de 199,220 animales también alojados en ocho casetas, los cuales recibieron AAL en el alimento durante toda la engorda a una dosis de 40 ppm. Las aves que consumieron AAL muestran una ganancia de peso mayor de 101 gramos para los machos y 30 gramos en las hembras al momento del sacrificio ($P < 0.01$). Por lo tanto, el presente estudio fue diseñado para medir las diferencias en los parámetros productivos mediante el uso de AAL y para cuantificar los niveles de expresión en el hígado, que podrían explicar los cambios en los parámetros

productivos en de los pollos de engorda. Teniendo en cuenta el papel regulador clave del AAL en el metabolismo, que ya ha sido reportado en otras especies y en los hallazgos de este trabajo, un análisis más detallado de los efectos del AAL en el músculo será justificado en el futuro.

PALABRAS CLAVE: Ácido alfa lipoico, pollo engorda, ganancia de peso, expresión diferencial génica, hígado, músculo.

SUMMARY

Alpha lipoic acid (ALA) is an organosulfur compound, derived from caprylic fatty acid. Acts as a regulator of the redox balance, and acts as a regulator of the redox balance. It is also a coenzyme in various multi enzyme complexes involved in mitochondrial energy metabolism, since it has the attribute of being dissolved in both the aqueous medium and in a lipid. Having an asymmetric carbon atom, ALA has two isomers, R-enantiomer (R-LA) and S-enantiomer (S-LA). Only the R-isomer is endogenously synthesized and bound to protein. R-LA, being an essential cofactor for the biogenesis of mitochondrial enzymes, is found as a naturally occurring prosthetic group in the alpha-keto acid and pyruvate dehydrogenase complexes. Exposure of birds to stress is unavoidable in poultry husbandry, when the threshold level of stress is reached results in distress to birds. Hence, the ability of ALA to alter the redox status of cells and interact with other antioxidants provides an attractive therapeutic potential in conditions where oxidative stress is involved, This research has demonstrated diets supplemented with 40 parts/ 10^6 of AAL during 7 weeks significantly improved feed conversion, decreased general mortality and mortality attributable to AS, and lowered thiobarbituric acid reactive substances and hydroxyl radicals in liver, and increased total glutathione pool. For this purpose, a total of 387,620 were used birds under industrial characteristics, they were divided into two groups: a control 188,400 animals housed in eight booths and another group of 199,220 animals also housed in other eight booths, the AAL group received 40 ppm in the food. The ALA consuming birds provide a weight gain of 101

grams for males and 30 grams for females at time of slaughter ($P < 0.01$). Therefore, the present study was conducted to measure the differences in productive parameters by the use of lipoic acid and to quantify the expression levels in liver that could explain the changes in productive parameters in the broilers, Considering the key regulatory role of ALA in metabolism reported in other species and in the light of the present findings, further analysis of effect of LA in muscle is warranted in the future.

KEYWORDS: alpha lipoic acid, broilers, weight gain, differential gene expression, liver, muscle.

1. INTRODUCCION

1.1 Contexto Nacional Agropecuario

La actividad ganadera en México durante el año 2009 se ha estimado con un valor de 140,219 millones de pesos (mdp) representando el 1.2% del PIB (INEGI, 2010). Dentro del sector agropecuario la producción pecuaria aporta el 45% de su valor neto (63,098 mdp). Las unidades de Producción Pecuaria se ubican a lo largo y ancho del territorio nacional, ocupando más de 110 millones de hectáreas, muchas de las cuales no tienen otra función operativa agrícola o pecuaria. Por lo que la actividad más relevante dentro del sector ganadero la representa la producción avícola con un crecimiento marcado del 4.6%, seguida de la producción bovina con un 2.1% (SIAP - SAGARPA, 2012).

En los últimos años, la producción de carne en México ha enfrentado cambios económicos significativos, tal y como sucede en otras actividades del sector pecuario, estos cambios se deben en parte a la tasa de crecimiento poblacional, misma que demanda cada vez más productos cárnicos de excelente calidad, alta disponibilidad en el mercado, e implícitamente un bajo costo de adquisición, y por otro lado, el precio de los insumos para la fabricación de alimentos necesarios en la industria cárnica son cada vez más elevados, debido a su alta demanda y competencia directa

para la alimentación humana (principalmente granos de cereales), lo que impacta directamente en la tasa poblacional ganadera.

Actualmente, los procesos productivos ganaderos son más intensivos y por tanto se sustentan en dietas basadas en granos y pastas de oleaginosas. La industria de fabricación de alimentos balanceados en México se posiciona como la segunda en importancia en Latinoamérica y la sexta a nivel mundial. La producción nacional de alimentos balanceados para la ganadería en 2006 alcanzó un volumen de 25.2 millones de toneladas (SIAP-SAGARPA, 2012).

En cuanto al consumo de carnes, se sabe que los países emergentes consumen cada vez más proteína de origen animal dentro de la dieta; México tiene en promedio una ingesta diaria de 97 gramos diarios de proteína, de los cuales 43 gramos son de origen animal (SAGARPA, 2012).

La calidad de la carne se define generalmente en función de su calidad composicional (coeficiente magro-graso) y de factores de palatabilidad tales como su aspecto, olor, firmeza, jugosidad, ternura y sabor. La calidad nutritiva de la carne es objetiva, mientras que la calidad “como producto comestible”, tal y como es percibida por el consumidor, es altamente subjetiva (FAO, División de Infraestructura Rural y Agroindustrias, 2005).

El cuadro 1 nos muestra las principales fuentes de proteína procedentes de productos cárnicos basados en el consumo preferencial de los mexicanos.

Cuadro 1. Consumo *pér capita* 2007

| Producto | Consumo kg |
|---------------|------------|
| Carne pollo | 27.3 |
| Huevo | 19.1 |
| Carne bovino | 15.5 |
| Carne porcino | 15.3 |
| Carne de pavo | 1.8 |
| Carne ovino | 0.8 |
| Carne caprino | 0.4 |

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera / SAGARPA 2007

1.2 Contexto Nacional Avícola

En el ámbito alimentario dentro del sector pecuario, la avicultura ha mostrado ser el subsector más importante en la última década (4.6%), ya que 6 de cada 10 kilos de proteína animal que existen en el mercado nacional corresponden al sector avícola.

Los últimos datos gubernamentales nos dicen que la avicultura representa el 24 % del valor de la producción pecuaria, aportando el 47 % de la producción total de carnes, con alrededor de 238 millones de pollos de engorda por ciclo y 5.5 ciclos por año, sumando 1,309 millones de pollos de engorda anuales (SAGARPA, 2012).

Son seis entidades federativas las que producen más de la mitad de carne de pollo en el país, destacando por orden de importancia Veracruz, Jalisco, Durango, Aguascalientes, Querétaro y Puebla (Figura 1).

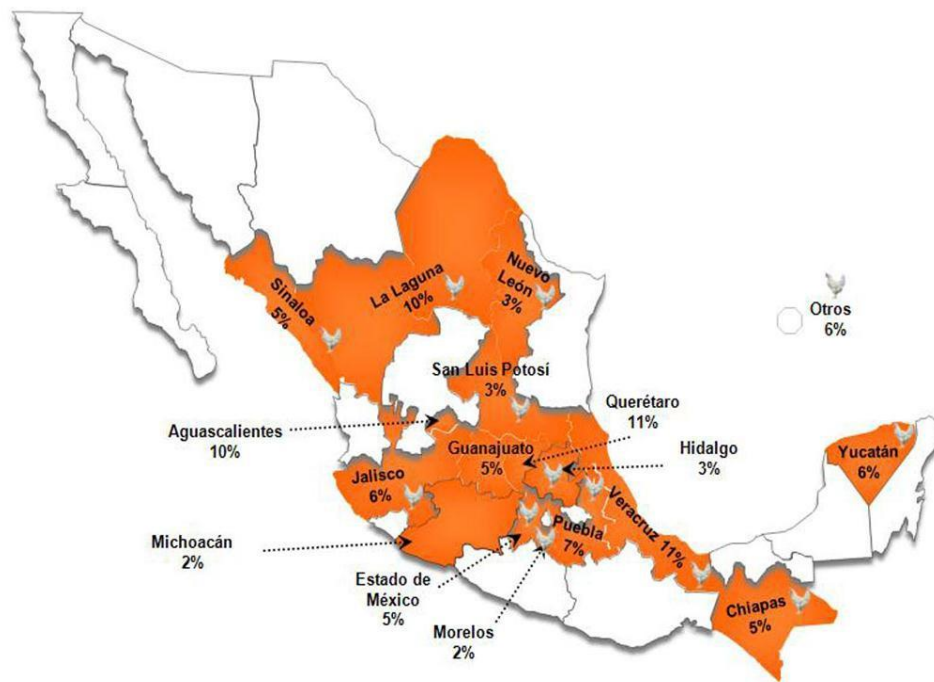


Figura 1. Principales Estados productores de pollo. UNA 2013

Para la Unión Nacional de Avicultores (UNA), la avicultura en México mostró un crecimiento del 25 % para el periodo de 1996 – 2012, con una tasa media de crecimiento anual de 2.8% en el caso del huevo y de 3.4% en la producción de carne de pollo (UNA, 2013).

Durante el año 2012, la avicultura generó 1,167 mil empleos directos y en ese año, México logró producir 2.958 mil toneladas de carne de pollo, siendo el 6º productor mundial y alcanzando la cifra de producción de 108.5 millones de cajas de huevo, posicionándose también el 6º productor mundial, pero siendo el primer consumidor de huevo. Para lograr estas cifras se consumieron 15.3 millones de toneladas de alimento balanceado, siendo del costo de producción por kilo de carne de pollo y huevo más del 60 % solo de gastos de alimentación (UNA, 2013).

Existen diversos factores que favorecen el consumo de carne de pollo en nuestro país:

- Es un producto de alto valor biológico a precios accesibles
- Es la carne más barata de producir (Conversión Alimenticia de 1.8 a 2.0 kg)
- Es una carne apta para todas las edades
- Más puntos de venta, cada vez más cercanos al consumidor
- Confianza en la calidad de los productos (frescura)
- Incremento de restaurantes de comida rápida
- Tendencia de consumo de carnes magras (pechuga)
- Carne que permite diferentes variedades de preparación

Pese a las grandes virtudes que han posicionado al pollo de engorda como el principal aportador de carne en la producción industrial aviar y el más importante producto cárnico de consumo nacional, el pollo ha enfrentado algunos factores publicitarios que han frenado su consumo como lo son:

- El costo por kilogramo de carne es más económica que el de bovino o cerdo, por lo que es común consumirlo varios días a la semana ello ha generado monotonía.
- Anuncios publicitarios totalmente infundados que citan a los llamados pollos “hormonales” donde mencionan que crecen de manera indiscriminada dentro de las granjas de engorda y que dañan la salud de quien los consume (Hans Mann *et al.*, 2002).
- Las aves para abasto cárnico son sacrificadas a temprana edad entre las cinco y ocho semanas de vida, aunque podrían vivir alrededor de seis años.

La figura 2 muestra la tendencia a la alza de la producción de carne de pollo en México.

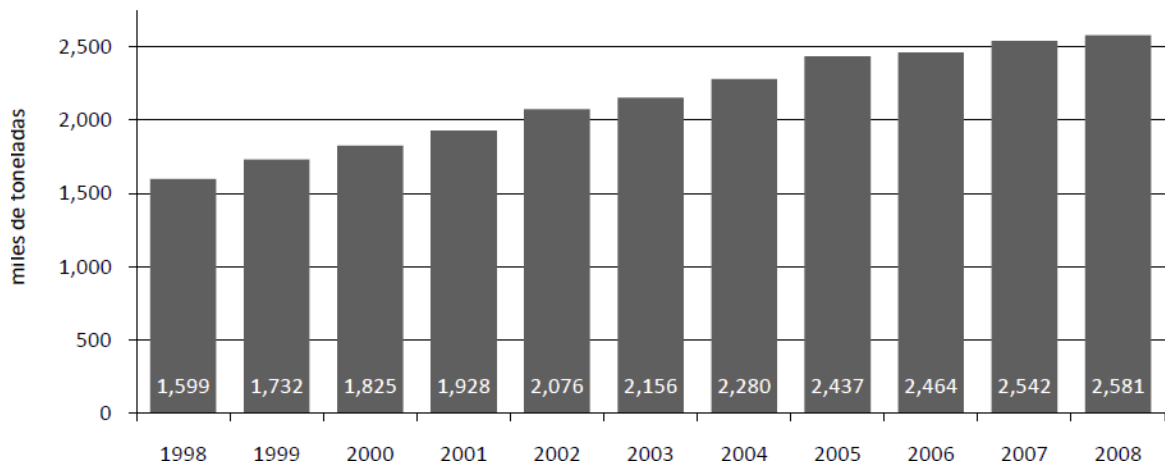


Figura 2. Producción de carne de pollo en México

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA (2009)

1.3 Evolución de la avicultura

Al hablar de un pollo de engorda nos referimos a un ave de sexo indefinido (macho o hembra), hacinado, que rara vez vive más allá de las ocho semanas de vida y que, principalmente, se distingue de cualquier otra ave de su misma especie por ser altamente precoz en su manera de ganar peso y

una acelerada velocidad de crecimiento, mayoritariamente de masas musculares: pechuga, piernas y muslos (Hans Mann *et al.*, 2002).

Como resultado del mejoramiento genético de las aves domésticas, gallos y gallinas (*Gallus gallus*), surgen nuevas estirpes de animales con mayor tamaño y precocidad, mejor conversión alimenticia y, lo más importante, un mayor desarrollo de masas musculares, lográndose en conjunto obtener la máxima eficiencia animal en la producción de carne.

Las aves confinadas en alojamientos de tipo industrial (casetas o naves) están sometidas a un ritmo acelerado de crecimiento y a un marcado desarrollo y síntesis de tejidos corporales (principalmente muscular), por tanto necesitan un estricto control en sus necesidades medio ambientales, como inmunológicas y, por supuesto nutrimentales.

El cuadro 2 muestra la evolución de la población total y la evolución en la producción de carne.

Cuadro 2. Tasa de crecimiento demográfico y producción de carne

| ESTIMADOR | 1970 | 1980 | 1990 | 2000 | 2010 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| Población mundial (millones) | 3,600 | 4,400 | 5,266 | 6,055 | 6,854 |
| Producción total carnes (Millones Toneladas Métricas) | 104 | 140 | 168 | 203 | 286 |
| Producción de carne de ave (Millones Toneladas Métricas) | 15 | 26 | 41 | 58 | 79 |
| Consumo anual de carne per cápita (Kilogramos) | 11 | 14 | 30 | 39 | 42 |
| Carne pollo <i>per capita</i> (Kilogramos) | 4.4 | 5.8 | 7.8 | 11 | 13 |

FAOSTAT, 2010

1.3.1 Mejoramiento genético del pollo de engorda

Evidentemente la manera más precisa de evaluar una producción avícola es el adecuado manejo en los registros de producción y la detección de factores que nos impacten positiva y/o negativamente sobre estos.

Han transcurrido unos 50 años de logros basados en selección y mejoramiento genético, para que el pollo se convirtiera en lo que actualmente es. Los esquemas y estrategias para el caso de la gallina de postura incluyen mejoramiento genético en la persistencia de la producción, calidad del cascarón, peso corporal y peso del huevo; mientras que para el pollo de engorda se contemplan aspectos claves como ganancia de peso, mejor conversión alimenticia, alto rendimiento en canal, una buena relación músculo-esqueleto, resistencia a enfermedades infecciosas y menor incidencia en trastornos de tipo metabólico. Estos efectos deseables se hacen más evidentes a medida que la selección se torna más intensa.

No obstante las buenas prácticas de manejo nutricional y sanitario aplicables a las parvadas de engorda permiten mejores resultados productivos, ya que responden a estímulos físicos y químicos como sucede en cualquier ave, por lo tanto únicamente presentan diferencias cuantitativas si nos enfocamos a producción cárnica, es decir, el mejoramiento gradual y continuo en el ave se han fijado gracias a las actuales tendencias génicas.

Las estirpes especializadas en la producción de carne son las líneas Ross 308 y 508, Cobb 500, Hubbard M99 y M77, Arbor Acres, Shaver, entre otras, las cuales se obtuvieron a partir de cruzamientos de machos de la raza Cornish con hembras de la raza Plymouth Rock. Entre las estirpes ponedoras de huevo, las más ampliamente difundidas son Rhode Island Red, New Hampshire y Plymouth Rock, las cuales producen un huevo de cáscara oscura, mientras que la principal ponedora de huevos de cáscara blanca es la Leghorn Blanca (Emmerson, 1997)

A medida que se define y se va mejorando el potencial genético de las aves de estirpes modernas, también se va especializando una mejor y balanceada ración nutricional, mediante técnicas analíticas de nutrimentos y compuestos antinutricionales en las materias primas, así como el empleo de modernos aditivos necesarios para la maximización del rendimiento productivo, además

de los procesos físicos y químicos de las presentaciones en los alimentos balanceados.

Por lo anterior, el desarrollo de la industria avícola ha crecido a pasos agigantados básicamente durante el siglo pasado, permitiendo el cambio desde las prácticas avícolas de traspatio hasta una avicultura altamente industrializada, que hoy en día se torna de dimensiones multimillonarias y en empresas transnacionales.

La marcada tendencia a la alza en la producción de carne de pollo, así como el acortamiento en los ciclos de engorda se describe en el cuadro 3.

Cuadro 3. Mejoramiento genético del pollo de engorda

| AÑO | Conversión Alimenticia (Kg.) | Peso Promedio (Kg.) | Días al sacrificio |
|------------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 1925 | 4.7 | 0.99 | 112 |
| 1935 | 4.4 | 1.18 | 98 |
| 1945 | 4.0 | 1.40 | 84 |
| 1955 | 3.0 | 1.50 | 70 |
| 1965 | 2.4 | 1.59 | 63 |
| 1975 | 2.1 | 1.68 | 56 |
| 1985 | 1.9 | 1.91 | 49 |
| 1995 | 1.8 | 2.09 | 46 |
| 2005* | 1.8 | 2.31 | 45 |
| 2025* | 1.8 | 2.95 | 44 |

Avances en el Mejoramiento de la Producción Avícola (Hans Mann *et al.*, 2002,) * Proyección.

La conversión alimenticia es un factor muy complejo, que representa una medida cruda de la eficiencia biológica, la relación entre la tasa de crecimiento y la conversión del alimento en términos generales pueden englobarse en el potencial de crecimiento. Visto desde otra perspectiva, el crecimiento es un proceso que implica tanto un aumento de la masa, diferenciación sincrónica y maduración de tejidos corpóreos (Emmerson, 1997).

Los procesos de selección sumamente rígidos en el pollo han repercutido negativamente en el equilibrio homeostático del ave; presentándose una marcada reducción en el rendimiento reproductivo, incremento en el tejido graso, deformaciones óseas (huesos largos, principalmente tibia), síndrome de muerte súbita, reducida competencia inmune y síndrome ascítico, los cuales suelen presentarse y en algunos casos agudizarse a partir del resultado en la interrupción del equilibrio fisiológico.

El mayor reto que enfrenta la conversión alimenticia es reducir la cantidad de alimento con el objetivo de favorecer a los individuos que presentan un acelerado crecimiento y simultáneamente alcanzar un peso al sacrificio más rápidamente, por consecuencia, la medición de conversión alimenticia solo puede ser evaluada prácticamente en un periodo de edad determinado, es decir, durante la fase productiva (Emmerson, 1997).

Los métodos empleados para medir conversión alimenticia generalmente involucran la selección de individuos en masa, es decir, aplicados a grandes grupos de animales.

Los métodos genéticos son aplicados a la avicultura industrial la cual eventualmente se torna global, aunque los recursos genéticos parecen ser finitos y altamente estructurados y orientados hacia la preferencia del consumidor final que deben reunir diversos requisitos en diversos mercados regionales, obedecen a entornos y sistemas de gestión en todo el mundo.

El éxito en la industria avícola depende de diversos factores, antes mencionados, no obstante padecimientos inherentes al acelerado ritmo en la producción surge como resultado de dietas ricas en calorías, es probable que la mala salud relacionada con los alimentos seguirá siendo un padecimiento generalizado y normalmente exacerbado con factores fisiológicos y ambientales (Hamano *et al.*, 2007).

Los métodos no genéticos involucran de igual manera optimizar el potencial genético del ave y todas las bondades que ello implica, partiendo de objetivos comercialmente deseables, aunque también podrían ayudar a

disminuir rasgos negativos que suelen limitar el potencial genético (Emmerson, 1997; Rishell, 1997). Las técnicas en biología molecular muestran que es económicamente factible y operativamente posible asegurar que el mejoramiento genético de crecimiento sostenido y conversión alimenticia sea el salto de la avicultura en el siglo XXI (Serenius *et al.*, 2006).

1.4 Implicaciones metabólicas en el balance energético del pollo

La sofisticada alimentación del pollo en engorda ha puesto al límite el desarrollo de tejidos corporales del pollo, la energía química contenida en el alimento es transformada a través de procesos catabólicos a biomoléculas indispensables para la formación de compuestos fosfatados de alta energía (AMP, ADP, ATP, GTP, etc.), la cual servirá para la formación de componentes celulares a partir de moléculas orgánicas menos complejas (anabolismo), en este proceso de formación de energía celular a través de la cadena de transporte de electrones se tiene como molécula de aceptor final de electrones al oxígeno (Baghbanzadeh *et al.*, 2008).

La oxidación–reducción ocurre en toda reacción química en la cual existe una transferencia de electrones; ésta siempre busca un equilibrio entre ambos eventos. Se denomina agente reductor a aquél elemento que cede sus electrones al medio (pasando a su forma oxidada), mientras que el agente oxidante es aquél elemento que tiende a captar dichos electrones del medio pasando a su forma reducida (Zamocky *et al.*, 2012)

Estas reacciones suceden siempre juntas, es decir, si un elemento se oxida, es porque otro elemento se redujo. El oxígeno es el mejor agente oxidante, lo cual se debe a que su molécula es poco reactiva (esto la hace poco excitable por su doble enlace), el hecho que se le denomine oxidación se debe a que en la mayoría de estas reacciones la adquisición de electrones provienen de átomos de oxígeno.

Por lo que se define como como Redox al equilibrio entre oxidantes y antioxidantes celulares. Es un factor importante en la salud, el envejecimiento celular y la enfermedad (Patel *et al.*, 2008).

Como resultado de la producción de energía, en los tejidos orgánicos aeróbicos mediante el movimiento de electrones a través de las crestas mitocondriales, se da la formación de ATP, teniendo como aceptor final de electrones al oxígeno, a partir del cual se forman las especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo las principales el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); estos reaccionan fácilmente con las membranas biológicas causándoles peroxidación, es decir la oxidación de ellas, esto ocurre de manera constante e ininterrumpida durante el proceso de formación de energía (Biewenga, 1997; López, 1997).

Los antioxidantes son compuestos cuya función primordial en el organismo es protegerlo del daño oxidativo que causan los radicales libres, contribuyendo así a mantener el equilibrio homeostático entre un buen estado de salud y la enfermedad. En su mayoría los radicales libres se producen exacerbadamente cuando existen procesos patológicos, lo que sugiere su creciente producción como un agente secundario al agente etiológico (Patel *et al.*, 2008). En casos particulares (como lo es el Síndrome Ascítico del pollo) el exceso de radicales libres son causales de enfermedad.

La célula conjuga dos métodos muy claros y precisos para contrarrestar los efectos de los radicales libres. Una manera es por medio de reacciones que comprenden enzimas antioxidantes como: la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, las cuales son altamente específicas al sustrato que catalizan; mientras que la segunda manera es por medio de las interacciones químicas directas de moléculas antioxidantes con los radicales libres, tal es el caso del ácido ascórbico, el glutatión, los tocoferoles, carotenoides, la melatonina y el ácido alfa lipoico (AAL) las cuales suelen ser menos específicas que las reacciones enzimáticas (Nistala *et al.*, 2008).

La peroxidación de lípidos es uno de los mecanismos fundamentales de deterioro de la calidad en alimentos almacenados. Los cambios en la calidad son el resultado de la oxidación de lípidos, perjudicando la calidad de la

carne y por ende, el valor nutritivo y la posterior producción de compuestos tóxicos.

La estabilidad oxidativa de la carne y productos derivados dependen del equilibrio de antioxidantes y la oxidación de sustratos que incluyen ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), proteínas, colesterol y pigmentos. Como se ha mencionado, el AAL es un cofactor esencial para enzimas mitocondriales y también un antioxidante natural que se utiliza para atrapar radicales libres (Sohaib *et al.*, 2012). Que de acuerdo a su origen se clasifican en dos grupos importantes: especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS).

1.5 Ácido Alfa Lipoico

El ácido alfa lipoico, es una molécula pequeña compuesta por una cadena de ocho carbonos y un grupo disulfuro dispuesto en un extremo de la misma. Por su estructura química, la forma biológica del AAL se le conoce como lipoato, esta es la molécula que actúa como un regulador en la reacción oxido – reducción. En las células solo se encuentra como lipoamida, la mayor parte de los estudios científicos, genéticos y bioquímicos, acerca de la síntesis de lipoamida fundamentalmente se han llevado a cabo en *E. coli*.

La estructura química del AAL contiene dos moléculas de azufre, entre los enlaces C-H de los carbonos 6 y 8 del ácido octanóico (C8), el cual es precursor directo del ácido alfa lipoico.

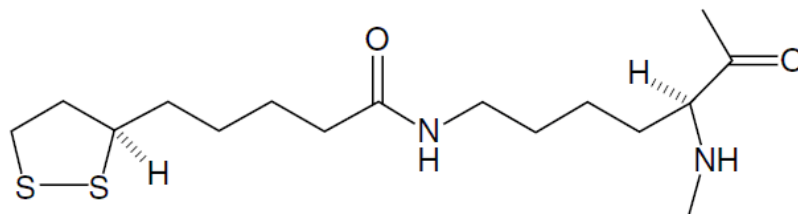


Figura 3. Estructura funcional del AAL (Patel *et al.*, 2008).

En la figura 3 se observa la estructura química de lipoamida; en donde, a la cadena de ocho carbonos de AAL se le une un residuo terminal de lisina en la subunidad E2 de los complejos deshidrogenasa.

El ácido lipoico está presente como coenzima en microorganismos eucariotes y procariotes y se encuentra presente en células y tejidos tanto animales como vegetales, es un componente estructural de complejos multi enzimáticos con funciones en la descarboxilación oxidativa de diversos α -cetoácidos y de glicina, así como la ruptura de 3-hidroxi 2-butanona (acetoina) hasta acetaldehído y acetil CoA (Patel *et al.*, 2008).

Su principal propiedad funcional como coenzima se debe a su gran capacidad para intercambiar electrones, por lo que en su forma oxidada de disulfuro cíclico (lipoamida) es aceptor de electrones y su forma reducida (dihidrolipoil) es donador de electrones (Patel *et al.*, 2008).

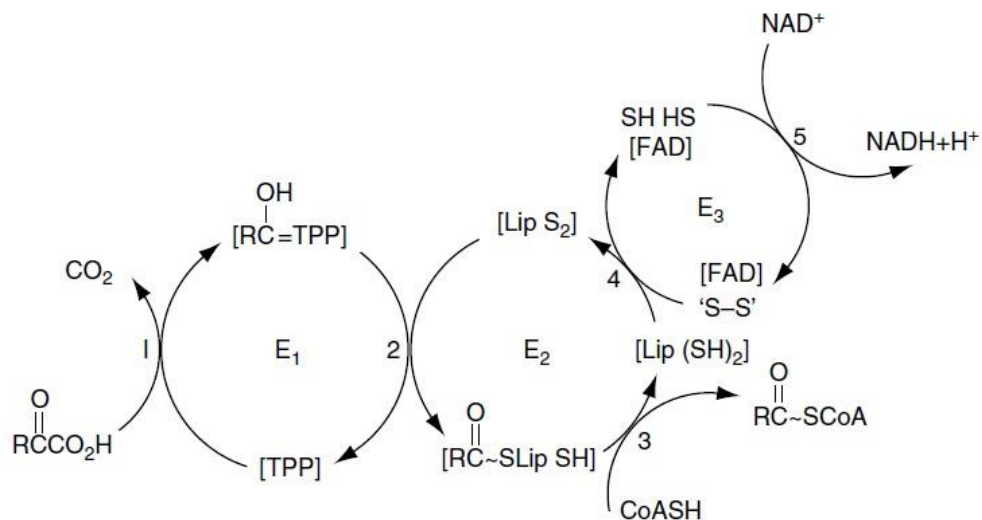


Figura 4. Secuencia de óxido - reducción del AAL. TPP, tiamina difosfato; LipS₂, fracción lipoil: LipS (SH)₂, fracción lipoil reducida; SCoA, succinil coenzima A; NAD, nicotinamida adenina dinucleótido; FAD, flavina adenina dinucleótido (Patel *et al.*, 2008).

El fin mediato en los equivalentes reductores de cada reacción global se transfiere a NAD⁺, proporcionando NADH y un protón. En la figura 4 se ejemplifica la oxidación y reducción de lipoamida a dihidrolipoil en su participación del metabolismo energético en la mitocondria (Patel *et al.*, 2008).

En la figura 5 se observan las estructuras químicas de AAL presentes en el organismo.

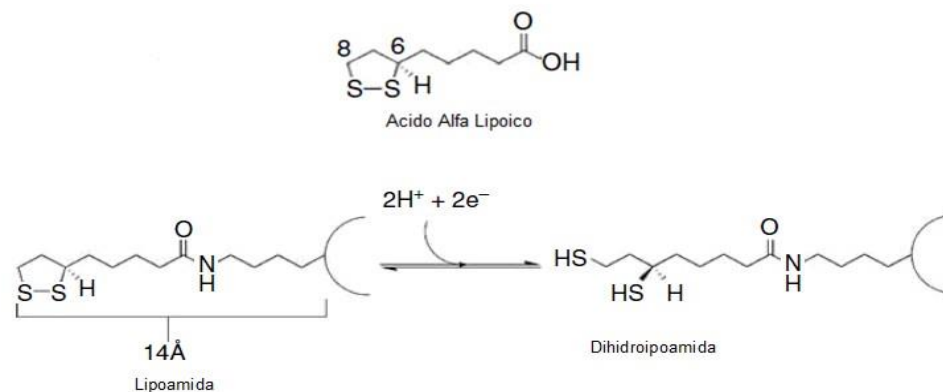


Figura 5. Estructura de diversas formas de AAL (Patel *et al.*, 2008).

1.5.1 Biosíntesis de Ácido Alfa Lipoico

La síntesis de novo de ácido alfa lipoico se sabe que es citosólica, ya que de manera biológica solo se encuentra como lipoamida en el citosol celular; la síntesis endógena de ácido alfa lipoico se debe a la acción de la enzima sintasa de ácido lipoico (LASY, por sus siglas en ingles), en los mamíferos la enzima LASY, esencialmente sólo se encuentra en las mitocondrias y gracias a esta molécula la síntesis de lipoamida se genera en el sitio de acción (Padmalayan *et al.*, 2009).

Existen dos maneras de incorporar el ácido alfa lipoico a los ya mencionados complejos multienzimáticos; siendo el primero el que proviene de una fuente exógena (alimento), en donde el AAL es removido de la dieta y mediante una proteína transportadora de lipoil (LCP) se incorpora al interior de las células mediante un proceso similar al que sucede para cualquier molécula lipídica.

Por el contrario, la vía endógena consiste en la síntesis de novo de AAL, en donde a partir de una cadena de ocho carbonos generada a través de la biosíntesis de ácidos grasos tipo II, la cual se une con una proteína transportadora de acilo (ACP) misma que posteriormente se le une a su correspondiente proteína transportadora de lipoil (LCP), mediante una proteína transferasa (octanoiltransferasa) que se conoce como LipB. Una siguiente enzima llamada lipoil sintasa (LipA) cataliza la inserción de dos átomos de azufre en los carbonos 6 y 8 formando así el ácido alfa lipóico en su forma biológica conocida como lipoamida.

En la figura 6 se ilustra la síntesis de novo del AAL en donde ACP, LipA y LipB son las principales responsables. También se explica como el AAL en su forma libre que proviene de fuentes exógenas se incorpora al metabolismo celular.

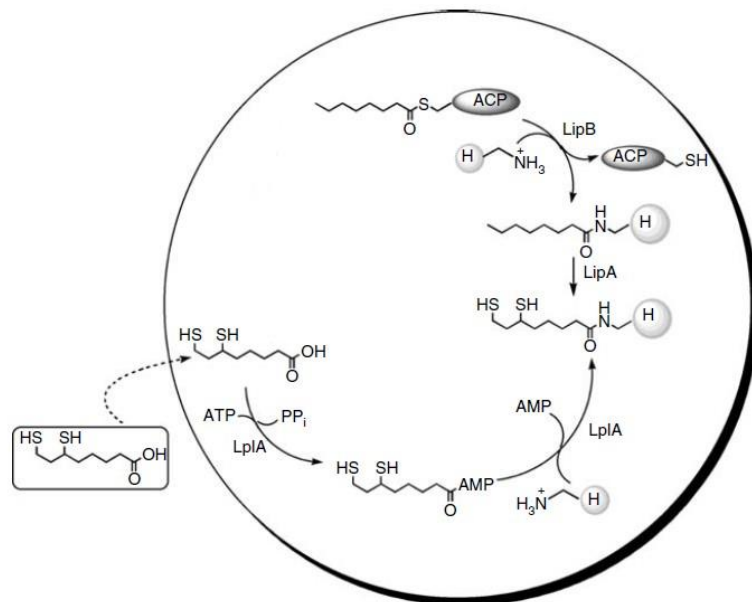


Figura 6. Incorporación de AAL en el organismo (Patel *et al.*, 2008).

1.6 Cambios en la expresión génica

La activación de la transcripción de los genes es un proceso con múltiples pasos, que implica a un gran número de proteínas que funcionan en complejos. Los factores de transcripción se unen al ADN en una secuencia

específica y esencialmente marcan a un gen para su activación o represión, a través del reclutamiento de proteínas coactivadoras o corepresoras. El blanco final de los factores de transcripción es el genoma y el principio de su acción es inducir cambios conformacionales en los complejos protéicos que interactúan con la maquinaria transcripcional. La regulación transcripcional es vital para la homeostasis y permite la adaptación de los procesos fisiológicos a las señales externas. En éste sentido, como parte de los objetivos de ésta tesis se buscó medir los cambios en la expresión génica a nivel hepático por efecto de la adición de AAL y por ello se describen brevemente algunas de las técnicas que se utilizaron para medir dichos cambios (Metzker et al., 2010).

Una forma de medir los cambios en la expresión de genes, es a través de la cuantificación del ARNm de un determinado gen, lo cual puede hacerse de manera sencilla mediante la retrotranscripción (RT) seguida de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), pero existen otras cuantitativas como el PCR en tiempo real y la secuenciación masiva.

1.6.1 PCR en tiempo real

El PCR en tiempo real o PCR cuantitativo es una variación del PCR estándar, utilizado para la cuantificación de ADN o ARN mensajero de una muestra. Se utilizan oligonucleótidos específicos de una secuencia para determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN. Para la cuantificación, se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicón producido. La cuantificación del producto se realiza mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón, de forma que a mayor producto mayor fluorescencia se emitirá, dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación a la longitud de onda apropiada, por lo que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (Vandesompele et al., 2002).

La medida de la expresión génica por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico, o normalizar respecto a la diferente concentración de RNA total de las muestras, ya que si la cantidad de control endógeno varía es debido a cambios en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de ADNc, no a cambios en su expresión. Los genes más utilizados como controles endógenos son: RNAr 18S, GAPDH, beta-actina, TBP, HPRT, beta-2-microglobulina, ciclofilina, entre otros (Vandesompele et al., 2002).

1.6.2 Secuenciación Masiva y RNA-seq

El desarrollo de nuevos métodos de secuenciación de ADN ha permitido mapear y cuantificar el transcriptoma (porción del genoma transcrito a ARNm). Este método denominado RNA-seq (secuenciación de ARN), en general parte de una muestra de ARN la cual se convierte en una biblioteca de fragmentos de ADN complementario que finalmente será secuenciado. Después de la secuenciación se alinea el genoma con uno otro de referencias, o en su caso, si es preciso se alinea sin tener un transcripto de referencia. Por consecuencia puede precisar el nivel de expresión para cada gen. La plataforma de secuenciación de alto rendimiento RNA-seq no tiene límite para la cuantificación con el número de secuencias obtenidas, por lo que, tiene un rango dinámico de expresión sobre los niveles del transcriptoma. También ha demostrado ser tan preciso en la cuantificación de niveles de expresión como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCRq) (Wang et al., 2009).

2. ANTECEDENTES

Estudios realizados en pollos de engorda por Hamano *et al.*, (2005) observaron que el AAL en dosis de 200 mg/kg de alimento a las dos y las cinco semanas de edad, reduce en un 17% el nivel de glucosa circulante y aumenta en contenido de triglicéridos sanguíneos.

En el año 2010 experimentos controlados llevados a cabo en la Ciudad de México por Díaz-Cruz y colaboradores emplearon 1008 pollos de la línea Ross x Ross, en engorda intensiva por siete semanas, y probaron que el AAL adicionado como aditivo en el alimento a dosis de 40 ppm mejora el comportamiento productivo de las aves obteniendo un aumento del 4.3% en el peso vivo, una reducción de 1.8% en el consumo de alimento y una mejora de 6.1% en la conversión alimenticia.

Chen *et al.*, en el año 2011 observaron que al suplementar la dieta de pollos con AAL a dosis de 300 mg/kg existe un aumento significativo para las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutathion peroxidasa (GPX), en suero, hígado y músculo de la pierna, así como el incremento de glutathion hepático y α -tocoferol en músculos de la pierna.

Sohaib *et al.*, hacia el año 2012 usaron en pollo de engorda, AAL en dosis de 150 mg/kg en la dieta junto con α -tocoferol en dosis de 200 mg/kg, observando que dichos compuestos favorecen la estabilidad oxidativa de la carne y que los subproductos de canales tratadas se pueden almacenar a -18°C hasta por tres meses más que en los del grupo control.

En el año 2013 Imik y colaboradores mediante la adición de AAL y ácido ascórbico en la dieta concluyen que en las aves tratadas se evita la disminución del peso corporal en machos y los efectos adversos sobre todo en el día 14 de almacenamiento de la canal.

Considerando las implicaciones y efectos del AAL en el metabolismo tanto como coenzima, así como de regulador redox, datos recientes sugieren que es una molécula que adicionada en la dieta de las aves provee notables

efectos profilácticos a la salud ya que es fundamental su participación en el metabolismo energético y en el equilibrio del estrés oxidativo, por lo que el resultado en la eficiencia productiva del pollo impactará directa y favorablemente en los estados financieros de las parvadas destinadas a la producción de carne a nivel industrial.

3. JUSTIFICACIÓN

La Oficina del Censo de los Estados Unidos sugiere que para el año 2050 más de 9 mil millones de habitantes poblarán el mundo. Esto hace necesario desarrollar tecnologías accesibles y eficaces para la producción de alimentos, esto como respuesta al número creciente poblacional, y el aumento en los ingresos de las personas, lo que implica mayor poder adquisitivo y evidentemente el alza en la demanda de alimentos. Garantizar insumos de origen pecuario es una creciente preocupación orientada hacia dietas ricas en nutrimentos. Todas las prácticas que conduzcan a mejoras en este rubro formaran parte de políticas multifuncionales de países desarrollados y de países en desarrollo, por lo que el reto es encontrar métodos y formas de mantener y aumentar la producción de alimentos mejorando los efectos secundarios positivos y eliminar los negativos.

Los estudios hasta ahora efectuados han cursado bajo condiciones muy controladas, que particularmente no consideran las implicaciones inherentes de producción de carne de pollo a nivel comercial; en el presente trabajo se buscó analizar cómo es que al suplementar la dieta con AAL tiene un efecto en los principales parámetros de producción como lo son la conversión alimenticia, consumo de alimento y mortalidad general del pollo de engorda bajo condiciones de producción industrial. Así mismo, estudiar el tejido hepático ya que es frecuentemente afectado por cambios metabólicos; la regulación transcripcional es vital para entender la homeostasis ya que permite la adaptación a los procesos fisiológicos, por lo que medir los cambios en la expresión génica a nivel hepático por efecto de la adición de AAL es imperativo en este trabajo.

4. HIPÓTESIS

La adición de ácido alfa lipoico (AAL) en el alimento a dosis de 40 partes/10⁶ durante el ciclo productivo del pollo bajo condiciones de granja comercial, impacta positivamente en el metabolismo energético del ave y mejora su eficiencia productiva.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

Evaluar el efecto de la adición de AAL a una dosis de 40 ppm en la dieta del pollo de engorda, sobre indicadores del metabolismo energético en tejido hepático, adiposo y muscular así como en los parámetros productivos del ave en condiciones de granja comercial, así como determinar el impacto que tiene el AAL en la expresión génica del pollo de engorda.

5.2 Objetivos Particulares:

- Determinar el efecto de la adición de AAL sobre la ganancia de peso en pollos de granja comercial.
- Evaluar el efecto del AAL sobre el ARN_T, ADN_g, Proteína total, Actividad y Tamaño Celular en Tejido Hepático (TH), Tejido Adiposo Subcutáneo (TAS), Tejido Adiposo Omental (TAO), Tejido Muscular Esquelético Semitendinoso (TMES) y Tejido Muscular Esquelético Pectoral (TMEP).
- Determinar el efecto de la adición de AAL sobre la expresión diferencial de genes a nivel hepático bajo condiciones de granja comercial.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Fase de Campo

La fase de campo en este experimento se llevó a cabo en dos granjas de pollo de engorda, ubicadas en el Municipio de Tequisquiapan, Estado de

Querétaro; dicho municipio se encuentra situado en la altiplanicie mexicana, con un clima que va de templado a cálido con temperatura media anual es de 17.5° C y con altitud de 1180 msnm (Gobierno del Estado de Querétaro, 2005).

En cada una de las granjas se emplearon ocho casetas con aves pertenecientes a la línea Ross 308, donde se alojaron 24,000 aves por caseta, es decir que 192,000 aves recibieron el tratamiento y 192,000 aves formaron el grupo control. Al comenzar la prueba, la parvada cumplía un día de edad para ambas unidades experimentales.

Ante la evidente necesidad de manejar los lotes de producción de una manera homogénea, se engordaron machos y hembras por separado; ya que el macho alcanza mayor talla en menos tiempo, lo cual se manifiesta más evidentemente a medida que tiene más edad y por lo tanto presenta mayor peso corporal, impactando directamente en el precio de la canal; dicha característica de crecimiento repercute en que cada sexo se sacrifique a edades diferentes, y esto es determinado directamente por la demanda del mercado y en menor medida por el estado zoo-sanitario de las aves.

6.1.1 Descripción física de la granja

Cada granja estaba delimitada por cerco perimetral externo, y conformada por 8 casetas de aves (16 casetas en las dos granjas), cuenta con arco y vado sanitario, así como baños para desinfectar al personal que accede y sale de sus instalaciones.

Las características de las casetas fueron las siguientes:

- 105 metros de largo x 12 metros de ancho = 1260 m²
- Ambiente interno controlado por computadora según necesidades.
- Bebederos y comederos automáticos (*ad libitum*).
- Piso de concreto con cama de paja.
- Distribución específica de aves según su sexo (machos y mixtas).

La distribución de las granjas empleadas durante la fase de campo de este experimento se puede observar en la figura 7; las casetas que sólo tienen machos cuentan con 24,000 aves, mientras que las casetas mixtas tienen 8,000 machos y 16,000 hembras, lo que resulta en un total neto de 96,000 machos y 96,000 hembras en ambos grupos.

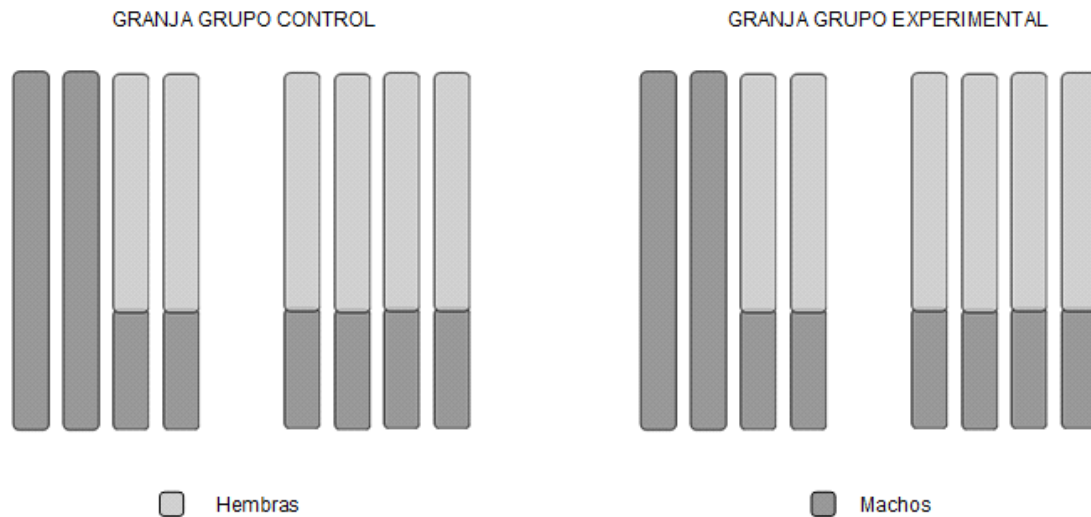


Figura 7. Distribución de aves en el grupo control y grupo experimental

6.1.2 Registros de producción

El presente trabajo se basa en la producción industrial de pollo, por lo cual los registros de productivos son tomados tal y como se hizo de manera rutinaria en la empresa en donde se produce (Pollo Querétaro). En los registros de producción se toman en cuenta los datos del peso inicial de las aves (g), ganancia semanal de peso (g), consumo de alimento semanal por ave (g), consumo de alimento acumulado por ave (g), mortalidad diaria (número y %), mortalidad semanal (número y %) y mortalidad general (número y %). Los datos de mortalidad se registraron por caseta, anotando en la medida de lo posible: granja, fecha, edad, sexo y peso.

Los registros de peso se obtuvieron semanalmente; las aves se pesaron de manera individual sin importar su edad y fueron escogidas al azar en distintas partes de la caseta, ello con el fin de obtener datos representativos.

Se tomó un muestreo de 120 aves machos por caseta y en el caso de las casetas mixtas se registraron datos de 120 aves de cada sexo.

Del mismo modo, se tomó una muestra del alimento durante cada fase de la engorda, el muestreo se aplicó en ambas granjas, con el fin de determinar la presencia de AAL en el alimento, y así, tener certeza de que el grupo control no recibió AAL.

6.1.3 Alimento empleado

El alimento es uno de los principales componentes del costo total de producir pollos de engorda. Sólo se logra una respuesta favorable a la mejor nutrición de las parvadas de pollo de engorda cuando el factor limitante del rendimiento no sea el aporte de nutrientes. El cuadro 4 proporciona información detallada del alimento utilizado y de los nutrimentos suministrados durante todo el ciclo productivo de la parvada. Las especificaciones de las dietas propuestas se obtuvieron de la planta NutriBaq (Nutrimentos Balanceados de Querétaro, SA de CV), donde el alimento fue preparado, mismo que es primero pelletizado y posteriormente reducido al tamaño de partícula acorde a la edad del pollo. La adición de AAL al alimento se realizó mediante la inclusión de un saco de 5 kg que contiene una mezcla de maíz molido con AAL, e cual al ser mezclado con una tonelada de alimento balanceado permite una dosificación de 40 partes/10⁶.

Cuadro 4. Composición nutrimental del alimento empleado

| ALIMENTO | ENERGIA Kcal/kg | PROTEINA CRUDA % | LISINA DISP % | MET & CISTINA DISP % | Ca % | P DISP % | COLINA Mg/kg | ACIDO LINOLEICO % |
|--------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|---------|-------------|-----------------|-------------------------|
| PREINICIADOR | 3075 | 24 | 1.43 | 1.07 | 1.05 | 0-50 | 1600 | 1.25 |
| INICIADOR | 3025 | 22 | 1.27 | 0.94 | 1.05 | 0.50 | 1600 | 1.25 |
| FINAL UNO | 3100 | 21 | 1.10 | 0.84 | 0.90 | 0.45 | 1500 | 1.20 |
| FINAL DOS | 3150 | 20 | 0.94 | 0.72 | 0.85 | 0.42 | 1400 | 1.0 |
| FINAL TRES | 3200 | 20 | 0.94 | 0.72 | 0.85 | 0.42 | 1400 | 1.0 |
| FINALIZADOR | 3225 | 18 | 0.89 | 0.69 | 0.80 | 0.40 | 1300 | 1.0 |

6.1.4 Sacrificio y toma de muestras

El Ross 308 es un pollo de engorda robusto, de crecimiento rápido y eficiente conversión alimenticia que debe alcanzar el máximo rendimiento final de la parvada en lo que se refiere a peso vivo, conversión alimenticia, uniformidad y con buen rendimiento de carne, enfocadas primordialmente en satisfacer las exigencias del consumidor. Una vez que las aves alcanzan su peso al sacrificio (producción del número máximo de canales de buena calidad y con buen rendimiento), estas se sacrificaron en el Rastro TIF 393 (ubicado en la carretera a Bernal km. 12.8, Colón, Qro.) donde se tomaron muestras de manera aleatoria e inmediata al sacrificio.

Se obtuvieron muestras de tejido hepático (TH), tejido adiposo subcutáneo (TAS), tejido adiposo omental (TAO), tejido músculo esquelético pectoral (TMEP) y músculo esquelético semitendinoso (TMES), a 10 aves de cada caseta, con un total de 160 aves; de éstas, 80 aves eran del grupo experimental y el resto del grupo control.

Una vez obtenidas las muestras, se colocaron en nitrógeno líquido, y se transportaron al laboratorio donde se preservaron en congelación a -70° C, para su posterior análisis

6.2 Análisis de laboratorio

Las muestras se analizaron en el Laboratorio Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN), ubicado en el Laboratorio A-03 del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla, Querétaro.

El ARN y el ADN son compuestos que se encuentran en todos los organismos vivos. El ADN es el templado genético y su concentración es relativa al tamaño celular, aunque puede verse afectada por factores ambientales. En contraste, la concentración del ARN está involucrado en la síntesis de proteínas y es altamente dependiente de la tasa de crecimiento celular, mismo que está determinado parcialmente por el medio ambiente. Como consecuencia, la concentración de ADN es una buena medida del

número de células, ya sea por órgano o por función de los gramos de tejido. La tasa o relación ADN/proteína se utiliza como indicador del tamaño celular y la tasa ARN/ADN se utiliza como indicador de la síntesis de proteína en función del tamaño celular y es lo que se denomina actividad celular. (Dortch *et al.*, 1983; Widdowson *et al.*, 1972).

6.2.1 ARN_T

Se realizó la extracción del ARN total (ARN_T) a partir de TRI_{ZOL}® Reagent (Invitrogen). Es una solución monofásica de fenol, tiocianato de guanidina y algunos otros componentes que facilitan el aislamiento del ARN. La técnica se describe a continuación.

- 1.- Pesar 100 mg de tejido.
- 2.- Añadir 1 ml de TRI_{ZOL} por cada 100 mg de tejido.
- 3.- Homogenizar las muestras mediante el uso de politrón (siempre mantener las muestras en hielo)
- 4.- Centrifugar durante 5 minutos a 12,000 rpm.
- 5.- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 6.- Añadir 1 ml de RNAsa out y dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Añadir 0.2 ml de cloroformo.
- 8.- Agitar vigorosamente por 15 segundos.
- 9.- Dejar reposar 2 – 3 minutos a temperatura ambiente.
- 10.- Centrifugar las muestras durante 15 segundos a 12,000 g.
- 11.- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
- 12.- Añadir 500 ml de isopropanol.
- 13.- Dejar reposar 10 minutos.
- 14.- Centrifugar por 10 minutos a 12,000 g.
- 15.- Remover y desechar el sobrenadante.
- 16.- Enjuagar con 1 ml de etanol al 75 %.
- 17.- Centrifugar 5 minutos a 7,600 g.
- 18.- Dejar secar el pellet 5 minutos a temperatura ambiente.
- 19.- Eluir el ARN en 40 µl de agua DEPC.
- 20.- Cuantificar en nanodrop.

6.2.2 ADN_g

La obtención de ADN genómico (ADN_g) se realizó mediante DNA_{ZOL}® Reagent (Genomic DNA Isolation Reagent Invitrogen). Este procedimiento se basa en el empleo de una solución de lisis que tiene como componente

activo guanidina, la cual hidroliza el ARN y permite la precipitación selectiva del ADN a partir de un lisado celular. La técnica se describe a continuación.

- 1.- Pesar de 25 – 50 mg de tejido.
- 2.- Adicionar 1 ml de DNAzol.
- 3.- Homogenizar el tejido para lisarlo.
- 4.- Centrifugar 10 minutos a 10,000g.
- 5.- transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 6.- Precipitar el ADN con etanol al 100 % con 0.5 ml.
- 7.- Mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente de 1 – 3 minutos (el ADN se visualiza y precipita)
- 8.- Centrifugar a 4000g por 1 ó 2 minutos.
- 9.- Lavar el ADN dos veces con etanol al 75 % con 0.8 ml.
- 10.- Invertir de 3 – 6 veces.
- 11.- Dejar los tubos verticalmente y dejar reposar 1 minuto.
- 12.- Remover el etanol por pipeteo o decantación.
- 13.- Secar el ADN de 5 – 15 segundos.
- 14.- Eluir el ADN en agua a 8mM de NaOH en 50 ml.
- 15.- Centrifugar a 12,000 g por dos minutos.
- 16.- Transferir el sobrenadante a u tubo nuevo.
- 17.- Cuantificar en nanodrop.

6.2.3 Cuantificación del ARN_T y ADN_g

La cuantificación del ARN_T y ADN_g se realizó en el espectrofotómetro (NANODROP 1000). Fundamentalmente la cuantificación de ARN y ADN se realiza mediante una fuente de radiación Uv-Vis. Una vez determinada la concentración de ARN_T y ADN_g en ng/μl, se verificaron a través de electroforesis en gel de agarosa, a continuación descrita.

- 1.- Gel de agarosa al 1%.
- 2.- En 30 ml de buffer TBE agregar 0.30 gr de agarosa.
- 3.- Calentar 30 segundos en horno de microondas.
- 4.- Colocar la mezcla en el molde y dejar solidificar por 30 minutos.
- 5.- Aplicar las muestras en un volumen de 10μl con jugo azul 1x.
- 6.- Correr las muestras en el gel a 80 voltios durante 45 minutos.
- 7.- Observar en transiluminador.
- 8.- Fotografiar.

6.2.4 Cuantificación de proteína

Para la cuantificación de proteína se empleó el método de Bradford (1976), este método emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico originan un color azul intenso que se puede medir fácilmente a una absorbancia de 280 nm. Se extrajo la proteína total a las muestras de TH, TASC, TAOM, TMEP y TMES de 15 animales del grupo experimental y 15 animales del grupo control para lo cual, se realizó una curva de calibrado empleando albúmina como proteína control, para hacer la lectura en el espectrofotómetro (NANODROP 1000, Thermo Scientific). La técnica se describe a continuación.

- 1.- Pesar 50 mg de tejido.
- 2.- Añadir 500 mcl de coctel inhibidor de proteasas.
 - a) TRIS: 1M
 - b) EDTA: 0.1M
 - c) NaCl: 1M
 - d) Azida de Na: 0.05g
- 3.- Dejar toda la noche en agitación (cuarto frío).
- 4.- A otro día centrifugar la muestra a 13,000 rpm durante 10 minutos.
- 5.- Tomar el sobrenadante.
- 6.- Realizar alícuotas de 200 mcl y congelar a -70°C.

6.2.5 Cuantificación materia seca muscular.

Se tomó 1g de muestra de tejido músculo esquelético pectoral (TMEP) debido a que la pechuga representa un valor económico significativo en la canal de estas aves. Se emplearon los mismos 15 animales de cada grupo, con objeto de determinar el contenido de agua tisular total en músculo; las muestras fueron pesadas antes y después al lapso de desecación, mediante el empleo de un horno a 100° C durante 8 horas.

6.2.6 Cuantificación de AAL en el alimento

Se tomó una muestra de 0.5 g a la que se realizó la extracción de lípidos (AOAC, 1990). A continuación se listan los pasos de la misma.

- 1.- Todas las muestras se trabajan en hielo en la campana de extracción con luz amarilla.

- 2.- Pesar 0.5 g de muestra seca en un matraz con aforación de 24 ml.
- 3.- Agregar 7.5 ml de solución de extracción (hexano, acetona, alcohol absoluto, tolueno 10:7:6:7)
- 4.- Agitar un minuto, colocar en oscuridad 16 horas.
- 5.- Al termino agregar 0.5 ml de KOH metanólico al 40%.
- 6.- Agitar un minuto y colocar en oscuridad una hora.
- 7.- Agregar 7.5 ml de hexano, agitar un minuto y aforar con Na₂SO₄ 10%, agitar un minuto y colocar en oscuridad una hora.
- 8.- Separar con pipeta Pasteur la fase superior y colocar en un tubo falcón nuevo de 15 ml, tener cuidado de no tomar fase acuosa ni residuos sólidos (material orgánico)
- 9.- Evaporar con solvente la muestra para concentrarla.
- 10.- Se mantiene a -70° C (muestra seca)
- 11.- Se reconstituyen en 0.200 ml de acetona para leer en HPLC.

Posteriormente se llevó a cabo la lectura de la muestra resultante con el mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV Hewlett Packard 1046-A). Esta técnica es empleada para diferenciar los componentes de una solución, consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil que actúa como portadora de la muestra. La muestra en solución es inyectada a la fase móvil permitiendo que los componentes de la muestra se muevan de acuerdo a las interacciones no covalentes de los compuestos de la columna. Para la determinación de AAL se empleó la columna C18. 250 X 4.60 mm 5µm Phenomenex.

La fase móvil constó de los siguientes componentes.

- a) ACN: 75 %.
- b) H₂O: 5 %.
- c) THF: 20 %.

6.3 Secuenciación Masiva de ARN hepático (RNA-seq)

A partir del tejido hepático de 10 aves de cada grupo, se aisló el ARN_T mediante el kit *SV Total RNA Isolation System (Promega)*, formando una mezcla compuesta de ARN_T tanto del grupo control, como del grupo experimental, cada muestra se compuso por 150 microgramos, es decir, 10

microgramos de ARN por animal. La técnica mediante la cual se extrajo se describe a continuación.

- 1.- Agregar a un tubo 175 μ l de buffer de lisis.
- 2.- Agregar tejido 30 mg de muestra, homogenizar con el pistilo.
- 3.- Agregar 350 μ l de amortiguador de ARN solución RDA (azul), mezclar por inversión 3 – 4 veces
- 4.- Centrifugar 13,000 rpm por 10 min.
- 5.- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 6.- Añadir 200 μ l de etanol al 100 % a -20°C , mezclar por inversión.
- 7.- Transferir a la columna y centrifugar 13,000 rpm de 45 segundos a un minuto.
- 8.- Eliminar el sobrenadante y agregar 600 μ l de buffer de lavado RWA y centrifugar 13,000 rpm por un minuto. Eliminar el residuo del tubo.
- 9.- Añadir a cada columna la mezcla de incubación con DNAsa:
 - a) 40 μ l de buffer amarillo
 - b) 5 μ l de MnCl_2
 - c) 5 μ l de DNAsa
- 10.- Agregar al tubo los 50 μ l e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- 11.- Agregar 200 μ l de la solución stop de DNAsa (DSA).
- 12.- Centrifugar un minuto a 13,000 rpm.
- 13.- Agregar 600 μ l de la solución de lavado de ARN (solución RWA) y centrifugar un minuto a 13,000 rpm.
- 14.- Agregar 200 μ l de la solución de lavado de ARN (solución RWA) y centrifugar un minuto a 13,000 rpm.
- 15.- Tirar el eluido y centrifugar 13,000 rpm por dos minutos para secar la columna.
- 16.- Transferir la columna a un tubo nuevo, añadir 22 μ l de agua con inhibidor de RNAsas e incubar a temperatura ambiente por un minuto.
- 17.- Agitar brevemente en el vortex y centrifugar 13,000 rpm durante dos minutos.

Cada muestra se almacenó a -80°C y fue transportada en hielo seco a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de ADN, en el Instituto de Biotecnología perteneciente a la UNAM, campus Morelos.

La secuenciación masiva de los genes se hizo mediante el equipo Illumina Cluster Station and Genoma Analyzer. Finalmente, esta parte del experimento se concluyó con un análisis Bio-Informático a través de la empresa Winter-genomics, éste análisis permitió determinar con claridad la expresión diferencial de genes.

El análisis Bio-Informático se constituyó de 31,873,989 lecturas de genes para el genoma del pollo (*Gallus gallus*) para el grupo de aves que consumió AAL y 33,894,398 lecturas pertenecientes al grupo control, a partir de los cuales se realizó un análisis Bioinformático, mediante un paquete Bioconductor denominado Bio-mart; las lecturas de los genes fueron alineados con el genoma del pollo mediante un alineador denominado Bowtie, el cual es una herramienta de *Ensembl* (proyecto de investigación bioinformática que se fundamenta en el desarrollo de un sistema computacional que produzca y mantenga anotaciones automáticas en los genomas eucariontes principalmente Cordados, invertebrados y levaduras), con una variabilidad significativa ($P < 0.05$). Los genes que se presentaron regiones superpuestas fueron excluidos. Los genes que se reportan con mayor expresión fueron aquellos que presentan mayor cantidad de lecturas, este enfoque puede ser demasiado simple cuando un gen es altamente expresado en una condición experimental, lo que predispone a un sesgo dado que la contraparte de referencia para el resto de genes en la muestra se encuentra disminuido o con menores lecturas.

Por tal razón los datos son estandarizados, dado que es necesario estimar la variación intrínseca en el número de lecturas entre bibliotecas (AAL y control), la estandarización aplicada es una distribución binomial negativa que es un tipo de distribución de probabilidad discreta y se utiliza para modelar el número de sucesos en una serie de ensayos antes que se produzca un número determinado de fallos.

6.4 Análisis Estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SAS, 2006.

6.4.1 Variable de respuesta ganancia de peso

Se empleó un modelo estadístico completamente al azar con arreglo factorial

$$Y = \mu + T_i + S_j + E_k + TSE_{ijk} + e_{(e)jk}$$

Dónde:

Y = Variable de respuesta ganancia de peso en gramo.

μ = Efecto de la media general.

T_i = Probable efecto del i -ésimo tratamiento.

S_j = Probable efecto del j -ésimo sexo.

E_k = Probable efecto de la k -ésima semana.

TSE_{ijk} = Efecto de la probable interacción del i -ésimo tratamiento, en el j -ésimo sexo y de la k -ésima semana.

$e_{(ejk)}$ = Error experimental asociado al i -ésimo tratamiento, en el j -ésimo sexo y de la k -ésima semana.

6.4.2 Variable de respuesta ARN_T, ADNg, Proteína, Actividad Celular y Tamaño Celular

Se empleó un modelo estadístico completamente al azar

$$Y = \mu + T_i + e_i$$

Dónde:

Y = Variable de respuesta cuantificación de ARN_T, ADNg, Proteína Total, Actividad Celular y Tamaño Celular.

μ = Media general.

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento.

e_i = Error experimental asociado al i -ésimo tratamiento.

6.4.3 Variable de respuesta contenido de agua tisular total.

Mediante el empleo del siguiente diseño completamente al azar:

$$Y = \mu + T_i + e_i$$

Dónde:

Y = Variable de respuesta determinación contenido de agua tisular total.

μ = Media general.

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento.

e_i = Error experimental asociado al i -ésimo tratamiento.

6.4.4 Análisis estadístico de RNA-seq

Se empleó un modelo de distribución binomial negativo

$$Y = \log_2 (T_i/N_{Ti} - \log_2 C/N_{Cj})$$

Dónde:

Y = Nivel de expresión génica.

T_i = Probable efecto del i -ésimo tratamiento

N_{Ti} = Cantidad total de lecturas del probable efecto del i -ésimo tratamiento

C_j = Probable efecto del j -ésimo grupo control

N_{Cj} = Cantidad total de lecturas del probable efecto del j -ésimo control

6.5 Análisis de estados financieros.

Sin duda alguna, la rentabilidad empresarial es la base de la producción, hoy en día caracterizado por el proceso de globalización por lo que debemos precisar y conocer con exactitud los estados financieros, es decir, evaluar la inversión de un proyecto considerando los costos de producción de cara a las nuevas tecnologías y exigencias, lo cual apoyará la toma de decisiones del beneficio económico actual y poder entonces trasladarlo a inversiones futuras y así determinar entonces si hubo notable mejoría o en su caso, un impacto negativo en el estado financiero de la parvada.

Lo primero que se hizo fue obtener un balance general, estimando las utilidades y las pérdidas, es decir, los ingresos y los egresos netos, a valores

monetarios actualizados, tanto en los pollos que consumieron AAL, así como en los pollos controles.

Es necesario no perder el objetivo de productividad y solvencia empresarial por lo que se calculó el precio unitario del alimento a diferentes etapas de producción y el precio a venta de la carne del pollo a mayoreo.

7. RESULTADOS

7.1 Variable de respuesta ARN_T, ADN_g, Proteína, Actividad Celular y Tamaño Celular

En este último análisis se observó en las aves alimentadas con AAL mayor cantidad de ARN_T e incremento en la actividad hepática, mientras que en el musculo pectoral se determina un incremento en la actividad celular, esto en unidades experimentales entre miembros del grupo (P< 0.05). El cuadro 5 nos muestra los resultados obtenidos por tejido y por tratamiento.

Cuadro 5. Variable de respuesta ARN_T, ADN_g, Proteína, Actividad Celular y Tamaño Celular

| TEJIDO | ARN _T mg/g | | ADN _g mg/g | | PROT. mg/g | | ACTIVIDAD | | TAMAÑO | |
|--------|-----------------------|--------|-----------------------|------|------------|------|-----------|--------|--------|------|
| | CON. | AAL | CON. | AAL | CON. | AAL | CON. | AAL | CON. | AAL |
| TH | 2.43 b | 2.94 a | 3.68 | 3.60 | 2.54 | 2.47 | 0.67 b | 0.85 a | 1.45 | 1.47 |
| TAS | 0.61 | 0.62 | 0.42 | 0.41 | 0.48 | 0.59 | 1.90 | 1.67 | 0.88 | 0.73 |
| TAO | 0.48 | 0.55 | 0.38 | 0.34 | 0.45 | 0.47 | 1.83 | 1.80 | 0.95 | 0.79 |
| TMES | 0.91 | 0.97 | 1.20 | 1.22 | 2.22 | 2.18 | 0.92 | 0.93 | 0.55 | 0.57 |
| TMEP | 0.93 | 1.03 | 1.51 | 1.41 | 2.39 | 2.31 | 0.69 b | 1.02 a | 0.63 | 0.62 |

a y b indican diferencias significativas dentro de renglón (P<0.05), n=30. Tejido Hepático (TH), Tejido Adiposo Subcutáneo (TAS), Tejido Adiposo Omental (TAO), Tejido Muscular Esquelético Semitendinoso (TMES), Tejido Muscular Esquelético Pectoral (TMEP).

7.2 Variable de respuesta contenido de agua tisular en TMEP

En la muestra de músculo pectoral no se encontraron diferencias (P>0.01) entre el grupo control con un valor promedio de 25.09 % de materia seca y mientras que en el grupo tratado el valor promedio es 24.81 % de materia seca.

Cuadro 6. Contenido de agua tisular total en TMEP

| No. | % MS CONTROL | % MS AAL |
|-----|--------------|----------|
| 1 | 24.74 | 25.94 |
| 2 | 24.62 | 25.20 |
| 3 | 25.35 | 24.98 |
| 4 | 24.01 | 24.33 |
| 5 | 25.05 | 25.41 |
| 6 | 26.07 | 24.71 |
| 7 | 24.52 | 24.48 |
| 8 | 25.00 | 25.73 |
| 9 | 24.87 | 23.80 |
| 10 | 24.98 | 25.08 |
| 11 | 26.10 | 23.93 |
| 12 | 25.33 | 24.49 |
| 13 | 24.50 | 25.43 |
| 14 | 25.72 | 24.68 |
| 15 | 25.59 | 24.00 |

7.3 Variable de respuesta ganancia de peso

Durante la fase de campo del experimento, se midió la variable ganancia de peso del grupo control y del grupo tratamiento el pesaje de las aves se realizó una vez a la semana y hasta el momento del sacrificio, los resultados obtenidos del peso vivo fueron comparados y analizados con un modelo estadístico completamente al azar con arreglo factorial, donde se considera los siguientes factoriales: 2 grupos, 2 tratamientos y 7 semanas: 28 tratamientos. El cuadro 7 muestra la ganancia de pesos entre sí.

Cuadro 7. Peso vivo de la parvada en gramos del grupo control y AAL.

| SEMANA | CONTROL | AAL |
|---------|---------|------|
| PRIMERA | 157 | 162 |
| SEGUNDA | 339 | 341 |
| TERCERA | 682 | 699 |
| CUARTA | 1116 | 1129 |
| QUINTA | 1618 | 1647 |
| SEXTA | 1993 | 2008 |
| SEPTIMA | 2734 | 2835 |

La figura 8 ilustra el efecto del tratamiento sobre la variable ganancia de peso (gramos) en hembras y machos respectivamente observándose una

diferencia mayor en el grupo tratado con AAL de 101 gramos para los machos y de 30 gramos para las hembras respecto a los pesos mostrados por el grupo control ($P<0.01$), al momento del sacrificio.

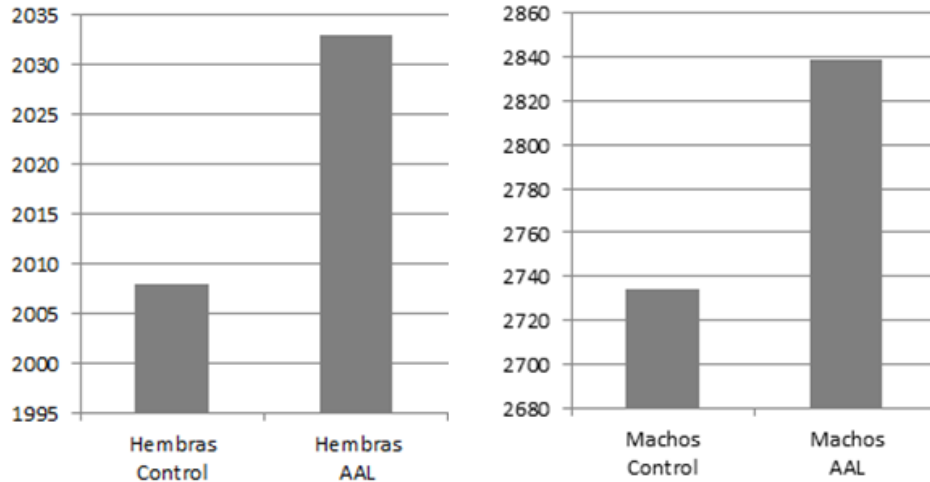


Figura 8. Efecto del tratamiento sobre la variable peso al sacrificio. $P<0.01$, $n= 16,197$.

En el cuadro 8 se observa comportamiento que mostraron las aves, se presentan los parámetros productivos y sus unidades de medición, en donde los datos presentados se hacen por sexo, por edad en semanas y tratamiento.

Cuadro 8. Parámetros productivos

| PARÁMETRO | GRUPO | SEXO | SEMANAS | | | | | | |
|-------------------------|---------|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 4 ^a | 5 ^a | 6 ^a | 7 ^a |
| GANANCIA DE PESO (g) | CONTROL | HEMBRAS | 159 | 338 | 667 | 1089 | 1527 | 1779 | 2510 |
| | | MACHOS | 155 | 340 | 682 | 1142 | 1706 | 2207 | 2734 |
| | AAL | HEMBRAS | 160 | 343 | 679 | 1074 | 1556 | 1791 | 2451 |
| | | MACHOS | 164 | 340 | 679 | 1183 | 1738 | 2225 | 2835 |
| MORTALIDAD (%) | CONTROL | HEMBRAS | 3.23 | 1.20 | 1.85 | 0.58 | 0.69 | 1.38 | 0.02 |
| | | MACHOS | 2.24 | 1.62 | 2.82 | 0.79 | 0.72 | 1.72 | 5.19 |
| | AAL | HEMBRAS | 2.23 | 1.27 | 2.06 | 0.73 | 0.58 | 1.43 | 0.44 |
| | | MACHOS | 1.48 | 1.80 | 2.22 | 0.89 | 2.68 | 2.68 | 4.675 |
| CONSUMO SEMANAL AVE (g) | CONTROL | PARVADA | 194 | 303.12 | 465.4 | 713.8 | 988.9 | 1089.8 | 1243 |
| | AAL | PARVADA | 140 | 289.4 | 491.6 | 709 | 1056.5 | 1252.3 | 1329.1 |
| CONSUMO ACUMULADO (g) | CONTROL | PARVADA | 194 | 499.63 | 960.5 | 1674.4 | 2662.5 | 3686.5 | 5006 |
| | AAL | PARVADA | 140 | 429.4 | 920.6 | 1629.6 | 3048.6 | 4192.8 | 5143.1 |

7.4 Análisis Financiero

A partir de los datos del cuadro 5 se calculan los gastos por concepto de alimentación por ave, tomando en cuenta los costos de alimento comercial. En el cuadro 9 se desglosan el tipo de alimento consumido por fase de la engorda del ave, el precio del alimento y el costo que represento por ave y por fase según el consumo observado.

Cuadro 9. Costos de alimentación

| TIPO ALIMENTO | PRECIO UNITARIO (\$) | PRECIO TONELADA (\$) | COSTO/AVE/FASE CONTROL (\$) | COSTO/AVE/FASE AAL (\$) |
|---------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| PREINICIADOR | 6.125 | 6125 | 1.188 | 0.858 |
| INICIADOR | 6.100 | 6100 | 1.849 | 1.765 |
| FINAL UNO | 6.050 | 6050 | 7.135 | 7.264 |
| FINAL DOS | 5.975 | 5975 | 5.909 | 6.313 |
| FINAL TRES | 5.815 | 5815 | 6.337 | 7.282 |
| FINALIZADOR | 5.775 | 5775 | 7.178 | 7.676 |
| COSTO NETO | - | - | 29.596 | 31.158 |

El cuadro 10 resume el Estado Financiero de las parvadas, en él se muestran los valores de ingresos y egresos brutos observados, donde, se ajustan los gastos de alimentación mediante la cantidad de alimento total consumido (cuadro 9), los kilogramos de carne total producida (dato obtenido por Corporativo Grupo Abrego) considerando los precios actuales en el mercado según Información económica y comercial para el sector agropecuario (InfoAseca) para marzo del 2014 el precio de la canal caliente es \$32.80. En la columna de extrema derecha se muestra la diferencia que existe entre ambos tratamientos.

Cuadro 10. Estado financiero entre la parvada control y parvada AAL

| PARÁMETRO | CONTROL | AAL | DIFERENCIA |
|------------------------------|------------|------------|------------|
| No. POLLOS INICIO | 188,400 | 192,200 | 3800 |
| No. POLLOS SACRIFICADOS | 162,842 | 163,689 | 847 |
| % MORTALIDAD | 13.57 | 14.84 | 1.27 |
| PESO (g) | 2353 | 2403 | 50 |
| CONVERSIÓN ALIM (Kg.) | 2.230 | 2.274 | 0.044 |
| GDP (g) | 50.38 | 50.71 | 0.33 |
| CARNE TOTAL PRODUCIDA (Kg) | 363,138 | 372,229 | 9,091 |
| IMPORTE CARNE PRODUCIDA (\$) | 11,910,915 | 12,209,194 | 298,279 |

7.5 Resultados cambios en la expresión génica

Los resultados correspondientes a la expresión génica se presentan como parte del artículo “Lipoic acid enhances broiler metabolic parameters by downregulating gene expression of enzymes in liver” enviado para su revisión al Journal of Animal Science.

8. DISCUSIÓN

8.1 ARNT, ADN_g, Proteína, Actividad Celular, Tamaño Celular.

La discusión correspondiente a las variaciones en la concentración ARNT, ADN_g, Proteína, Actividad Celular, Tamaño Celular se presentan como parte del artículo “Lipoic acid enhances broiler metabolic parameters by downregulating gene expression of enzymes in liver” enviado para su revisión al Journal of Animal Science.

8.2 Ganancia de peso.

Los resultados de los parámetros productivos se muestran en los cuadros 7 y 8, así como en la figura 8, en ellos se observa que se obtuvo una ganancia de peso mayor de 101 gramos para las aves que recibieron AAL con respecto al control en los machos y 30 gramos más para las hembras ($P < 0.05$). Cabe recordar que las hembras se sacrificaron a las seis semanas de edad. Díaz-Cruz *et al.*, (2003) observaron en pollos machos, diferencias a partir de la tercera semana de engorda, lo que les representó una ganancia de 124 g al final para los animales que consumieron 40 ppm de AAL en la dieta. El consumo total de alimento, conversión alimenticia, aumento de peso y la mortalidad son similares a los reportados por otros autores (Díaz- Cruz *et al.*, 2003). Arshad *et al.*, (2011) reportan que las aves que fueron suplementadas con AAL en dosis de 25, 75 y 150 mg/kg de alimento más acetato de α -tocoferol (200 mg / kg de alimento) mejoraron la ganancia de peso respecto a los pollos machos no tratados, esto en un período de seis semanas. Shen *et al.*, 2005 observaron que en ratones el AAL en la dieta

redujo la ganancia de peso ($P < 0.05$) cuando se administró durante tres semanas. También observaron que el AAL administrado a una dosis del 1.0% en la dieta disminuyó el porcentaje de grasa en la canal, respecto al control que no recibía AAL; respecto al consumo diario de alimento, en el trabajo de Shen *et al.*, (2005) observaron que fue de 4.4, 3.8 y 3.3 g para los ratones que recibieron dietas suplementadas con 1.0, 0.5 y 0% de AAL, durante tres semanas respectivamente. Sin embargo en éste trabajo, no se midió el consumo de diario de alimento, y sólo tenía el reporte final de consumo presentado por la granja.

En los cuadros 9 y 10 se observan los costos y análisis financiero de la parvada, el costo de los animales control fue de \$ 29.6 contra \$ 31.2 de los animales tratados con AAL, sin embargo se produjeron un total de 9,091 kg más de carne, lo que justifica ampliamente el uso del AAL en la alimentación de pollos de engorda.

Además si observamos el cuadro 6 podemos concluir que el aumento de peso (medido sobre la pechuga) no fue provocado por mayor acumulación de agua, sino probablemente debido a una hiperplasia muscular o aumento en la actividad celular (cuadro 5), lo que soporta aún más el uso del AAL como mejorador de la calidad de la canal en el pollo de engorda.

8.3 Cambios en la expresión génica

Los resultados correspondientes a la expresión génica se presentan como parte del artículo “Lipoic acid enhances broiler metabolic parameters by downregulating gene expression of enzymes in liver” enviado para su revisión al Journal of Animal Science.

8.3.1 Aislamiento ARN_T hepático y Secuenciación de ARN.

EdgeR o DESeq.

Es bien conocido que el AAL es un cofactor esencial para el componente E2 de los complejos de α -cetoácido deshidrogenasas, los cuales se localizan exclusivamente en mitocondrias, por ejemplo piruvato deshidrogenasa (PD),

α -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDH), y el complejo de α -cetoácido deshidrogenasas de cadena ramificada (BCKDH), (Parker y Cadenas, 2011).

En los resultados de secuenciación del ARNm (RNA-seq) se observa que la avidina en sus formas AVR2 y AVD (ENSGALG0000002441 y ENSGALG00000023622) se disminuyeron por efecto del AAL. La AVD es una glicoproteína tetramérica que puede unirse hasta con cuatro moléculas de biotina, donde cada subunidad se une de manera individual a una molécula de biotina. La avidina puede formar enlaces intermoleculares entre las partículas de diversas fuentes del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC). Se ha visto que la avidina se une al AAL en una región de las cadenas polipeptídicas de dihidrolipoamida de acetiltransferasa que componen el núcleo estructural del complejo (Hale et al., 1992). EL PDC cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato con la formación de CO₂, Acetil CoA y dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH) (Harris et al., 1997). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una disminución en la expresión de Avidina por AAL, esto podría significar menor actividad del PDC. En este sentido Hong *et al.*, (1999) y Korotchkina *et al.*, (2004) reportaron que tanto S-ALA y R-ALA mostraban una marcada inhibición en la actividad del PDC de mamíferos.

Durante el metabolismo normal, la glucosa es fosforilada por la hexocinasa para inducir la glucólisis. Las concentraciones elevadas de glucosa saturan a la hexocinasa y desencadenan la ruta del sorbitol. El primer paso de esta vía depende de la Aldosa Reductasa (AKR1B1, ENSGALG0000003466) que convierte la glucosa en sorbitol y sirve como un sistema de retroalimentación porque la hexocinasa tiene una KM menor para glucosa que la Aldosa Reductasa (Mieyal *et al.*, 2008). El papel fisiológico de la AKR1B1 consiste en proveer una ruta metabólica adicional para la utilización de glucosa y la eliminación de compuestos tóxicos mediante un transportador de grupo aldehído fuera de la célula y se considera que desempeña un papel clave en diversos estadios hiperglicémicos (Vartanov *et al.*, 1992). Nadaf *et al.*, (2009) emplearon líneas de pollos de bajo y alto crecimiento, observando la

presencia de insulina endógena hiperactiva en concentraciones circulantes normales y los pollos que presentaron una marcada hiperglucemia (alrededor de 180–200 y 220–240 mg/dl en estadios de ayuno y alimentación respectivamente), lo que sería perjudicial para los seres humanos. En conjunto una marcada hiperglucemia encontrada en pollos parece imitar a la diabetes tipo 2 en humanos. Esto podría significar que el AAL favorece el estado glucémico de los pollos como se ha reportado en otras especies (Rochette *et al.*, 2013), y esto puede contribuir a la disminución del ARNm y la expresión de la proteína del gen AKR1B1, la cual es relacionada con Aldosa Reductasa (ARL). En células de Schwan de humanos se ha demostrado que el transportador de taurina reduce la glucosa, pero cuando es añadido junto con AAL se muestra inhibición de la Aldosa Reductasa (Askwith *et al.*, 2009). Estos resultados son similares a los encontrados en este trabajo en el hígado de las aves que consumieron AAL, suponiendo que esto se debió a un incremento en la sensibilidad de insulina.

En relación al receptor Decoy 3 (DcR3), este es un receptor miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFR) que se asocia con la supresión de la inmunidad antitumoral. DcR3 es altamente expresado en muchos tumores y esta expresión puede ser regulada por la vía MAPK/MEK/ERK (mitogen-activated protein kinase/mitogen extracellular kinase/extracellular signal-relayed kinase). Ha sido reportado que esta vía es un regulador en la incidencia, desarrollo y expansión clonal de tumores (Yang *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran que en los pollos que consumieron AAL la expresión de DcR3 se redujo, lo que podría significar repercusiones benéficas del AAL en la tumorigenesis. Bajo condiciones fisiológicas normales, las células mantienen un sistema amortiguador redox que consiste en concentraciones altas de antioxidantes y enzimas antioxidantes para minimizar la acción oxidativa de los ROS (reactive oxygen species) y de los RNS (reactive nitrogen species). Las alteraciones en el equilibrio celular redox pueden conducir a a la expresión de importantes factores que contribuyen a la patogénesis de numerosas enfermedades

degenerativas incluyendo el cáncer. Las células tumorales se diferencian de las células normales por que muestran un incremento intrínseco del estrés oxidativo (OS) debido a un número de factores que incluyen estimulación oncogénica, incremento en la actividad metabólica y disfunción mitocondrial (Mieyal *et al.*, 2008).

La RNA-Seq de hígado mostró una disminución en el gen de beta-cristalina (CRYBA2) (ENSGALG00000011354), Histona H2A-IV, y LOC420789 (Tablas 3 y 4 del artículo “lipoic acid enhances broiler metabolic parameters by downregulating gene expression of metabolic enzymes in liver”). Sin embargo, no se ha reportado ninguna relación entre estos y el AAL.

8.3.2 ARNm de las enzimas hepáticas analizadas por PCR cuantitativa (PCRq)

Están bien documentados los efectos benéficos que tiene el AAL sobre la función mitocondrial y en la disminución del estrés oxidativo.

En relación con la expresión de enzimas antioxidantes GSTT1 (glutathione S-transferase theta 1) y GPX3 (glutathione peroxidase 3), solo la primera mostro una disminución ($P < 0.01$). Se sabe que el AAL evita la acumulación de triglicéridos hepáticos, así como el daño oxidativo en el hepatocito, mediante la inhibición en la producción del peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y la estimulación de defensas antioxidantes mitocondriales. Se ha reportado que el tratamiento con AAL disminuyó la actividad de la enzima SOD2 (Superoxide dismutase) y GPX (Glutathione peroxidase) en un 60.6% y 100.2% respectivamente, e incrementó el glutation reducido a glutation oxidado (GSH:GSSG) en relación a los niveles de ARNm de UCP2 (Valdecantos *et al.*, 2012). Chen *et al.*, 2011 observaron en el hígado de pollos de engorda que los tratamientos con AAL incrementaban linealmente (17.6, 27.9, y 31.6%, respectivamente) la actividad hepática de la Superóxido Dismutasa (SOD) en comparación con un grupo control. En los pollos consumieron 300 mg de AAL por kilogramo de alimento, se observó una

mayor actividad de GPX que los pollos alimentados con la dieta control ($P < 0.05$). La capacidad antioxidante total (T-AOC) no se vio afectada por el AAL de la dieta, sin embargo, en este estudio GPX3 no fue modificado por el tratamiento. GST es una superfamilia de genes, donde cada miembro de la subfamilia se encuentra en una región genómica distinta. Los productos génicos de GST catalizan la conjugación del glutathion reducido (GSH) a los centros electrofílicos para una amplia variedad de sustratos. Los sustratos incluyen a compuestos xenobióticos y compuestos endógenos que son nocivos para las macromoléculas celulares (Zhao *et al.*, 2009), basados en los resultados que los pollos con AAL estuvieron más expuestos a compuestos tóxicos.

Deng *et al.*, (2010) reportaron que la expresión de proteínas de enzimas importantes en el ciclo tricarboxílico (TCA), tales como la subunidad flavoproteína succinato deshidrogenasa (SDHFI), isocitrato deshidrogenasa (IDH) y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa E2 (OGDH) fueron todas aumentadas en el hígado de la rata durante la progresión de la diabetes tipo 2. Estas proteínas juegan un papel crucial en el TCA al catalizar reacciones que generan equivalentes reductores (NADH y FADH) y guanósina trifosfato (GTP). Este incremento es de esperarse ya que la diabetes tipo 2 esto podría ser evitado a través de la compensación con un incremento de enzimas del ciclo TCA para contrarrestar los glucosa plasmática excedente.

El piruvato proveniente de la glucosa es eficientemente introducido a las mitocondrias presumiblemente a través de un transportador de piruvato. Dentro de la matriz mitocondrial el piruvato es oxidado por PDHA1 para formar Acetil CoA. PDHA1 es parte del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC). Alternativamente el piruvato entra en la vía anaplerótica con la piruvato carboxilasa (PC). De manera interesante en una alteración del gen PDHA1, la secreción de insulina que es estimulada por la glucosa se vio afectada, pero no erradicada. Estos resultados demuestran que la secreción de insulina estimulada por la glucosa no dependen solo de la oxidación del

piruvato mitocondrial y son consistentes con la idea de que el flujo de metabolitos a través de PDH y PC son importantes para la secreción de insulina (Akhmedov *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2010). La disminución en la expresión de PDHA1 podría explicarse por el hecho de que el exceso de glucosa en la alimentación de los pollos fue controlada por el AAL.

El complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDHC) es una enzima que se compone por múltiples copias de tres subunidades: α -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDH o E1k); dihidrolipoil succiniltransferasa (DLST o E2k) y dihidrolipoil deshidrogenasa ((DLD o E3). Estos participan en el ciclo TCA donde se cataliza irreversiblemente la conversión de α -cetoglutarato, CoASH y NAD⁺ en succinil CoA, NADH y CO₂. Se puede demostrar un alto control de flujo de coeficientes en la generación de equivalentes reductores, también es crucial para el mantenimiento del estado redox mitocondrial (Kiss *et al.*, 2013). La expresión de DLST también se vio disminuido por efecto del AAL en los pollos, y esto puede deberse a lo que Nielsen *et al.*, 2011 señalan, ellos sostienen que la disminución de la actividad de KGDHC (por DSLT+/-) redujo el consumo de glucosa en la corteza, pero no mostró efectos perjudiciales sobre el metabolismo mitocondrial en el cerebro, únicamente en dirección de aspartato, así que probablemente el oxalato es el que sea disminuido.

En este caso para los pollos alimentados con AAL, la disminución en la expresión de OGDH puede ser explicado como lo opuesto de lo que se ha reportado para ratas, en las cuales una disminución en la expresión de las enzimas del ciclo TCA podría ser observado como un mecanismo compensatorio para acortar más eficientemente el ciclo.

En la figura 9 se muestra el efecto del AAL en el metabolismo del hepatocito. En donde al existir menor expresión del gen de DcR3 el resultado final sería una menor expresión de los factores tumorigénicos; Al existir mayor sensibilidad de la insulina se genera disminución en la actividad de la enzima Aldosa Reductasa (AR), y por lo tanto menor sorbitol; una disminución en el

ARNm del gen y de avidina tiene como resultado mediato disponibilidad de biotina. Mientras que en mitocondria el correcto funcionamiento del complejo piruvato deshidrogenasa acopla una eficiente cadena de transporte de electrones y de fosforilación oxidativa generando oxido reductores NADPH+ y NADH+ para la síntesis de compuestos fosfatados de alta energía principalmente ATP. Debido al efecto antioxidante del AAL se reduce la síntesis de radicales libres principalmente H₂O₂.

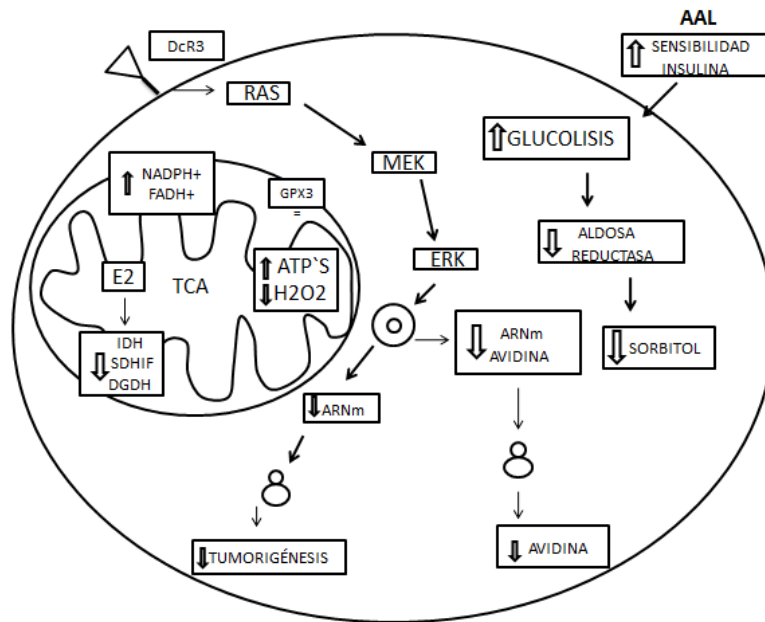


Figura 9. Efecto del AAL en el hepatocito.

9. CONCLUSIONES

- Las aves alimentadas a dosis de 40 ppm de AAL durante todo el ciclo de engorda muestran mayor ganancia de peso vivo, por lo que aumenta la eficiencia productiva en el ave bajo condiciones de producción industrial.
- La ganancia de peso por efecto del AAL es más evidente en machos que en hembras.
- Las aves que se alimentaron con AAL presentan mayor cantidad de ARNt y se determinó un incremento en la actividad hepática, mientras

que en el musculo de la pechuga solo de determino incremento en la actividad celular.

- Se estableció el efecto benéfico del AAL sobre los parámetros productivos, esto a través de una regulación a la baja en la expresión de diversas enzimas hepáticas, especialmente aquellas involucradas en el metabolismo de la glucosa y el ciclo del TCA.
- Por los resultados del análisis financiero es aconsejable el empleo de AAL en el alimento balanceado, lo que mejora significativamente la rentabilidad empresarial.

10. LITERATURA CITADA

- Akhmedov, D., U. De Marchi, C.B. Wollheim, and A. Wiederkehr. 2012. Pyruvate dehydrogenase E1 α phosphorylation is induced by glucose but does not control metabolism-secretion coupling in INS-1E clonal β -cells. *Biochim Biophys Acta*. (10):1815-24.
- Arshad MS, Anjum FM, Asghar A, Khan MI, Yasin M, Shahid M, El-Ghorab AH. Lipid stability and antioxidant profile of microsomal fraction of broiler meat enriched with α -lipoic acid and α -tocopherol acetate. *J Agric Food Chem*. 2011 Jul 13;59(13):7346-52. doi: 10.1021/jf2002393. Epub 2011 Jun 13. PubMed PMID: 21557618.
- Askwith, T., W. Zeng, M.C. Eggo, and M.J. Stevens. 2009. Oxidative stress and dysregulation of the taurine transporter in high-glucose-exposed human Schwann cells: implications for pathogenesis of diabetic neuropathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 297:E620-E628.
- Baghbanzadeh A, Decuypere E. 2008. Ascites syndrome in broilers: physiological and nutritional perspectives. *Avian Pathology*, London, 37(2), 117-126.
- Biewenga G, Haenen M, Bast A. 1997. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmac*. Vol. 29; 315.331.
- Chen Li-Jung, Jeong Hyun Seo, Michael J. Eller, Stanislav V. Verkhoturov, Sunny S. Shah, Alexander Revzin, and Emile A.

- Schweikert. 2011. Quantitative label-free characterization of avidin-biotin assemblies on silanized glass, *Anal Chem*.
- Choi, C.S., P. Ghoshal, M. Srinivasan, S. Kim, G. Cline, and M.S. Patel. 2010. Liver-specific pyruvate dehydrogenase complex deficiency upregulates lipogenesis in adipose tissue and improves peripheral insulin sensitivity. *Lipids*. 45:987-95.
- Deng, W.J., S. Nie, J. Dai, J.R. Wu, and R. Zeng. 2010. Proteome, phosphoproteome, 617 and hydroxyproteome of liver mitochondria in diabetic rats at early pathogenic stages. *Mol Cell Proteomics*. 9(1):100-16.
- Díaz-Cruz Antonio, Maurilio Serret, Guadalupe Ramírez, Ernesto Ávila, R Raquel Guinzberg & Enrique Piña. 2003. Prophylactic action of lipoic acid on oxidative stress and growth performance in broilers at risk of developing ascites syndrome. *Avian Pathology*. 32(6), 645-653.
- E.M.Widdowson, D.E. Crabb, and R. D. G. Milner. 1972. Cellular development of some human organs before birth. *Archives of disease in childhood*. 47, 652-653.
- Emmerson D. A. 1997. Commercial approaches to genetic selection for growth and feed conversion in domestic poultry. Farmington, Arkansas, USA. 76:1121-1125.
- FAO. 2005. *Perspectiva Mundial*.
- Hale, G., N.G. Wallis, and R.N. Perham. 1992. Interaction of avidin with the lipoyl domains in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: three-dimensional location and similarity to biotinyl domains in carboxylases. *Proc Biol Sci*. 248:247-53.
- Hamano Yoshio, Sanae Sugawara, Yoko Kamota and Emi Nagai. 1999. Involvement of lipoic acid in plasma metabolites, hepatic oxygen consumption, and metabolic response to a β -agonist in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*. 82, 497–503.

- Hamano Yoshio. 2006. Effects of dietary lipoic acid on plasma lipid, in vivo insulin sensitivity, metabolic response to corticosterone and in vitro lipolysis in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*. 95,1094–1011.
- Hamano Yoshio. 2007. Continuous infusion of lipoic acid rapidly reduces plasma β hydroxybutyrate with elevation of nonesterified fatty acids in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*. 97, 495–501.
- Hans Mann y Víctor Aguirre. 2002. Avances en el mejoramiento de la producción avícola. Delegación para Centro América y el Caribe. Guatemala.
- Hong, Y.S., S.J. Jacobia, L. Packer, and M.S. Patel. 1999. The inhibitory effects of lipoic compounds on mammalian pyruvate dehydrogenase complex and its catalytic components. *Free Radic Biol Med*. 26:685-94.
- Imika H., H. Ozlub, R. Gumusa, M. Aydemir Ataseverb, S. Urcarb & M. Ataseverb. 2013. Effects of ascorbic acid and α -lipoic acid on performance and meat quality of broilers subjected to heat stress. Department of Animal Nutrition and Nutritional Disorders, Faculty of Veterinary Sciences, Turkey. Vol. 53; 800-808.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Querétaro. 2005.
- Kiss, G., C. Konrad, J. Doczi, A.A. Starkov, H. Kawamata, G. Manfredi, S.F. Zhang, G.E. Gibson, M.F. Beal, V. Adam-Vizi, and C. Chinopoulos. 2013. The negative impact of α -ketoglutarate dehydrogenase complex deficiency on matrix substrate-level phosphorylation. *FASEB J*. 27: 2392-2406
- Korotchkina, L., S. Sidhu, and M. Patel. 2004. R-Lipoic acid inhibits mammalian pyruvate dehydrogenase kinase. *Free Radical Res*. 38:1083-92.
- López Coello Carlos. 1991. Investigaciones sobre el Síndrome Ascítico en pollos de engorda. FMVZ, UNAM, MÉXICO, DF. 1;13-38.

- Metzker Michael L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. Human Genome Sequencing Center and Department of Molecular & Human Genetics, Houston Texas. Vol 11; 31-46.
- Mieyal, J., M. Gallogly, S. Qanungo, E. Sabens, and M. Shelton. 2008. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Sign.* 10:1941-88.
- Mieyal, J., M. Gallogly, S. Qanungo, E. Sabens, and M. Shelton. 2008. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Sign.* 10:1941-88.
- Nadaf, J., F. Pitel, H. Gilbert, M.J. Duclos, F. Vignoles, C. Beaumont, A. Vignal, T.E. Porter, L.A. Cogburn, S.E. Aggrey, J. Simon, and E.L. Bihan-Duval. 2009. QTL for several metabolic traits map to loci controlling growth and body composition in an F2 intercross between high- and low-growth chicken lines. *Physiol Genomics.* 38:241-9.
- Nilsen, L., Q. Shi, G. Gibson, and U. Sonnewald. 2011. Brain [U-13 C] glucose metabolism in mice with decreased α -ketoglutarate dehydrogenase complex activity. *J Neurosci Res.* 89:1997-2007.
- Nistala Ravi, Adam Whaley-Connell, and James R. Sowers. 2008. Redox Control of Renal Function and Hypertension. University of Missouri, USA. 2008-2034.
- Packer, L., and E. Cadenas. 2011. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J Clin Biochem Nutr.* 4 48:26-32
- Padmalayam Indira, Sumera Hasham, Uday Saxena, and Sivaram Pillarisetti. , 2009. Lipoic Acid Synthase (LASy). A novel role in inflammation, mitochondrial function, and insulin resistance. American Diabetes Association, USA. Vol. 58;600-608.
- Patel Jatin, Nur Azim Matnor, Abishek Iyer, and Lindsay Brown. 2011. A regenerative antioxidant protocol of vitamin E and α -lipoic acid ameliorates cardiovascular and metabolic changes in fructose-fed rats. Australia.

- Patel Mulchand S. and Lester Packer. 2008. Energy Production, Antioxidant Activity and Health Affects. University of Southern California School of Pharmacy, Los Angeles, California.
- Pretty Jules. 2007. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. Department of Biological Sciences, University of Essex, Colchester, UK. 363, 447–465.
- Quay Durtch, Todd L. Roberts, J.R. Clayton Jr. and S. I. Amhed. 1983. RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organism. University Washington, USA. Vol. 13: 61-71.
- Rishell W. A. 1997. Symposium: Genetic selection strategies for the future breeding and genetics. Historical Perspective. Glastonbury, Connecticut, USA, x. 76:1057–1061.
- Rochette, L., S. Ghibu, C. Richard, M. Zeller, Y. Cottin, and C. Vergely. 2013. Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res.* 57:114-25.
- Serenius T. and Stalder K. J. 2006. Selection for sow longevity. Iowa State University, USA. 84(E. Suppl.):E166–E171.
- Shen, Q.W., C.S. Jones, N. Kalchayanand, M.J. Zhu, and M. Du. 2005. Effect of dietary alpha lipoic acid on growth, body composition, muscle pH, and AMP-activated protein kinase phosphorylation in mice. *J Animal Sci.* 83:2611-7.
- Sohaib Muhammad, Faqir M Anjum, Muhammad I Khan, Muhammad S Arshad. 2012. Enhancement of lipid stability of broiler breast meat and meat products feed on Alpha Lipoic Acid and Alpha Tocopherol Acetate supplemented feed. *Lipids in Health and Disease.* 11-57.
- Sorensen, P. and Ducro, J.B. 1995. Age-related and proportional aspects of growth in broilers, *European Poultry Science.* Vol. 1; 30-34.
- Valdecantos, M.P., P. Pérez-Matute, P. González-Muniesa, P.L. Prieto-Hontoria, M.J. Moreno-Aliaga, and J.A. Martínez. 2012. Lipoic acid

- improves mitochondrial function in nonalcoholic steatosis through the stimulation of sirtuin 1 and sirtuin 3. *Obesity*. 20:1974-730 83.
- Vandesompele Jo, Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe, and Frank Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* Vol 3 No 7.
- Vartanov, S.S., A.R. Pavlov, and A.I. Iaropolov. 1992. Aldose reductase: physiological role, properties and prospects for regulating activity. *Biokhimiia*. 57:323-41.
- Wang Zhong, Mark Gerstein and Michael Snyder. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature review genetics*, Mc Millan publisher. Vol. 10; 57-63.
- www.fao.org/ags/2005
- www.faostat.fao.org/2010
- www.inegi.org.mx/2010
- www.siap.sagarpa.gob.mx, 2007
- www.siap.sagarpa.gob.mx/Programa Nacional Pecuario, 2012
- www.una.org.mx/2010
- Yang, D., X. Fan, P. Yin, Q. Wen, F. Yan, S. Yuan, B. Liu, G. Zhuang, and Z. Liu. 2012. Significance of decoy receptor 3 (Dcr3) and external-signal regulated kinase 1/2 (Erk1/2) in gastric cancer. *BMC Immunol.* 13:28-37.
- Zámocky Marcel, Bernhard Gasselhuber, Paul Furtmüller, Christian Obinger. 2012. Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. Department of Chemistry, Vienna Institute of BioTechnology. 525(2);131-144.
- Zhao, Y., M. Marotta, E. Eichler, C. Eng, and H. Tanaka. 2009. Linkage disequilibrium between two high-frequency deletion polymorphisms: implications for association studies involving the glutathione-S transferase (GST) genes. (Abstract). *PLoS Genet.* 5:e1000472.

11. ANEXO

11.1 Perspectivas.

- Los resultados de este trabajo muestran hasta ahora una molécula clave que favorece el desempeño del ave durante su ciclo productivo. Sería pertinente realizar estudios acerca de si el AAL sufre alguna modificación en el proceso de pelletización en el que se le incluye a la dieta.
- Es de resaltar que la mortalidad general fue mayor para las aves alimentadas con AAL, ello, debido a que en la empresa se cuentan con vectores infectocontagiosos, a los que se suscriben vehículos que proveen de alimento, los que recolectan la mortandad y el mismo cuerpo de médicos veterinarios, así como aquellos que se encargan de la inmunización de las aves; estos en su conjunto, impactaron negativamente en el status zoonosario de las granjas en estudio, lo que repercutió en cuadros patológicos que por su agente etiológico sobrepasan el potencial terapéutico del AAL.
- Sería necesario estudiar el efecto de AAL sobre el metabolismo del tejido muscular, ya que se sabe que dicho compuesto promueve la biogénesis mitocondrial, lo que podría representar un efecto benéfico en la producción del pollo de engorda.

11.2 Artículo científico “Lipoic acid enhances broiler metabolic parameters by downregulating gene expression of enzymes in liver”



Lipoic acid enhances broiler metabolic parameters by downregulating gene expression of metabolic enzymes in liver

| | |
|-------------------------------|--|
| Journal: | Journal of Animal Science |
| Manuscript ID: | E-2014-7606 |
| Manuscript Type: | Animal Nutrition - NonRuminant |
| Date Submitted by the Author: | 15-Jan-2014 |
| Complete List of Authors: | Mora, Ofelia; UNAM, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán Alvarez, Carlos; UNAM, Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal Sigler, Sergio; UNAM, Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal Pérez, Rosa; UNAM, Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal González-Dávalos, Laura; UNAM, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán Vargas, Carlos; Winter Genomics, Shimada, Armando; UNAM, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán Piña, Enrique; UNAM, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina |
| Key Words: | lipoic acid, broilers, expression, liver, muscle, adipose tissue |

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 Lipoic acid enhances broiler metabolic parameters by downregulating gene expression of
2 metabolic enzymes in liver^{1,2}

3

4 Running head: Lipoic acid in broilers

5

6 O. Mora*, C.J. Álvarez-Alonso§, S. Sigler-Galván§, R. Pérez-Serrano§, L. González-Dávalos*,
7 C. Vargas#, A. Shimada* and E. Piña‡³

8

9 * Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN), Facultad de Estudios
10 Superiores (FES)-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Blvd. B.
11 Quintana 514-D, Col. Arboledas, 76140 Querétaro, Qro., México

12 § Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM, Circuito de
13 Posgrados, Ciudad Universitaria, Unidad de Posgrado, Edif. B. 1er. nivel, Del. Coyoacán, 04510
14 México, D.F., México

15 # Winter Genomics, Manizales 906, Col. Lindavista, Del. G.A. Madero, 07300 México, D.F.,
16 México

17 ‡ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, Del.
18 Coyoacán, 04510 México, D.F., México

19

¹ This study was supported by grants 55429 from SEP-CONACyT [SEP (Ministry of Public Education); Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico City, Mexico], and IT-201912 from PAPIIT-UNAM.

² This work is part of the Master in Science thesis that the second author submitted to the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Carlos Álvarez-Alonso, Sergio Sigler-Galván, and Rosa Pérez-Serrano received scholarships from CONACyT. We thank Maggie Brunner, M.A., for revising the English manuscript and Dr. Felipe Ruiz-López for the statistical advice and the Proteogenomics Unit, Neurobiology Institute-UNAM, Querétaro, Qro., México, for providing technical assistance in real-time PCR.

³ Corresponding author: ofemora66@unam.mx

20 Abstract

21 To explore the mechanisms by which lipoic acid (LA) exerts its action by modulating
22 differentiation in cell cultures, and mRNA expression levels in liver, muscle, and white adipose
23 tissue of broilers, two studies were conducted, one with cultured cells obtained from day-old
24 chicks to analyze LA action on myocyte and adipocyte differentiation, and the second, with
25 samples from 7-week-old broilers raised on a commercial farm. Results of cell culture
26 experiments exploring a putative role of LA in modulating myoblast or adipoblast differentiation
27 did not show differences among treatments ($p > 0.1$). Results from DNA, RNA, and protein, and
28 their ratios, recorded in tissues from the commercial farm birds, pointed to LA macroeffects. As
29 LA did not change DNA or the DNA:protein ratio, it appears that it does not increase cell
30 numbers nor the cellular mass in the tissues studied ($p > 0.1$). LA treatment increased
31 RNA:protein ratios in liver and breast muscle ($p < 0.01$), which leads us to think of LA-mediated
32 cell induction of cell differentiation and or a rise in protein synthetic capacity. Liver RNA-Seq
33 differential expression analysis revealed that the majority of the genes under both conditions did
34 not vary significantly. However, a small set of genes that varied in terms of a modest degree of
35 significance was identified. Three genes, namely avidin-related protein 2, avidin, and beta-
36 crystallin A2, were identified by edgeR and DESeq methods and showed to have the highest
37 degree of confidence of the entire gene set. Gene decoy receptor 3, histone H2A-IV,
38 LOC420789, aldose reductase, and aldose reductase-like (ADL) proteins were only identified by
39 DESeq. All eight genes in the group had a negative Log₂ (FoldChange). Liver mRNA enzymes
40 analyzed by qPCR (GSTT1, OGDH, PDHA1, DLST) showed a decrease in their expression (p
41 < 0.01) when LA was compared with the control, except for GPX3, where no differences were
42 found. To our knowledge, this is the first study concerning the effect of lipoic acid on the
43 expression of hepatic, muscle, and adipose tissue differentiation. We established that its
44 beneficial effect on productive parameters is practically by downregulation of enzyme
45 expression in liver, especially those involved in glucose metabolism and the tricarboxylic acid
46 cycle. Considering the key regulatory role of LA in metabolism reported in other species and in
47 the light of the present findings, further analysis of effect of LA in muscle is warranted in the
48 future.

49 Keywords: lipoic acid, broilers, expression, liver, muscle, adipose tissue.

50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72

INTRODUCTION

Lipoic acid (LA) is a derivative of octanoic acid containing a cyclic disulfide bond (Reed, 2001). The LA complex with lysine-lipoamide functions as a co-factor in the mitochondrial dehydrogenase complex that catalyzes the oxidative decarboxylation of α -keto acids (Bustamante et al., 1998; Lester et al., 2000; Smith et al., 2004; Chen et al., 2011). In this reaction, LA is reduced to Dihydrolipoic acid (DHLA), which interacts with Reactive oxygen species, and LA can also inactivate free radicals (Goraca et al., 2011). Another important role of DHLA is in signal transduction by activating Insulin receptors (IR), which leads to a cascade of substrate phosphorylation that causes the translocation of Glucose transporters from the cytoplasm to the cell surface (Konrad et al., 2001; Konrad, 2005).

The ability of LA to enhance the redox status of cells and to interact with other antioxidants provides an attractive therapeutic potential under conditions where Oxidative stress (OS) is involved, such as in Ascites syndrome (AS) or aflatoxin toxicosis (Biewenga et al., 1997; Díaz-Cruz et al., 2003; Karaman et al., 2010). In previous experiments, our group demonstrated that diets supplemented with 40 mg LA/kg diet during 7 weeks significantly improved feed conversion, decreased general mortality and mortality attributable to AS (Díaz-Cruz et al., 2003). In this sense, a lowering effect of LA on the plasma hydroxybutyrate level was reported, this suggests that the LA-induced plasma NEFA increment was attributable to decreased hepatic fatty acid oxidation in chickens (Hamano, 2007). Therefore, the present study was planned to explore the mechanism of LA to exert this beneficial action at the molecular level by modulating cell differentiation in cell cultures and mRNA expression levels in liver, muscle, and white adipose tissue of adult broilers.

73 MATERIALS AND METHODS

74 All experimental protocols were approved by the National Autonomous University of Mexico
75 Animal Care Advisory Committee (CICUAE, UNAM), and all procedures were carried out in
76 accordance with Mexican Federal Laws for Animal Care (SAGARPA, 2001).

77 Two types of studies were performed: one in cultured cells taken from day-old chickens to
78 analyze LA action on muscular and adipocyte differentiation, and the other with samples
79 obtained at a slaughter house from broilers raised on a commercial farm.

80

81 Cell Culture Studies

82 Effect of LA on Chicken Myoblast Differentiation

83 Thirty newly hatched chickens were killed by cervical dislocation followed by decapitation.
84 Myoblasts were isolated from pectoral, supracoracoideus, gracilis, and abductor muscles
85 employing a modified version of the protocol reported by Montoya-Flores et al. (2012). A
86 sample of approximately 8 g of these muscles was obtained from each animal and pools of five
87 animals were formed; these were then placed in Dulbecco's phosphate buffered saline solution at
88 4°C (D-PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Each pool was washed twice with the same
89 solution, connective tissue was removed, and then muscle tissue was excised and cut into small
90 (6–8-mm) pieces with scissors. The tissue was incubated for 1 h at 37°C with 2 g/L pronase E
91 (Sigma-Aldrich) in D-PBS at 90 rpm and then centrifuged at $1,200 \times g$ for 10 min. The
92 supernatant containing the enzyme was discarded and the pellet was re-suspended in D-PBS and
93 homogenized. Differential centrifugation at $200 \times g$ for 10 min was performed in order to
94 eliminate tissue debris and to separate fibroblasts. The supernatant was transferred into a new
95 tube and the pellet was re-suspended again in D-PBS; this procedure was repeated twice. The

96 three supernatants were combined and further centrifuged at $1,200 \times g$ for 6 min; the pellets were
97 re-suspended in proliferation medium (15% equine serum, 1% penicillin-streptomycin, 1%
98 amphotericin, and 0.1% gentamicin in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco,
99 Grand Island, NY, USA) and passed through a 40- μ m filter (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ,
100 USA). An aliquot with approximately 150,000 cells was placed in each well in 4-well culture
101 dishes previously coated with porcine skin gelatin (0.5 g in 500 mL water); these were grown in
102 proliferation medium until they reached 80% confluence. Then, they were maintained in
103 proliferation medium for 4 days until they reached a pre-confluent state (day 0). On day 5, the
104 medium was changed to Differentiation medium (DM) DMEM supplemented with 10% equine
105 serum, 1% penicillin-streptomycin, 1% amphotericin, and 0.1% gentamicin), and the
106 experimental treatments were tested.

107

108 Samples and Experimental Treatments

109 Cell experiments were performed in all six pools ($n = 6$). Two wells per culture dish were used
110 for each treatment, either control or 100 μ M LA (LA) (Cho et al., 2003).

111

112 Myogenin mRNA Detection by Reverse Transcription-PCR in Chicken Myocytes

113

114 RNA isolation and complementary DNA (cDNA) synthesis

115 Total RNA was extracted from cells with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Austin, TX, USA)
116 according to the manufacturer's protocol; total RNA was eluted in 30 μ L RNase-free water and
117 stored at -70°C to be used in subsequent experiments. Myogenin expression was used as an
118 indicator of muscular differentiation (Filigheddu et al., 2007) and was detected by Reverse

119 transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR). Single-strand cDNA was synthesized using
120 Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Sigma-Genosys of Texas, Inc., St. Louis, MO, USA) and SuperScript® II
121 Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's
122 instructions. Primers for chicken myogenin mRNA are reported in Table 1. PCR was performed
123 using Taq DNA polymerase (Invitrogen). The amplification parameters consisted of initial
124 denaturation at 94°C for 4 min, denaturation at 94°C for 45 sec, annealing at 60°C for 1 min, and
125 extension at 72°C for 1 min, for 40 cycles, with a final extension at 72°C for 2 min. The products
126 were separated onto a 1.5% agarose gel and visualized with SYBR® Gold (Invitrogen).

127

128 Quantitative PCR (qPCR)

129 Myogenin expression was assessed by qPCR. Complementary DNA samples were obtained from
130 cell cultures under two different experimental conditions and tested by real-time quantitative
131 PCR (LightCycler® 1.5; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The fragment was amplified
132 using LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I® (Roche Applied Science,
133 Indianapolis, IN, USA) and 20-µL LightCycler® Capillaries (Roche Applied Science). In order to
134 obtain the relative quantification, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was
135 measured as a housekeeping gene (primers in Table 1). qPCR conditions were as follows: initial
136 denaturation 95°C for 10 min; amplification at 20°C/sec for 55 cycles: denaturation 95°C for 10
137 sec; annealing at 63°C for 10 sec, and extension at 72°C for 12 sec. Melting curve analysis:
138 denaturation at 95°C for 0 sec, 20°C/sec; annealing at 55°C for 1 min, 20°C/sec; melting with a
139 0.1°C/sec increase up to 95°C and a 0-sec hold, and cooling at 40°C for 30 sec, 20°C/sec. In
140 order to use the relative quantification formula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, cDNA curves were carried out for each
141 pair of primers. For Gallus gallus myogenin, cDNA dilutions of 1:2.5, 1:5, and 1:25 were used

142 and the Efficiency (E) obtained was 2.044, and for GAPDH, cDNA dilutions were 1:5, 1:10,
143 1:100, and 1:1,000 and E was 1.926.

144

145 Effect of LA in Chicken Adipoblast Differentiation

146

147 Chicken Adipoblast Isolation and Culture

148 Seventy newly hatched chickens were killed by cervical dislocation followed by decapitation and
149 samples were collected immediately; seven animals were pooled together and approximately 3–5
150 g of subcutaneous (s.c.) adipose tissue was used for each pool. These samples were placed in 50-
151 mL tubes with D-PBS, washed three times, and then adipose tissue was excised and cut into
152 small pieces. The tissue was processed in a digestion buffer that contained 2.8 mM glucose, 4%
153 Bovine serum albumin (BSA), and 0.1% type II collagenase (Sigma-Aldrich) for 1.5 h at 37°C
154 with continuous shaking at 110 rpm and then filtered through a 250- μ m mesh cheesecloth. The
155 filtrate was centrifuged at $200 \times g$ at ambient temperature for 10 min. Cells, showing mainly
156 fibroblast morphology (preadipocytes), were re-suspended in DMEM (Gibco, Grand Island, NY,
157 USA) containing 10% Fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 U/mL penicillin (Invitrogen), 100
158 μ g/mL streptomycin (Invitrogen), and 250 ng/mL amphotericin B (Invitrogen). Cells were plated
159 on 24-well plates (Nunc Brand Products, Rochester, NY, USA) and incubated 5 h at 37°C in a
160 humidified, 5% CO₂ atmosphere. Cell cultures were washed twice with PBS (1x) supplemented
161 with the previously mentioned antibiotics. Preadipocyte differentiation was induced after
162 reaching 80% confluence by adipogenic agents consisting of 0.5 mM 3-isobutyl-1-
163 methylxanthine, 0.25 μ M Dexamethasone (DMS; Sigma-Aldrich), and 20 μ g/mL insulin (Wako
164 Chemicals USA, Inc., Richmond, VA, USA) (Differentiation medium 1, DM1) for 48 h.

165 Treatments started after 48 h and DM1 was changed to Differentiation medium 2 (DM2), which
166 contained 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin. The treatment continued until 80% of cells were differentiated, at
167 around day 4.

168

169 Samples and Experimental Treatments

170 It has been reported that Thiazolidinediones (TZD) increase preadipocyte differentiation through
171 upregulation of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) therefore, 2, 4-TZD
172 in DM2 medium (Cho et al., 2003) was used as positive control of its differentiation (García-
173 Rojas et al., 2010), and this effect was compared with the action of different concentrations of
174 LA (0, 125, 250, and 500 μM) and one combination of TZD (20 μM) with LA (500 μM).

175

176 RNA Isolation

177 Total RNA was extracted from cells in the same manner described for myoblasts.

178

179 PPAR γ mRNA Detection by Reverse Transcription-PCR in Chicken Adipocytes

180 The expression of PPAR γ was analyzed (as an indicator of adipose differentiation) by RT-PCR.

181 The protocol used for RT and for PCR is the same as that described for myogenin.

182

183 Quantitative PCR (qPCR)

184 PPAR γ expression was assessed by qPCR using samples from all pools. cDNA samples were
185 obtained from each of the variously treated cultures and tested by real-time qPCR (LightCycler®
186 1.5; Roche Diagnostics). The primers used for chicken PPAR γ are listed in Table 1. The
187 fragment was amplified using LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I® (Roche

188 Applied Science) and 20- μ L LightCycler[®] Capillaries (Roche Applied Science). In order to
189 normalize mRNA expression, β -actin was used as a housekeeping gene; the primers used are
190 shown in Table 1. qPCR conditions were the following: initial denaturation 95°C for 10 min;
191 amplification for 55 cycles: denaturation 95°C for 10 sec, 20°C/sec; annealing at 61°C for 10
192 sec, 20°C/sec, and extension 72°C for 9 sec, 20°C/sec. There was one melting cycle as follows:
193 denaturation at 95°C for 0 sec, 20°C/sec, annealing at 50°C for 15 sec, 20°C/sec; melting curve
194 at 95°C for 0 sec, 0.1°C/sec, and cooling at 40°C for 30 sec, 20°C/sec. In order to use the relative
195 quantification formula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, cDNA curves were carried out for each pair of primers. Curves
196 for *G. gallus* peroxisome PPAR γ and β -actin were obtained using dilutions of 1:5, 1:50, and
197 1:500 and Efficiencies (E) were 1.920 and 2.479, respectively.

198

199 Samples from a Commercial Broiler Farm

200 Eighty market-weight male broilers that had received LA in their diets throughout a 7-week
201 productive period were slaughtered and samples of liver tissue, semitendinosus, and pectoral
202 skeletal muscles, and s.c. and omental adipose tissues were obtained; an additional 80 birds that
203 never received the additive were used as negative controls.

204

205 Samples

206 Tissue samples were collected in tubes (Nunc CryoTube[®] cryogenic vials; Nunc Brand Products,
207 Roskilde, Denmark), frozen in liquid nitrogen for transport, and stored at -70°C for subsequent
208 analysis.

209

210 Total RNA and DNA Isolation

211 Total RNA from sampled tissues (100 mg) were purified using 1 mL TRIzol[®] reagent
212 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA was eluted in 40 µL RNase-free
213 water and quantified by spectrophotometry, and the samples were then stored at -70°C until use
214 in further molecular biology experiments. RNA samples were verified by agarose gel
215 electrophoresis (Seakem[®] LE Agarose; FMC BioProducts Co., Rockland, ME, USA).

216 DNA was extracted from 50 mg tissue in 1 mL DNazol[®] reagent (Invitrogen) according to the
217 manufacturer's protocol and eluted in 50 µL of 8 mM NaOH. Spectrophotometry reading
218 (NanoDrop[™] ND-1000; Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE) was performed and
219 samples were stored at -20°C.

220

221 Total Protein Isolation

222 Protein was extracted from tissues according to García and Phillips (2009). Extraction solution
223 consisted of 1 M Tris, 0.1 M EDTA, 1 M NaCl, 0.1% protease inhibitor cocktail, and 0.5%
224 NaN₃. Tissue samples (50-mg) were incubated overnight in a 500-µL extraction solution at 5°C
225 with agitation. Subsequently, centrifugation at 13,000 rpm for 10 min was performed in order to
226 obtain total protein. Total protein was quantified by Bradford assay (1976).

227

228 Liver RNA Isolation and RNA Sequencing (RNA-Seq)

229 RNA-Sequencing was used to quantify differential gene expression from 10 liver samples of
230 each group (control and LA). These were sequenced in two lanes in the Illumina Genome
231 Analyzer IIx at the DNA Massive Sequencing Unit (UUSMD) at the UNAM Institute of
232 Biotechnology (IBt) (on the World Map of High-throughput Sequencing) for 36 cycles of single-
233 end sequencing. Two files, one with 33,894,398 reads from the lane corresponding to the control

234 group (s6), and the other with 31,873,989 reads from the lane corresponding to LA chickens (s7)
235 were provided in FASTQ format.

236 The input data for RNA-Seq analysis is composed of tables with the amount of reads associated
237 to a given tag (transcript, binding region, etc.) because it has been demonstrated that the amount
238 of reads can be a good estimator of the abundance of the target tag (Mortazavi et al., 2008). Also,
239 it has been suggested that normalization of the data is a very important step to take into
240 consideration when analyzing RNA-Seq data (Robinson and Oshlack, 2010).

241 There is a great variety of methods available for performing normalization, but the main
242 objective of the majority of these methods is to scale the number of reads in a given lane to a
243 common value across all lanes, meaning that each lane is scaled according to its size (amount of
244 reads). This approach might be too simple when faced with the majority of biological issues,
245 given that it only considers size of the library and, in some cases, size of each tag.

246 With the results obtained, it was decided to utilize the robust normalization method to adjust the
247 data by using the edgeR (Robinson et al., 2010) package from Bioconductor. For validation of
248 these results, the DESeq (Anders and Huber, 2010) differential gene expression analysis R
249 package (for analyzing count data from high-throughput sequencing assays such as RNA-Seq),
250 which normalizes data by using a similar approach, was employed. In their report, the authors
251 demonstrated that this could provide better fits, thus providing a more balanced selection of
252 differentially expressed genes.

253

254 mRNA Liver Enzymes Analyzed by Quantitative PCR (qPCR)

255 Once the report of the RNA-Seq was analyzed, we proceeded to select 16 enzymes involved in
256 energy metabolism that we thought could be affected by LA but that were not significant by

257 edgeR or DESeq analysis. The sixteen enzymes chosen were analyzed individually to explore
258 whether they were encoded by a single gene or by several genes. All of the genes identified as
259 components of an enzyme were selected for analysis, for a total of 40 genes. These genes were
260 compared between libraries and, although none was found to be differentially expressed, there
261 are modest differences in their expression levels.

262 It is noteworthy that the majority of the genes that are subunits of a same enzyme or that encode
263 for the same enzyme have a similar tendency, as is the case for all of the genes of the
264 Glutathione-S-transferase (GST) family. Of the 16 genes identified, 10 have higher expression
265 levels in the chickens of the control group. This can be considered as being of interest because
266 while the individual p-value for these genes is modest, the fact that a group of genes with a
267 similar function that also has similar regulation when comparing two conditions may increase the
268 significance.

269 As a result, five enzymes were chosen to quantify their mRNA in the same control and in LA
270 animals analyzed by RNA-Seq. The selected enzymes were GST theta 1 (GSTT1), Glutathione
271 peroxidase 3 (GPX3), Oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (OGDH), Pyruvate
272 dehydrogenase (lipoamide) alpha 1 (PDHA1), and Dihydrolipoamide S-succinyltransferase
273 (DLST).

274 Real-time PCR primers were designed for these enzymes (Table 1), and their expression profiles
275 in liver were determined by real-time PCR using the StepOne™ Real-Time PCR system (Applied
276 Biosystems). Four candidate endogenous genes (MnSOD, PPIA, β -actin, and 18S rRNA) were
277 tested, and the most stable for both treatments was 18S rRNA. For the five genes measured,
278 standard curves were performed using 1:5 serial dilutions to obtain the reaction efficiencies,
279 which yielded 110% for GPX3, 115% for PDHA1, 112% for GSTT1, 95% for DLST, 105% for

280 18S, and 96% for OGDH. Relative quantification is expressed using the $2^{-\Delta Ct}$ method (Livak and
281 Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008).

282 The real-time PCR program utilized consisted of pre-incubation at 94°C for 10 min., 40
283 quantification cycles including a 1-m denaturation at 94°C, 10-sec annealing at a temperature
284 depending on the gene (see Table 1), and a 12-sec extension at 72°C. The amplification program
285 was followed by a melt curve analysis that consisted of 1-min annealing at 50°C, a temperature
286 rise of 0.25°C/sec up to 94°C, and a final cooling cycle at 40°C for 30 sec. The melt curves were
287 performed to ensure the purity of the amplified product, which was confirmed by a single peak
288 after 80°C.

289

290 Statistical analysis

291

292 Cell Culture

293 The results of quantitative PCR to measure the expression of myogenin and PPAR γ were
294 analyzed in a completely randomized design using the general linear model procedure (SAS
295 Institute, Inc., Cary, NC, USA) with the significance level set at $p \leq 0.05$. Least square means \pm
296 Standard error of the mean (SEM) were used to analyze differences among treatments (SAS,
297 2008).

298

299 Commercial Broiler Samples

300 RNA, DNA, protein synthesis, and cellular size were analyzed in a completely randomized
301 design using the general linear model procedure (SAS Institute, Inc.) with the significance level

302 set at $p \leq 0.05$. Least square means \pm SEM were used to analyze differences among treatments
303 (SAS, 2008).

304

305 RESULTS

306

307 Cell Culture

308

309 Effect of LA on Chicken Myoblasts

310

311 The 100- μ M dose of LA did not appear to promote cell differentiation, i.e., myogenin
312 expression, in muscle tissue ($p > 0.05$) (Figure 1).

313

314 Effect of LA on Chicken Adipoblasts

315

316 LA did not appear to promote adipoblast differentiation ($p > 0.1$) as measured by PPAR γ
317 expression (Figure 2).

318

319 Commercial Broiler Samples

320

321 Data of DNA, RNA content, and protein per weight (w/w) in selected tissues from animals from
322 the commercial farm are presented in Table 2. Addition of LA did not change DNA content in
323 any of the tissues, but resulted in a statistically significant increase in RNA in liver and protein in

324 s.c. adipose tissue. These data were used to obtain DNA:protein ratios, and RNA:protein ratios,
325 which are included in the same table.

326 Liver RNA Isolation and RNA-Sequencing (RNA-Seq)

327

328 Aligning

329

330 The 2.1 (May 2006) release of the chicken genome was downloaded via the File transfer protocol
331 (FTP) from ENSEMBL (European Bioinformatics Institute,
332 ftp://ftp.ensembl.org/pub/current/fasta/gallus_gallus/dna/), selecting the repeat masked file, which
333 contains the full sequence of the assembly in FASTA format, Masking hides regions of low
334 complexity by substituting all of the nucleotides in these regions with Non repeating sequences
335 (Ns). This reduces ambiguities in the alignment step because the majority of the reads will only
336 align to a single place in the genome. The file with reads in the FASTQ format contains the
337 sequence and the Phred quality score of each read. The Phred quality score is a score assigned to
338 each base during base calling, which refers to the probability of assigning a base inaccurately
339 when the information is translated from fluorescence into nucleotides. The higher the Phred
340 quality score, the lower the chance that a mistake was made during base calling.

341 The reads were aligned using Bowtie (Langmead et al., 2009), a ShortRead aligner, against the
342 2.1 release of the chicken genome after being indexed using the Bowtie-build indexer. Bowtie
343 indexes the reference genomes to maintain their memory requirements low. While performing
344 the alignment, the -n alignment mode was specified, allowing up to three mismatches on the
345 seed, which corresponds to the first 28 leftmost bases of the read. Additionally, the sum of Phred
346 qualities in all mismatched positions could not exceed 70. Finally, because best parameter was

347 selected, only best alignment according to both criteria was reported; 69.8% of reads
348 (23,659,806) from the s6 lane and 66.62% (21,235,899) of reads from the s7 lane were
349 successfully mapped against the reference genome.

350

351 Filtering

352

353 After the reads were aligned, the output files were filtered using the ShortRead (Morgan et al.)
354 package from Bioconductor (Gentleman et al., 2004). The reads with >3 Ns (unknown
355 nucleotide) or >6 nucleotides corresponding to the sequencing adapter on the 3' end were
356 discarded. This latter filtering removed only 1,088 reads from lane s6 and 985 reads from lane
357 s7. The qualities of the reads in both lanes were evaluated before and after aligning the reads.
358 Aligned reads have much higher qualities in both lanes and, even at the lowest quantile, Phred
359 qualities are >25, meaning that base call accuracy is always >99.68%.

360 Also, nucleotide frequency per cycle was evaluated to determine whether there were biases in the
361 frequencies both before and after aligning. The GC content of the unaligned reads was lower
362 than the GC content of the aligned reads, this reflecting that many of the reads with a high AT
363 content failed to align. Therefore, it is likely that these reads are noise, or that they would have
364 aligned to the low complexity masked regions. Also, the GC content between lanes s6 and s7
365 was more similar among the aligned reads, which is to be expected given that the samples
366 sequenced belong to the same organism.

367 A distinctive pattern could be observed in the first 13 bases of the reads. This pattern is
368 conserved between the two lanes and even after aligning the reads. This phenomenon had
369 already been observed and discussed in previous works (Hansen et al., 2010).

370

371 Mapping the Reads

372

373 The genome annotation for *Gallus gallus* was downloaded from BioMart from the database
374 ENSEMBL GENES 59 (SANGER UK) using the biomaRt Bioconductor package (Durinck and
375 Huber, 2008); the annotation included 17,934 genes. There were overlapping regions among
376 several of the genes and these conflicting regions were excluded from the analysis.

377 Afterward, a table containing the amount of reads mapping to each gene was created. This table
378 was generated using functions from the GenomicRanges package (Aboyoun et al.) Each read was
379 assigned a range of length 36, starting in the position assigned by Bowtie; this then overlaps
380 among these ranges, and the ranges of all of the genes were identified. It is noteworthy that while
381 each of the genes has a specific strand, the reads are strandless due to the sequencing protocol
382 used. This table allowed assigning 19,088,287 reads (56.32% of total reads) from lane s6 to the
383 non-overlapping regions of the genes (including both exons and introns) and 15,431,431 reads
384 (48.41% of total reads) from lane s7.

385

386 Differentially Expressed Genes

387

388 EdgeR

389

390 For Differential expression (DE) analysis using edgeR, it was necessary to load the table with the
391 tag counts. Once the dataset was ready for processing, common dispersion was estimated. Given
392 that there are no replicates in this dataset, it was impossible to directly estimate the dispersion for

393 the Negative Binomial model, which is the underlying model utilized by edgeR. Therefore, it
394 was necessary to perform a blind estimate of the dispersion. This blind estimate implies that two
395 conditions are replicates of each other and that this estimate assesses dispersion between the two
396 groups. Once the dispersion has been estimated, an exact test that identifies differences between
397 groups was performed. Finally, the Differentially expressed (DE) genes were identified (Table
398 3).

399

400 DESeq

401

402 To validate the genes proposed by edgeR to be differentially expressed, DESeq was used as well.
403 This package also employs a negative binomial model to manage the dispersion of the different
404 samples. The table that contained the tag counts for the two conditions was also employed as
405 input data. The fact that there were no replicates for the data set meant that it was necessary to
406 normalize and calculate the variance of the data by assuming that the two conditions were
407 replicates from the same experiment (similar to what was done in edgeR). However, this
408 assumption will lower the power of the test by increasing the amount of false negatives. Then,
409 the negative binomial test for the search for DE genes was run. The test also had the option to
410 adjust p-values for better results. Finally, a threshold of 0.5 for the adjusted p- value was set, and
411 a set of eight differentially expressed genes was obtained (Table 4).

412

413 Comparison Between Conditions

414

415 DE analysis revealed that expression levels of the majority of genes in both conditions do not
416 vary significantly. However, a small set of genes that vary with a modest degree of significance
417 was identified. The genes with Ensembl identifiers (ID) ENSGALG00000002441,
418 ENSGALG000000023622, and ENSGALG000000011354 were identified by both methods; thus,
419 these three genes have the highest degree of confidence of the entire gene set. Genes
420 ENSGALG00000006106, ENSGALG000000023214, ENSGALG000000012435,
421 ENSGALG000000003466, and ENSGALG000000019283 only were identified by DESeq. As can
422 be observed in Table 4, all eight genes in the group have a negative Log₂ (FoldChange, FC).
423 This is also true for the three genes identified by edgeR (Table 3, LogFC), meaning that all of
424 these genes had higher expression levels in the control group with respect to the group
425 undergoing LA.

426

427

428 mRNA Liver Enzymes Analyzed by Quantitative PCR

429

430 As depicted in Figure 3, all enzymes analyzed (GSTT1, OGDH, PDHA1, and DLST) showed a
431 decrease in their expression ($p < 0.01$) when LA was compared with control, except for GPX3,
432 for which no differences were found.

433

434

DISCUSSION

435

436 Cell Culture Studies

437

438 Our cell culture experiments exploring a putative role of LA modulating myoblast or adipoblast
439 differentiation did not help to advance knowledge on the mechanism(s) to promote body weight
440 (b.w.) (Figures 1 and 2). Comparison of the latter results with data from the literature is
441 hampered by the scarce information available and by substantial differences in the origin of cells
442 and in their differentiation stage.

443 Thus, Chan et al. (2013) demonstrated that 50–100 μM of Dihydrolipoic acid (DHHLA) had no
444 effect on Embryonic stem cell (ESC)-B5 cells, including cell differentiation at doses <50 , but
445 induced apoptosis at concentrations >50 μM . In addition, in these cells the authors showed that
446 DHHLA not only affected the differentiation potential of ectoderm, but also inhibited the potential
447 of ESC differentiation into endoderm. In another experimental model, Cho et al. (2003)
448 demonstrated that LA inhibited differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes and that major
449 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways mediated collateral actions of LA
450 in clonal expansion and adipocyte maturation by attenuating the expression and activation of the
451 immediate early genes, such as c-Fos and c-Jun, and by negatively regulating integral members
452 of the differentiation program: PPAR γ , and CCAAT/Enhancer binding protein alpha (C/EBP α).
453 In the same study, LA at lower concentrations (100 μM) promoted adipogenesis, whereas at
454 higher concentrations (250 and 500 μM), it was inhibitory; in our results, all of the doses utilized
455 were similar and none induced differentiation (Figure 2). Importantly, LA inhibited adipogenesis
456 induced by insulin or troglitazone, indicating that co-treatment with LA may be beneficial in
457 preventing PPAR γ agonist-induced obesity by maintaining optimal adipogenesis (Cho et al.,
458 2003).

459

460 Commercial Broiler Samples

461
462 Results from DNA, RNA, and protein, and their ratios, recorded in tissues from the commercial
463 farm broilers, pointed to LA macroeffects. Thus, because LA did not change DNA, or the
464 DNA:protein ratio, LA does not increase cell number or cell mass in the tissues analyzed,
465 whereas, the fact that LA treatment increases RNA:protein ratios in liver and breast muscle
466 (Table 4) leads us to think of LA-mediated cell induction of cell differentiation (Harel et al.,
467 1981) and or a rise in protein synthetic capacity (Smith et al., 2004).

468
469 Liver RNA Isolation and RNA-Sequencing (RNA-Seq)

470
471 EdgeR or DESeq

472
473 It is well known that LA is an essential co-factor for the E2 component of α -ketoacid
474 dehydrogenase complexes, which are exclusively located in mitochondria, e.g., Pyruvate
475 dehydrogenase (PD), α -Ketoglutarate dehydrogenase (KGDH), and Branched chain α -ketoacid
476 dehydrogenase (BCKDH) complexes (Parker and Cadenas, 2011). The RNA-Seq (Tables 3 and
477 4) reported that AVR2 and AVD (ENSGALG00000002441 and ENSGALG00000023622) were
478 downregulated by LA. AVD is a tetrameric glycoprotein that can bind up to four biotin
479 molecules, with each subunit binding individually to one biotin. Avidin can form intermolecular
480 cross-links among particles of the PDC from various sources. Avidin does this by binding to LA-
481 containing regions of the dihydrolipoamide acetyltransferase polypeptide chains that comprise
482 the structural core of the complex (Hale et al., 1992). PDC catalyzes oxidative decarboxylation
483 of pyruvate with the formation of CO₂, acetyl-CoA, and Nicotinamide adenine dinucleotide

484 (NADH) (Harris et al., 1997). Our results showed low avidin expression by LA this could mean
485 less PDC activity. In this regard, Hong et al. (1999) and Korotchkina et al. (2004) reported that
486 both S-LA and R-LA markedly inhibited mammalian PDC activity.

487 During normal metabolism, glucose is phosphorylated by hexokinase and enters into the
488 glycolysis pathway. Elevated glucose concentrations saturate hexokinase and trigger a second
489 metabolic pathway called the polyol (sorbitol) pathway. The first step in this pathway depends
490 on aldose reductase (AKR1B1, ENSGALG00000003466) to convert glucose into sorbitol, and
491 serves as a “backup” system because hexokinase has a lower K_M for glucose than does aldose
492 reductase (Mieyal et al., 2008). The physiological role of AKR1B1 consists of providing an
493 additional pathway for utilization of glucose and removing toxic compounds by carrying an
494 aldehyde group out of the cell and is thought to play a key role in various hyperglycemic states
495 (Vartanov et al., 1992). Nadaf et al. (2009), using high- and low-growth chicken lines, observed
496 the presence of hyperactive endogenous insulin circulating at “normal” concentrations and
497 chickens exhibiting constitutive hyperglycemia (about 180–200 and 220–240 mg/dL in fasting
498 and fed states, respectively), which would be deleterious to humans. As a whole, the constitutive
499 hyperglycemia found in chickens appears to mimic type 2 diabetes in humans. This would mean
500 that LA improved the glycemetic state of the chickens, as has been determined in other species
501 (Rochette et al., 2013), and this may contribute to the decrease in mRNA and the protein
502 expression of the AKR1B1 gene, which was Aldose reductase-like (ARL) (Table 4) when
503 compared with chickens that did not receive LA. In human Schwann cells, it has been
504 demonstrated that glucose reduced taurine transporter, but when added together with LA, the
505 aldose reductase exhibited inhibition (Askwith et al., 2009). These results are similar to those

506 found in this work in LA livers and assuming that this was due to an increase in insulin
507 sensitivity.

508 In relation to Decoy receptor 3 (DcR3), a member of the Tumor necrosis factor receptor (TNFR)
509 superfamily, it is associated with anti-tumor immunity suppression. DcR3 is highly expressed in
510 many tumors and its expression can be regulated by the MAPK/Mitogen-activated protein kinase
511 kinase (MEK)/Extracellular signal-relayed kinase (ERK) signaling pathway. The
512 MAPK/MEK/ERK pathway has been reported to be a regulator of tumor occurrence,
513 development, and clonal expansion (Yang et al., 2012). Our results demonstrated that in LA
514 chickens, DcR3 expression was decreased, which could mean a beneficial effect of LA in
515 tumorigenesis. Under normal physiological conditions, cells maintain a redox buffer consisting
516 of high concentrations of antioxidants and antioxidant enzymes to minimize the oxidative action
517 of ROS/Reactive nitrogen species (RNS). Perturbations to this cellular redox state can lead to
518 OS, which has been acknowledged as a significant contributing factor to the pathogenesis of
519 numerous degenerative diseases, including cancer. Cancer cells differ from normal cells because
520 they exhibit increased intrinsic OS due to a number of factors including oncogenic stimulation,
521 increased metabolic activity, and mitochondrial dysfunction (Mieyal et al., 2008).

522 The liver RNA-Seq reported a decrease of the Crystallin, beta-A gene (CRYBA2)
523 (ENSGALG00000011354), Histone H2A-IV, and LOC420789 (Tables 3 and 4). However, no
524 relationship reported to date between these and LA.

525

526 mRNA Liver Enzymes Analyzed by Quantitative PCR (qPCR)

527

528 Lipoic acid (LA) has been reported to have beneficial effects on mitochondrial function and to
529 attenuate OS.

530 In relation to the expression of antioxidant enzymes GSTT1 and GPX3, only the former showed
531 a decrease ($p < 0.01$, Figure 3). It is known that LA prevents hepatic triglyceride accumulation
532 and liver oxidative damage through the inhibition of Hydroperoxide (H_2O_2) production and the
533 stimulation of mitochondrial antioxidant defenses. LA treatment upregulated manganese
534 Superoxide dismutase (SOD2) (60.6%) and Glutathione peroxidase (GPX) (100.2%) activities,
535 and increased the reduced Glutathione to oxidized Glutathione (GSH:GSSG) ratio and UCP2
536 mRNA levels (Valdecantos et al., 2012). Chen et al. (2011) observed, in the liver of broilers, that
537 treatments with LA linearly increased (17.6, 27.9, and 31.6%, respectively) hepatic SOD activity
538 as compared with that of the control. Their chicks, fed a 300-mg LA/kg diet, had higher GPX
539 activity than chicks fed the control diet ($p < 0.05$). Total-Antioxidant capacity (T-AOC) activity
540 was not affected by dietary LA; however, in this study, GPX3 was not affected by LA treatment.
541 GST is a supergene family and each sub-family member is located in a distinct genomic region.
542 GST gene products catalyze the conjugation of reduced Glutathione (GSH) into electrophilic
543 centers for a wide variety of substrates. Substrates include both xenobiotics and endogenous
544 compounds that are harmful to cellular macromolecules (Zhao et al., 2009), based on the results
545 that LA chickens were more exposed to toxic compounds.

546 Deng et al. (2010) reported that protein expression of important enzymes of the TCA cycle, such
547 as the Succinate dehydrogenase flavoprotein (SDHFI) subunit, isocitrate dehydrogenase (IDH),
548 and 2-Oxoglutarate dehydrogenase E1 (OGDH), were all upregulated in the liver of rat during
549 the progression of type 2 diabetes. These proteins play crucial roles in the TCA by catalyzing
550 reactions that generate reducing equivalents (NADH and Flavin adenine dinucleotide [FADH₂])

551 and Guanosine triphosphate (GTP). This upregulation should be expected, because type 2
552 diabetes might be forestalled through compensation with increased enzymes of the TCA cycle to
553 counteract the superfluous plasma glucose.

554 Glucose-derived pyruvate is efficiently taken up by mitochondria presumably via the pyruvate
555 carrier. In the mitochondrial matrix, pyruvate is oxidized by PDHA1 to form acetyl-CoA.
556 PDHA1 is part of the Pyruvate dehydrogenase complex (PDC). Alternatively, pyruvate enters the
557 anaplerotic pathway initiated by Pyruvate carboxylase (PC). Interestingly, following disruption
558 of the PDHA1 gene, glucose-stimulated insulin secretion was impaired but not abolished. These
559 results demonstrate that glucose-stimulated insulin secretion does not solely rely on
560 mitochondrial pyruvate oxidation and are consistent with the view that metabolite fluxes through
561 both PDH and PC are important for insulin secretion (Akhmedov et al., 2012; Choi et al., 2010).
562 The diminished expression of PDHA1 could be explained by the fact that the excess of glucose
563 in poultry feed was controlled by LA.

564 The α -Ketoglutarate dehydrogenase complex (KGDHC) is an enzyme consisting of multiple
565 copies of three subunits: α -Ketoglutarate dehydrogenase (KGDH or E1k); Dihydrolipoyl
566 succinyltransferase (DLST or E2k), and Dihydrolipoyl dehydrogenase (DLD or E3). It
567 participates in the TCA cycle, where it irreversibly catalyzes the conversion of α -ketoglutarate,
568 CoASH, and NAD^+ into succinyl-CoA, NADH, and CO_2 . It may exhibit a high flux-control co-
569 efficient in the generation of reducing equivalents and is also crucial for maintenance of the
570 mitochondrial redox state (Kiss et al., 2013). The expression of DLST is also diminished by LA
571 in chickens, and this can be because it is consistent with the work of Nilsen et al. (2011), who
572 observed that a decrease in KGDHC activity (by DLST+/-) reduced glucose consumption in

573 cortex, but did not have detrimental effects on mitochondrial metabolism in the brain, in the
574 direction of only aspartate, thus probably Oxaloacetate (OAA), were decreased.

575 In the case of lipoic acid-fed chicks, decreased OGDH expression can be explained as opposite
576 to what has been reported for rats, in which a decrease in the expression of enzymes of TCA
577 cycle enzymes could be observed as a compensatory mechanism for shortening the cycle more
578 efficiently.

579 In conclusion, to our knowledge, this is the first study on the effect of lipoic acid on the
580 expression of hepatic liver and muscle and adipose tissue differentiation. We established that its
581 beneficial effect on productive parameters is in practice by downregulation of enzyme expression
582 in liver, especially those involved in glucose metabolism and the TCA cycle. Considering the
583 key regulatory role of LA in metabolism as reported in other species and in the light of the
584 present findings, further analysis of effect of LA on muscle is warranted in the near future.

585

586

587 LITERATURE CITED

- 588 Aboyoun, P., H. Pages, and M. Lawrence. Genomic Ranges: Representation and manipulation of
589 genomic intervals. R package version 1.1.38.
- 590 Akhmedov, D., U. De Marchi, C.B. Wollheim, and A. Wiederkehr. 2012. Pyruvate
591 dehydrogenase E1 α phosphorylation is induced by glucose but does not control
592 metabolism-secretion coupling in INS-1E clonal β -cells. *Biochim Biophys Acta*.
593 (10):1815-24.
- 594 Anders, S., and W. Huber. 2010. Differential expression analysis for sequence count data.
595 (Abstract). *Genome Biol.* 11:R106.
- 596 Askwith, T., W. Zeng, M.C. Eggo, and M.J. Stevens. 2009. Oxidative stress and dysregulation of
597 the taurine transporter in high-glucose-exposed human Schwann cells: implications for
598 pathogenesis of diabetic neuropathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297:E620-E628.
- 599 Biewenga, G.P., G.R. Haenen, and A. Bast. 1997. The pharmacology of the antioxidant lipoic
600 acid. *Gen Pharmacol.* 29:315-331.
- 601 Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
602 protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem.* 72:248-54.
- 603 Bustamante, J., J.K. Lodge, L. Marcocci, H.J. Tritschler, L. Packer, and B.H. Rihn. 1998. Alpha-
604 lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med.* 24:1023-39.
- 605 Chan, W.H., W.L. Houg, C.A. Lin, C.H. Lee, P.W. Li, J.T. Hsieh, J.L. Shen, H.I. Yeh, and
606 W.H. Chang. 2013. Impact of dihydrolipoic acid on mouse embryonic stem cells and
607 related regulatory mechanisms. *Environ Toxicol.* 28:87-97.
- 608 Chen, P., Q.G. Ma, C. Ji, J.Y. Zhang, L.H. Zhao, Y. Zhang, and Y.Z. Jie. 2011. Dietary lipoic
609 acid influences antioxidant capability and oxidative status of broilers. *Int J Mol Sci.*
610 12:8476-88.
- 611 Cho, K.J., H.E. Moon, H. Moini, L. Packer, D.Y. Yoon, and A.S. Chung. 2003. Alpha-lipoic
612 acid inhibits adipocyte differentiation by regulating pro-adipogenic transcription factors
613 via mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem.* 278:34823-33.
- 614 Choi, C.S., P. Ghoshal, M. Srinivasan, S. Kim, G. Cline, and M.S. Patel. 2010. Liver-specific
615 pyruvate dehydrogenase complex deficiency upregulates lipogenesis in adipose tissue
616 and improves peripheral insulin sensitivity. *Lipids.* 45:987-95.

- 617 Deng, W.J., S. Nie, J. Dai, J.R. Wu, and R. Zeng. 2010. Proteome, phosphoproteome, and
618 hydroxyproteome of liver mitochondria in diabetic rats at early pathogenic stages. *Mol*
619 *Cell Proteomics*. 9(1):100-16.
- 620 Díaz-Cruz, A., M. Serret, G. Ramírez, E. Ávila, R. Guinzberg, and E. Piña. 2003. Prophylactic
621 action of lipoic acid on oxidative stress and growth performance in broilers at risk of
622 developing ascites syndrome. *Avian Pathol*. 32:645-53.
- 623 Durinck S., and W. Huber. 2008. biomaRt: Interface to BioMart databases (e.g., Ensembl,
624 COSMIC, Wormbase and Gramene). R package version 2.4.0. European Bioinformatics
625 Institute. ftp://ftp.ensembl.org/pub/current/fasta/gallus_gallus/dna/
- 626 Filigheddu, N., V.F. Gnocchi, M. Coscia, M. Cappelli, P.E. Porporato, R. Taulli, S. Traini, G.
627 Baldanzi, F. Chianale, S. Cutrupi, E. Arnoletti, C. Ghe, A. Fubini, N. Surico, F.
628 Sinigaglia, C. Ponzetto, G. Muccioli, T. Crepaldi, and A. Graziani, A., 2007. Ghrelin and
629 des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Mol*
630 *Biol Cell*. 18:986-94.
- 631 García, R, and J.G. Phillips, 2009. Physical distribution and characteristics of meat and bonemeal
632 protein. *J Sci Food Agric*. 89:329-36.
- 633 García-Rojas, P., A. Antaramian, L. González-Dávalos, F. Villarroya, A. Shimada, A. Varela-
634 Echavarría, and O. Mora. 2010. Induction of peroxisomal proliferator-activated receptor
635 gamma and peroxisomal proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 by
636 unsaturated fatty acids, retinoic acid, and carotenoids in preadipocytes obtained from
637 bovine white adipose tissue. *J Anim Sci*. 88:1801-8.
- 638 Gentleman, R.C., V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L.
639 Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F.
640 Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney,
641 J.Y. Yang, and J. Zhang. 2004. Bioconductor: open software development for
642 computational biology and bioinformatics. (Abstract). *Genome Biol*. 5:R80.
- 643 Gorąca, A., H. Huk-Kolega, A. Piechota, P. Kleniewska, E. Ciejka, and B. Skibska. 2011. Lipoic
644 acid- biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep*. 63:849-58.
- 645 Hale, G., N.G. Wallis, and R.N. Perham. 1992. Interaction of avidin with the lipoyl domains in
646 the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: three-dimensional location and
647 similarity to biotinyl domains in carboxylases. *Proc Biol Sci*. 248:247-53.

- 648 Hamano, Y. 2007. Continuous infusion of lipoic acid rapidly reduces plasma beta-
649 hydroxybutyrate with elevation of non-esterified fatty acids in broiler chickens. *Br J Nutr.*
650 97:495-501.
- 651 Hansen, K.D., S.E. Brenner, and S. Dudoit. 2010. Biases in Illumina transcriptome sequencing
652 caused by random hexamer priming. *Nucleic Acids Res.* 38:1-7.
- 653 Harel, L., C. Blat, F. Lacour, and C. Friend. 1981. Altered RNA/protein ratio associated with the
654 induction of differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
655 78:3882-6.
- 656 Harris, R.A., M.M. Bowker-Kinley, P. Wu, J. Jeng, and K.M. Popov. 1997. Dihydrolipoamide
657 dehydrogenase-binding protein of the human pyruvate dehydrogenase complex. DNA-
658 derived amino acid sequence, expression, and reconstitution of the pyruvate
659 dehydrogenase complex. *J Biol Chem.* 272:19746-51.
- 660 Hong, Y.S., S.J. Jacobia, L. Packer, and M.S. Patel. 1999. The inhibitory effects of lipoic
661 compounds on mammalian pyruvate dehydrogenase complex and its catalytic
662 components. *Free Radic Biol Med.* 26:685-94.
- 663 Karaman, M., H. Ozen, M. Tuzcu, Y. Cigremiş, F. Onder, and K. Ozcan. 2010. Pathological,
664 biochemical and haematological investigations on the protective effect of alpha-lipoic
665 acid in experimental aflatoxin toxicosis in chicks. *Br Poult Sci.* 51:132-141.
- 666 Kiss, G., C. Konrad, J. Doczi, A.A. Starkov, H. Kawamata, G. Manfredi, S.F. Zhang, G.E.
667 Gibson, M.F. Beal, V. Adam-Vizi, and C. Chinopoulos. 2013. The negative impact of α -
668 ketoglutarate dehydrogenase complex deficiency on matrix substrate-level
669 phosphorylation. *FASEB J.* 27: 2392-2406.
- 670 Konrad, D., R. Somwar, G. Sweeney, K. Yaworsky, M. Hayashi, T. Ramlal, and A. Klip.
671 2001. The antihyperglycemic drug alpha-lipoic acid stimulates glucose uptake via both
672 GLUT4 translocation and GLUT4 activation. *Diabetes.* 50:1464-71.
- 673 Konrad, D. 2005. Utilization of the insulin-signaling network in the metabolic actions of alpha-
674 lipoic acid-reduction or oxidation? *Antioxid Redox Sign.* 7:1032-9.
- 675 Korotchikina, L., S. Sidhu, and M. Patel. 2004. R-Lipoic acid inhibits mammalian pyruvate
676 dehydrogenase kinase. *Free Radical Res.* 38:1083-92.

- 677 Langmead, B., C. Trapnell, M. Pop, and S. Salzberg. 2009. Ultrafast and memory-efficient
678 alignment of short DNA sequences to the human genome. (Abstract). *Genome Biol.*
679 10:R25.
- 680 Lester, P., R. Peter, H.J. Tristschler, G.L. King, and A. Azzi. 2000. *Antioxidants in Diabetes*
681 *Management*. New York, NY, USA: Marcel Dekker, Inc.
- 682 Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time
683 quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25:402-8.
- 684 Mieyal, J., M. Gallogly, S. Qanungo, E. Sabens, and M. Shelton. 2008. Molecular mechanisms
685 and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Sign.*
686 10:1941-88.
- 687 Montoya-Flores, D., O. Mora, E. Tamariz, L. González-Dávalos, A. González-Gallardo, A.
688 Antaramian, A. Shimada, A. Varela-Echavarría, and J.L. Romano-Muñoz. 2012. Ghrelin
689 stimulates myogenic differentiation in a mouse muscle satellite cell line and in primary
690 cultures of bovine myoblasts. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 96:725-38.
- 691 Morgan, M., M. Lawrence, and S. Anders. ShortRead: Base classes and methods for high-
692 throughput short-read sequencing data. R package version 1.6.2.
- 693 Mortazavi, A., B.A. Williams, K. McCue, L. Schaeffer, and B. Wold. 2008. Mapping and
694 quantifying mammalian transcriptomes by RNASeq. *Nature Methods*. 5(7):1-8.
- 695 Nadaf, J., F. Pitel, H. Gilbert, M.J. Duclos, F. Vignoles, C. Beaumont, A. Vignal, T.E. Porter,
696 L.A. Cogburn, S.E. Aggrey, J. Simon, and E.L. Bihan-Duval. 2009. QTL for several
697 metabolic traits map to loci controlling growth and body composition in an F2 intercross
698 between high- and low-growth chicken lines. *Physiol Genomics*. 38:241-9.
- 699 Nilsen, L., Q. Shi, G. Gibson, and U. Sonnewald. 2011. Brain [U-13 C]glucose metabolism in
700 mice with decreased α -ketoglutarate dehydrogenase complex activity. *J Neurosci Res.*
701 89:1997-2007.
- 702 Packer, L., and E. Cadenas. 2011. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of
703 transcription and cell signaling. *J Clin Biochem Nutr*. 48:26-32.
- 704 Reed, L.J. 2001. A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase
705 complexes. *J Biol Chem*. 276:38329-36.
- 706 Robinson, M.D., and A. Oshlack. 2010. A scaling normalization method for differential
707 expression analysis of RNA-Seq data. (Abstract). *Genome Biol*. 11(3):R25.

- 708 Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for
709 differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*.
710 26(1):139-40
- 711 Rochette, L., S. Ghibu, C. Richard, M. Zeller, Y. Cottin, and C. Vergely. 2013. Direct and
712 indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food*
713 *Res.* 57:114-25.
- 714 SAS Institute, Inc., 2008: SAS OnlineDoc. 9.1.3. Cary, NC, USA: SAS Institute, Inc.
- 715 SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación).
716 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la
717 producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación.
718 22 de Agosto. México.
- 719 Schmittgen, T.D., and K.J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT
720 method. *Nat Protoc.* 3:1101-8.
- 721 Shen, Q.W., C.S. Jones, N. Kalchayanand, M.J. Zhu, and M. Du. 2005. Effect of dietary alpha-
722 lipoic acid on growth, body composition, muscle pH, and AMP-activated protein kinase
723 phosphorylation in mice. *J Anim Sci.* 83:2611-7.
- 724 Smith, A.R., S.V. Shenvi, M. Widlansky, J.H. Suh, and T.M. Hagen. 2004. Lipoic acid as a
725 potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem.*
726 11:1135-46.
- 727 Valdecantos, M.P., P. Pérez-Matute, P. González-Muniesa, P.L. Prieto-Hontoria, M.J. Moreno-
728 Aliaga, and J.A. Martínez. 2012. Lipoic acid improves mitochondrial function in
729 nonalcoholic steatosis through the stimulation of sirtuin 1 and sirtuin 3. *Obesity.* 20:1974-
730 83.
- 731 Vartanov, S.S., A.R. Pavlov, and A.I. Iaropolov. 1992. Aldose reductase: physiological role,
732 properties and prospects for regulating activity. *Biokhimiia.* 57:323-41.
- 733 Yang, D., X. Fan, P. Yin, Q. Wen, F. Yan, S. Yuan, B. Liu, G. Zhuang, and Z. Liu. 2012.
734 Significance of decoy receptor 3 (Dcr3) and external-signal regulated kinase 1/2 (Erk1/2)
735 in gastric cancer. *BMC Immunol.* 13:28-37.
- 736 Zhao, Y., M. Marotta, E. Eichler, C. Eng, and H. Tanaka. 2009. Linkage disequilibrium between
737 two high-frequency deletion polymorphisms: implications for association studies

738 involving the glutathione-S transferase (*GST*) genes. (Abstract). PLoS Genet.
739 5:e1000472.

Table 1. List of PCR primers used in this work

| GENE | Reference sequence accession number | Primers' position (5' → 3') | Predicted fragment size | Alignment (Tm-align) |
|--|--|--|-------------------------|----------------------|
| Chicken myogenin | NM_204184 Gallus gallus myogenin (Myogenic factor 4, [MYOG]), mRNA | Forward: AAGCCTTCGAGGCTCTGA Reverse: TCATCGCTCAGGAGGTGA | 283 pb | 63° |
| Chicken Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) | NM_001001460.1 Gallus gallus Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), mRNA | Forward: GCAGGAACAGAACAAAGAAG Reverse: CTCCCGTGTCATGAATCCTT | 244 pb | 61° |
| Chicken Dihydrolipo-amide S-succinyl-transferase (DEST) | NM_001012901.1 Gallus gallus Dihydrolipo-amide S-succinyl-transferase (E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex) (DLST), mRNA | Forward: GTCTTGTGGTCCCTGTCGTT Reverse: AAAGAGTGACCCAAAAACCC | 147 pb | 56° |
| Chicken Glutathione peroxidase 3 (GPX3) | NM_001163232 Gallus gallus Glutathione peroxidase 3 (GPX3), mRNA | Forward: AGAAAGGGGATGTGAACGGG Reverse: ATTTGATGTCGTGGTTCCTC | 115 pb | 56° |
| Chicken Pyruvate dehydrogenase (PD) | NM_001012544 Gallus gallus Pyruvate dehydrogenase | Forward: GTATTGTCGGTGCTCAGGTT Reverse: | 260 pb | 61° |

| | | | | |
|--|---|--|--------|-----|
| | (lipoamide) alpha 1 (PDHA1), mRNA | TCCATGCCATCCACTCTAAG | | |
| Chicken glutathione S- transferase theta 1 (GSTT1) | NM_205365 Gallus gallus Glutathione S- transferase theta 1 (GSTT1), mRNA | Forward: CGCACAGGGCCATCAAATAG Reverse: CTTCTCTGATGGCTGTGGTT | 291 pb | 57° |
| Chicken Oxoglutarate (alpha-keto- glutarate) dehydro- genase (lipoamide) (OGDH) | NM_001031382 Gallus gallus Oxoglutarate (alpha- ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide) (OGDH), mRNA | Forward: TGAGCCGAATCCTGAAGACC Reverse: GGTCCTCTTGTCCACGTTCT | 193 pb | 58° |
| Bovine 18S ribosomal | NR_036642 Bos taurus 18S ribosomal RNA (RN18S1), ribosomal RNA | Forward: GGAGCGATTTGTCTGGGTTA Reverse: GTAGGGTAGGCACACGCTGA | 195 pb | 58° |
| Bovine actin, beta (ACTB), mRNA | NM_173979.3 Bos taurus actin, beta (ACTB), mRNA | Forward: CCATCATGAAGTGTGACGTTG Reverse: ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA | 175 pb | 61° |
| Chicken Glyceralde-hyde 3- phosphate dehydro-genase (GAPDH) | NM_204305 Gallus gallus Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA | Forward: AAGGCTGAGAACGGGAAACT Reverse: ATCAGCTGAGGGAGCTGAGA | 201 pb | 65° |

PCR = Polymerase chain reaction; mRNA = messenger RNA.

Table 2. DNA, RNA, and total protein content in samples of representative tissues removed from control and LAt chickens maintained for 7 weeks on a commercial farm.

| Tissue | DNA mg g ⁻¹ ww | | | RNA mg g ⁻¹ ww | | | Protein mg g ⁻¹ ww | | | DNA:Protein ratio | | | RNA:protein ratio | | |
|--------|---------------------------|-----|------|---------------------------|------------------|------|-------------------------------|------------------|------|-------------------|-----|------|-------------------|------------------|------|
| | Control | LAt | SE | Control | LAt | SE | Control | LAt | SE | Control | LAt | SE | Control | LAt | SE |
| Liver | 3.7 | 3.6 | 0.1 | 2.4 ^a | 2.9 ^b | 0.2 | 2.5 | 2.5 | 0.02 | 1.5 | 1.5 | 0.06 | 0.7 ^a | 0.9 ^b | 0.05 |
| BM | 1.5 | 1.4 | 0.1 | 0.9 | 1.0 | 0.04 | 2.4 | 2.3 | 0.05 | 0.6 | 0.6 | 0.05 | 0.7 ^a | 1.0 ^b | 0.1 |
| SM | 1.2 | 1.2 | 0.08 | 0.9 | 1.0 | 0.05 | 2.2 | 2.2 | 0.02 | 0.6 | 0.6 | 0.04 | 0.9 | 0.9 | 0.1 |
| SAT | 0.4 | 0.4 | 0.05 | 0.6 | 0.6 | 0.09 | 0.5 ^a | 0.6 ^b | 0.02 | 0.9 | 0.7 | 0.1 | 1.9 | 1.7 | 0.3 |
| OAT | 0.4 | 0.4 | 0.03 | 0.5 | 0.6 | 0.05 | 0.5 | 0.5 | 0.03 | 1.0 | 0.8 | 0.1 | 1.8 | 1.8 | 0.2 |

ww, wet weight; BM, Breast muscle; SM, Semitendinous muscle; SAT, Subcutaneous adipose tissue; OAT, Omental adipose tissue; LAt = 100- μ m Lipoic acid treatment; SEM = Standard error of the mean. N = 80 for control animals and 80 for LAt animals.

^{a,b}Means with different lowercase letters indicate a significant difference between control and LAt ($p < 0.01$).

Table 3. Differentially expressed (DE) genes using edgeR

| Ensembl Identifier (ID) | Protein name | logConc | logFC | P value | FDR |
|-------------------------|---------------------------------|---------|-------|---------|------|
| ENSGALG0000002441 | Avidin-related protein 2 (AVR2) | -17.83 | -3.93 | 0.00 | 0.47 |
| ENSGALG00000023622 | Avidin (AVD) | 14.54 | -3.54 | 0.00 | 0.48 |
| ENSGALG00000011354 | Beta-crystallin A2 (CRYBA2) | -20.58 | -4.60 | 0.00 | 0.54 |

logConc = log Concentration; logFC = log FoldChange; FDR = False discovery rate.

Table 4. Differentially expressed (DE) genes using DESeq

| Ensembl Identifier (ID) | Protein name | Log2 (Fold Change) | P value | Adjusted p value |
|-------------------------|---|--------------------------|---------|---------------------|
| ENSGALG00000002441 | Avidin-related protein 2 (AVR2) | -4.35 | 0.00 | 0.00 |
| ENSGALG00000023622 | Avidin (AVD) | -3.95 | 0.00 | 0.02 |
| ENSGALG00000006106 | Decoy receptor 3 (DcR3) | -3.14 | 0.00 | 0.23 |
| ENSGALG00000011354 | Beta-crystallin A2 (CRYBA2) | -5.01 | 0.00 | 0.05 |
| ENSGALG00000023214 | Histone H2A-IV | -2.81 | 0.00 | 0.23 |
| ENSGALG00000012435 | LOC420789 | -3.00 | 0.00 | 0.18 |
| ENSGALG00000003466 | Aldose reductase AKR1B1 | -2.72 | 0.00 | 0.32 |
| ENSGALG00000019283 | Aldose reductase-like (ARL) protein | -2.85 | 0.00 | 0.23 |

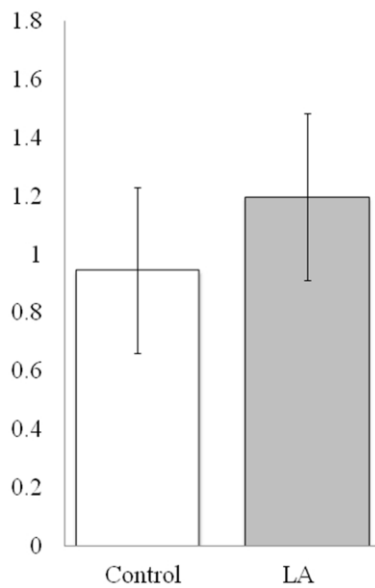
FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of Lipoic acid (LA) on myogenin expression in chicken myoblast. Myogenin expression was measured by quantitative Polymerase chain reaction (qPCR) in cells incubated in Differentiation media (DM), used as a control, and in DM supplemented with 100 μ M LA. Respective values were normalized to the level of Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and compared ($p > 0.05$). The bars indicate the means \pm Standard error of the mean (SEM) from six independent experiments.

Figure 2. Effect of Lipoic acid (LA) on Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) expression in chicken adipoblast. Differentiation medium (DM) was used as a negative control, and 20- μ M 2,4-Thiolidinedione (TZD), as positive control. It shows induction of the PPAR γ gene relative to the control, as measured by quantitative Polymerase chain reaction (qPCR). PPAR γ was determined and normalized to the level of β -actin. The bars indicate the means \pm Standard error of the mean (SEM) from 10 independent experiments. ^{a,b}Different lowercase letters indicate a significant difference.

Figure 3. Effect of Lipoic acid (LA) on Dihydrolipoamide S-succinyltransferase (DLST), Glutathione peroxidase 3 (GPX3), Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1 (PDHA1), Glutathione-S transferase theta 1 (GSTT1), and Oxoglutarate (alpha ketoglutarate) dehydrogenase (OGDH) expression in chicken liver. All genes were determined and normalized to the level of the 18S gene. ^{a,b}Different lowercase letters indicate a significant difference.

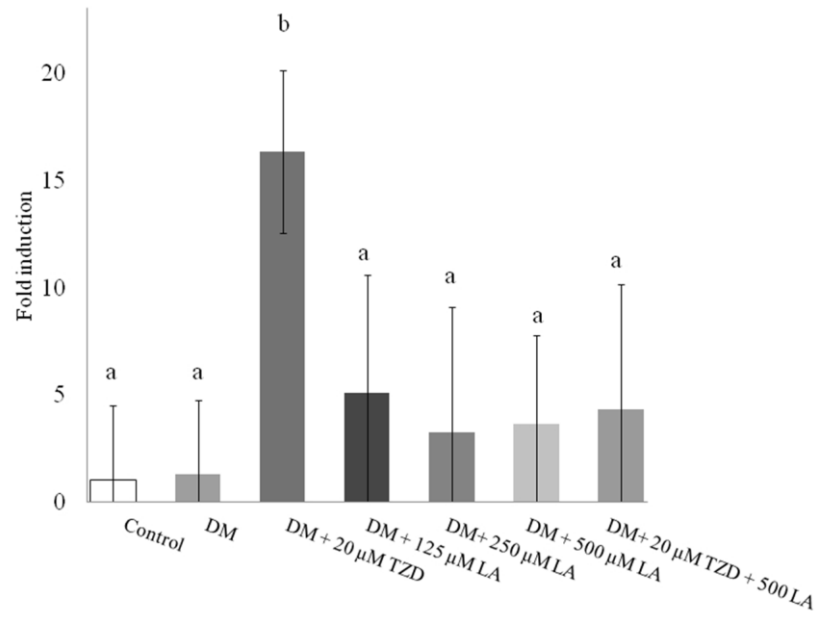
Figure 1



254x190mm (96 x 96 DPI)

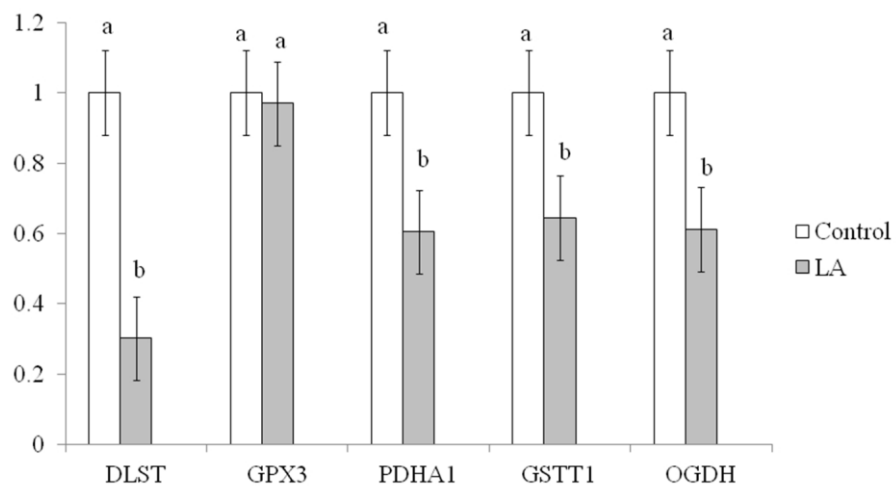
Review

Figure 2



254x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 3



254x190mm (96 x 96 DPI)

Review