



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

ESTIMACIÓN DEL ESTADO OXIDANTE DE LA CERDA NULIPARA DURANTE SU
CICLO PRODUCTIVO.

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:
JUAN JOSÉ FLORES MALPICA

**TUTOR:
DR. ANTONIO DÍAZ CUZ
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**COMITÉ TUTORAL:
DRA. MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DR. GERARDO MARISCAL LANDÍN.
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2014

DEDICATORIA

A Thamara por ser mi compañera y estar a mi lado en toda circunstancia. Te amo.

A Thamarita por ser el motivo que me impulsa a seguir progresando, “Papa ya son muchos diplomas y poco trabajo”. Te amo

A la Sra. Gloria Urrutia y Familia por el gran apoyo que siempre me han brindado.

Al Dr. Marco Antonio González Acosta y Familia por su valiosa ayuda.

A mi madre María Malpica Cárdenas, gracias por tu apoyo y comprensión.

A mi padre MVZ Rodolfo Flores López por ser un ejemplo en todos los aspectos de la vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial al Dr. Antonio Díaz Cruz por permitirme el trabajar a su lado.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. María Elena Trujillo Ortega y el Dr. Gerardo Mariscal Landin por su tiempo y los comentarios para mejorar el presente trabajo.

A mi Jurado integrado por la Dra. Silvia Elena Buntinx Dios, Dr. Diego Braña Varela, Dr. Cesar Mejía Guadarrama y el Dr. Oscar Gutiérrez Pérez, por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Al M en C Cuauhtémoc Nava Cuellar por su paciencia y apoyo en la fase de laboratorio.

Al Ing. José Luis Pablos Hach por su ayuda en la abrumadora parte de la “estadística”.

A mis amigos del Laboratorio por su ayuda y palabras de aliento.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al personal del CEIEPO Jilotepec por su valiosa ayuda.

RESUMEN

La selección genética continua ha mejorado el rendimiento reproductivo de las cerdas. Durante la gestación existe una alta demanda energética, condición que favorece el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo. El objetivo de este trabajo fue explorar el estatus oxidativo de la cerda nulípara previo a la gestación, durante la gestación y después del parto a través de algunos indicadores metabólicos de estrés oxidativo en plasma, para valorar el posible uso profiláctico de antioxidantes. Se utilizaron cerdas nulíparas, clínicamente sanas, las cuales se dividieron en 4 grupos: vacías, 45 días de gestación, 100 días de gestación y 21 días posparto. Se determinaron los siguiente indicadores metabólicos de daño oxidativo en plasma: daño proteico por oxidación (Carbonilación), capacidad antioxidante no enzimática (FRAP), actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px), niveles de ácido ascórbico (Vitamina C) y lipoperoxidación (TBARS). Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En la prueba de Carbonilación se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el grupo vacías y los demás grupos (45 días de gestación, 100 días de gestación y 21 Días Posparto). En la prueba de FRAP se observó **un incremento estadísticamente significativo ($P < 0.05$)** en los grupos de 45 días de gestación, 100 días de gestación y 21 Días Posparto contra el grupo de vacías. En la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, se observó una disminución significativa (**$P < 0.05$**) **solamente a los 45 días de gestación**, el resto de los grupos no mostró diferencias. Con relación a los niveles de ácido ascórbico el grupo de vacías presentó los niveles más altos y van disminuyendo con una diferencia estadísticamente significativa (**$P < 0.05$**) **durante la gestación**, hasta no ser detectada al final del periodo de destete. Con respecto a (TBARS), observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos. Los resultados de oxidación proteica y disponibilidad de vitamina C, obtenidos en este trabajo, sugieren el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo en cerdas gestantes. Es probable que exista una relación inversa entre los altos niveles de carbonilación y la disminución gradual de las concentraciones séricas de vitamina C, lo que tendría un impacto negativo en el estado fisiológico de las cerdas, llegando, incluso, a afectar su productividad. Apoyado parcialmente por DGAPA-UNAM: IT222611-3.

Palabras Claves: Estrés Oxidativo, cerdas nulíparas, FRAP, TBARS, Carbonilación, Actividad glutatión peroxidasa, Vitamina C

ABSTRAC

Continuous breeding has improved the reproductive performance of sows. During pregnancy there is a high energy demand, a condition that favors the development of a cadre of oxidative stress. The objective of this study was to explore the oxidative State of gilt bristle prior to pregnancy, during pregnancy and after childbirth through some metabolic indicators of oxidative stress, to assess the possible prophylactic use of antioxidants. Clinically healthy nulliparous gilts were used and were divided in 4 groups: empty, 45 days of gestation, 100 days of gestation and 21 days postpartum. The following metabolic indicators of oxidative damage in plasma were determined: protein damage by oxidation (Carbonylation), non-enzymatic antioxidant capacity (FRAP), activity of Glutathione peroxidase (GSH-Px), levels of Ascorbic acid (vitamin C) and lipoperoxidación (TBARS). The non-parametric Kruskal-Wallis test was performed. In the Carbonylation test significant differences were observed ($P > 0.05$) between the empty group and the other groups (45 days of gestation, 100 days of gestation and 21 days postpartum). In the FRAP test was observed a statistically significant increase (**$P < 0.05$**) in groups of 45 days of gestation, 100 days of gestation and 21 days post-partum against the empty group. In the activity of the enzyme Glutathione peroxidase, a significant decrease (**$P < 0.05$**) was observed only to the 45 days of gestation, the rest of the groups showed no difference. In relation to the levels of Ascorbic acid the empty group presented the highest levels and are decreasing with a statistically significant difference (**$P < 0.05$**) during gestation, to not be detected at the end of the weaning period. With respect to (TBARS), we observe that statistically significant differences between the different groups there are no. The results of protein oxidation and availability of vitamin C, obtained in this study, suggest the development of a table of oxidative stress in sows. It is likely that there is an inverse relationship between high levels of carbonylation and the gradual decline in serum vitamin C, which would have a negative impact on the physiological state of the bristles, reaching even affect your productivity. Supported partially by UNAM-DGAPA: IT222611-3.

Key words: Oxidative stress, nulliparous, FRAP, TBARS, Carbonylation, activity bristles Glutathione peroxidase, vitamin C

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LA LITERATURA	2
Especies reactivas de oxígeno	2
Sistema Antioxidante	5
Estrés Oxidativo	14
Estrés Oxidativo en los animales	17
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
MATERIAL Y METODOS	22
Instalaciones	22
Animales	22
Toma de muestras sanguíneas	26
Pruebas de laboratorio	27
Análisis estadístico	33
RESULTADOS	34
Daño proteico por oxidación	34
Capacidad antioxidante no enzimática	36
Actividad de la enzima GSH-Px	38
Concentración de ácido ascórbico	41
Lipoperoxidación	43
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Estadísticas Descriptivas. Daño proteico por oxidación nmol/mg proteína.	34
Cuadro 2. Cuartiles. Daño proteico por oxidación nmol/mg proteína.	34
Cuadro 3 Estadísticas Descriptivas. Capacidad Antioxidante no enzimático nmol Fe II/ml plasma	36
Cuadro 4 Cuartiles. Capacidad Antioxidante no enzimática nmol Fe II/ml Plasma	37
Cuadro 5 Estadísticas Descriptivas. Actividad de la enzima GSH-Px nmol de NADPH oxidado/ml de muestra	39
Cuadro 6 Cuartiles. Actividad de la enzima GSH-Px nmol de NADPH oxidado/ml de muestra	39
Cuadro 7 Estadísticas Descriptivas. Concentración ácido ascórbico. nmol ácido ascórbico/ml muestra	41
Cuadro 8 Cuartiles. Concentración ácido ascórbico.	41
Cuadro 9 Estadísticas Descriptivas. Lipoperoxidación nmol MDA / ml plasma	44
Cuadro 10 Cuartiles. Lipoperoxidación nmol MDA / ml plasma	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cadena Respiratoria	3
Figura 2. Vitamina A	8
Figura 3. Ácido Ascórbico	9
Figura 4. Vitamina E	10
Figura 5. Glutati3n oxidado y reducido	11
Figura 6. 1cido Lipoico	12
Figura 7. 1cido 3rico	13
Figura 8. 17 β -Estradiol	14
Figura 9. Da3o prote3nico por oxidaci3n.	35
Figura 10. Capacidad Antioxidante	38
Figura 11. Actividad de la enzima GSH-Px	40
Figura 12. Concentraci3n de 1cido asc3rbico	43
Figura 13. Lipoperoxidaci3n.	45

Introducción.

Los cambios dinámicos que ocurren en varios sistemas del organismo durante el período de gestación resultan en una modificación al consumo de sustratos energéticos por parte de la madre, sobre todo en la unidad feto placentaria. Los procesos anabólicos y catabólicos, que se desarrollan durante este proceso, son altamente demandantes de energía.

La selección genética continua ha mejorado el rendimiento reproductivo de las cerdas en las últimas décadas. Por ejemplo, el número de lechones nacidos y destetados se ha incrementado en un 9% y 14%, respectivamente (MLC, 1979, 1998; Hermesch *et al*, 2008). Satisfacer este requisito productivo incrementa el consumo energético por parte del animal.

Las exigencias energéticas sucedidas durante la gestación conducen a un incremento en la tasa metabólica del organismo, la cual se acompaña de un aumento en el consumo de oxígeno. Esta situación metabólica exacerba la tendencia oxidativa de la célula, y posiblemente el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo. Sobre esta base, el organismo materno debe desarrollar una serie de mecanismos de protección de tipo antioxidante, con la finalidad de permitir la progresión adecuada de la gestación (Vannucchi *et al*. 2007). Es probable que la capacidad antioxidante de la cerda no sea suficiente para amortiguar la agresión oxidativa que ocurre durante los procesos de gestación y destete y que esto facilite el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo.

Revisión de Literatura.

1. Especies reactivas del oxígeno.

El término de especies reactivas del oxígeno (ERO) se utiliza para describir a los compuestos identificados como radicales libres (un radical libre se define como una molécula que poseen uno o más electrones desapareados en su última orbita) y a los compuestos intermediarios, como aquellos que sin ser radicales libres, generan un radical libre (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las ERO de mayor presencia en el metabolismo celular son: el radical superóxido o anión superóxido ($O^{\bullet-}$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}).

Las ERO se generan: durante la irradiación con luz UV, rayos X y rayos gamma; en reacciones catalizadas por metales; en procesos inflamatorios; en la cadena transportadora de electrones mitocondrial; en el transporte de electrones de la NADPH oxidasa de los macrófagos activados (Valko *et al* 2006; Palmieri y Sblendorio, 2007).

Las ERO representan la clase más importante de moléculas reactivas generadas en un sistema vivo aerobio. El oxígeno molecular (dioxígeno) tiene una configuración única y es por sí mismo un radical. La adición de un electrón al dioxígeno forma al radical anión superóxido ($O^{\bullet-}$), el cual ha sido implicado en la fisiopatología de varias enfermedades (Valko *et al.* 2007). Bajo condiciones fisiológicas la producción del radical anión superóxido ocurre principalmente en la mitocondria, a

nivel de la cadena respiratoria, sitio donde se produce la energía para las células (Fig. 1). El 2% del oxígeno consumido se convierte en anión superóxido en la mitocondria (Burton y Jauniaux. 2011; Circu *et al*, 2010).

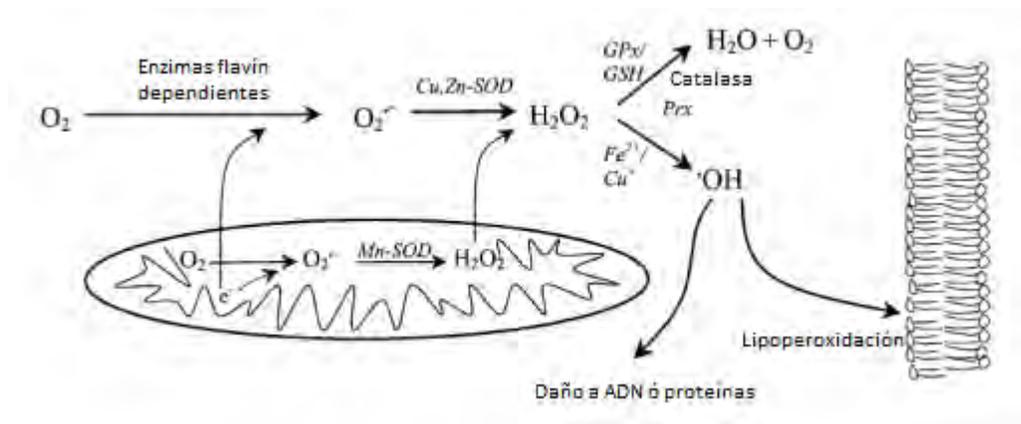
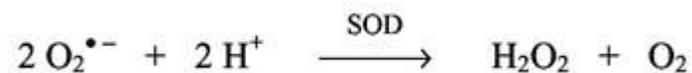


Figura 1. Cadena respiratoria. Formación de especies reactivas del oxígeno (Tomado de Nordberg y Arnér, 2001).

Debido a su carga, el anión superóxido carece de la capacidad de penetrar las membranas lipídicas y, por lo tanto, solo se encuentra en el compartimiento donde se produce (Nordberg y Arnér, 2001), y reacciona con los protones disponibles en el medio (Fig. 1) y por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2), como se muestra en la siguiente reacción:



El H₂O₂ a concentraciones fisiológicas, participa en eventos de señalización celular, como por ejemplo, en la proliferación, diferenciación y migración celular (Veal *et al.* 2007), en la apoptosis (Clément *et al.* 1998) y en la regulación de la ureagénesis y gluconeogénesis hepática (Díaz-Cruz *et al.*, 2011). El sistema antioxidante enzimático (catalasa, glutatión peroxidasa y tioredoxinas, entre otras) es el responsable de regular la concentración fisiológica del H₂O₂.

El H₂O₂ también es el precursor del OH• y del ácido hipocloroso (HOCl) generados durante el estallido respiratorio en los fagocitos activados (Halliwell y Chirico, 1993; Norberg y Amér, 2001).

El OH• es el agente oxidante más reactivo y tóxico de las ERO. El OH• es altamente reactivo, debido a su capacidad de abstraer electrones (vida media de 10⁻¹² seg). La toxicidad del OH• se refleja al abstraer los electrones de moléculas como los ácidos grasos poliinsaturados de membrana plasmática (Laguerre *et al.*, 2007), de los aminoácidos proteicos lisina, arginina y prolina (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Madian *et al.*, 2011), así como de los ácidos nucleicos, a nivel de las bases adenina y guanosina del ADN (Klaunig *et al.* 2011). Por lo que OH•, está involucrado en los procesos de lipoperoxidación, modificación de la vida media de las proteínas y fragmentación de las cadenas polinucleotídicas del ADN.

2. Sistema antioxidante.

Debido a que las ERO se producen constantemente en forma inevitable durante los procesos metabólicos, la célula ha desarrollado un complejo sistema de defensa para limitar la exposición a estos agentes. Este sistema de defensa recibe el nombre genérico de sistema antioxidante. Según Halliwell y Gutteridge (1999), un antioxidante se puede definir como cualquier sustancia que al estar presente en baja concentración con respecto a un sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación del sustrato. Por su naturaleza los antioxidantes se pueden dividir en dos grandes grupos: antioxidantes de tipo enzimático y antioxidantes no enzimáticos (Burton y Jauniaux, 2011; Mates *et al*, 1999).

2.1 Antioxidantes Enzimáticos.

2.1.1 Superóxido dismutasa.

Fue la primera enzima antioxidante en descubrirse. En las células eucariotas, el $O_2^{\bullet-}$ se metaboliza a peróxido de hidrógeno por dos isoenzimas, que en su estructura contienen un centro metálico activo: la Mn-SOD, que se encuentra en la mitocondria, y la Cu/Zn-SOD, localizada en el citosol. En la reacción catalizada por SOD, dos moléculas de anión superóxido más $2 H^+$ son utilizados para la síntesis de peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Nordberg y Arnér, 2001).

2.1.2 Catalasa

Las catalasas son enzimas que con una elevada velocidad catalítica transforman al H_2O_2 en agua y oxígeno. La catalasa es codificada por un solo gen, el cual es altamente conservado entre las especies. Los mamíferos, incluyendo los humanos, expresan catalasa en todos los tejidos y una elevada concentración de ella puede ser encontrada en hígado, riñón y eritrocitos. Una elevada actividad de esta enzima es detectada en los peroxisomas (Nordberg y Arnér, 2001), controlando así, el riesgo de la formación de radicales hidroxilo a partir de H_2O_2 .



2.1.3 Glutación peroxidasa (GSH-Px).

Existen por lo menos cuatro diferentes isoformas de GSH-Px en mamíferos; todas ellas contienen selenocisteína. La GSH-Px 1 y la GSH-Px 4 son enzimas citosólicas abundantes en la mayoría de los tejidos. La GH-Px 2 (GSH-Px gastrointestinal) y la GSH-Px 3 (GSH-Px plasmática). Todas las glutación peroxidases catalizan la reducción de H_2O_2 usando glutación reducido (GSH) como sustrato:



La actividad de la GSH-Px puede ser un parámetro útil para la determinación del estado del selenio (Se) en los animales: una disminución en la actividad de esta

enzima puede deberse a una deficiencia de Se en la dieta (Lawrence y Burke, 1976; Wegger *et al.*, 1980).

2.1.4 Peroxiredoxinas

Las peroxiredoxinas (Prx) son un grupo de enzimas peroxidases en las cuales los residuos de cisteína redox activas participan en la reducción del H₂O₂. Con base a su mecanismo catalítico, las Prx han sido separadas en tres clases: 2-Cys típica, 2-Cys atípica y 1-cys Prx. El grupo de las 2-Cys típicas, son la subfamilia de las Prx más abundantes y contienen dos residuos de cisteínas catalíticos. Una de estas cisteínas es oxidada directamente por H₂O₂ generando un derivado sulfénico que es estabilizado por un puente disulfuro con otra cisteína. (Kang y Kang, 2013).

2.2 Antioxidante no enzimático.

2.2.1 Carotenoides

La vitamina A o retinol (Fig. 2) es una de las moléculas más conocidas dentro del grupo de los carotenoides. Su efecto de tipo antioxidante fue descrito por primera vez en 1932 por Monaghan y Schmitt (Konigsberg, 2008). El mecanismo de acción de la vitamina A como antioxidante es el de proporcionar al radical libre el electrón faltante, evitando así la toxicidad de este y dejando a la vitamina como una molécula químicamente conjugada sin su efecto clásico de vitamina y de antioxidante, lista para ser eliminada por el hígado.

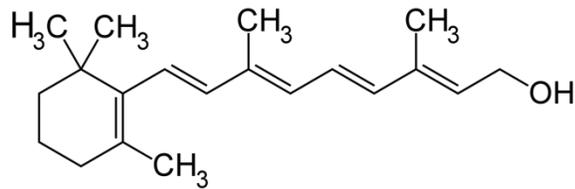


Figura 2. Vitamina A

2.2.2 Ácido ascórbico (ASC)

El ácido ascórbico (Fig. 3) es una vitamina de tipo hidrosoluble que participa como cofactor en la síntesis de colágeno, carnitina y catecolaminas. (Fernandez-Dueñas *et al*, 2008). Una de las enzimas responsables de la síntesis del ácido ascórbico es la L-gulono- γ -lactona oxidasa y cuyo sustrato es la glucosa, esta enzima se localiza en los microsomas hepáticos de los animales que poseen la capacidad de síntesis de esta vitamina, como por ejemplo, el cerdo (Mahan *et al*, 2004).

A pH fisiológico, predomina la forma aniónica del ácido ascórbico, identificada como ascorbato. El ASC conocido también como vitamina C, es un potente antioxidante hidrosoluble en los fluidos biológicos, que secuestra radicales libres del tipo hidroxilo, peroxilo y superóxido, quedando como un antioxidante conjugado, el radical ascorbilo (Konigsberg, 2008). El ASC es un excelente

antioxidante siempre y cuando no esté en presencia de hierro o de cobre, pues en estas condiciones genera HO• (Hansberg-Torres, 2002).

Se ha demostrado que el ASC actúa sinérgicamente con el α -tocoferol, regenerando al radical tocoferilo en soluciones y en la membrana celular (Fernández-Dueñas *et al*, 2008).

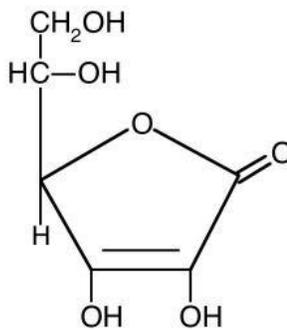


Figura 3. Ácido ascórbico

2.2.3 α – Tocoferol (vitamina E).

Es el principal antioxidante liposoluble que protege a la membrana plasmática del ataque de los radicales libres. Su función principal es inactivar la mayor parte de las formas reactivas de radicales libres de oxígeno, protegiendo a los ácidos grasos poliinsaturados de la oxidación, con lo que se previene el daño lipoperoxidativo de las membranas celulares (Konigsberg, 2008).

La vitamina E (Fig. 4) es importante para el desarrollo y maduración del sistema inmune; su deficiencia predispone a infecciones ocasionadas por *Escherichia coli* en cerdos (Lauridsen *et al.*, 2007).

El tocoferol al reaccionar con los radicales libres y/o con los ácidos grasos peroxidados, detiene la propagación del proceso lipoperoxidativo quedando esta vitamina en su forma conjugada (radical tocoferilo). La actividad antioxidante de la vitamina es nula en un medio acuoso. El radical tocoferilo, puede ser regenerado a la forma activa (vitamina E), siempre y cuando haya disponibilidad de vitamina C (Hansberg-Torres, 2002).

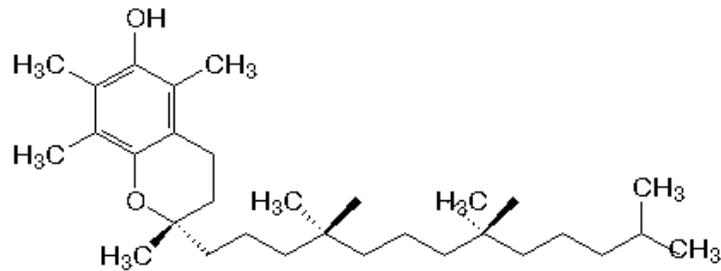


Figura 4. Vitamina E

2.2.4 Glutación (GSH).

El glutatión (Fig. 5) es el antioxidante de mayor concentración en el organismo (10 mM) se sintetiza en el hepatocito y se forma por la adición secuencial de tres aminoácidos: cisteína, glutamato y glicina (Pamplona y Costantini, 2001). El grupo sulfhidrilo o tior (-SH) del aminoácido cisteína es el sitio activo de la molécula, ya

que a través de él, participa en las reacciones de óxido-reducción, dando origen a la forma reducida (GSH) u oxidada (GSSG), según sea el caso (Martínez-Samano *et al.*, 2011).

El glutatión también participa en la detoxificación del H₂O₂, a nivel del sistema glutatión peroxidasa – glutatión reductasa (Forman *et al.*, 2009) y juega un papel central en regeneración de la vitamina C y E a partir de sus formas oxidadas (Sen, 1997).

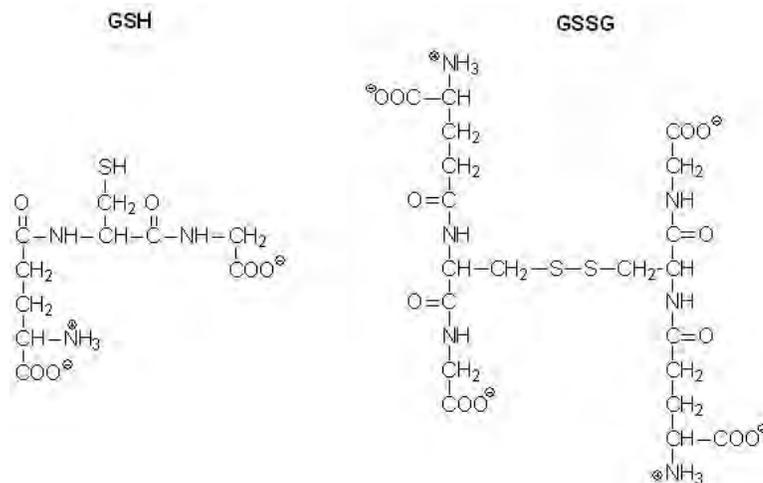


Figura 5. Glutatión oxidado (GSH) y reducido (GSSG).

2.2.5 Ácido Lipoico (LA)

El ácido lipoico (Fig. 6) se encuentra en todas las células procariontes y eucariontes. Estructuralmente está formado por una cadena de ocho carbonos, la cual contiene dos grupos sulfhidrilos los que le permiten actuar como un par redox (ácido lipoico/ácido dihidrolipoico). Esta característica fisicoquímica ha sido

utilizada por la célula para regenerar los principales sistemas antioxidantes de ella (tioredoxina, ascorbato, ubiquinona y glutatión). Por otro lado, este par redox posee la propiedad de inactivar radicales libres en un medio acuoso o lipídico, por lo que se le ha considerado como un antioxidante ideal (Biewenga *et al*, 1997; Cadenas y Packer, 2002; Díaz-Cruz, *et al*, 2003).



Figura 6. Ácido lipoico

2.2.6 Ácido Úrico

El ácido úrico (fig. 7) se produce en la oxidación de la hipoxantina y xantina por la xantino oxidasa y deshidrogenasa (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Es el antioxidante más abundante en el plasma y contribuye con dos terceras partes de toda la capacidad de este para neutralizar a los radicales libres. Es particularmente efectivo en la desactivación de hidroxilo, superóxido y peroxinitrito (Waring, 2002).

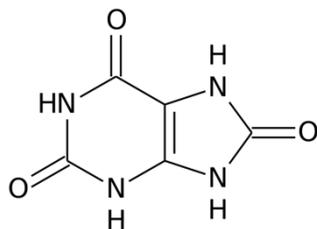


Figura 7. Ácido úrico

2.2.7 17 β -Estradiol

Las propiedades antioxidantes del 17 β -estradiol y otros compuestos estrogénicos relacionados se deben al grupo fenólico en el anillo A de esta molécula (Fig. 8) (Borrás *et al*, 2010). Estudios de relación estructura-actividad han demostrado claramente que este grupo es el único requisito estructural para lograr la supervivencia celular a agresiones oxidativas (Prokai-Tatrai *et al*, 2008). Se ha postulado que la captación directa de radicales hidroxilo por los antioxidantes fenólicos causa la interrupción de la reacción en cadena de los radicales libres, como la lipoperoxidación, debido a la rápida donación de un átomo de hidrógeno del hidroxilo del grupo fenólico al radical (Behl, 2003). La reducción del radical fenoxil por reductores intracelulares (ascorbato, tioles) recicla a los antioxidantes fenólicos (Prokai-Tatrai *et al*, 2008).

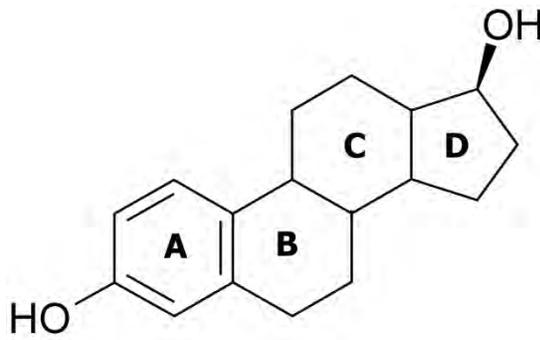


Fig 8. 17 β -Estradiol

3. Estrés oxidativo.

Todos los organismos aeróbicos sintetizan especies reactivas del oxígeno y es el sistema antioxidante de célula el responsable de mantener a estas especies en el rango de una concentración fisiológica. Se sabe que algunas de las ERO, a concentraciones fisiológicas actúan como reguladores de varios procesos metabólicos (Díaz-Cruz, *et al*, 2011).

Sin embargo, la toxicidad de las especies reactivas del oxígeno se pone de manifiesto cuando su producción rebasa sus niveles fisiológicos y el sistema antioxidante de defensa de la célula, es incapaz de controlar la sobreproducción de **ERO's. A esta situación metabólica se le conoce** como estrés oxidativo (Lykkesfeld y Svendsen, 2007).

3.1 Estrés oxidativo y su efecto sobre el ADN

El daño al ADN ocasionado por las ERO, principalmente el radical hidroxilo, incluye ruptura de las cadenas polinucleotídicas, formación de enlaces cruzados entre ellas, así como cambios en la estructura de las bases púricas y pirimídicas y en la desoxirribosa (Klaunig *et al.* 2011).

Si el daño al ADN no se repara antes o durante la replicación, puede resultar en una mutación ó inducción de la transcripción, inducción de las vías de señalización, errores de replicación e inestabilidad genómica y muerte celular; todos estos efectos han sido asociados al proceso de carcinogénesis (Klaunig *et al.* 2011).

3.2 Lípidos.

La peroxidación lípidica es probablemente el área más explorada en la investigación cuando se trata de ERO. Debido a sus dobles enlaces, los ácidos grasos poliinsaturados son un excelente blanco para ser atacados por los radicales libres. La elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados en todas las membranas las hace especialmente vulnerables a la peroxidación y las consecuencias son: modificación de la topología, de la fluidez y motilidad, inactivación enzimática, efectos tóxicos en la división celular, etc. (Catalá, 2006).

Entre las especies reactivas del oxígeno involucradas en el proceso de oxidación lípidica se encuentran, en primer lugar el radical hidroxilo, seguido de los radicales

peroxilo y alcoxilo y finalmente el singulete de oxígeno y el ozono (Laguerre *et al.*, 2007).

La lipoperoxidación se divide en tres etapas: iniciación, propagación y terminación. En la etapa de iniciación un radical con suficiente reactividad sustrae un átomo de hidrógeno del grupo metileno adyacente al doble enlace, formando un radical lipídico ($L\cdot$). En la etapa de propagación, se adiciona oxígeno al radical lipídico, originando el radical lipoperoxilo ($LOO\cdot$), que a su vez sustrae un hidrógeno de otro ácido graso, formando un nuevo radical lipídico además de un lipohidropéroxido (LOO). Esta molécula es la primera relativamente estable en la reacción. Cada radical lipídico formado puede iniciar una nueva oxidación de un ácido graso insaturado ocasionando una reacción en cadena. La etapa de terminación se caracteriza por la reacción entre dos radicales lipídicos ó lipoperóxidos formando productos no radicales (Catalá, 2006; Laguerre *et al.*, 2007; Niki *et al.*, 2005).

Una gran diversidad de aldehídos se forma cuando los lipohidropéroxidos son degradados por la célula. Algunos de esos aldehídos son altamente reactivos, el más estudiado es el malondialdehído (MDA) (Catalá, 2009).

3.3 Proteínas.

Diferentes tipos de modificaciones por oxidación pueden inducirse directamente por ERO o indirectamente por reacción con productos secundarios de otros procesos oxidativos ocasionados por las ERO. La cisteína es particularmente propensa al ataque oxidativo por casi todas las ERO. Las modificaciones en las proteínas provocadas por oxidación directa de lisina, arginina, treonina y prolina o por la reacción secundaria de cisteína, histidina o residuos de lisina con compuestos producidos durante la lipoperoxidación (malondihaldeído, 4-hidroxi-2-nonenal), conducen a la formación de grupos carbonilos en las proteínas. (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Madian *et al.*, 2011).

Uno de los efectos ocasionados por la oxidación de las proteínas, es acortar su vida media, modificando negativamente los procesos metabólicos dependientes de estas proteínas.

3.4 Estrés oxidativo en los animales.

El estrés oxidativo ha sido observado en caballos con algún proceso patológico, por ejemplo: en obstrucciones de las vías respiratorias, hemorragia pulmonar inducida por ejercicio, artritis, laminitis y estrangulamiento intestinal (Lykkesfeld y Svendsen, 2007; Kirschvink *et al.*, 2008; de Moffarts *et al.*, 2005).

En bovinos, se ha sugerido que la retención de las membranas fetales en vacas está conectada a un desbalance entre la producción y la neutralización de ROS

(Kankofer, 2001 y Kankofer y Schmerold, 2002). Así como en mastitis (Ranjan *et al.*, 2005) y neumonía (Ledwozym and Stolarezyk, 1992). Igualmente, se han encontrado altas concentraciones de ERO en la sangre de becerros recién nacidos en comparación con los valores de sus madres. Esto es un indicador indirecto de la presencia de estrés oxidativo (Gaál *et al.* 2006).

También se ha demostrado la existencia de un cuadro de estrés oxidativo en pollos de engorda con síndrome ascítico (Diaz-Cruz *et al.* 2003).

En perros de cacería se ha confirmado que el ejercicio incrementa la producción de ERO al punto de exceder las defensas antioxidantes y causar estrés oxidativo (Pasquini *et al.* 2010).

Wang *et al.* (2006), reporta que el arsénico (30 mg/Kg) en dietas para cerdos, induce un aumento en los niveles de lipoperoxidación, depleción del gutatión y disminución de la actividad de algunas enzimas del sistema antioxidante (SOD, CAT, GPx), todos ellos relacionados al metabolismo de los radicales libres.

Ma *et al.* (2012) mencionan con base a sus resultados, que el epitelio intestinal de cerdos recién destetados, cursa con un cuadro de estrés oxidativo.

Además, Shi-bin *et al.* (2007), reportan que la administración de aceite de pescado oxidado, induce un cuadro de estrés oxidativo en cerdos destetados y que esta alteración metabólica, podría afectar el desarrollo productivo de los animales.

Así mismo, Zhu *et al.* (2012) muestran a nivel intestinal, que la actividad de la enzima SOD disminuyó y las concentraciones de MDA, NO, y H₂O₂ aumentaron en cerdos después del destete y que la presencia de una mezcla de antioxidantes en la dieta, previene el daño causado por los radicales libres y suprime el estrés oxidativo.

Por otra parte, algunos autores han reportado el efecto que tiene la administración de vitamina C a distintas concentraciones en la dieta para cerdos, principalmente sobre la ganancia de peso, la conversión alimenticia y la respuesta inmune, sin explorar el efecto antioxidante de esta vitamina (Brown *et al.*, 1970; Yen and Pond 1981, 1983; Mahan and Saif 1983; Miller and Kornegay 1983; Mahan *et al.*, 1994; Eicher *et al.*, 2006), lo que difiere en mucho a lo reportado con la vitamina E, en donde el efecto antioxidante de ella ha sido ampliamente estudiado en cerdos (Monahan *et al.*, 1990; Fontaine and Vally 1977; Jensen *et al.*, 1979; Lauridsen *et al.*, 1999).

Justificación

La literatura especializada indica que los cerdos desarrollan un estado de estrés oxidativo en presencia de algún inductor (aceite de pescado oxidado, arsénico, cobre, hierro, etc.); sin embargo, hay poca información que muestre si la gestación o el destete, por sí mismos, son factores que favorezcan el progreso de un estado oxidativo en la cerda. Por consiguiente y debido al impacto negativo que podría tener un estado oxidativo, más allá de lo fisiológico, sobre la productividad porcícola, es importante explorar si la cerda antes de la gestación, durante la gestación y después del parto cursa con un cuadro de estrés oxidativo.

Hipótesis

La gestación y la lactación son procesos que favorecen la aparición de un cuadro de estrés oxidativo en la cerda.

Objetivo general

Realizar un estudio observacional para explorar el estado oxidativo de la cerda nulípara previo a la gestación, durante la gestación y después del parto a través de algunos indicadores metabólicos de estrés oxidativo, para valorar el posible uso profiláctico de antioxidantes.

Objetivo particular

Estimar el estado oxidativo en la cerda previo a la gestación, durante la gestación y después del parto a través de la determinación del daño oxidativo proteínico (carbonilación), del poder antioxidante por reducción férrica (FRAP), de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), de la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de las concentraciones de ácido ascórbico en el plasma.

Material y Métodos

1. Instalaciones

La investigación se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, el cual se localiza en el Km 2 de la carretera Jilotepec-Corrales, en Jilotepec, Estado de México.

Las pruebas de laboratorio se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

2. Animales

Los animales utilizados en este estudio pertenecían a la línea Yorkshire-Landrace y se seleccionaron según los lineamientos establecidos por el CEIEPP. El número de animales usados se indica en la sección de Resultados (cuadros). El alimento ofrecido a los animales se formuló con base en los requerimientos nutrimentales que marca el NRC (1998) para cerdas primerizas y se fabricó en la planta de alimentos del CEIEPP.

2.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron hembras primerizas de 24 semanas de edad, con 125 Kg de peso, 17 mm de grasa dorsal, aproximadamente, que hubieran presentado entre uno y tres celos, clínicamente sanas, sin antecedentes de enfermedad.

2.2 Criterios de exclusión

No se incluyeron hembras que tuvieran reporte de enfermedad o que estuvieran involucradas en algún otro protocolo de investigación al momento de tomar la muestra sanguínea.

2.3 Criterios de eliminación

Se eliminaron del estudio los animales que presentaron signos clínicos de cualquier proceso patológico.

3. Clasificación de los animales

Las cerdas primerizas seleccionadas se clasificaron de la siguiente forma:

- a) No gestantes (vacías)
- b) Con 45 días de gestación
- c) Con 100 días de gestación
- d) Con 21 días posparto (al destete)

De cada grupo se seleccionaron al azar distintos animales, a cada uno de los cuales se le tomó una muestra de sangre, que posteriormente se analizó en el laboratorio.

En el CEIEPP, las condiciones de alojamiento y alimentación de cada grupo son las siguientes:

3.1 Cerdas primerizas no gestantes (vacías)

Tienen una edad aproximada de 24 semanas y pesan 125 Kg. Se alojan en grupos de tres animales, en corrales de concreto de 4 x 3 m, con piso de rejilla en el área húmeda y reciben un alimento en harina con 15% de proteína cruda y 3.05 Mcal EM/Kg a libre acceso.

3.2 Cerdas con 45 días de gestación

Se alojan en jaulas individuales, con piso de rejilla de concreto y alimentador automático. Reciben 2 Kg de un alimento en harina con 13% de proteína cruda y 3.2 Mcal EM/Kg. En esta área permanecen hasta el día 55 de la gestación.

3.3 Cerdas con 100 días de gestación

A partir del día 56 de gestación las cerdas se alojan en corrales individuales, con dimensiones de 2.5 m de ancho x 4 m de largo. Reciben 3 Kg de dieta de gestación y permanecen en esta área hasta cinco días antes del parto.

3.4 Cerdas con 21 días posparto (al destete)

Cinco días antes del parto, las cerdas se trasladan a una sala de maternidad, donde se alojan en jaulas parideros con lechonera lateral. Allí reciben un alimento de lactación en harina, con 18.2% de proteína cruda y 3.35 Mcal EM/Kg. En esta área permanecen hasta el destete, que se realiza a los 21 días posparto.

3. Toma de muestras sanguíneas

Se tomaron aproximadamente 10 ml de la vena cava anterior, en tubos Vacutainer® con K2 EDTA, de cada animal seleccionado para cuantificar los distintos indicadores metabólicos de estrés oxidativo (carbonilación de proteínas, FRAP, GSH-Px, TBARS y ácido ascórbico). Las muestras se obtuvieron aproximadamente a la 8 de la mañana, con los animales en ayunas.

La muestra colectada se centrifugó a 3000 rpm por 10 min (Nuñez y Bouda, 2007); se recuperó el sobrenadante (aprox. 4 ml) y se dividió en alícuotas de 2 ml aproximadamente, las cuales se congelaron a -40°C para su posterior procesamiento. Las muestras se trabajaron por duplicado y para las determinaciones de tipo colorimétrico se utilizó un espectrofotómetro UV/Visible (Genesys 10S UV/VIS, Thermo Scientific).

4. Pruebas de laboratorio

4.1. Daño proteínico por oxidación (carbonilación). La aparición de nuevos grupos carbonilos en los residuos de aminoácidos de proteínas es evidencia de daño por oxidación. La 2,3-dinitrofenilhidrazina se une de forma selectiva a los grupos carbonilos de las proteínas, formando un complejo hidrazona estable que puede cuantificarse a 370 nm (Levine *et al.* 1990).

Primero se determinó la concentración de proteína en las muestras, según la técnica de Bradford (1976). Brevemente, 10 µl de plasma se diluyeron en agua destilada (1/50). De cada dilución se tomaron 50 µl y se aforaron a 100 µl con agua destilada. A este volumen se le adicionaron 5 ml del reactivo de Bradford (100 mg de azul de Coomassie G-250, 50 ml de etanol al 95%, 100 ml de ácido fosfórico al 85% y agua destilada suficiente para alcanzar 1 litro de solución final). La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se leyó a 595 nm. Cada prueba se hizo por duplicado. Los resultados se calcularon mediante una curva patrón de albúmina sérica bovina (P/V) y los resultados se expresaron como mg de proteína por ml de plasma. A partir de estos valores se calculó el volumen necesario para obtener 2 mg de proteína.

La concentración de carbonilos se realizó con base en el procedimiento consignado por Levine *et al.* (1990). Para este fin, por cada muestra de plasma se etiquetaron cuatro tubos de microcentrifuga como control(C), control duplicado (CD), prueba

(P) y prueba duplicado (PD), a los cuales se transfirieron volúmenes de plasma que contuvieran 2 mg de proteína. A los tubos C y CD se les agregó 500 μ l de HCl 2.5M, mientras que a los tubos P y PD se les agregó 500 μ l de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) 10 mM en HCl 2.5 M. Los tubos se mantuvieron 1 hora a temperatura ambiente, en la obscuridad, agitando cada 15 minutos. Al finalizar el periodo de incubación, se adicionaron 500 μ l de ácido tricloroacético al 20% con la finalidad de precipitar la proteína; seguidamente, los tubos se centrifugaron a 15000 x g por 5 minutos; se decantó el sobrenadante. Para eliminar la 2,4-dinitrofenilhidrazina que no se unió a los grupos carbonilos, los precipitados se lavaron con 1 ml de una mezcla etanol anhidro y etil acetato en una relación 1:1 (V/V), luego se centrifugaron a 15000 x g por 5 minutos y el sobrenadante se decantó. Este proceso se repitió tres veces. Por último, se agregó 1ml de solución acuosa de hidrocóloruro de guanidina 6 M más fosfato de potasio monobásico 20 mM (pH ajustado a 2.3); los tubos se agitaron e incubaron a 37 °C por 20 minutos para poner en suspensión el precipitado. La absorbancia de las muestras se obtuvo a 370 nm. Para calcular los resultados, la absorbancia promedio de los tubos control se restó a la absorbancia promedio de los tubos prueba. Este valor se utilizó para obtener la concentración de carbonilos, empleando un coeficiente de extinción molar de 22000 M⁻¹ cm⁻¹; los valores se consignaron en nmol por mg de proteína (nmol/mg).

4.2 Capacidad antioxidante no enzimática. Esta prueba se basa en el hecho de que los antioxidantes impiden la oxidación de un sustrato mediante una reacción redox, en la cual el oxidante se reduce a expensas del antioxidante. La prueba exceptúa a los antioxidantes que actúan mediante quelación o desactivación enzimática. Los antioxidantes presentes en una muestra reducen en un medio ácido al Fe (III), dando lugar a Fe (II), el cual, en presencia de 2,4,6-tripiridil-s-triazina, forma un complejo de color azul, cuya absorbancia se mide a 593 nm. La técnica empleada para cuantificar el nivel de protección no enzimático con que cuenta el animal fue la metodología identificada por sus siglas en inglés como FRAP (prueba de poder antioxidante por reducción férrica), de acuerdo con el método descrito por Benzie y Strain (1999). En resumen, se tomaron alícuotas de 50 µl por duplicado de cada muestra; a cada una se le agregaron 1.5 ml de una solución amortiguadora de acetato 300 mM a pH 3.6, cloruro férrico hexahidratado (Fe (III)) 200 mM y 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM (disuelto en HCl 40 mM) en una relación 10:1:1, respectivamente. Las muestras se incubaron a 37°C en agitación continua por 15 minutos y se midió la absorbancia a 593nm. Las muestras se protegieron de la luz todo el tiempo, pues el TPTZ es sensible a la luz. Se prepararon curvas patrón con soluciones acuosas de FeSO₄ a diferentes concentraciones (0.2 – 3.2 mM); los resultados se presentan en nmol de Fe (II) formados por ml de muestra.

4.3 Actividad de la glutatión peroxidasa. Se determina mediante el acoplamiento de dos reacciones. En la primer reacción, la enzima glutatión peroxidasa (GPx) presente en la muestra cataliza la transformación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG); para ello utiliza el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) como segundo sustrato. En la segunda reacción, el GSSG es reducido (GSH) por acción de la enzima glutatión reductasa, con el consumo de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida). De este modo, la desaparición de NADPH es proporcional a la concentración de GSSG formado y dependiente de la actividad de la enzima GPx.

La actividad de la glutatión peroxidasa se cuantificó por el método descrito por Lawrence y Burk (1976). Para ello, se tomaron alícuotas de 100 μ l de cada muestra; a cada una se le agregaron 800 μ l de una mezcla formada por una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 7.0 con EDTA 1 mM y NaH_3 1 mM, GSH reducido 1mM, glutatión reductasa 1 U/ml y NADPH. Las pruebas y los controles se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos y luego se les agregaron 100 μ l de H_2O_2 2.5 mM. La absorbancia se leyó a 340 nm a los 0 y 5 minutos posteriores a la adición del H_2O_2 . El coeficiente de absorción molar del NADPH de 6.22×10^3 se empleó para los cálculos. Los resultados se presentan en nmol por ml de plasma.

4.4 Concentración de ácido ascórbico. El ácido ascórbico reduce al colorante 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) y causa una disminución en la absorbancia del colorante a 520 nm. La reacción debe llevarse a cabo en un rango de pH de 3.0 – 4.5.

La concentración de ácido ascórbico se midió según el procedimiento descrito por Omaye *et al* (1979). En tubos de microcentrífuga se agregan 300 μ l de DCPIP y 300 μ l de buffer de citrato/acetato elaborado de la siguiente manera: se pesan 22 g de citrato trisódico dihidratado y se disuelven en 40 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 4.15 con ácido acético glacial y se afora a 100 ml con agua bidestilada. Dicha mezcla se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente; al finalizar este periodo, se registra la absorbancia a 520 nm. Enseguida, a la mezcla anterior se le adicionan 600 μ l de plasma, para después precipitar la proteína con ácido tricloroacético al 10% y centrifugar los tubos a 35000 x g por 20 minutos. Se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos y se realiza una segunda lectura a la misma longitud de onda. Esta determinación se acompaña de una curva patrón con diferentes concentraciones de ácido ascórbico (0 a 120 nmol). Para obtener el resultado final, se resta la densidad óptica de la segunda lectura a la primera. Los resultados se consignan en nmol de ácido ascórbico por ml de muestra.

4.5 Lipoperoxidación. El malondialdehído (MDA) es un producto secundario de la oxidación de los ácidos grasos insaturados con más de dos dobles ligadura, que reacciona con el ácido tiobarbitúrico en un medio ácido y a temperaturas elevadas;

al conjunto de todos estos compuestos se les llama TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, Hoyland y Taylor, 1991). El producto de la reacción tiene un color rosa-naranja que absorbe luz entre 532 y 535 nm.

La presencia de ácidos grasos oxidados se detectó mediante la prueba de TBARS, de acuerdo con el procedimiento descrito por Ohkawa *et al* (1979). Para tal fin, se tomaron alícuotas de 100 μ l de cada muestra; a cada una se le agregó 1 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8% en solución acuosa y 2 ml de ácido acético al 20% con un pH de 2.5. Las muestras se colocaron en agua en ebullición por un periodo de 60 min, al término del cual las muestras se incubaron a 4°C por 5 min. Posteriormente, se agregaron 5ml de n-butanol a cada muestra, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se separó y se midió su densidad óptica a 532 nm. La concentración de TBARS en las muestras se calculó usando curvas patrón de MDA (entre 10 y 80 μ M). El MDA se obtuvo de la hidrólisis de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en HCl 0.1 N durante 12 horas a temperatura ambiente (Gutteridge, 1975); una molécula de 1,1,3,3-tetraetoxipropano produce 1 molécula de MDA, por lo que la molaridad se mantiene (Lawrence et al.,1979). Los resultados se consignan en nmol de malondialdehído por ml de muestra (nmol MDA/ml).

4. Análisis estadístico

Para las diferentes pruebas se realizaron estadísticas descriptivas y se obtuvieron cuartiles. El análisis gráfico consistió en obtener las gráficas de caja. El número de animales que se utilizó en cada prueba se muestra en el apartado de resultados, en el cuadro correspondiente a la estadística descriptiva.

Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para igualdad de medianas (Randles y Wolfe, 1979) y en los casos en que se rechazó la hipótesis nula se compararon las medianas de los diferentes grupos mediante la contrastación de las siguientes hipótesis:

$$1. H_0: 3\theta_1 = (\theta_2 + \theta_3 + \theta_4) \text{ vs } H_a: 3\theta_1 \neq (\theta_2 + \theta_3 + \theta_4)$$

$$2. H_0: 2\theta_2 = (\theta_3 + \theta_4) \text{ vs } H_a: 2\theta_2 \neq (\theta_3 + \theta_4)$$

$$3. H_0: \theta_3 = \theta_4 \text{ vs } H_a: \theta_3 \neq \theta_4$$

donde θ_i es la mediana del grupo i , $1 \leq i \leq 4$; θ_1 es la mediana del grupo de vacías, θ_2 es la mediana del grupo con 45 días de **gestación**, θ_3 es la mediana del grupo con 100 días de **gestación** y θ_4 es la mediana del grupo con 21 días posparto (Marascuilo y McSweeney, 1977)

Resultados

1. Daño proteínico por oxidación

Los datos de la estadística descriptiva de los diferentes grupos con respecto al proceso oxidativo de las proteínas plasmáticas, como un indicador metabólico de estrés oxidativo, se muestran en el cuadro 1. El cuadro 2 muestra los cuartiles de los diferentes grupos.

**Cuadro 1. Estadísticas descriptivas del daño proteínico por oxidación,
nmol/mg proteína.**

	Vacías	45 días de gestación	100 días de gestación	21 días posparto
n	10	13	13	10
Media	0.1906	0.8859	0.7617	0.7010
Desviación estándar	0.0492	0.1818	0.1614	0.1748
Mínimo	0.1102	0.6238	0.5556	0.3613
Máximo	0.2500	1.1943	1.0897	0.9170
Rango	0.1397	0.5704	0.5340	0.5556

**Cuadro 2. Cuartiles del daño proteínico por oxidación,
nmol/mg proteína.**

	Primer cuartil	Mediana	Tercer cuartil
Vacías	0.1377	0.2051	0.2258
45 días de gestación	0.7488	0.9187	0.9772
100 días de gestación	0.6264	0.7287	0.8659
21 días posparto	0.5982	0.6761	0.8500

La Fig. 9 presenta la formación de carbonilos por mg de proteína; el estadístico de Ji-cuadrada de la prueba de Kruskal-Wallis resultó significativo (Ji cuadrada= 25.085, $P < 0.0001$).

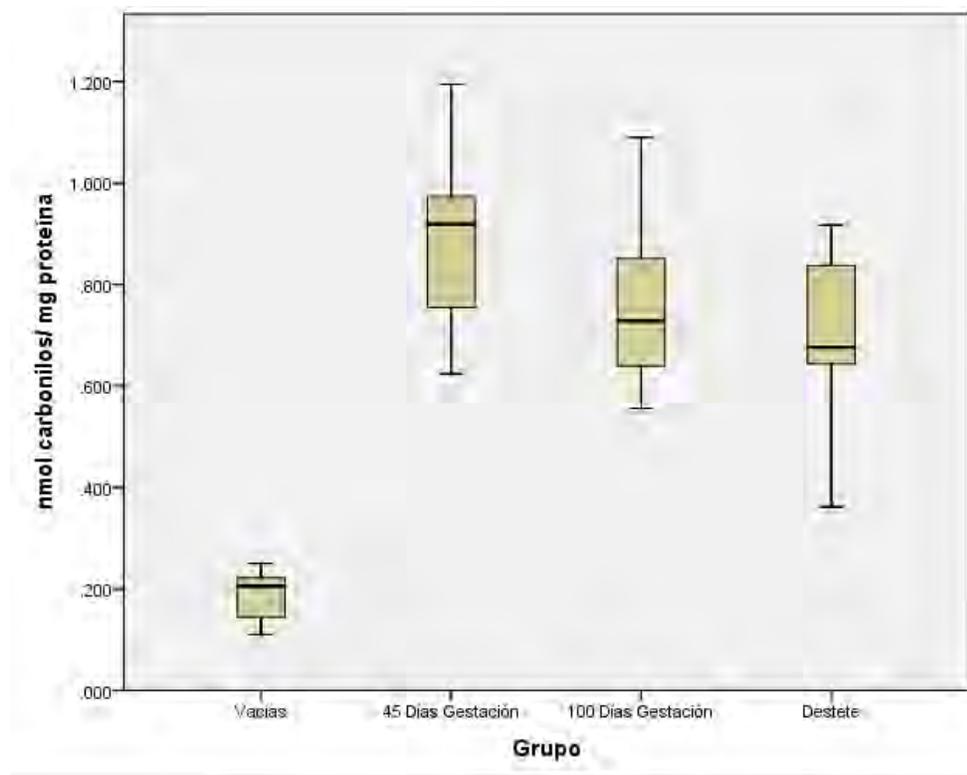


Figura 9. Daño proteínico por oxidación (Carbonilación de proteínas).

La comparación de las medianas de los diferentes grupos mediante un intervalo de confianza al 95%, dio los siguientes resultados:

- para el primer contraste: (-108.591, -27.978)

- para el segundo contraste: (-12.598, 39.644)
- para el tercer contraste: (-14.567, 16.998)

El daño proteínico por oxidación fue menor en las cerdas vacías que en el resto de los grupos ($P>0.05$). Este resultado muestra que la gestación y el destete son eventos fisiológicos que se acompañan de un proceso oxidativo de proteínas plasmáticas.

2. Capacidad antioxidante no enzimática

Los datos de las estadísticas descriptivas de los diferentes grupos con respecto a la prueba de capacidad antioxidante no enzimática se muestran en el cuadro 3. El cuadro 4 muestra los cuartiles de los diferentes grupos.

Cuadro 3. Estadísticas descriptivas de la capacidad Antioxidante no enzimática, nmol Fe II/ml plasma

	Vacías	45 días de gestación	100 días de gestación	21 días posparto
n	16	13	13	9
Media	425.040	753.122	682.927	683.668
Desviación estándar	204.804	152.644	65.837	170.382
Mínimo	205.397	564.853	579.305	424.369
Máximo	825.910	1075.007	793.534	926.937
Rango	620.513	510.155	214.229	502.568

Cuadro 4. Cuartiles de la capacidad antioxidante no enzimática, nmol Fe II/ml plasma

	Primer cuartil	Mediana	Tercer cuartil
Vacías	248.433	322.708	600.481
45 días de gestación	608.710	747.925	866.521
100 días de gestación	629.924	678.517	753.514
21 días posparto	526.326	692.957	804.010

En la Fig. 10 puede observarse el resultado de la medición de la capacidad antioxidante de las cerdas, expresada como nmol de FeII/ml de plasma; el estadístico de Ji-cuadrada de la prueba de Kruskal-Wallis resultó significativo (Ji-cuadrada= 17.929, $P < 0.0001$).

La comparación de las medianas de los diferentes grupos mediante un intervalo de confianza al 95%, dio los siguientes resultados:

- para el primer contraste: (-95.388, -18.831)
- para el segundo contraste: (-24.502, 34.482)
- para el tercer contraste: (-21.449, 14.189)

Las cerdas vacías presentaron la menor capacidad antioxidante no enzimática ($P > 0.05$). Los valores superiores al basal indican una mayor protección al ataque de las especies reactivas al oxígeno. En la Fig. 10 puede observarse cómo

incrementó la protección antioxidante de tipo no enzimático durante la gestación y hasta el momento del destete.

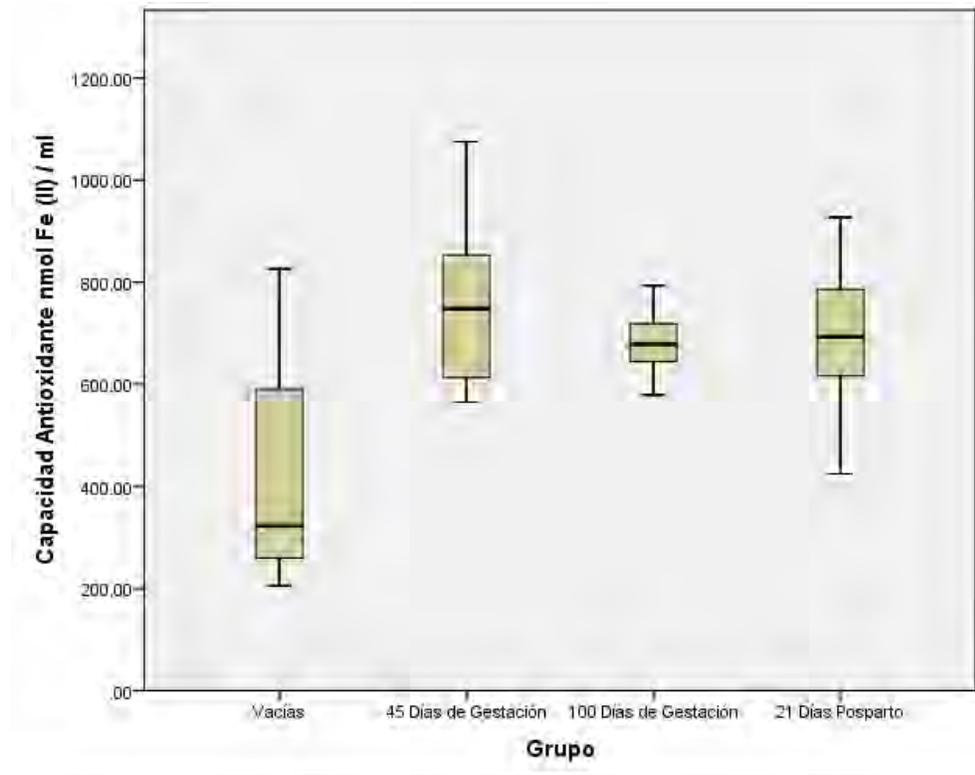


Figura 10. Capacidad antioxidante

3. Actividad de la enzima GSH-Px

Los datos de las estadísticas descriptivas de los diferentes grupos con respecto a la actividad de la enzima GSH-Px se muestran en el cuadro 5. El cuadro 6 muestra los cuartiles de los diferentes grupos.

La Fig. 11 presenta la actividad de la enzima GSH-Px; el estadístico de Ji-cuadrada de la prueba de Kruskal-Wallis resultó significativo (Ji-cuadrada= 13.868, $P<0.003$).

Cuadro 5. Estadísticas descriptivas de la actividad de la enzima GSH-Px,

nmol de NADPH oxidado/ml de muestra

	Vacías	45 días de gestación	100 días de gestación	21 días posparto
n	16	13	13	7
Media	73.272	52.642	92.724	102.223
Desviación estándar	39.685	27.679	19.726	17.676
Mínimo	12.861	9.807	61.414	74.115
Máximo	129.903	92.733	124.405	126.205
Rango	117.041	82.926	62.990	52.090

Cuadro 6. Cuartiles de la actividad de la enzima GSH-Px,

nmol de NADPH oxidado/ml de muestra

	Primer cuartil	Mediana	Tercer cuartil
Vacías	28.110	82.990	97.704
45 días de gestación	25.723	57.556	75.016
100 días de gestación	74.011	97.427	107.451
21 días posparto	82.379	110.755	119.139

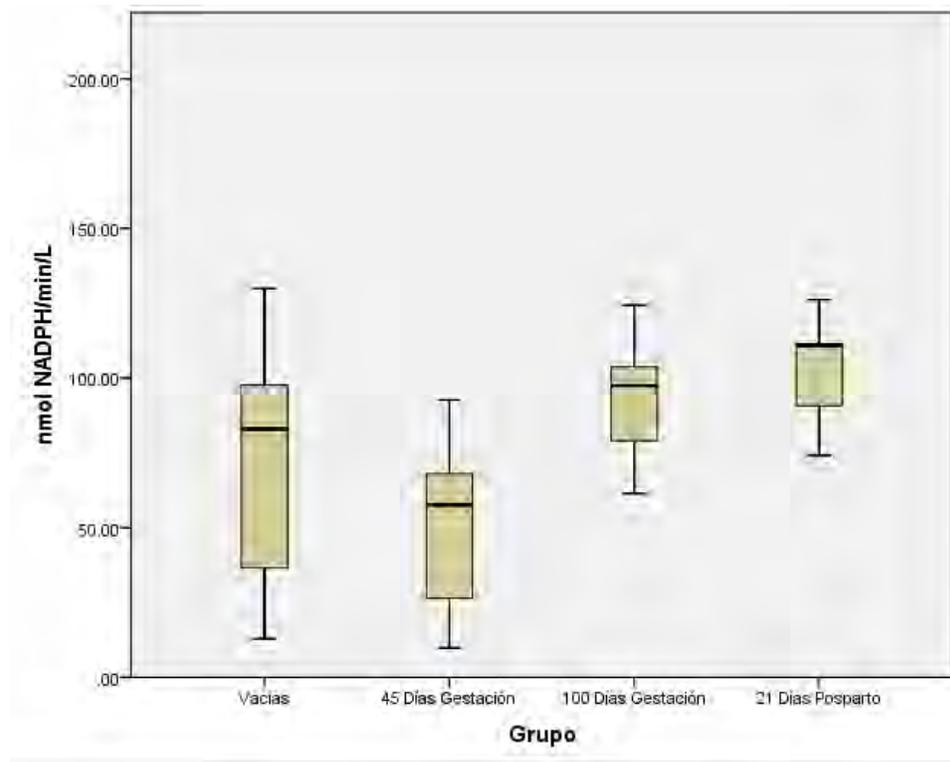


Figura 11. Actividad de la enzima GSH-Px

La comparación de las medianas de los diferentes grupos mediante un intervalo de confianza al 95% dio los siguientes resultados:

- para el primer contraste: (-46.803, 28.803)
- para el segundo contraste: (-67.840, -9.319)
- para el tercer contraste: (-21.761, 14.281)

La actividad de la enzima GSH-Px fue menor en las cerdas con 45 días de gestación que en las cerdas con 100 días de gestación y destetadas ($P > 0.05$). La

Fig. 11 muestra esa disminución y la posterior recuperación de la actividad de la enzima.

4. Concentración de ácido ascórbico

Los datos de las estadísticas descriptivas de los diferentes grupos con respecto a la concentración de ácido ascórbico se muestran en el cuadro 7. El cuadro 8 muestra los cuartiles de los diferentes grupos.

Cuadro 7. Estadísticas descriptivas de la concentración ácido ascórbico,
nmol ácido ascórbico/ml muestra

	Vacías	45 días de gestación	100 días de gestación	21 días posparto
N	19	11	8	10
Media	14.451	22.070	13.376	ND
Desviación estándar	6.127	6.113	8.405	0
Mínimo	3.091	9.778	6.062	0
Máximo	25.682	30.820	29.138	0
Rango	22.590	21.042	23.076	0

Cuadro 8. Cuartiles de la concentración ácido ascórbico,
nmol ácido ascórbico/ml muestra

	Primer Cuartil	Mediana	Tercer Cuartil
Vacías	10.827	13.794	20.473
45 días de gestación	18.331	22.828	27.342
100 días de gestación	7.224	9.029	20.582
21 días posparto	0	0	0

La Fig. 12 presenta la concentración de ácido ascórbico; el estadístico de Ji-cuadrada de la prueba de Kruskal-Wallis resultó significativo (Ji-cuadrada= 29.564, $P<0.0001$). La concentración de ácido ascórbico disminuyó con el tiempo, desde los 45 días de gestación hasta los 21 días posparto, momento en el cual el ácido ascórbico ya no se detectó.

La comparación de las medianas de los diferentes grupos mediante un intervalo de confianza al 95% dio los siguientes resultados:

- para el primer contraste: (-27.803, 41.847)
- para el segundo contraste: (9.982, 70.037)
- para el tercer contraste: (4.065, 41.194)

La concentración de ácido ascórbico fue mayor en las cerdas vacías que en las 45 días de gestación, cerdas con 100 días de gestación y destetadas ($P>0.05$).

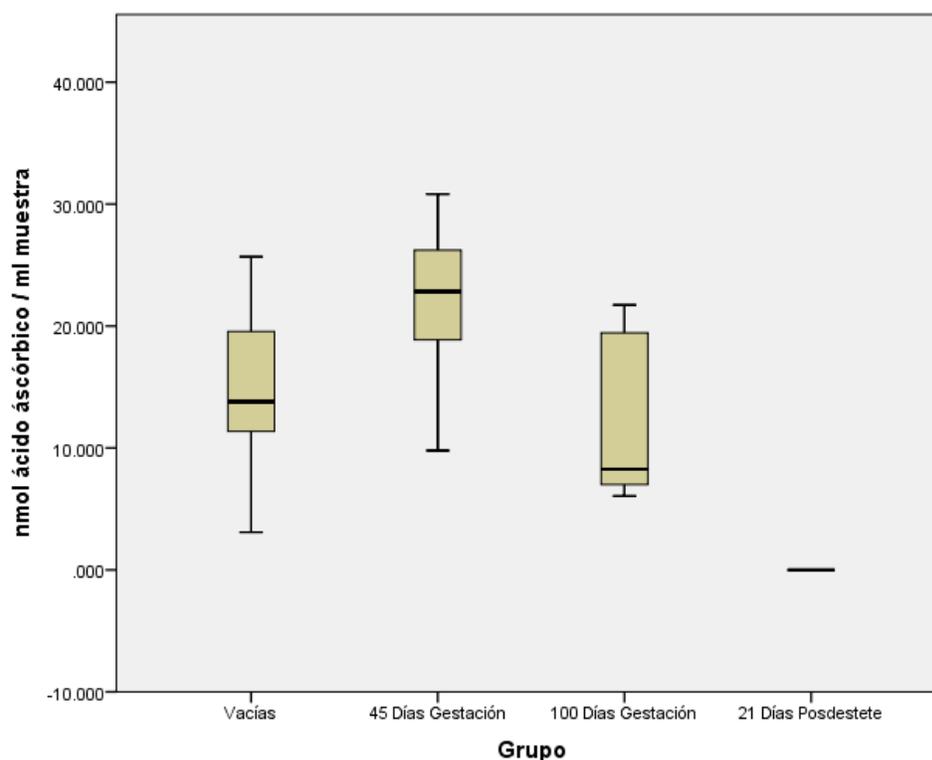


Figura 12. Concentración de ácido ascórbico

5. Lipoperoxidación

Los datos de las estadísticas descriptivas de los diferentes grupos con respecto a la lipoperoxidación se muestran en el cuadro 9. El cuadro 10 muestra los cuartiles de los diferentes grupos.

La Fig. 13 presenta la concentración de MDA en plasma; el estadístico de Ji-cuadrada de la prueba de Kruskal-Wallis resultó no significativo (Ji-cuadrada= 1.530, $P < 0.675$). Esta medición es directamente proporcional a la magnitud de la lipoperoxidación en una muestra; entonces, los valores más elevados indican

mayor estrés oxidativo. En esta prueba no existieron diferencias entre los cuatro grupos de animales.

**Cuadro 9. Estadísticas descriptivas de la lipoperoxidación,
nmol MDA / ml plasma**

	Vacías	45 Días Gestación	100 Días de gestación	21 Días Posparto
n	22	13	12	10
Media	10.029	12.1938	14.066	11.620
Desviación Estándar	4.147	7.560	17.854	10.068
Mínimo	1.204	2.197	2.131	1.50
Máximo	16.359	26.731	62.497	35.339
Rango	15.155	24.533	60.365	33.839

**Cuadro 10. Cuartiles de la lipoperoxidación,
nmol MDA / ml plasma**

	Primer Cuartil	Mediana	Tercer Cuartil
Vacías	8.308	10.996	12.155
45 Días Gestación	7.202	9.332	18.400
100 Días Gestación	5.988	7.626	10.951
21 Días Posparto	4.892	7.721	16.179

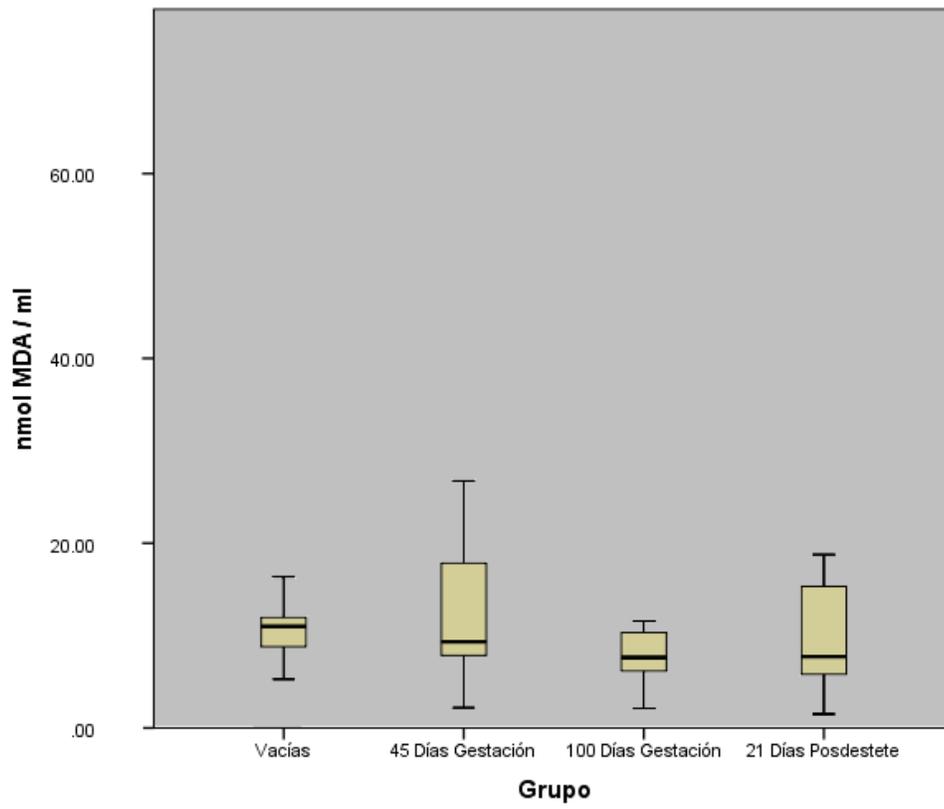


Figura 13. Lipoperoxidación.

Discusión

El propósito de este estudio fue investigar si los procesos de gestación y destete generan un cuadro de estrés oxidativo en las cerdas. Se sabe que la cerda se encuentra en un estado metabólico comprometido durante los periodos de gestación y lactación a consecuencia del crecimiento fetal (Ji *et al.*, 2005), del aumento de la glándula mamaria (Kim *et al.*, 1999; Ji *et al.*, 2006) y de la producción de leche (Kim *et al.*, 2000).

La alta demanda de energía conlleva un incremento en el consumo de oxígeno, condición que favorece la presentación de un cuadro de estrés oxidativo (Agarwal *et al.*, 2003; Vannucchi *et al.*, 2007). Un control ineficiente en la síntesis de las especies reactivas de oxígeno, tales como radicales libres, hidroperóxidos lipídicos y aldehídos, conduce a un daño de las proteínas, de los lípidos y del ADN (Wang y Huang, 1994).

La carbonilación de proteínas es una de sus modificaciones estructurales más perjudiciales e irreversibles y se considera como un sello distintivo de los desórdenes relacionados con el estrés oxidativo (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Yao y Rahman, 2011). La determinación de carbonilos proteínicos se realiza a menudo para evaluar el grado de estrés oxidativo en el contexto de daño celular, el envejecimiento y varios trastornos relacionados con la edad (Fedorova *et al.*,

2013). Además, se ha propuesto a la carbonilación de proteínas musculares como una de las principales razones de la distrofia muscular (Barreiro y Hussain, 2010).

Recientemente, un gran número de evidencias experimentales indican que la carbonilación de biomoléculas es el paso inicial en la respuesta inflamatoria y autoinmune (Foell *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2012). Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, puede decirse que la gestación y el destete son eventos fisiológicos en los que se incrementa la oxidación de las proteínas plasmáticas, siendo una de las posibles causas, la presencia de especies reactivas del oxígeno.

En un estudio llevado a cabo en humanos clínicamente sanos, se consignó un valor de correlación de 0.807 entre FRAP y el estado total de antioxidantes (TAS, por sus siglas en inglés), lo que significa que ambas técnicas son útiles para valorar la protección de tipo antioxidante que posee el individuo (Jansen y Ruskovska, 2013). Al respecto, Harsem *et al.* (2006) informan que en mujeres con preeclamsia se observa una disminución en los niveles de FRAP, lo que sugiere una susceptibilidad al desarrollo de un cuadro oxidativo en condiciones no fisiológicas. Por otro lado, los niveles de FRAP en linfocitos de adultos clínicamente sanos (60 a 80 años) se encuentran disminuidos significativamente, en tanto que el MDA (TBARS), la carbonilación y el daño del ADN estuvieron significativamente elevados al compararse con sujetos jóvenes sanos de 21 a 40 años. Estos datos indican que la edad es un factor a considerar en el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo (Mutlu-Türkoğlu *et al.*, 2003).

También se señala que tanto el α -tocoferol como la vitamina C disminuyeron los niveles de MDA (TBARS) y aumentaron los de FRAP en leucocitos de becerros obtenidos al finalizar su periodo de transporte, en comparación con animales no transportados, lo que sugiere que el transporte influyó en el proceso de lipoperoxidación de las células blancas. Por lo tanto, el uso de antioxidantes puede proteger a las células inmunológicas durante infecciones bacterianas (Urban-Chmiel *et al.*, 2009).

Por otro lado, la técnica para medir la capacidad antioxidante (FRAP) no detecta antioxidantes de tipo enzimático, de tipo tiol (R-SH) y carotenoides (Benzie y Strain, 1999), por lo que el aumento en los niveles de FRAP observados durante los periodos de gestación y destete se debieron probablemente a un incremento en la concentración de ácido úrico, que se sabe que tiene actividad antioxidante (Niki, 2010), o a una elevación en el contenido de polifenoles, quizá por efecto de la dieta, o a algún otro metabolito, no identificado.

Con respecto a los valores de MDA, éstos no se modificaron en ninguno de los grupos. En el caso de las cerdas vacías esto quizá se debió a que no están sometidas a una exigencia metabólica; en los demás grupos, la disponibilidad de antioxidantes detectada por los análisis de FRAP pudo haber sido suficiente para controlar el proceso lipoperoxidativo (MDA). Se han observado niveles altos de MDA en condiciones no fisiológicas (Niki, 2009), situación muy distinta a la que se encontraron los animales de este experimento.

Como parte de la defensa celular antioxidante, las enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa (GSH-Px), catalasa, glutatión reductasa, tiorredoxina reductasa y tiorredoxina peroxidasa, juegan un papel importante en la eliminación de los oxidantes. La GSH-PX reduce el nivel de varios peróxidos que se encuentran en la célula usando glutatión reducido (GSH) como un donador de electrones (Miyamoto *et al.*, 2003).

El óxido nítrico (NO) implicado en los procesos fisiológicos de la vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria y la neurotransmisión, entre otros (Moncada *et al.*, 1991), inhibe la actividad de la enzima GSH-Px (Asahi *et al.*, 1995). También se ha observado un efecto inhibitorio sobre la actividad de la GSH-Px por la presencia de grupos carbonilo (Lo *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1997) y por aldehídos (Kinter *et al.*, 1996). En este trabajo, la enzima GSH-Px mostró una disminución en su actividad sólo a los 45 días de gestación. Es posible que la presencia de carbonilos (Fig. 10), algún derivado del óxido nítrico o una baja temporal de GSH hayan influido en tal efecto (Miyamoto *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006). No se cuenta con ninguna evidencia experimental o bibliográfica que explique este dato.

Por otro lado, se sabe que los lechones están protegidos de muchos patógenos por transferencia pasiva de inmunoglobulinas durante las primeras semanas de vida (Stokes y Bailey, 1998). La estimulación temprana de la respuesta inmune puede mejorar las defensas inmunitarias innatas durante este periodo de desarrollo

inmunológico, que está marcado con muchos factores de estrés. Un inmunomodulador de este sistema es la vitamina C. Se ha consignado que en macrófagos esta vitamina incrementa la fagocitosis, la quimiotaxis y la adherencia celular (Del Rio *et al.*, 1998).

En un estudio realizado con *Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdos, los niveles de ascorbato sanguíneo disminuyeron en paralelo a la progresión de la enfermedad. Los niveles de ascorbato se normalizaron cuando al cerdo se le aplicó un tratamiento de antibióticos (Lykkesfeld y Svendsen, 2007).

Asimismo, hay varios estudios en los que se señala el efecto de la adición de diferentes concentraciones de vitamina C a la dieta de los cerdos en distintos parámetros productivos: ganancia de peso, conversión alimenticia, inmunomodulación, sangrado del ombligo, etc., y los resultados son variables, contradictorios e inconsistentes (Mahan *et al.*, 1983,1994; Yen and Pond 1981, 1984, 1987; Lynch 1985; Chiang 1985; Eicher *et al.*, 2006). Estas diferencias pueden atribuirse a la raza del cerdo en estudio, al manejo de los animales, a la variación del medio ambiente, a la presencia de patógenos, etc. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se investigó el efecto antioxidante de la vitamina en los parámetros productivos y reproductivos de la cerda.

Se sabe que la vitamina C posee actividad de tipo antioxidante, demostrada por su eficiente inactivación de los radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, hidroxil y peroxil (Sies *et al.*, 1992).

En el presente estudio, los niveles de vitamina C disminuyeron desde los 45 días de gestación hasta no ser detectados al final del periodo de destete. Al parecer, el periodo de gestación es altamente demandante de vitamina C, superando la capacidad de síntesis de la madre. Esta situación metabólica podría ser la responsable del desarrollo de algunos problemas infecciosos que se presentan después del parto en las cerdas. Darle seguimiento a este dato sería de gran importancia y podría desembocar en la recomendación práctica de incluir vitamina C en las dietas para cerdas gestantes.

CONCLUSIÓN

Los resultados de oxidación proteínica y disponibilidad de vitamina C obtenidos en este trabajo sugieren que las cerdas gestantes desarrollan un cuadro de estrés oxidativo. Es probable que exista una relación inversa entre los altos niveles de carbonilación y la disminución gradual de las concentraciones séricas de vitamina C, lo que tendría un impacto negativo en el estado fisiológico de las cerdas, llegando, incluso, a afectar su productividad.

Referencias.

1. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 2003;79:829–843
2. Asahi M, Fujii J, Suzuk K, Seo HG, Kuzuya T, Hori M, Tada M, Fujii S, Taniguchi N. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *Journal Biological Chemistry* 1995;270:21035-21039.
3. Barreiro E, Hussain S. Protein carbonylation in skeletal muscle: Impact on function. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:417-429.
4. Behl C. Estrogen can protect neurons: mode of action. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2003;83:195-197.
5. Benzie, I.F.F., Strain, and J.J. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology* 1999;299:15-27.
6. Biewenga G, Haenen GRMM, Bast A. The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid. *Gen Pharmac.* 1997;29:315-331.
7. Borrás C, Gambini J, López-Gruesso R, Pallardó FV, Viña J. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010;1802:205–211.

8. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
9. Brown RG, Buchanan-Smith JG, Sharma VD. Ascorbic acid metabolism in swine. The effects of frequency of feeding and level of supplementary ascorbic acid on swine fed various energy levels. *Canadian Journal of Animal Science* 1970;55:353-358.
10. Burton, J.G. Jauniaux, E. Oxidative Stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2011;25:287-299.
11. Cadenas E, Packer L. *Handbook of Antioxidants*. Second edition. New York Marcel Dekker Inc. 2002.
12. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1482-1495.
13. Catalá A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids* 2009;157:1–11
14. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2010;48:749-762.

15. Clément MV, Ponton A, Pervaiz S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Letters* 1998;440:13-18.
16. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human disease. *TRENDS in Molecular Medicine*. 2003;9:169-176.
17. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation , cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006;10:389-406.
18. de Moffarts B, Kirschvink N, Art T, Pincemail J, Lekeux P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *The Veterinary Journal*. 2005;169:65-74.
19. Del Rio M, Ruedas G, Medina S, Victor VM, De la Fuente M. Improvements by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sciences* 1998;63:871–881.
20. Díaz-Cruz, A. Serret, M. Ramírez, G. Ávila, E. Guinzberg, R. Piña, E. Prophylactic action of lipoic acid on oxidative stress and growth performance in broilers at risk of developing ascites syndrome. *Avian Pathology* 2003;32: 645 – 653.

21. Díaz-Cruz A, Vilchis-Landeros MM, Guinzberg R, Villalobos-Molina R, Piña E. NOX2 activated by α_1 -adrenoceptors modulates hepatic metabolic routes stimulated by β -adrenoceptors. *Free Radical Research* 2011; 45,1366-1378.
22. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine* 2002;32:1102-1115.
23. Eicher SD, McKee CA, Carroll JA and Pajor EA. Supplemental vitamin C and yeast **cell wall β -glucan** as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. *Journal of Animal Science* 2006; 84:2352-2360.
24. Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*. 2014;33:79-97.
25. Fernández-Dueñas DM, Mariscal G, Ramírez E, Cuarón JA. **Vitamin C and β -carotene** in diets for pigs at weaning. *Animal Feed Science and Technology*. 2008;146:313-326.
26. **Foell D, Wittkowski H, Roth J. Mechanism of disease: A "DAMP" view of inflammatory arthritis.** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3:382-390.

27. Fontaine M and Valli VEO. Studies on vitamin E and selenium deficiency in young pigs. II. The hydrogen peroxide hemolysis test and the measure of red cell lipid peroxides as indices of vitamin E and selenium status. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1977;41:52–56
28. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009;30:1-12.
29. Gaál T, Ribiczeyné-Szabó P, Stadler K, Jakus J, Reiczigel J, Pál Kövér, Mézes M, Sümeghy L. Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006;143:391-396.
30. Gutteridge, J.M. The use of standars for Malonyldialdehyde. *Anal Biochem* 1975;69:518-526.
31. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *AMm J Clin Nutr* 1993;57 (suppl);715S-725S.
32. Halliwell B., Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3^a Edition. Oxford University Press. 1999.
33. Hansberg-Torres W. *Biología de las especies de oxígeno reactivas*. Mensajero Bioquímico 2002;26;19-54.

34. Harsem NK, Braekke K, Staff AC. Augmented oxidative stress as well as antioxidant capacity in maternal circulation in preeclampsia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2006;128, 209-215.
35. Hermesch S, Jones RM, Bunter KL. Feed intake of sows during lactation has genetic relationships with growth and lifetime performance of sows. 2008 AGBU Pig Genetics Workshop Notes. Australia. 2008;55–66
36. Hoyland, D., Taylor, A. A Review of the Methodology of the 2-Thiobarbituric Acid Test. *Food Chem* 1991;40:271-291.
37. Jansen EHJM and Ruskovska T. Comparative Analysis of Serum (Anti)oxidative Status Parameters in Healthy Persons. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14:6106-6115.
38. Jensen PT, Danielsen V, Nielsen HE. Glutathione peroxidase activity and erythrocyte lipid peroxidation as indices of selenium and vitamin E status in young pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1979;20:92-101.
39. Ji F, Hurley WL, Kim SW. Characterization of mammary gland development in pregnant gilts. *J. Anim. Sci.* 2006;84:579–587.
40. Ji F., Wu G., Blanton JR, Kim SW. Weight and compositional changes in pregnant gilts and its implication to nutrition. *J. Anim. Sci.* 2005;83:366–375.

41. Kang DH and Kang WK. Targeting cellular antioxidant enzymes for treating atherosclerotic vascular disease. *Biomolecules & Therapeutics*. 2013;21:89-96.
42. Kankofer M. Antioxidative defence mechanisms against reactive oxygen species in bovine retained and not-retained placenta: activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase, catalase and superoxide dismutase. *Placenta* 2001;22:466-472.
43. Kankofer M., Schmerold, I. Spontaneous oxidative damage in bovine retained and nonretained placental membranes. *Theriogenology* 2002;57: 1929-1938.
44. Kim SW, Hurley WL, Han IK, Easter RA. Changes in tissue composition associated with mammary gland growth during lactation in the sow. *J. Anim. Sci.* 1999;77:2510–2516.
45. Kim SW, Hurley WL, Han IK, Easter RA. Growth of nursing pigs related to the characteristics of nursed mammary glands. *J. Anim. Sci.* 2000;78:1313–1318.
46. Kinter M., and Roberts R.J. Glutathione consumption and glutathione peroxidase inactivation in fibroblast cell lines by 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radical Biology and Medicine* 1996;21:457-462.
47. Kirschvink, N., de Moffarts, B., Lekeux, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horse. *The Veterinary Journal*. 2008;177: 178-191.

48. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011;254;86-99.
49. Konigsberg Fainstein M. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. 1ª Edición. El Manual Moderno. México 2008.
50. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 2007; 46:244-282.
51. Lauridsen C, Højsgaard S and Sørensen MT. Influence of dietary rapeseed oil, vitamin E, and copper on the performance and the antioxidative and oxidative status of pigs. *Journal of Animal Science*. 1999;77:906-916.
52. Lauridsen C, Stagsted J, Jensen SK. n-6 and n-3 fatty acids ratio and vitamin E in porcine maternal diet influence the antioxidants status and immune cell eicosanoid response in the progeny. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2007; 84;66-78.
53. Lawrence, J.M., Michael, J.B., Morton, R., Melissa A.T. Studies of hydrolysis of ¹⁴C-labeled tetraethoxypropane to malondialdehyde. *Anal Biochem* 1979;99:458-463.
54. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxide activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71: 952-958.

55. Ledwozyw A, Stolarezyk H. The involvement of polymorphonuclear leucocytes in the pathogenesis of bronchopneumonia in calves VI Superoxide dismutase and lipoprotein lipase activities. *Acta Veterinaria Hungarica* 1992;40:267-277.
56. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A, Ahn B, Shaltiel S and Stadman ER. Determinacion of carbonyl content in oxidatively modified Proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-478.
57. Lykkesfeld J., Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*. 2007;173:502-511.
58. Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N α -actylarginine, N α -acetylcysteine, and N α -acetyllysine, and bovine serum albumin. *Journal Biological Chemistry* 1994;269:32299-32305.
59. Ma X, Fan PX, Li LS, Qiao SY, Zhang GL, Li DF. Butyrate promotes the recovering of intestinal wound healing through its positive effect on the tight junctions. *Journal of Animal Science*. 2012;90:266-268.
60. Madian GA, Diaz-Maldonado N, Gao Q, Regner FE. Oxidative stress induced carbonylation in human plasma. *Journal of Proteomics*. 2011;74:2395-2416.

61. Mahan DC and Saif LJ. Efficacy of Vitamin C Supplementation for Weanling Swine. Journal of Animal Science 1983;56:631-639.
62. Mahan DC, Lepine AJ and Dabrowski K. Efficacy of magnesium-L-ascorbyl-2-phosphate as a vitamin C source for weanling and growing-finishing swine. Journal of Animal Science 1994;72:2354-2361.
63. Mahan DC, Ching S, and Dabrowski K. Developmental aspects and factors influencing the synthesis and status of ascorbic acid in the pig. Annual Review of Nutrition. 2004;24:79-103.
64. Marascuilo LA, McSweeney M. Nonparametric and Distribution-free Methods for the Social Sciences. Brooks/Cole Publishing Co. 1977.
65. Martínez-Samano J, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA. El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. Revista de Educación Bioquímica. 2011; 30,56-67.
66. Mates, J.M. Perez-Gomez L. Antioxidant Enzymes and human diseases. Clinical Biochemistry 1999; 32; 595 – 603.
67. Meet and Livestock Council. 1979. Pig Yearbook 1979. Meat and Livestock Commission, London. Milton Keynes.

68. Meat and Livestock Council. 1998. Pig Yearbook 1998. Meat and Livestock Commission, London. Milton Keynes.
69. Miller E, Walczak A, Salukb J, Ponczekb MB, Majsterekc I. Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical Biochemistry* 2012;45:26–30.
70. Miller ER and Kornegay ET. Mineral and Vitamin Nutrition of Swine. *Journal of Animal Science* 1983;57:315-329.
71. Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Taniguchi N. Oxidative Stress Caused by Inactivation of Glutathione Peroxidase and Adaptive Responses *Biological Chemistry*. 2005;384:567–574.
72. Monahan FJ, Buckley DJ, Morrissey PA, Lynch PB, Gray JL. Effect of dietary α -tocopherol supplementation on α -tocopherol levels in porcine tissues and on susceptibility to lipid peroxidation. *Journal Food Sciences and Nutrition* 1990;42:203-212
73. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991;43:109-142.
74. Mutlu-Türkoğlu Ü, İlhan E, Öztezcan S, Kuru A, Aykaç-Toker G, Uysal M. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and

- lymphocyte DNA damage in elderly subjects *Clinical Biochemistry* 2003;36:397-400.
75. Niki E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radicals Biology & Medicine* 2009;47:469-484.
76. Niki E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radicals Biology & Medicine* 2010;49:503-515.
77. Niki, E. Yoshida, Y. Saito, Y. Noguchi, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;338:668-676.
78. Nordberg J., Arnér E. Reactive Oxygen Species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radicals Biology & Medicine* 2001;31:1287-1312.
79. NRC. Nutrient requirements of swine, 10th ed. Washington DC. National Academy Press, 1998.
80. Núñez LO, Bouda J. Patología Clínica Veterinaria. 1ª. Edición. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 2007.
81. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animals Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.

82. Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE. Selected methods for the determination of Ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. *Methods in enzymology*: 1979;62, 3 – 24.
83. Palmieri B, Sblendorio V. Oxidative stress detection: what for? Part II. *European Review for Medical and Phamacological Sciences* 2007;11:27-54.
84. Pamplona R, Costantini. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2001;301:R843-R863.
85. Pasquini, A., Luchetti, E., Cardini, G. Evaluation of oxidative stress in hunting dogs during exercise. *Research in Veterinary Science*. 2010;89: 120-123.
86. Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Rivera-Portalatin NM, Simpkins JW, Prokai L. Mechanistic investigation on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative. *Steroids* 2008;73:280-288.
87. Randles RH, Wolfe DA. *Introduction to The Theory of Nonparametrics Statistics*. John Wiley and Sons. New York. 1979.
88. Ranjan R, Swarup D, Naresh R, Patra RC. Enhanced erythrocytic lipid peroxides and reduced plasma ascorbic acid and alteration in blood trace elements level in dairy cows with mastitis. *Veterinary Research Communications*. 2005;29:27-34.

89. Sen CK. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2007;8;660-672.
90. Shi-bin Y, Dai-wen C, Ke-ying Z, Bing Y. Effects of Oxidative Stress on Growth Performance, Nutrient Digestibilities and Activities of Antioxidative Enzymes of Weanling Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 2007;20;1600-1605.
91. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins: Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1992;669:7–20.
92. Stokes C, and Bailey M. Passive transfer of immunity. Page 395 in *Handbook of Vertebrate Immunology*. P. Pastoret, P. Griebel, H. Bazin, and A. Govaerts, ed. Academic Press, San Diego, CA.
93. Uchida K, Khor OT, Oya T, Osawa T, Yasuda Y, Miyata T. Protein modification by a Maillard reaction intermediate methylglyoxal. Immunochemical detection of fluorescent 5-methylimidazolone derivatives. *FEBS Letters* 1997;410:313-318.
94. Urban-Chmiel R, Kankofer M, Wernicki A, Albera E, Puchalski A. The influence of different doses of α -tocopherol and ascorbic acid on selected oxidative stress parameters in *in vitro* culture of leukocytes isolated from transported calves *Livestock Science* 2009;124:89–92.

95. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M., Telser J. Free Radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39:44-84.
96. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. Mazur M. Free Radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;160:1-40.
97. Vannucchi C.I., Jordao A.A., Vannucchi H. Antioxidant compounds and oxidative stress in female dogs during pregnancy. *Research in Veterinary Science*. 2007; 83: 188 – 193
98. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell* 2007;26:1-14.
99. Wang TS and Huang H. Active oxygen species are involved in the induction of micronuclei by arsenite in XRS-5 cells. *Mutagenesis*1994;9:253-257.
100. Wang L, Xu ZR, Jia XY, Jiang JF, Han XY. Effects of arsenic (As^{III}) on lipid peroxidation, glutathione content and antioxidant enzymes in growing pigs. *Asian-Australasian Journal Animal Sciences* 2006,19;727-733.
101. Waring WS. Uric acid: an important antioxidant in acute ischemic stroke. *Q J Med* 2002;95:691-693.

102. Wegger I, Rasmussen K, Jørgensen PF. Glutathione peroxidase activity in liver and kidney as indicator of selenium status in swine. *Livestock Production Science* 1980;7:175-180.
103. Yao H, Rahman I. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;254:72-85.
104. Yen JT and Pond WG. Effect of Dietary Vitamin C Addition on Performance, Plasma Vitamin C and Hematic Iron Status in Weanling Pigs. *Journal of Animal Science* 1981;53:1292-1296.
105. Yen JT and Pond WG. Response of Swine to Periparturient Vitamin C Supplementation. *Journal of Animal Science* 1983;56:621-624.
106. **Yen JT and Pond WG. Responses of weanling pigs to dietary supplementation with vitamin C and carbadox. *Journal Animal Science*. 1984;58:132–137.**
107. **Yen JT and Pond WG. Effect of dietary supplementation with vitamin C or carbadox on weanling pigs subjected to crowding stress. *Journal Animal Science*. 1987;64: 1672-1681.**

108. Zhu LH, Zhao KL, Chen XL, Xu JX. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *Journal of Animal Science*. 2012;90:2581-2589.