



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

Efecto del ácido alfa lipóico sobre los parámetros productivos, la calidad de la canal y la biogénesis mitocondrial del pollo de engorda.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
Sergio Sigler Galván

Director de Tesis:
Dra. María Ofelia Mora Izaguirre, FESC.

Comité Tutorial:
Dr. Armando Shimada Miyasaka, FESC.
Dr. Enrique Piña Garza, Facultad de Medicina.

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México Julio 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi madre, que constantemente me ha brindado su apoyo incondicional.

A mi familia, que siempre espera mi retorno a casa con los brazos abiertos.

A mis amigos, quienes han estado para mí en mis momentos de necesidad.

A mi fiel mascota, compañera por mas de 18 años, Regalo, que me recibe con la alegría que sólo un ser leal e incondicional puede dedicar.

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. Así como al CONACyT por permitirme cursar mis estudios mediante la beca otorgada.

A mi comité tutor conformado por la Dra. Ofelia Mora, el Dr. Enrique Piña y el Dr. Armando Shimada, por recibirme como estudiante y dedicar tiempo a mi formación, mostrándome que el conocimiento no debe poseerse, sino compartirse.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, Instituto de Neurobiología, en especial al Laboratorio de Diferenciación Neural y Axogénesis A-03. Así como a los miembros del laboratorio RuMeN, sin su ayuda varios de los experimentos presentados no hubieran sido posibles. Gracias a Rosa, Tania, Yumi, Denisse, Daniela, Magda, Esperanza, Jonathan y Martín por todos los ratos buenos y malos, por las discusiones y reconciliaciones.

A los miembros del H. Jurado el Dr. Carlos López Coello, el Dr. Francisco Montiel Sosa, el Dr. Ernesto Ávila González, la Dra. Maricela Luna Muñoz y la Dra. Ofelia Mora Izaguirre por su disposición para revisar el presente trabajo, por las aportaciones brindadas para enriquecerlo y sobre todo por su pronta respuesta y compromiso con el mismo.

A la Unidad de Proteogenómica del INB-UNAM, campus Juriquilla, por el apoyo brindado en experimentos diversos.

A la M en C Laura González por la dedicada atención y colaboración.

A la Dra. Patricia García-Rojas Montiel, por mostrarme que con cariño y paciencia todo es posible.

Al CENID-Fisiología Animal, por facilitar sus instalaciones para parte del proyecto.

A la Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología, en especial a la Dra. Alma Delia Alarcón Rojo por participar en el proyecto.

Resumen

En la producción avícola se han usado diversos aditivos entre los que destacan los antioxidantes, como el ácido alfa lipóico (AAL). Se ha observado que al adicionarlo en la dieta de los animales ofrece diversos beneficios, como prolongar la vida de anaquel y mejorar la ganancia de peso. Por ello el objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta productiva, la calidad de la canal y los efectos celulares y moleculares sobre el músculo esquelético y cardíaco mediante la administración de AAL en la dieta con en diferentes dosis. El trabajo se dividió en dos experimentos, el primero presentado a manera de artículo, muestra los datos obtenidos de la respuesta productiva y calidad de la canal al suministrar el AAL a dosis de 0, 40, 80, 160 y 320 ppm en la dieta. No se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) por la adición de AAL sobre las variables productivas; aunque los pollos alimentados con 40 ppm de AAL perdieron menor cantidad de agua por cocción. El segundo experimento muestra los resultados de la evaluación de la morfología y biogénesis mitocondrial, así como la actividad de la sirtuina1 en el músculo esquelético y cardíaco, y la capacidad total antioxidante en el suero, al administrar el AAL en dosis de 0, 40, 80 y 160 ppm en la dieta. Los pollos que recibieron 40 ppm presentaron mayor integridad de las miofibrillas en pechuga y corazón, así como mayor cantidad de mitocondrias e integridad de estas en el corazón. El AAL mejoró la capacidad total antioxidante aunque no presentó diferencias entre las dosis ($P>0.05$). La actividad de la sirtuina1 aumentó en el corazón y pechuga de los pollos alimentados con 40 ppm ($P<0.0001$). Estos resultados mostraron que la adición del AAL en la dieta aumenta la biogénesis mitocondrial en el músculo cardíaco activando los genes involucrados en dicha vía a través de la actividad de la sirtuina1.

Palabras Clave: Ácido alfa lipóico, pollos, variables productivas, calidad de la canal, sirtuina1, biogénesis mitocondrial.

Abstract

In poultry production, it has been used various additives among them antioxidants like alpha lipoic acid (ALA). It has been observed that it, in the diet of animals provides various benefits, such as prolonging the shelf life and improve weight gain. Therefore the objective of this study was to evaluate the productive performance, carcass quality and the cellular and molecular effects on skeletal and cardiac muscle by administration of ALA in the diet in different doses. The work was divided into two experiments, the first presented as a paper published, shown the data obtained from the productive performance and carcass quality by providing the AAL at doses of 0, 40, 80, 160 and 320 ppm in the diet. No significant differences ($P > 0.05$) were observed by the addition of ALA on productive variables; while 40 ppm addition reduce cooking loss. The second experiment showed the results of evaluating the morphology and mitochondrial biogenesis and the sirtuin 1 activity in skeletal and cardiac muscle, and the total antioxidant capacity in serum, by ALA in doses of 0, 40, 80 and 160 ppm in the diet. Chickens fed 40 ppm had higher integrity of myofibrils in breast and heart as well as more mitochondria and integrity of those in the heart. AAL improved total antioxidant capacity but no differences between doses were observed ($P > 0.05$). The activity of the sirtuin 1 increased in heart and breast fed 40 ppm ($P < 0.0001$) chickens. These results showed that the addition of ALA in the diet increases mitochondrial biogenesis in the heart muscle by activating genes involved in this pathway through the activity of the sirtuin 1.

Keywords: Alpha lipoic acid, broilers, productive performance, carcass quality, sirtuin 1, mitochondrial biogenesis.

Contenido	
Introducción	1
Distribución de la producción pecuaria	1
Revisión de literatura	4
Calidad de la canal	4
<i>Eventos postmortem</i>	6
<i>Músculo</i>	6
Tamaño de las fibras	6
Tipos de fibras	7
pH muscular	7
<i>Aumento de Proteína</i>	8
<i>Bandeo blanco en la pechuga</i>	8
<i>Norma oficial mexicana</i>	11
Aditivos	13
Ácido Alfa Lipóico	14
<i>Obtención y Lipoilación</i>	14
Efectos <i>in vivo</i> del AAL	17
Justificación	20
Hipótesis	21
Objetivos	21
<i>General</i>	21
<i>Específicos</i>	21
Material y métodos	22
Experimento 1	23
Experimento 2	37
Animales	37
Tratamientos	37
Capacidad total antioxidante (TAC)	38
Biogenesis mitocondrial	38
<i>Microscopía electrónica</i>	38
<i>Determinación por qPCR de la cantidad de DNA mitocondrial (mtDNA)</i>	39
<i>Extracción de RNA</i>	40
<i>Retrotranscripción, DNAc</i>	40
<i>PCR en tiempo real (qPCR)</i>	41

<i>Determinación de la actividad de la Sirtuina1</i>	46
Análisis estadístico	47
Resultados	48
Granja Experimental	48
Biogénesis mitocondrial	51
<i>Microscopía electrónica</i>	51
<i>Actividad de la sirtuina1</i>	52
<i>qPCR</i>	56
Discusión	60
Respuesta productiva	60
Capacidad antioxidante	60
Biogénesis mitocondrial	61
Microscopía electrónica	61
Actividad de la sirtuina1 y PCR en tiempo real	62
Conclusiones	66
Referencias	67
Anexos	76
Anexo 1	76
Capacidad total antioxidante	
Anexo 2	77
Microscopía electrónica	
Anexo 3	78
DNA mitocondrial	
Anexo 4	79
Extracción de RNA	
Anexo 5	80
Extracción nuclear	
Anexo 6	81
Fluor de Lys®-SIRT1 plus NAD ⁺	

Lista de cuadros

Cuadro 1. Evolución histórica de los rendimientos del pollo de carne. Fuente: Moreno, 2005.

Cuadro 2. Clasificación de productos avícolas-carne de pollo de engorda en canal y en piezas.

Cuadro 3. Reportes previos en los cuales el AAL ha sido usado en animales.

Cuadro 4.- Diferentes dosis de ácido alfa lipóico usadas.

Cuadro 5.- Composición de las dietas de las diferentes fases de alimentación de los pollos.

Cuadro 6. Secuencias usadas de referencia para la elaboración de los oligonucleótidos para qPCR.

Cuadro 7. Templado para *ND1* como gen problema.

Cuadro 8. Templado para *GAPDH* como gen endógeno.

Cuadro 9. Templado *TFAM* como gen problema.

Cuadro 10. Templado *NRF1* como gen problema.

Cuadro 11. Templado *NRF2* como gen problema.

Cuadro 12. Templado *AMPKa1* como gen problema.

Cuadro 13. Templado *PGC1a* como gen problema.

Cuadro 14. Templado *SIRT1* como gen problema.

Cuadro 15. Templado *RPLP0* y *PPIA* como genes endógenos.

Cuadro 16.- Composición de los buffers usados en la extracción nuclear.

Cuadro 17.- Valores de la primera derivada a partir de las ecuaciones de regresión de la actividad de sirtuina1 en el corazón de pollos tratados con diferentes niveles de AAL en la dieta.

Cuadro 18.- Valores de la primera derivada a partir de las ecuaciones de regresión de la actividad de sirtuina1 en la pechuga de pollos tratados con diferentes niveles de AAL en la dieta.

Cuadro 19.- Valores de la primera derivada a partir de las ecuaciones de regresión de la actividad de sirtuina1 en la pierna de pollos tratados con diferentes niveles de AAL en la dieta.

Cuadro 20.- Coeficientes de correlación para el mtDNA y los mRNA involucrados en la biogénesis mitocondrial en corazón, por efecto de AAL en la dieta.

Cuadro 21.- Coeficientes de correlación para el mtDNA y los mRNA involucrados en la biogénesis mitocondrial en pechuga por efecto del AAL en la dieta.

Cuadro 22.- Coeficientes de correlación para el mtDNA y los mRNA involucrados en la biogénesis mitocondrial en pierna por efecto del AAL en la dieta.

Cuadro 23.- Coeficientes de correlación de los mRNA de *SIRT1*, *AMPK1a* y *PGC-1a* por efecto del AAL en corazón.

Cuadro 24.- Coeficientes de correlación de los mRNA de *SIRT1*, *AMPK1a* y *PGC-1a* por efecto del AAL en pechuga.

Cuadro 25.- Coeficientes de correlación de los mRNA de *SIRT1*, *AMPK1a* y *PGC-1a* por efecto del AAL en pierna.

Lista de figuras

Figura 1.- Crecimiento de la producción y consumo de las principales carnes en el país (Programa Nacional Pecuario 2007-2012, SAGARPA).

Figura 2.- Estructura del ácido alfa lipóico.

Figura 3.- Vías de obtención, endógena y exógena, del ácido alfa lipóico en la mitocondria.

Figura 4.- Complejo de la piruvato deshidrogenasa.

Figura 5.- Efecto de AAL administrado en el alimento sobre el peso final de pollo de engorda.

Figura 6.- Efecto del AAL sobre el consumo total de alimento en pollos de engorda, a lo largo de 7 semanas.

Figura 7.- Efecto del AAL sobre la eficiencia alimenticia en pollos de engorda al finalizar 7 semanas.

Figura 8.- Efecto del AAL sobre la conversión Alimenticia en pollos de engorda al finalizar 7 semanas.

Figura 9.- Efecto del AAL sobre la capacidad Total Antioxidante en suero en pollos de engorda a la 7 semana de producción.

Figura 10.- Efecto del AAL sobre la biogénesis mitocondrial, así como sobre la integridad de las miofibrillas, de las mitocondrias y la deposición de colágena.

Figura 11.- Efecto del AAL sobre la activación de sirtuina1 en corazón.

Figura 12.- Efecto del AAL sobre la activación de sirtuina1 en pechuga.

Figura 13.-Efecto del AAL sobre la activación de sirtuina1 en pierna.

Figura 14.- Activación de la biogénesis mitocondrial en el músculo por efecto del AAL a través del aumento en la actividad de la sirtuina1 (SIRT1) (Adaptado de Brenmoehl y Hoeflich, 2013; Chen *et al.*, 2012).

Abreviaturas y siglas

FAO; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

SAGARPA; Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación

UNA; Unión Nacional de Avicultores

PNP; Programa Nacional Pecuario

INA; Instituto Nacional Avícola

PSE; Pálida, suave y exudativa

DFD; Oscura, firme y seca

CK; Creatinina Quinasa

ALT; Alanina Aminotransferasa

AST; Aspartato Aminotransferasa

LDH; Lactato Deshidrogenasa

TG; Triglicéridos

AAL; Ácido Alfa Lipóico

FATP4; Proteína Transportadora de Ácidos Grasos 4

FABP2-1; Proteína de Unión a los Ácidos Grasos Intestinal o del Hígado

LAE; Enzima activadora de lipoato

GTP; Guanosín Trifosfato

LT; Lipoiltransferasa

FAS-II; Síntasa de Ácidos Grasos Tipo 2

LipB; Octanoiltransferasa

LipA; Lipoil Sintasa

ATGL; Lipasa Adiposa de Triglicéridos

FAS; Sintasa de Ácidos Grasos

ATA; Acetato Alfa Tocoferol

OLETEF; Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty

NAD⁺/ NADH; Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NA; Nicotinamida

AMPK; 5' AMP-activated protein kinase gene

AMPK; 5' AMP-activated protein kinase protein

PGC-1 α ; peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha gene

PGC-1 α ; peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha protein

NRF1; Nuclear respiratory factor 1 gene

NRF1; Nuclear respiratory factor 1 protein

NRF2 o *GABPA*; GA-binding protein alpha chain gene

NRF2 o GABPA; GA-binding protein alpha chain protein

TFAM; Mitochondrial transcription factor A gene

TFAM; Mitochondrial transcription factor A protein

MT-ND1; NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 gene

MT-ND1; NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 protein

UE; Unidades Experimentales

ME; Energía Metabolizable

TAC; Capacidad total antioxidante

mtDNA; DNA mitocondrial

ND1; NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 gene

ND1; NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 protein

GAPDH; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene

GAPDH; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase protein

qPCR; Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

dNTP's; Trifosfatos de Desoxinucleótidos

BLAST; Basic Local Alignment Search Tool

EDTA; Ácido Etildiaminotetraacético

KCl; Cloruro de Potasio

MgCl₂; Cloruro de Magnesio

OD; Densidad Óptica

OsO₄; Tetróxido De Osmio

Introducción

Distribución de la producción pecuaria 2011

En décadas recientes han aparecido diversas economías emergentes en Asia Occidental, África del Norte, América Latina y Asia del Este, las cuales presentaron cambios rápidos y significativos en los patrones y niveles de consumo de alimentos. Se calcula que en estas regiones el consumo de energía per cápita es de aproximadamente 3 000 kcal/día. Esto ha permitido que el consumo de trigo, arroz, azúcar, aceites vegetales, carne y productos lácteos sustituya gradualmente a las raíces, tubérculos y cereales secundarios. Sin embargo, existen aun zonas como el África Subsahariana y Asia Meridional que se encuentran por debajo del umbral de 2 500 kcal/persona/día (FAO, 2013).

Uno de los principales objetivos de la producción pecuaria es ofrecer productos de la mejor calidad posible, en el menor tiempo y a bajo costo para el consumidor, cuidando siempre la salud de este. Todo esto debido en gran parte a la necesidad de producir alimentos que permitan abastecer a la población mundial, evitando la actual problemática donde se calcula existen 1020 millones de personas que pasan hambre diariamente, de acuerdo a datos publicados por la FAO (SAGARPA, 2009).

La producción pecuaria deberá aumentarse en los próximos 20 años; pues el aumento en la demanda de alimentos así como el crecimiento acelerado de la población mundial, principalmente en las grandes ciudades, marcan la pauta a seguir en el rubro de producción de proteína de origen animal (SAGARPA, 2009).

En los países desarrollados el consumo de carne por parte de sus habitantes rebasa los 80 kg/año. Mientras que en México en 1970 el consumo de carne fue de 23 kg, para 1990 llegó a los 34 kg y en el 2012 se registró un consumo de 63 kg per capita, donde la carne de pollo representó el 46% (SAGARPA, 2009; SAGARPA 2012).

Parte del crecimiento que ha presentado el sector de la carne se debe al aumento en la demanda de carne de aves de corral, ya que su incremento constante ha sido cerca de tres veces la tasa de crecimiento de la población en las últimas cinco décadas (FAO, 2013).

Para poder cumplir con dichos objetivos de producción, México ha fijado la vista en el pollo de engorda, debido a que esta especie es capaz de producir elevadas cantidades de carne en espacios relativamente pequeños en periodos cortos, en comparación con otras especies, como los bovinos de carne. Además, la avicultura es también la rama de la ganadería que se encuentra en uno de los niveles tecnológicos más desarrollados, pues ha incorporado los avances en genética y alimentación de los últimos 50 años. Esta industria se encuentra totalmente consolidada y compite con la de países más desarrollados (SAGARPA, 2009).

A nivel mundial México se posicionó en el séptimo sitio como productor de pollo con un promedio de 3.050 millones de toneladas de carne de pollo (UNA, 2015), representando el 33.5% de la producción nacional en el 2013. Durante el periodo de 1993-2002 el país contribuyó con cerca del 90% de su consumo nacional aparente para la carne de pollo, por lo que únicamente importó aproximadamente el 10%, principalmente de Estados Unidos de Norteamérica (SAGARPA, 2009). Sin embargo, durante el periodo 2007-2012 México ascendió al quinto lugar a nivel mundial, con 293.6 millones de aves, que representaron el 24% del valor de la producción pecuaria y el 47% de la producción nacional de carnes, teniendo 5.5 ciclos al año y 238 millones de pollos por ciclo (SAGARPA, 2007-2012).

Con la globalización de los mercados, la competencia nacional e internacional en la producción de proteína animal se vuelve más demandante por lo que es necesario que los avicultores sean capaces de entregar productos que posean características distintivas en el mercado, por ello se ha recurrido a esquemas de certificación que garanticen un producto sano, inocuo y de calidad, tanto para los consumidores nacionales como para los internacionales (SAGARPA, 2009).

Una de las características favorables de la carne de pollo es que esta posee una cantidad relativamente mayor de ácidos grasos insaturados (SAGARPA, 2009).

Actualmente se maneja una densidad de población dentro de las casetas de 12-15 aves/m² o 36-39 kg/m² (SAGARPA, 2009), dependiendo de las condiciones de la caseta. Los periodos de engorda de esta especie productiva son cortos, el pollo de engorda tipo eviscerado finaliza su ciclo de producción en la semana 6 con una ganancia de alrededor de 2979 g en machos y 2557 g en hembras, mientras que el pollo tipo mercado finaliza su ciclo en la semana 7 con un peso cercano a los 3695 g y 3118 g para machos y hembras respectivamente (Ross, 2012). ¡

Por todas estas características el pollo de engorda en México ha superado los niveles de producción y consumo del bovino de engorda, como lo muestra la figura 1.

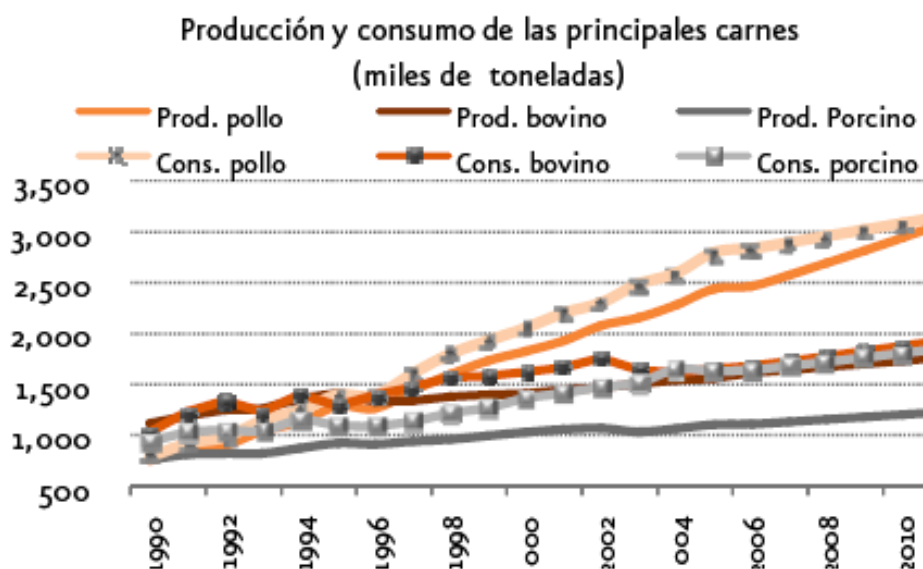


Figura 2. Crecimiento de la producción y consumo de las principales carnes en el país (Programa Nacional Pecuario 2007-2012, SAGARPA).

Cabe añadir que además los organismos internacionales consideran la avicultura una de las actividades que mantengan el crecimiento (SAGARPA) en los siguientes años.

Calidad de la canal

Revisión de literatura

Calidad de la canal

Antes de comenzar a hablar acerca de las características que conforman calidad de la carne de pollo, se debe contextualizar la definición de calidad dentro de la avicultura. Esto es una tarea difícil, pues la definición de calidad es verdaderamente subjetiva ya que depende de la perspectiva de la persona. Sin embargo, la perspectiva del consumidor será siempre la más adecuada porque será él quien esté tomando en cuenta las características organolépticas del producto y únicamente comprará un producto que satisfaga sus expectativas, si el producto no cumple con lo esperado resultará ser definido como un producto de baja calidad (Northcutt, 2004).

La calidad se define como atributos o características de la carne deseables para el consumo humano, y se encuentran en función de su composición (coeficiente magro-graso) y de factores de palatabilidad como jugosidad, sabor, terneza, olor, color y aspecto (FAO, 2015). Hoy en día uno de los productos de mayor demanda en Latinoamérica y el resto del mundo es la carne de pollo, como ya se mencionó en estadísticas anteriores, pues el mercado busca productos de fácil preparación y además nutritivos (Alvarado, 2012).

Una característica que ha permitido a la avicultura ser competitiva es su habilidad para cambiar de forma continua según las demandas del mercado, dentro de las cuales se encuentra la calidad de la carne de pollo incluyendo tanto las características deseables en canales completas, como en piezas o carne deshuesada (Alvarado, 2012) por lo que ha sido necesario la elaboración de parámetros y normas para evaluar la calidad, definiendo así lo que es deseable o aceptado por el consumidor y lo que no lo es, eliminando la subjetividad durante la evaluación de la calidad en demanda.

Para el consumidor la apariencia es el principal criterio para seleccionar lo que comprará y para una evaluación inicial de la calidad de la carne (Allen *et al.*, 1998).

Otros factores que están involucrados en la determinación de la calidad de la carne del pollo son la textura, sabor y capacidad de retención de agua; características dadas por factores como la genética, el medio ambiente, el manejo y procesamiento (Northcutt, 2004).

Existen diversos factores que pueden afectar la calidad de la canal, estos pueden dividirse en *ante-mortem* y *post-mortem*. Los factores *ante-mortem* son aquellos relacionados con la granja tales como la densidad de población, alimentación y estrés generado, y que son algunos de los causantes de los principales problemas que se observan al evaluar la calidad de la carne como la presencia de carne pálida, suave y exudativa (PSE) y la carne oscura, firme y seca (DFD) (Alarcón *et al.*, 2006).

Durante los últimos 30 años la selección avícola se concentró en la velocidad de crecimiento de las líneas de carne, produciendo mejoras en dicho crecimiento que han sido a costa de la estructura muscular, el metabolismo y la calidad de la carne, como se puede observar en el cuadro 1. Sin embargo, tasas más elevadas de crecimiento pueden inducir anomalías morfológicas (Dransfield y Sosnicki, 1999). Por ello los productores han optado por el uso de aditivos para mejorar la producción, tales como los coccidiostatos, enzimas, saborizantes, antioxidantes, por mencionar algunos.

Cuadro 1. Evolución histórica de los rendimientos del pollo de carne. Fuente: Moreno, 2005.

Característica/Año	1957	1991	2001
Peso canal, kg	0.655	2.048	3.145
Rendimiento de la canal, %	63.1	69.3	74.1
Rendimiento de la pechuga, %	12.2	15.4	20.9
Grasa canal, %	11.1	14.5	14.4
Grasa abdominal, %	0.8	1.3	1.52

Eventos postmortem

Cuando el animal ha muerto la reducción del pH que sufre el músculo es causada por el metabolismo anaeróbico, disminuyendo el pH de 7.2 a 5.8 en la carne, lo que provoca rigidez conocida como rigor *mortis*; si el rigor *mortis* se desarrolla demasiado rápido aumentan las posibilidades de que la carne posea un color pálido y disminuya su capacidad de retención de agua, resultado en un producto de baja calidad (Dransfield y Sosnicki, 1999). Dentro de los factores antemortem que afectan la calidad de la canal se encuentra el estrés calórico, que provoca una temprana y rápida glucólisis (McKee y Sams, 1997). Las fibras glucolíticas desarrollan más rápido el rigor *mortis*, el cual toma alrededor de 1 hora para la pechuga de pollo. Al aumentar el desempeño del crecimiento, este puede influenciar la velocidad y grado de desarrollo del rigor en la carne. También un elevado pH final mantendrá las propiedades de retención de agua de la miosina elevadas. Un rápido descenso del pH a elevadas temperaturas inactiva el sistema de la calpaina, reduciendo la tenderización provocando entonces un endurecimiento, además la miosina se desnaturaliza con mayor facilidad disminuyendo la capacidad de retención de agua (Dransfield y Sosnicki, 1999).

La carne más tierna es producida cuando alcanza los 10°C con un pH 6.2; por lo tanto las canales que adquieren rápidamente el rigor *mortis* se deberán enfriar velozmente para evitar la desnaturalización de proteínas como la miosina, aquellas que alcanzan un rigor *mortis* lentamente se enfriarán a menor velocidad con el propósito de evitar su endurecimiento (Dransfield y Sosnicki, 1999).

Músculo

Tamaño de las fibras

El número de fibras está relacionado con los cambios durante todo el crecimiento, los animales de crecimiento rápido tienen muchas más fibras que las estirpes de crecimiento lento, además los pollos de crecimiento rápido tienen fibras con diámetros más grandes que las estirpes de crecimiento lento, dicho

incremento está asociado con un aumento en el número de fibras gigantes, las cuales tienen áreas de sección transversal de 3 a 5 veces más grandes de lo normal. El área de la sección transversal de las fibras musculares incrementa al aumentar la edad. Al incrementarse la velocidad de crecimiento y el tamaño del músculo también aumentarían problemas tales como la incidencia de debilidad en las piernas, edema, miopatías profundas en los pectorales así como de miopatías focalizadas (Dransfield y Sosnicki, 1999).

Tipos de fibras

Como en otras especies, las fibras musculares de las aves se dividen en fibras rojas y fibras blancas debido a diferencias metabólicas; las fibras rojas están adaptadas a un metabolismo principalmente aeróbico u oxidativo, mientras que las fibras blancas están adaptadas a un metabolismo anaeróbico o glucolítico. Al aumentar la tasa de crecimiento las fibras se volvieron más glucolíticas (Dransfield y Sosnicki, 1999). En el caso de los pollos la pechuga (*Pectoralis major*) está compuesta enteramente de fibras glucolíticas (Re'mignon *et al.*, 1993).

pH muscular

Cuando las aves se agotan antes de la matanza disminuye el glucógeno muscular por lo que menos ácido láctico se acumula durante la glucólisis *post mortem* dando como resultado un pH final más elevado, lo cual es algo deseado para evitar que se presenten problemas de carne pálida suave y exudativa, sin embargo un pH elevado compromete la vida de anaquel del producto porque puede permitir la proliferación de microorganismos con mayor facilidad. Se ha demostrado que existe una correlación negativa entre el color claro que presenta la carne de la pechuga y el pH bajo de ésta. El bajo pH de la carne de las aves también se ha asociado con una baja capacidad de retención de agua que a su vez resulta en un incremento en las pérdidas de agua por goteo y por cocción; además de que un pH bajo disminuye la ternura aunque aumenta la vida de anaquel. Se ha observado que la adición de polifosfatos a la carne ha resultado en un incremento en la capacidad de retención del agua al incrementar el pH.

Por lo que, con la finalidad de incrementar la vida de anaquel, las canales de pollo se enfrían en soluciones de fosfatos (Allen *et al.*, 1998).

Aumento de Proteína

El crecimiento del tejido muscular es un proceso dinámico debido a que involucra cambios entre el catabolismo y el anabolismo, lo que significa que la inhibición en la degradación de las proteínas musculares constituye un importante mecanismo que permite el desarrollo del músculo (Goll *et al.*, 1992). Existen tres sistemas proteolíticos en el músculo: las catepsinas (lisosomales), las calpainas (dependientes de calcio) y el proteosoma (dependiente de ATP/ubiquitina). Estudios donde se ha relacionado el efecto de la velocidad de crecimiento con la capacidad proteolítica del músculo de la pechuga, han demostrado que las aves de crecimiento lento poseen un exceso de enzimas (catepsinas, calpainas) mientras que en las líneas de crecimiento rápido el inhibidor es el que se encuentre en exceso (Schreurs *et al.*, 1995). Dichos estudios sugieren que el incremento en el crecimiento y masa muscular en las estirpes modernas puede ser regulado al reducir el catabolismo de las proteínas. Se ha relacionado a las catepsinas y principalmente a las calpainas con la proteólisis *postmortem* y la debilidad de las fibras musculares que llevan a la ternura de la carne, por lo que al reducirse el potencial proteolítico en las líneas de crecimiento rápido, hay menos actividad y se reduciéndose así la suavidad de la carne (Dransfield y Sosnicki, 1999).

Bandeo blanco en la pechuga

Uno de los principales problemas que se observan en la pechuga es el bandeo blanco o "White striping", caracterizado histológicamente por un elevado grado de degeneración de las fibras musculares junto con fibrosis y lipidosis cuando se comparan con un músculo normal, las cuales no presentan ninguna línea blanca paralela a la dirección de la fibra.

Dicho problema se asocia con los animales más pesados (Bauermeister *et al.*, 2009; Kuttappan *et al.*, 2013a) o con aves con elevadas tasas de crecimiento (Kuttappan *et al.*, 2012a). Esto sugiere que el incremento en el tamaño de los animales en la avicultura, acompañado con la selección de rápidas y altas tasas de crecimiento en periodos cortos, puede producir una elevada incidencia de este problema en el mercado de la carne. El “White striping” severo también se ha asociado con elevados contenidos de grasa en la pechuga. Aunque esta condición se ha relacionado con distrofia muscular hereditaria (Asmundson y Julian, 1956; Julian y Asmundson, 1963) y a miopatías nutricionales a causa de deficiencia de vitamina E (Dam *et al.*, 1952; Machlin y Shalkop, 1956; Klasing, 2008). La incidencia de estriaciones pálidas sobre el músculo puede ser una manifestación de la mineralización o infiltración de colágeno o grasa como una secuela de necrosis de la miofibrilla (Valentine y McGavin, 2012).

Kuttappan *et al.*, (2012b) reportaron que la aceptación visual de los filetes de pechuga de pollo puede reducirse debido a la ocurrencia en un grado moderado o severo del “White striping”, lo que resulta en pérdidas económicas para el productor.

Kuttappan *et al.*, (2013b) evaluaron esta condición histológicamente y reportaron que los grados más elevados de “White striping” están asociados con daño de las fibras musculares. Dicho daño puede verse reflejado en los perfiles bioquímicos del plasma o suero. La condición puede interrumpir la integridad del sarcolema liberando a varias de sus enzimas como la creatinina quinasa (CK), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y lactato deshidrogenasa (LDH) en el suero (Hochleithner, 1994; Hoffman y Solter, 2008). La lipidosis localizada, se asocia con miofibras necróticas (Kuttappan *et al.*, 2013b) mostrando una gran cantidad de grasa con un perfil diferente de ácidos grasos en las muestras que poseen un grado severo de “White striping” cuando se comparan con una muestra normal (Kuttappan *et al.*, 2012a). El incremento en la deposición de grasa puede deberse a un aumento en la síntesis y secreción del hígado o a una mayor ruptura, absorción y almacenamiento en los adipocitos (Hermier, 1997). Una mayor lipogénesis en los pollos es asociada con una relación mayor del peso del hígado: peso vivo, y a las diferencias en los

perfiles de ácidos grasos (Saadoun y Leclercq, 1987). La lipogénesis en el hígado está asociada con una mayor secreción de lipoproteínas de baja densidad y un aumento de los triglicéridos (TG) circulantes en aves (Hermier, 1997).

El patrón de los niveles enzimáticos en aves que sufren de este daño muscular es similar al de condiciones como estrés. Este daño también puede llevar a una regulación catiónica defectuosa resultando en niveles altos de sodio, potasio, magnesio y calcio en el tejido muscular (Sandercock *et al.*, 2009). Estos niveles altos de calcio son capaces de iniciar severos cambios tisulares que incluyen la activación de proteasas intracelulares o lipasas que llevan a cambios miopáticos.

El problema se observa principalmente en la parte craneal de la pechuga, además de los muslos. Las lesiones microscópicas incluyen degeneración vacuolar, lisis, mineralización media, ocasionalmente regeneración (actividad nuclear y células multinucleadas), e inflamación intersticial junto con fibrosis. Muchas fibras se presentan redondeadas e hipereosinofílicas con pérdida de la estriación transversal e internalización del núcleo. Otras fibras son fragmentadas y fagocitadas.

Los factores liberados por las células inflamatorias activan a las células satélite iniciando la regeneración de las miofibrillas dañadas (Kääriäinen *et al.*, 2000). Cuando el daño muscular es demasiado grave, agudo o crónico, el proceso regenerativo no es efectivo (Mahon, 1999), llevando eventualmente a una degeneración grasa (Natarajan *et al.*, 2010). Entonces, las células pluripotenciales en el tejido muscular se diferencian hacia fibroblastos o adipocitos (Shefer *et al.*, 2004; Brack *et al.*, 2007), debido a la influencia de la fibra muscular degenerada (Hosoyama *et al.*, 2009) lo que resulta en fibrosis y lipidosis tisular.

El desarrollo de las lesiones puede estar relacionado con diferencias en la distribución de los tipos de fibras musculares, recordando que las fibras que componen a la pechuga son principalmente blancas (Smith y Fletcher, 1988) mientras que las de la pierna son fibras rojas (Julian y Asmundson, 1963).

Por ello se sugiere que las fibras blancas son más susceptibles a problemas como el “White striping”. La selección genética realizada con base en mejores tasas de crecimiento pudo haber afectado de forma adversa el suministro capilar a la musculatura llevando a un incremento en el porcentaje de las fibras glucolíticas en varios músculos esqueléticos (Soike y Bergmann, 1998a). Estas fibras glucolíticas en las aves de rápido crecimiento pueden ver reducidas sus habilidades para el transporte de calcio, volviéndose propensas a cambios patológicos debido a un incremento en las demandas energéticas y producción de lactato (Soike y Bergmann, 1998b).

Se ha visto que el rápido crecimiento en pavos puede causar que los músculos sobrepasen el límite de los sistemas de apoyo durante el desarrollo de las aves, presentándose una condición llamada “miopatía focal”, la cual es diferente de la miopatía profunda del pectoral o la distrofia muscular hereditaria (Wilson *et al.*, 1990). Otros reportes muestran daño muscular en los pavos debido a isquemia causada por una rápida tasa de crecimiento (Sosnicki *et al.*, 1989; Sosnicki *et al.*, 1991).

Se ha mencionado que la intensa selección de las aves para una rápida tasa de crecimiento pudo estar accidentalmente acompañada por la selección de un inadecuado crecimiento capilar/fascial o de defectos en las fibras musculares que llevan a cambios miopáticos referidos como “miopatías inducidas por crecimiento” (Mahon, 1999). También está involucrada la reducción en el suministro de oxígeno al músculo de la pechuga como resultado de una menor densidad capilar en los pollos de rápido crecimiento (Hoving-Bolink *et al.*, 2000). La carencia de un suministro suficiente de sangre resulta en la acumulación de productos metabólicos de desecho (MacRae *et al.*, 2006), causando estrés oxidativo y daño tisular.

Norma oficial mexicana

Para finalizar con el tema relacionado a la calidad de la carne y su evaluación, en México la carne de pollo es clasificada de acuerdo a la norma **NMX-FF-080-SCFI-2006** (Cuadro 2), en la cual se evalúan diversos atributos como son la conformación general, los restos de vísceras, la apariencia de la piel,

hematomas, manchas de bilis, restos de plumas y filoplumas, así como fracturas o mutilaciones.

Cuadro 2. Clasificación de productos avícolas-carne de pollo de engorda en canal y en piezas.

Atributos	México Extra	Mexico 1	México 2
Conformación general de la canal	Musculatura bien desarrollada libre de deformidades que afecten la distribución normal de la carne, de contornos redondeados.	Musculatura bien desarrollada libre de deformidades que afecten la distribución normal de la carne, de contornos redondeados.	Musculatura desarrollada se permiten deformaciones, como quilla dañada o torcida, así como piernas, muslos y rabadilla curvos.
Restos de vísceras	Se permiten restos de esófago y riñón. Se admiten vísceras comestibles en un empaque cerrado dentro o fuera de la cavidad abdominal.	Se permiten restos de esófago, riñón y pulmón. Se admiten vísceras comestibles en un empaque cerrado dentro o fuera de la cavidad abdominal.	Se aceptan restos de víscera. Se admiten vísceras comestibles en un empaque cerrado dentro o fuera de la cavidad abdominal.
Apariencia general de la piel	Debe presentar uniformidad en el color sin importar si éste es blanco o amarillo. No se permiten rasgaduras lineales que expongan la carne de la canal. Se permite la decoloración para el pollo pintado.	Debe presentar uniformidad en el color sin importar si éste es blanco, pigmentado ó pintado, sin embargo, se admiten zonas de decoloración. Se permiten rasgaduras lineales en la rabadilla que no expongan la carne de la canal.	Puede presentar decoloración parcial o total. Se permiten rasgaduras en cualquier parte de la canal.
Hematoma	Libre de hematomas	Sólo en la punta del ala y en el muñón de la pierna	Se aceptan en cualquier parte de la canal
Manchas de bilis	Libre de manchas de bilis	Libre de manchas de bilis	Se permiten manchas de bilis
Plumas y filoplumas	Libre de plumas. Se aceptan filoplumas	Se aceptan plumas sólo en el ala, muñón de la pierna y pigostilo (última	Se aceptan plumas y filoplumas en cualquier parte de

	solamente en alas.	vértebra). Se aceptan filoplumas en cualquier parte de la canal	la canal
Fracturas	Libre de fracturas	Se aceptan fracturas sólomente en la punta del ala.	Se aceptan fracturas en cualquier parte de la canal
Mutilaciones	Libre de mutilaciones	Libre de mutilaciones	Se permiten mutilaciones en cualquier parte de la canal

Aditivos

El alimento es uno de los principales componentes del costo total al momento de producir pollos de engorda. Por ello las raciones deben de ser formuladas de manera adecuada y así aportar el balance correcto de energía, proteína, aminoácidos, minerales, vitaminas y ácidos grasos esenciales para lograr los objetivos establecidos por el potencial genético del ave (Ross, 2009). Lo que se busca en los aditivos que se agregan a dichas raciones es que los animales usen de manera más eficiente el alimento durante la conversión alimenticia, reduciendo así el costo de producción.

Los aditivos son aquellos ingredientes que son adicionados a los alimentos a fin de mejorar alguna característica como la palatabilidad, la vida de almacén, la ingesta, la digestión, absorción o metabolismo de los alimentos, aunque de forma estricta su adición no sea esencial en el alimento debido a que no se trata de un ingrediente indispensable en la nutrición. Algunos ejemplos de dichos aditivos son los saborizantes, enzimas, aglutinantes, coccidiostatos, antioxidantes (Shimada, 2007).

Ácido Alfa Lipóico

Dentro de los aditivos se encuentran a los antioxidantes, siendo el ácido alfa lipóico (AAL) uno de ellos. Es un ácido graso organosulfurado derivado del ácido octanoico, compuesto por ocho carbonos.

Participa como cofactor de 2 complejos enzimáticos importantes en el ciclo de Krebs (Nesbitt *et al.*, 2008): la piruvato deshidrogenasa y la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa.

El AAL, también llamado ácido tióctico, posee dos átomos de azufre (en el carbono 6 y 8) unidos por un puente disulfuro que le otorgan sus características antioxidantes. En la forma oxidada se encuentra como un disulfuro cíclico, mientras que la forma reducida posee dos grupos sulfhidrilo (-SH) denominándose ácido dihidrolipoico. El átomo de carbono 6 es quiral, por lo que la molécula existe como dos enantiómeros por separado R-(+)- ácido lipóico (RLA) y S-(-)-ácido lipóico (SLA), aunque también hay una mezcla racémica de ambos R/S-ácido lipóico. Sólo la forma RLA existe en la naturaleza y actúa como cofactor de los complejos enzimáticos antes mencionados.

El AAL se encuentra unido a un resto específico de lisina de la enzima con la que trabaja; en cuyo caso se pasa a denominar como lipoamida.

El lipoato es la base conjugada del AAL y la forma de mayor prevalencia en condiciones fisiológicas.

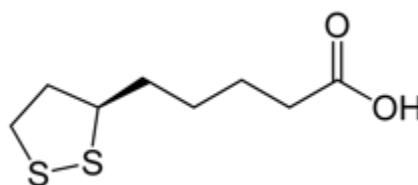


Figura 2.- Estructura del ácido alfa lipóico.

Obtención y Lipoilación

Las células eucariotas del pollo son capaces de obtener el ácido lipóico de dos fuentes:

- Exógeno: proveniente de la dieta o de la síntesis de las bacterias intestinales.

- Endógeno: proviene de la síntesis de *ново* a partir de ácido octanoico.

Para el primer caso, las células obtienen el AAL del medio, en el intestino delgado el enterocito puede absorberlo a través de los receptores para ácidos grasos, tales como la proteína transportadora de ácidos grasos 4 (FATP4). Una vez dentro del enterocito es transportado al retículo endoplásmico por la misma FATP4 o por la proteína de unión a los ácidos grasos intestinal o del hígado (FABP2-1) incorporado a los prequilomicrones para después pasar al aparato de Golgi y finalmente salir de la célula en los quilomicrones (Boudry *et al.*, 2010).

Cuando el ácido lipóico llega a la mitocondria se encuentra con LAE (Enzima activadora de lipoato) que se encarga de catalizar la reacción para formar lipoil-GMP, usando GTP como sustrato, después este compuesto a través de una LT (lipoiltransferasa) es unido a una apoproteína para formar una proteína lipoilada que le permitirá viajar al ácido lipóico en el medio intracelular.

La segunda forma de obtención y lipoilación es a través de la síntesis de *ново*, donde a partir de acetil-CoA por acción de la FAS-II (Síntasa de ácidos grasos tipo 2) la célula formará ácido octanoico y será unido a una proteína acarreadora de octanoil-acilo para que LipB (Octanoiltransferasa) transfiera la mitad lipoil de la proteína acarreadora y lo una a la apoproteína formando una proteína lipoilada a la que LipA (Lipoil sintasa) le insertará los 2 átomos de azufre en los carbonos 6 y 8 del que era originalmente el ácido octanoico para finalmente dar como resultado, al igual que la vía anterior, una proteína lipoilada que podrá viajar en el medio extracelular (Fujiwara *et al.*, 2008).

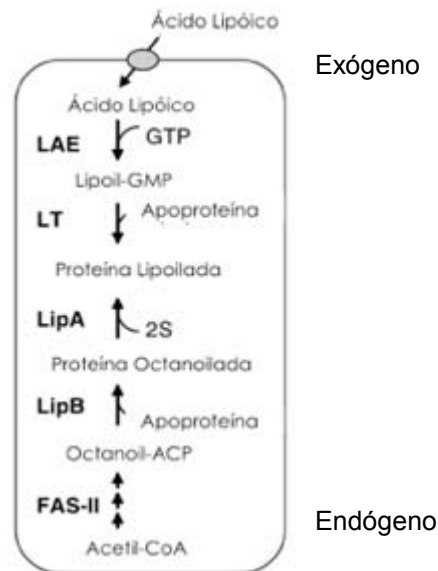


Figura 3.- Vías de obtención, endógena y exógena, del ácido alfa lipóico en la mitocondria (Tomado de Patel y Packer, 2008).

El AAL participa en los complejos enzimáticos antes mencionados para poder tomar y ceder los electrones tanto del piruvato como del alfa-cetoglutarato, formando acetil-CoA y Succinil-CoA, pero además interactúa con otros elementos como la vitamina C, la coenzima Q10, la tioredoxina y la glutatona, donde a través de reacciones de óxido-reducción, mantendrá a estos elementos reducidos.

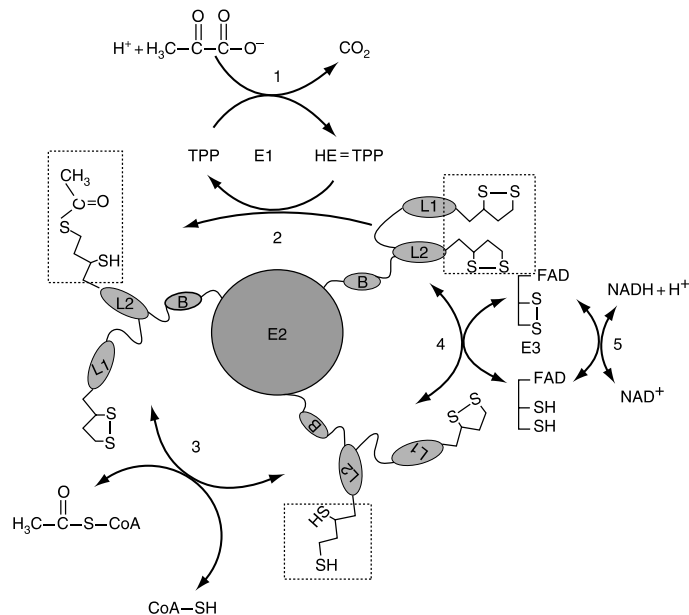


Figura 4.- Complejo de la piruvato deshidrogenasa (Tomado de Patel y Packer, 2008).

Efectos *in vivo* del AAL

El AAL ha sido usado en animales tanto de laboratorio como de producción (pollo de engorda, codornices) donde se ha observado que el principal efecto es que mejora la ganancia de peso corporal y que disminuye problemas como los asociados con el estrés calórico o el síndrome ascítico.

En producción es conocido que las dietas altas en lípidos se pueden convertir en una fuente de radicales libres y desestabilizar los lípidos de la membrana celular. Por ello se sabe que la suplementación con AAL disminuye el daño oxidativo, mejorando la estabilidad de la membrana mitocondrial. El AAL, incrementa la sensibilidad a la insulina y en el músculo la oxidación de ácidos grasos activando a la AMPK en ratas obesas propensas a diabetes (Evans y Goldfine, 2000; Lee *et al.*, 2005); aumenta la absorción de glucosa en adipocitos 3T3-L1, en células de músculo esquelético y en el músculo propiamente de ratones *ob/ob* (Eason *et al.*, 2002). Aumenta la ATGL e inhibe la producción de sintasa de ácidos grasos (FAS), eficientizando su uso para la B-oxidación y reduciendo la acumulación de lípidos en células C₂C₁₂ expuestas a elevadas concentraciones de glucosa.

El cuadro 3 muestra algunos de los experimentos en los que el AAL ha sido usado en modelos animales.

Cuadro 3. Reportes previos en los cuales el AAL ha sido usado en animales.

Autores y año de publicación	Dosis	Especie animal	Efecto
Arshad <i>et al.</i> , 2011	25, 75, 150 mg + 200 mg ATA mg/kg alimento	Pollos	Alfa tocoferol acetato (200mg/kg) + ácido lipóico (25mg/kg) aumento de peso en las aves (55.36 g vs aceites) y mayor vida de anaquel (estabilidad de lípidos).
Díaz <i>et al.</i> , 2003	40mg/kg alimento	Pollos	Mejora conversión alimenticia (1.82g), disminuye mortalidad por síndrome ascítico (1.14%), mejora la ganancia de peso (2.4 kg)
Mora <i>et al.</i> , 2015	40mg/kg alimento	Pollos	Aumento de peso en las aves (40g hembras, 100g machos).
Hamano <i>et al.</i> , 1999	5 mg/kg, 50 mg/kg alimento	Pollos	Permite el uso eficiente de los ácidos grasos no esterificados.
Hamano, 2006	200 mg/kg, 400 mg/kg alimento	Pollos	Estimula la sensibilidad a insulina en los tejidos, promueve la liposis.

Halici <i>et al.</i> , 2011	250 mg/kg alimento	Codornices	Contrarresta los efectos causados por estrés calórico.
Kim <i>et al.</i> , 2004	75 mg/kg de peso vivo	Ratas OLETF Ratones Lep ^{-/-} y Lepr ^{-/-}	Sumprime la AMPK hipotalámica disminuyendo el consumo y peso
Parveen <i>et al.</i> , 2013	25, 75, 150 mg + 200 mg ATA/kg de alimento	Pollos	Modifico el consumo, peso, conversión alimenticia, mejorándolos en algunas dosis. Aumentó la actividad antioxidante en la membrana mitocondrial.
Shen <i>et al.</i> , 2005	0.5 – 1 % (5-10mg/g) de la dieta en base materia seca	Ratones	Aumento de tejido muscular (0.43 vs 0.417 control) y disminución de tejido adiposo (0.09 vs 0.61g control).
Wang <i>et al.</i> , 2010	0.75 % (7.5mL) en agua de bebida	Ratones seniles	Mejóro la composición corporal, masa magra (90% vs 75% control), promovió la biogénesis mitocondrial.

Abreviaturas:

ATA= Acetato de alfa tocoferol

OLETF=Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty

Se han realizado estudios previos (Chen *et al.*, 2012) in vitro en células C₂C₁₂ donde se ha observado que el AAL es capaz de activar de forma indirecta a la sirtuina1 mediante la modulación del ratio de NAD⁺/NADH. La NA puede convertirse en NAD⁺ por medio de la fosforilación catalizada por NAMPT, mientras tanto NAMPT se activa a través de la privación de nutrientes, el ejercicio y la activación de la AMPK.

La AMPK es una enzima que actúa como un sensor energético ejerciendo un efecto similar al de la sirtuina1 en el metabolismo celular energético y en la biogénesis mitocondrial (Winder y Holmes 2000; Jager *et al.*, 2007). La literatura menciona que al administrar AAL a ratones seniles se observó que la composición corporal de los animales mejoró al hacer más eficiente el gasto energético realizado por el músculo debido a que promovió la biogénesis mitocondrial, lo cual comprobaron mediante cultivos de células C₂C₁₂ donde se corroboró que el AAL activó la ruta de la AMPK que posteriormente activa a PGC-1 α llevando así al aumento de la biogénesis mitocondrial en los cultivos

celulares (Wang *et al.*, 2010), es por ello que en este trabajo se planea medir la expresión de *SIRT1*, *AMPK* y *PGC-1 α* .

Cuando se activa la biogénesis mitocondrial existen otros genes involucrados como *NRF1* (Nuclear respiratory factor 1), *NRF2* o *GABPA* (GA-binding protein alpha chain), *TFAM* (Mitochondrial transcription factor A) y el *MT-ND1* (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1). Los primeros tres se encuentran involucrados directamente en la vía de señalización requerida para activar la biogénesis mitocondrial (Brenmoehl y Hoeflich 2013); la última proteína es codificada por el DNA mitocondrial (Entrez Gene: MT-ND1 NADH dehydrogenase subunit 1") y se localiza en la membrana interna de la mitocondria (Voet *et al.*, 2013). Es usada en experimentos donde se desea cuantificar la cantidad de DNA en la muestra debido a que forma parte de la enzima NADH deshidrogenasa, por lo que se pretende que al aumentar la biogénesis mitocondrial y en consecuencia la cantidad de mitocondrias aumente la expresión de está en las muestras.

Con estos antecedentes la presente investigación pretende demostrar los efectos positivos de AAL sobre los parámetros productivos y la calidad de la canal en el pollo de engorda, proponiendo que tales efectos observados se logran a través de la biogénesis mitocondrial y la actividad de la sirtuina1.

El trabajo se dividió en dos experimentos principales, el primero que se presenta a forma de nota científica publicada, en el cual se realizó una prueba con 1,000 pollos de la línea Ross 308, donde se alimentaron con diferentes dosis de AAL y se evaluaron los parámetros productivos. Posterior al sacrificio las canales fueron usadas para pruebas de calidad de la carne y obtener así un panorama más completo de los efectos del AAL sobre los animales.

El segundo experimento se realizó con 100 pollos de la línea Ross 308, donde los animales fueron alimentados con las mismas dietas que en el experimento anterior (excluyendo 320 ppm por carecer de efecto positivo), en el cual además de evaluar el peso y consumo se recolectaron muestras para determinar la capacidad antioxidante, así como para microscopia electrónica, PCR en tiempo real para la evaluación de la biogénesis mitocondrial y otros genes adicionales

involucrados indirectamente en esta vía de señalización, cuantificación de DNA mitocondrial y actividad de la sirtuina1.

Justificación

Los resultados previos en el pollo de engorda demostraron el efecto benéfico del AAL sobre los parámetros productivos, sin embargo la dosis máxima utilizada hasta ese momento fue de 40 ppm, por lo que en el presente estudio se usaron dosis mayores (0, 40, 80, 160 y 320 ppm) a fin de observar si hay alguna mejora en las variables productivas y sobre la calidad de la canal, en variables tales como color, pH, terneza y capacidad de retención de agua. También fue parte del trabajo dilucidar si la biogénesis mitocondrial y la actividad de la sirtuina1 están afectadas por efecto del AAL en los músculos esqueléticos y cardiaco. Todo esto a fin de proponer al AAL como un aditivo al alcance de los avicultores y de uso común en la dieta del pollo de engorda.

Hipótesis

El AAL suministrado en la dieta durante todo el ciclo productivo mejorará los parámetros productivos y la calidad de la canal; así como promoverá la biogénesis mitocondrial y la expresión y actividad de la sirtuina1 en el músculo esquelético y cardíaco del pollo de engorda.

Objetivos

General

Evaluar el efecto del AAL administrado en el alimento a diferentes dosis, sobre los parámetros productivos, calidad de la canal y la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético y cardíaco del pollo de engorda.

Específicos

- Evaluar el efecto de 0, 40, 80, 160 y 320 ppm de AAL en el alimento sobre la ganancia diaria de peso, conversión alimenticia y calidad de la canal.
- Evaluar el efecto de 0, 40, 80 y 160 ppm de AAL en el alimento, sobre la capacidad total antioxidante en el suero de los animales experimentales.
- Evaluar el efecto de 0, 40, 80 y 160 ppm de AAL en el alimento sobre la morfología mitocondrial y la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético y cardíaco.
- Evaluar el efecto de 0, 40, 80 y 160 ppm de AAL en el alimento sobre la actividad de la sirtuina1 en el músculo esquelético de la pierna, la pechuga y cardíaco.

Material y métodos

Se presentan los resultados de dos experimentos realizados.

El primero, que cubre los objetivos específicos 1 y 2, ha sido enviado y publicado en la Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias y se presenta en su forma de nota científica.

El segundo experimento, con el cual se cubrieron los objetivos específicos 3 y 4, se presenta de forma convencional.

Experimento 1

Efecto del ácido lipoico sobre parámetros productivos y calidad de la canal en el pollo de engorda

Effect of alpha-lipoic acid on productive parameters and carcass quality in broiler chickens

Sergio Sigler Galván^a, Sergio Gómez Rosales^b, Alma Delia Alarcón-Rojo^c,
Lourdes Angeles^b, Enrique Piña^d, Armando Shimada Miyasaka^e, Ofelia Mora Izaguirre^e

RESUMEN

En la producción de pollo de engorda se han empleado diferentes aditivos, entre ellos, los antioxidantes han tenido un papel relevante. Dentro de este tipo de productos el ácido alfa lipoico (AAL) ha destacado, pues se ha observado que su adición en la dieta ofrece diferentes beneficios a los animales. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar las respuestas productivas y la calidad de la carne del pollo de engorda con la administración de AAL en diferentes dosis (0, 40, 80, 160 y 320 ppm). El experimento se dividió en dos fases, en la primera se evaluó el desempeño productivo de 1,000 aves que fueron divididas en 5 tratamientos con 200 animales cada uno, la duración de esta prueba fue 49 días. En la segunda fase se realizó el sacrificio de los animales, se obtuvieron 20 muestras por tratamiento y se realizaron pruebas de la calidad de la carne. Los resultados de las variables productivas y de las pruebas de calidad en la carne fueron analizados mediante un modelo completamente al azar. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) por la adición de AAL sobre las variables productivas; sin embargo, los pollos que recibieron 40 ppm de AAL perdieron menor cantidad de agua por cocción.

PALABRAS CLAVE: Ácido alfa lipoico, Calidad de la carne, Pollo de engorda.

ABSTRACT

Broilers production has been employed various additives, including antioxidants that have played an important role in it. Within these products, alpha lipoic acid (ALA) has distinguished; its addition in the diet provides different benefits to the animals. Therefore, the objective of this study was to evaluate the productive performance and meat quality of broilers with use of ALA in different doses (0, 40, 80, 160 and 320 ppm). The experiment was divided into two phases, the first productive performance was evaluated using 1,000 birds that were divided into five treatments with 200 animals each; the duration of this test was 49 d. In the second phase the sacrifice of animals was performed, 20 samples were obtained by treatment and testing the meat quality of them. The results of the production and quality meat variables were analyzed in a completely randomized design. No significant differences ($P > 0.05$) were found by the addition of ALA on productive variables; however, chicks receiving 40 ppm of ALA lost less water by cooking.

KEY WORDS: Alpha lipoic acid, Meat quality, Broilers.

En México, la producción de pollo ha mantenido una tendencia de crecimiento muy elevada,

Chicken production in Mexico has been increasing steadily in response to growing

Recibido el 6 de febrero de 2014. Aceptado el 8 de mayo de 2014.

^a Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D.F. 04510, México.

^b Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP. Ajuchitlán, Colón, Oro. México.

^c Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih., México.

^d Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. México D.F. México.

^e Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN), Secretaría de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM, Blvd. B. Quintana 514-D, Col. Arboledas, 76140, Querétaro, Oro. México. Tel 01 442 2381032. ofemora66@unam.mx. Correspondencia al último autor.

situación que ha sido influida principalmente por la creciente demanda de carnes blancas y en especial por sus precios, los cuales resultan altamente competitivos con respecto a otros cárnicos. Este elevado crecimiento de la producción, obedece a un fuerte nivel de tecnificación, similar al observado en países desarrollados, lo que se refleja en una alta eficiencia y en costos de producción bajos⁽¹⁾.

Durante los últimos 30 años, la selección avícola se centró en lograr aumentos en la velocidad de crecimiento de las líneas de carne; sin embargo, a consecuencia de esto se afectó negativamente el metabolismo del ave, su estructura muscular y la calidad de la carne⁽²⁾. Además, se observó que las tasas elevadas de crecimiento pueden originar anomalías morfológicas⁽²⁾. Lo anterior, indica que las mejoras basadas en la selección genética tienen un límite que ya se está alcanzando, por ello los avicultores han optado por el uso de aditivos para mejorar la producción, tales como coccidiostatos, enzimas, saborizantes, antioxidantes, por mencionar algunos. Dentro de los antioxidantes se encuentra el ácido alfa lipoico (AAL), que es un ácido graso derivado del ácido octanoico que integra en su estructura dos átomos de azufre, los cuales le confieren varias de sus características particulares. El AAL participa como cofactor de dos complejos enzimáticos importantes en el ciclo de Krebs: la piruvato deshidrogenasa y la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa⁽³⁾.

El AAL ha sido usado en animales, tanto de laboratorio^(4,5) como de granja (pollo de engorda, codornices y cerdos), en los que se ha observado una mejora en la ganancia de peso y la disminución de problemas asociados con el estrés calórico y el síndrome ascítico, además del papel que ha desempeñado en la estimulación de la sensibilidad a la insulina⁽⁶⁻¹⁰⁾. El Cuadro 1 muestra algunos experimentos en los que el AAL ha sido evaluado empleando distinto modelo animal, cuyos resultados revelan efectos positivos de ese ácido sobre la ganancia de peso y en diferentes variables de calidad en la carne. Sin embargo, los modelos experimentales

demand for white meats, and its more competitive pricing compared to other meats. This high growth rate has been facilitated by production technology analogous to that in developed countries, high efficiency rates and low production costs⁽¹⁾.

Genetic selection in poultry during the last thirty years has focused on augmenting growth rates in broiler lines. However, this has negatively affected animal metabolism, muscle structure and meat quality⁽²⁾. Very high growth rates can also cause morphological abnormalities⁽²⁾. Apparently, line improvement based on genetic selection is reaching its limit. To improve production, poultry producers are now opting for use of additives such as coccidiostats, enzymes, flavorings and antioxidants, among others. Alpha-lipoic acid (ALA) is a fatty acid derived from octanoic acid. It includes two sulphur atoms in its structure, which confer it specific characteristics. It participates as a cofactor in two enzymatic complexes in the Krebs cycle: pyruvate dehydrogenase and a-ketoglutarate dehydrogenase⁽³⁾.

As an antioxidant, ALA has been used in laboratory animals^(4,5), as well as farm animal systems (e.g. broiler chickens, quail and pigs). Addition of ALA has been shown to improve weight gain, decrease problems associated with caloric stress and ascites syndrome, and stimulate insulin sensitivity⁽⁶⁻¹⁰⁾. Although many studies have shown ALA's positive effects on weight gain and meat quality (Table 1), very different experimental models and inclusion levels (e.g. 10 to 10,000 ppm) were used, which may partially explain the wide variation in results.

The present study objective was to test five ALA inclusion levels (0, 40, 80, 160 and 320 ppm) in broiler chicken diets and evaluate their effects on production parameters and meat quality.

Animal trials were run at the Ajuchitlán, Querétaro, experimental farm of the National Center for Disciplinary Research in Animal

y las dosis utilizadas han sido muy amplias (de 10 a 10,000 ppm), lo que podría explicar parte de la variación que se observa en los resultados obtenidos.

Tomando como referencia las diversas dosis administradas (Cuadro 1), se optó por emplear como base el trabajo de Díaz⁽⁸⁾, donde se usaron 10, 20 y 40 ppm, presentando el mejor resultado la dosis de 40 ppm. No obstante esto, se quería saber si con dosis más altas mejoraría la ganancia de peso y la calidad de la carne, por lo que se decidió usar además 80, 160 y 320 ppm de AAL.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue probar tales dosis de AAL (0, 40, 80, 160 y 320 ppm) incorporadas en la dieta de pollos de engorda para evaluar su efecto en las variables productivas y en la calidad de la carne.

La investigación se realizó en la granja experimental del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENID-FyMA), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Ajuchitlán, Querétaro. Las pruebas de calidad de carne se realizaron en el laboratorio de

Physiology and Improvement (Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal - CENID-FyMA) of the National Institute for Forestry, Agriculture and Livestock Research (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias - INIFAP). Meat quality tests were done at the Biochemistry Laboratory of the Faculty of Zootechny and Ecology, Autonomous University of Chihuahua (Universidad Autónoma de Chihuahua).

Trials were run using a total of 1,000 recently hatched male Ross 308 line chicks. Two hundred chicks were assigned to each treatment (i.e. inclusion level), and divided into eight corrals per treatment (each corral was a replicate), with 25 animals per corral. Corrals were distributed using a random block design. Previous studies had shown wide variation in results due to drastic differences in ALA inclusion levels. One study using 10, 20 and 40 ppm levels in broiler chickens showed optimum results at the 40 ppm level⁽⁸⁾. However, slightly higher inclusion levels may improve weight gain and meat quality. Five dietary ALA levels (0, 40, 80, 160 and 320 ppm) were tested throughout the three-phase, 49-d experimental

Cuadro 1. Experimentos en los cuales se usó el ácido lipoico sobre distinto modelo animal

Table 1. Some previous studies using lipoic acid in animal models

Authors	Concentration	Model	Effect
Hamano <i>et al</i> , 1999 ⁽³⁴⁾	5 and 50 ppm	Broiler chickens	Collaborates in energy metabolism as possible facilitator in b-adrenergic response
Berg <i>et al</i> , 2003 ⁽⁷⁾	150 ppm	Finished pigs	Improved loin pH
Díaz <i>et al</i> , 2003 ⁽⁸⁾	10, 20 and 40 ppm	Broiler chickens	40 ppm improved feed conversion and lowered mortality from ascites
Shen <i>et al</i> , 2005 ⁽⁴⁾	5,000 and 10,000 ppm	Mice	Increased muscle tissue, reduced adipose tissue and raised carcass pH
Hamano, 2006 ⁽¹⁰⁾	200 and 400 ppm	Broiler chickens	Stimulated tissue insulin sensitivity and promoted lipolysis
Wang <i>et al</i> , 2010 ⁽⁵⁾	0.75 % in drinking water	Senile mice	Improved carcass composition and lean mass, promoted mitochondrial biogenesis
Arshad <i>et al</i> , 2011 ⁽⁶⁾	25, 75 and 150 ppm + a-tocopherol	Broiler chickens	Promoted better carcass shelf life
Halici <i>et al</i> , 2011 ⁽⁹⁾	250 ppm	Quail	Counteracted effects of caloric stress

Bioquímica de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Se empleó un total de 1,000 pollitos machos, recién eclosionados, de la línea Ross 308, usando 200 animales por tratamiento, los cuales se dividieron en ocho corrales para cada dosis probada, colocando 25 animales por corral, cada corral correspondió a una repetición. Los corrales se distribuyeron mediante un diseño de bloques al azar. Se probaron cinco niveles de AAL: 0, 40, 80, 160 y 320 ppm en el alimento, que fueron adicionados durante toda la engorda (49 días). Se evaluó la ganancia diaria de peso, el consumo de alimento, la conversión alimenticia y el peso final.

Los animales se alimentaron con un producto comercial (Pollo Sow de Nutri Sow®) en un esquema de tres fases, cada una con las características que se indican en el Cuadro 2. El alimento comercial se molió y fue colocado en una mezcladora donde se adicionaron las diferentes dosis de AAL; después el alimento mezclado se identificó y almacenó para proporcionárselo a las aves posteriormente.

Los animales se mantuvieron en un horario de 24 h de luz durante todo el experimento, a fin de promover un mayor consumo de alimento. No se aplicó ninguna vacuna ni se adicionó otro aditivo ajeno al alimento, ya que éste incluía vitaminas y minerales, además, en las fases II y III se incluían pigmentos amarillos.

Al terminar la Fase III todos los pollos se sacrificaron en la planta de procesamiento de aves Tipo Inspección Federal Pollo de Querétaro S. A. de C. V., localizada en el municipio de Colón, Querétaro. Previamente al sacrificio, los animales se ayunaron durante un periodo de 10 h, permitiéndoseles sólo el acceso al agua *ad libitum*. Al momento del sacrificio se seleccionaron, al azar, 20 canales por cada tratamiento (incluyendo todas las repeticiones), las cuales se enfriaron a 4 °C durante 24 h. Posteriormente, se tomaron las muestras que

period. Data were collected on daily weight gain, feed intake, feed conversion rate and final weight.

A commercial feed was administered in a three-phase growth scheme (Table 2). The commercial feed was ground, placed in a mixer and ALA added in the amount required to produce diets containing the five tested ALA proportions. Prepared diets were identified and stored until use.

A 24 h light photoperiod was used throughout the experimental period to promote greater feed intake. No vaccines were administered to animals. Neither were other additives included in the diets since the commercial feed was formulated with vitamins and minerals. Yellow pigments were added in phases II and III.

At the end of Phase III all animals were slaughtered at a Federal Inspection Type (Tipo Inspección Federal - TIF) poultry processing plant (Pollo de Querétaro S.A. de C.V., Colón, Querétaro). Before they were killed the animals were fasted for 10 h, with free access to water. When killed, 20 carcasses were selected randomly from each treatment (including all replicates), and cooled to 4 °C for 24 h. Two samples of breast meat were then taken, one to measure cooking loss and the other for the remaining tests. The breasts were frozen at -30 °C until use.

Cuadro 2. Composición proximal del alimento empleado en las fases de producción de pollo de engorda (%)

Table 2. Proximate composition of feed used in three broiler chicken production phases (%)

Composition	Phase 1 (1-21 d)	Phase II (22-35 d)	Phase III (36-49 d)
Moisture	12.0	12.0	12.0
Fat	3.0	3.0	3.0
NFE	54.0	56.5	59.5
Protein	21.5	19.5	17.5
Crude fiber	3.5	3.5	3.0
Ash	6.0	5.5	5.0

serían usadas para las pruebas de calidad de la carne, obteniendo dos muestras de pechuga por cada canal, una sería usada para medición de la pérdida de agua por cocción y la otra sería empleada en el resto de las pruebas. Las pechugas se congelaron a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Para determinar la calidad de la carne se realizaron las siguientes pruebas:

Rendimiento de la pechuga. Después del sacrificio las canales se procesaron de forma convencional, almacenándose a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Pasado este periodo se tomaron los pesos de las canales en frío y, posteriormente, el peso de las pechugas deshuesadas, considerando tanto el músculo pectoral mayor como el menor, expresando el resultado como porcentaje del peso de la canal en frío.

Determinación del pH. El pH de las carne se midió durante dos ocasiones en el músculo pectoral o pechuga (*Pectoralis major*), con un potenciómetro portátil de la marca HANNA modelo HI 99163 (HANNA® instruments, USA). La primera medición del pH se tomó a los 15 min *post mortem*^(11,12) (pH_{15}) insertando el electrodo a 1 cm de profundidad, con calibraciones del equipo cada 30 a 50 mediciones con soluciones buffer de $\text{pH}=4$ y $\text{pH}=7$ ^(12,13). Las canales se enfriaron durante 24 h para alcanzar una temperatura interna de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; posteriormente, se procedió a medir el pH final a las 24 h *post mortem* (pH_{24}), justo en el mismo punto en donde se realizó la lectura anterior pH_{15} ⁽¹²⁾.

Determinación del color. Se usó un colorímetro modelo CR-410 (Konica Minolta, USA) el cual tiene como referencia el sistema CIE $L^*a^*b^*$ ⁽¹⁴⁾, determinando los valores de luminosidad (L^*), índice de rojo (a^*) e índice de amarillo (b^*). El iluminante seleccionado fue D65, con un ángulo de medición de 2° y enfoque de 8 mm^(12,15). La medición del color se realizó a las 24 h *post mortem*, tomándose la lectura en la zona de la pechuga, tanto sobre la piel como sobre el músculo pectoral mayor. Para el caso del

Six meat quality variables were measured using the breast meat:

Breast yield. The carcasses were processed using conventional techniques and stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. They were then weighed cold, and again after deboning, considering both the pectoralis major and minor muscles. Results were expressed as a percentage of cold carcass weight.

pH. Meat pH was measured twice in the pectoralis major or breast, using a portable potentiometer (HI 99163, HANNA® Instruments, USA). The first measurement was taken 15 min post mortem (pH_{15}) by inserting the electrode to 1 cm depth and calibrating the device every 30 to 50 measurements using pH 4 and pH 7 buffer solutions^(11,12,13). After chilling for 24 h to lower breast internal temperature to $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, a second measurement was taken (pH_{24}) at exactly the same point at which pH_{15} had been measured⁽¹²⁾.

Color. Based on the CIE $L^*a^*b^*$ system⁽¹⁴⁾, luminosity (L^*), red index (a^*) and yellow index (b^*) values were measured using a colorimeter (CR-410, Konica Minolta, USA). The selected illuminant was DE65, with a 2° measurement angle and an 8 mm focus^(12,15). Color measurements were taken 24 h post mortem on the breast, in areas of skin and muscle tissue. To measure color on the muscle tissue, while avoiding the excessive shine found on the breast muscle surface, the skin was removed and a measurement taken on the medial surface, wishbone side^(11,12,16).

The deboned breasts were stored in a vacuum and frozen at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use. Before measuring other variables, the breasts were defrosted at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight, then left at room temperature until fully defrosted.

Water holding capacity. Following the technique of Grau and Hamm⁽¹⁷⁾, a 0.3 g sample was placed between two sheets of 0.5 m porosity filter paper, and then between two 12 x 12 cm

músculo, antes de la medición se retiró la piel y se midió el color sobre la superficie medial del lado de la fúrcula con el fin de evitar el brillo excesivo de la superficie del músculo de la pechuga^(11,12,16).

Posteriormente, las pechugas deshuesadas fueron envasadas al vacío y congeladas a -30 °C hasta el momento de efectuar las demás mediciones. Para descongelar las pechugas, éstas se colocaron en refrigeración a 4 °C durante toda la noche, en la mañana siguiente se retiraron del refrigerador y se mantuvieron a temperatura ambiente para finalizar el proceso de descongelación.

Capacidad de retención de agua. Se midió con la técnica de Grau y Hamm⁽¹⁷⁾ modificada, en la cual se utilizó una muestra de 0.3 g que fue colocada entre dos hojas de papel filtro con porosidad de 0.5 m, para después ser posicionada entre dos placas de plexiglass de 12 x 12 cm² aplicando una fuerza con un peso de 10 kg durante 15 min^(17,18). El porcentaje de agua perdida se expresó como agua libre y la capacidad de retención de agua se determinó restando el agua libre de 100.

Pérdida por goteo. Se determinó por el método gravimétrico a las 24 h *post mortem*, usando una porción del músculo pectoral de 3 g que fue suspendida dentro de un recipiente de plástico lo más hermético posible, a fin de evitar que la muestra se secase, manteniéndose a 3 °C durante 48 h. El resultado se expresó como porcentaje de la masa muscular inicial, esto es [peso perdido por goteo/peso inicial de la carne] x 100^(12,16,19).

Agua perdida por cocción. Para este análisis, la carne se empaquetó al vacío y se congeló a -30 °C, posteriormente la carne (músculo *Pectoralis major*) se descongeló como se explicó previamente, para después pesarla y cocerla en agua a 85 °C durante 15 min, hasta alcanzar una temperatura interna de 75 a 80 °C, se enfrió y pesó nuevamente, obteniendo así el agua perdida por descongelación-cocción; el

Plexiglas squares under 10 kg of force for 15 min^(17,18). Water loss was expressed as released water, and water holding capacity (WHC) calculated by subtracting free water values from 100.

Drip-loss. Twenty-four hours post mortem, a 3 g portion of breast muscle was suspended inside a hermitically sealed plastic container (to avoid water loss from evaporation) for 48 h at 3 °C. Results were expressed as a percentage of initial muscle mass: [weight loss by drip/initial weight] x 100^(12,16,19).

Cooking loss. Breast meat was packed in a vacuum, frozen at -30 °C and defrosted as described previously. It was then weighed, and cooked in water at 85 °C for 15 min, until reaching 75 to 80 °C internal temperature. It was cooled and weighed again. Loss from freezing/cooking was expressed as a percentage of fresh muscle weight⁽¹¹⁾.

Texture. This variable was quantified in cooked muscle tissue by measuring shear force (Warner-Bratzler) with a materials tester (LS1, Lloyd Instruments, USA). Cooking technique (i.e. heating rate and final temperature in thermal center) was standardized, and internal temperature varied from 75 to 80 °C. Sample size, location within the muscle, fiber orientation vis-a-vis the cutting blade and presence of connective tissue were controlled for⁽¹²⁾. A minimum of three samples (1 cm high x 1.5 cm wide x 5 cm long) from each breast sample were cut parallel to the longitudinal orientation of the muscle fibers. During cutting, samples were positioned with muscle fibers perpendicular to the blade⁽¹²⁾.

Productive variable and meat quality data were analyzed with a completely random model, using the general linear models procedure. Differences between the means were identified with the least squares differences method. A distribution test was run for the pH data, and all the percentage values were arc-sine square-root transformed for analysis.

resultado obtenido se expresó como porcentaje del peso del músculo fresco⁽¹¹⁾.

Textura. La textura se evaluó midiendo la fuerza de corte (Warner-Bratzler) con el equipo LLOYD LS1 (USA), empleando cortes de carne después de cocinarse, por lo que se estandarizó el método de cocinado (velocidad de calentamiento y temperatura final en el centro térmico). La temperatura interna osciló entre 75 y 80 °C. Siempre se tuvo en cuenta el tamaño de muestra, la localización dentro del músculo, la orientación de las fibras a la hoja de la cuchilla y la presencia de tejido conectivo⁽¹²⁾. Las muestras se cortaron paralelas a la orientación longitudinal de las fibras musculares tomando siempre una muestra del mismo tamaño (1 cm de alto x 1.5 cm de ancho x 5 cm de largo), y se repitió tres veces para cada muestra de pechuga como mínimo. Las muestras se posicionaron de forma que la navaja cortara las fibras de manera perpendicular⁽¹²⁾.

Los datos de las variables productivas y los obtenidos de las pruebas para calidad de la carne se analizaron mediante un modelo completamente al azar, con el procedimiento de modelos lineales generales. Las diferencias entre medias se evaluaron usando el método de las diferencias mínimo cuadráticas. Se realizó una prueba de distribución para el caso del pH,

No differences in final weight and weight gain were identified between the 40, 80 and 160 ppm treatments. The 320 ppm treatment had values below the other ALA treatments but not different ($P>0.05$) from the control treatment (i.e. 0 ppm)(Table 3). Feed intake was lower ($P<0.05$) in the 320 ppm treatment than in all other treatments, including the control. Feed conversion rate (FCR) differed between treatments; the 80, 160 and 320 ppm treatments had values lower ($P<0.05$) than those of the 0 and 40 ppm treatments. The present results partially coincide with a study of the effects of ALA in pig diets in which no effects were observed on carcass weight⁽⁷⁾.

The present data for total feed intake, final weight and weight gain showed that the 320 ppm ALA level had a negative effect on these variables. This may be caused by a decrease in hypothalamic AMPK activity in response to this inclusion level. Voluntary feed intake would consequently decrease, leading to lower weight gain and lower carcass weight, as reported elsewhere⁽²⁰⁾. The present results support those of studies in which the lowest weights were observed at the highest ALA inclusion level (150 mg/kg feed) administered in tandem with α -tocopherol (200 ATA mg/kg feed). In another study, addition of 40 ppm ALA in broiler chickens had no effect on feed intake, but did increase

Cuadro 3. Efecto de diferentes niveles de ácido alfa lipoico (ALA) en la dietas sobre parámetros productivos de pollos de engorda

Table 3. Effect of different α -lipoic acid (ALA) inclusion levels on production parameters in broiler chickens

ALA (ppm)	Final weight (kg)		Total intake (kg)		Weight gain (kg)		Feed conversion	
	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE
0	2.24 ^{a,b}	0.02	5.06 ^a	0.06	2.19 ^{a,b}	0.02	2.26 ^a	0.02
40	2.27 ^a	0.02	5.18 ^a	0.06	2.23 ^a	0.02	2.28 ^a	0.02
80	2.32 ^a	0.02	5.17 ^a	0.06	2.28 ^a	0.02	2.23 ^{ab}	0.02
160	2.30 ^a	0.02	5.06 ^a	0.06	2.26 ^a	0.02	2.19 ^b	0.02
320	2.18 ^b	0.02	4.86 ^b	0.06	2.14 ^b	0.2	2.23 ^{ab}	0.02

^{a,b} Different letter superscripts in the same column indicate significant difference ($P<0.05$), n=20.

SE = Standard error.

y todos los valores que estaban expresados como porcentaje se transformaron a la raíz cuadrada del arco-seno para su análisis.

En el Cuadro 3 se observan las medias y el error estándar del peso final, ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia en 49 días de evaluación. Respecto al peso final y la ganancia de peso, se puede observar que no existió diferencia entre los tratamientos 40, 80 y 160 ppm, sólo el nivel de 320 ppm de AAL mostró valores menores que el resto de las dosis, pero iguales al testigo ($P>0.05$). A su vez, el consumo de alimento fue menor ($P<0.05$) en los animales que recibían 320 ppm de AAL con respecto a todos los tratamientos incluyendo al testigo. En el caso de la conversión alimenticia se observaron algunas diferencias entre tratamientos, la dosis de 160 ppm presentó el menor valor, siendo diferente a los niveles de 0 y 40 ppm, pero igual al resto de los tratamientos ($P<0.05$). En los experimentos realizados por Berg et al.⁽⁷⁾ con cerdos, no se observaron efectos sobre el peso de la canal al adicionar ácido alfa lipoico en su dieta.

Como se puede ver en los resultados de consumo total de alimento, peso final y ganancia de peso del presente trabajo, la mayor dosis de AAL (320 ppm) ejerció un efecto negativo

daily weight gain and feed conversion⁽⁸⁾. However, other authors report no differences in chickens fed different ALA levels⁽²²⁾.

Meat color exhibited lower L* values for all treatments except the 320 ppm, a lower a* value in the 160 ppm treatment, and lower b* values in all the ALA treatments (Table 4). Skin color did not differ ($P>0.05$) between treatments. No data have been published on color measurements directly on breast meat from chickens fed ALA-supplemented diets, although color data have been reported for raw chicken meat in the form of nuggets and hamburgers⁽²¹⁾. In the nuggets at day 0, the control did not differ from the lowest ALA level (25 mg ALA/kg feed), which, in turn, did not differ from the other tested ALA levels. The hamburger patties in the control also did not differ from the lowest level, but did differ from the treatments with higher ALA levels. In the present results, the breast meat exhibited higher yellow (b*) than red (a*) values. This could be partially due to low final pH, which reduces myoglobin's absorption of red light (negative a* value), resulting in meat that appears less red and more yellow⁽²³⁾.

Only the color of breast meat was evaluated here. It should be noted that breast meat has

Cuadro 4. Efecto de diferentes niveles de ácido alfa lipoico (ALA) en la dietas sobre el color de la carne y piel de pollos de engorda

Table 4. Effect of different α -lipoic acid (ALA) inclusion levels on meat and skin color in broiler chickens

ALA (ppm)	Meat						Skin					
	L*		a*		b*		L*		a*		b*	
	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE
0	55.18 ^b	0.49	11.45 ^a	0.58	23.24 ^b	0.46	72.46	1.06	7.18	0.54	38.45	1.49
40	53.11 ^a	0.48	9.88 ^{a,b}	0.57	21.61 ^a	0.46	72.21	1.06	7.21	0.54	35.49	1.49
80	52.70 ^a	0.48	10.07 ^a	0.57	22.43 ^{a,b}	0.46	71.97	1.12	7.51	0.57	39.44	1.57
160	52.25 ^a	0.48	8.44 ^b	0.57	22.13 ^{a,b}	0.46	71.75	1.12	8.07	0.57	35.97	1.57
320	53.86 ^{a,b}	0.48	10.30 ^a	0.57	21.80 ^a	0.46	73.24	1.06	6.98	0.54	36.32	1.49

L* = Luminosity; a* = Red index; b* = Yellow index.

a,b Different letter superscripts in the same column indicate significant difference ($P<0.05$), n=20.

SE = Standard error.

debido a que en estos parámetros se obtuvieron los valores más bajos, esto puede deberse a que dicha dosis disminuye la actividad de la AMPK hipotalámica, reduciendo de esta forma, el consumo voluntario, lo que trae como consecuencia menor ganancia de peso y por ende menor peso corporal, tal como se ha visto en trabajos previos⁽²⁰⁾.

Los resultados obtenidos con la mayor dosis, 320 ppm, concuerdan con lo observado por otros autores^(6,21), quienes administraron ácido alfa lipoico junto con alfa-tocoferol y observaron que el grupo con la mayor dosis (150 mg AAL + 200 mg ATA/kg de alimento) presentó el menor peso. En este sentido los resultados de Díaz *et al*⁽⁸⁾ muestran que 40 ppm de AAL en la dieta, no tuvieron efecto sobre el consumo de alimento, pero sí mejoraron la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia. Sin embargo, otros autores⁽²²⁾ no encontraron diferencias entre sus tratamientos con diferentes dosis en los pollos de engorda.

En el Cuadro 4 se aprecia que en el caso del color de la carne, hubo una disminución de L* para todos los tratamientos que recibieron AAL excepto 320 ppm, un menor valor de a* para la dosis de 160 ppm y una disminución de b* para todos los niveles de AAL. En el caso del color de la piel, no hubo diferencias ($P>0.05$). Respecto a los valores de color de la carne,

a lower myoglobin concentration, and therefore a lighter color, than other pieces such as the leg⁽²⁴⁾. All the tested ALA levels affected ($P<0.05$) meat color. Compared to the control, the 40 and 160 ppm levels resulted in less luminous meat with less red and yellow intensity. The 80 ppm treatment produced meat that was less luminous, but with the same red and yellow intensities as the control. Finally, the 320 ppm treatment only lowered yellow intensity, having no effect on luminosity or red intensity. In contrast, none of the treatments affected skin color.

Of the ALA treatments, the 160 ppm had the highest ($P<0.05$) shear force value, meaning that addition of ALA generally lowered meat tenderness *versus* the control (Table 5). This differs from a study reporting the effect of ALA inclusion at 0, 30, 60 and 90 d in which only the lowest level (200 mg ATA + 25 mg ALA/kg feed) was tenderer than the control and the other treatments (200 mg ATA + 75 or 150 mg ALA/kg feed). The higher shear force values in the 160 ppm treatment may have been due to differences in tissue architecture⁽²⁵⁾.

Addition of ALA reduced cooking loss without affecting WHC and drip loss. With the exception of the 80 ppm treatment, cooking loss was lower in the ALA treatments. No differences ($P>0.05$) between treatments were observed

Cuadro 5. Efecto de diferentes niveles de ácido alfa lipoico (ALA) en la dieta sobre las características de la carne en pollos de engorda

Table 5. Effect of different α -lipoic acid (ALA) inclusion levels on meat quality parameters in broiler chickens

ALA (ppm)	Shear force (kgf)		Cooking Loss (%)		Water holding capacity (%)		Drip loss (%)		pH ₁₅		pH ₂₄		Breast yield (%)	
	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE
0	1.72 ^{a,b}	0.03	20.67 ^a	0.67	52.76	0.62	2.17	0.1	6.52 ^a	0.04	5.25 ^a	0.09	19.21	0.04
40	1.59 ^a	0.03	17.20 ^b	0.67	53.94	0.62	1.99	0.1	6.65 ^b	0.04	5.18 ^a	0.09	19.49	0.04
80	1.65 ^a	0.03	19.28 ^{a,b}	0.67	53.86	0.62	2.12	0.1	6.74 ^b	0.04	5.05 ^{a,b}	0.09	19.23	0.04
160	1.79 ^b	0.03	18.24 ^b	0.67	53.42	0.62	2.17	0.1	6.73 ^b	0.04	4.98 ^b	0.09	20.23	0.04
320	1.64 ^a	0.03	18.55 ^b	0.67	53.90	0.62	2.06	0.1	6.60 ^{a,b}	0.04	5.08 ^{a,b}	0.09	19.62	0.04

a,b,c, d Different letter superscripts in the same column indicate significant difference ($P<0.05$), n=20.

SE = Standard error.

aun cuando no existen reportes en la literatura de mediciones directas sobre la pechuga, sí existen datos de otros autores⁽²¹⁾ que evaluaron la carne cruda de la pechuga en presentación de nugget y hamburguesa, y muestran que para el caso de los nuggets el testigo fue similar al tratamiento con la menor dosis (25 mg AAL/kg alimento); dicho tratamiento, a su vez, no presentó diferencia con el resto de los niveles de AAL. Mientras que para el caso de la hamburguesa el testigo también fue similar al tratamiento con la menor dosis, pero diferente de las demás concentraciones de AAL, todo esto tomando en cuenta únicamente los datos del día 0. Respecto a a^* y b^* , se puede observar que la carne presentó valores mayores para el índice de amarillo que para el de rojo, esto fue causado, en parte, por un pH final bajo, que reduce la absorción de la luz verde (valor negativo de a^*) de la mioglobina, y resulta en una carne que parece menos roja y más amarilla⁽²³⁾.

En el presente trabajo sólo se evaluó el color de la carne de la pechuga y se debe tomar en cuenta que ésta contiene una baja concentración de mioglobina, por lo que su color es más claro que otras piezas, como el muslo⁽²⁴⁾. En general, todas las concentraciones de AAL afectaron el color de la carne ($P < 0.05$), los niveles de 40 y 160 ppm de AAL produjeron carne menos luminosa, y con menor intensidad de rojo y de amarillo en comparación con la carne del tratamiento testigo. El nivel de 80 ppm de AAL también mostró carne menos luminosa que el testigo, pero con igual intensidad de color rojo y amarillo que el mismo testigo; a su vez, el tratamiento de 320 ppm AAL solamente disminuyó la intensidad de color amarillo de la carne, pero mostró una luminosidad y una intensidad de color rojo igual que la carne del tratamiento testigo. Sin embargo, para el caso de piel no fue así, pues no se presentó ninguna diferencia atribuida a los tratamientos.

En el Cuadro 5 se observa que la dosis 160 ppm obtuvo el mayor valor en la fuerza de

for water holding capacity, drip loss and breast yield. Water holding capacity values aid in quantifying muscle fiber integrity. High WHC values suggest that muscle fiber has maintained its integrity during the transition from muscle to meat. Lower WHC values indicate a greater loss of intracellular liquids from muscle fiber⁽⁷⁾. As reported previously⁽¹²⁾, drip loss in the tested breast meat did not differ between treatments. Initially developed to evaluate the abundant water loss in pork, this test does not identify notable differences in chicken, which has lower drip-loss values. Extending time period in this test up to three days (72 h) at 4 °C would better identify any possible differences between treatments⁽¹⁹⁾.

Administering an antioxidant could promote muscle fiber cell membrane integrity, leading to high WHC values^(26,27). Only cooking loss values for three of the treatments (40, 160 and 320 ppm) behaved as expected, while the remaining cooking loss values, and all the WHC and drip loss values did not.

For pH₁₅, the 40, 80 and 160 ppm treatments had values different ($P < 0.05$) from the control, while the 320 ppm treatment did not differ ($P > 0.05$) from the control. At 24 h (pH₂₄), the 160 ppm treatment differed ($P < 0.05$) from all the other inclusion levels. Meat color can be influenced by pH⁽²⁸⁾; indeed, lower pH is reported to increase L^* values^(28,29,30). This agrees with the present initial pH values (pH₁₅) in which the control and 320 ppm treatments had the lowest pH values and the highest L^* values; these treatments did not differ in pH₁₅ or L^* .

Both muscle tissue glycogen content and the mechanism that converts glycogen into lactic acid can affect pH values^(31,32,33); these variables were not measured in the present study. Nonetheless, the fact that the 160 ppm pH₂₄ value was lower than the control may be explained by higher muscle glycogen content in this treatment in response to its higher FCR values. Another possible factor affecting muscle

corte que el resto de los tratamientos ($P>0.05$), excepto que el tratamiento testigo. Los resultados de fuerza de corte presentan discrepancias con lo observado por otros autores⁽²¹⁾, la adición de AAL disminuyó la dureza de la carne con excepción del nivel 160 ppm, el cual mostró una dureza igual que la carne del tratamiento testigo. Cabe mencionar que tales autores⁽²¹⁾ evaluaron el efecto a través del tiempo 0, 30, 60 y 90 días, pero si se toma como referencia únicamente el día 0, entonces el testigo fue igual al resto de las dosis (200 mg de ATA + 75, 150 mg de AAL/kg de alimento), siendo sólo la menor dosis (200 mg de ATA + 25 mg de AAL/kg de alimento) la que fue diferente. Los resultados observados en la fuerza de corte para el tratamiento de 160 ppm pueden ser debidos a cambios en la arquitectura tisular⁽²⁵⁾.

El AAL disminuyó la pérdida por cocción sin afectar la capacidad de retención de agua y la pérdida por goteo. La pérdida por cocción fue menor en las canales de los animales tratados con AAL, excepto para los animales que recibieron 80 ppm. En las pruebas de capacidad de retención de agua, pérdida por goteo y rendimiento de la pechuga no se presentaron diferencias ($P>0.05$). Los valores de capacidad de retención de agua dan una idea de la integridad de las fibras musculares, pues si éstas conservan una mayor cantidad de agua, se debe a que han mantenido su integridad durante la conversión de músculo a carne y por ende presentarán un valor mayor para esta variable. Contrariamente, al perder demasiada agua el resultado obtenido irá disminuyendo, lo que significa que hay más líquidos intracelulares que han salido de las fibras musculares⁽⁷⁾. Tampoco se presentaron diferencias para el caso de la prueba de pérdida por goteo, como otros autores mencionan⁽¹²⁾; esta prueba se desarrolló inicialmente para evaluar carne de cerdo en donde las pérdidas de agua son abundantes; sin embargo, para el caso de la carne de pollo que tiende a perder menor cantidad de agua por goteo, sería preferible que la prueba aumentara el periodo de duración

glycogen content is pre-slaughter stress in animals.

Overall, a-lipoic acid (ALA) had no significant effect on the evaluated productive parameters, although at the 320 ppm inclusion level it decreased feed intake and consequently lowered final weight. Lower levels (40 and 160 ppm ALA) decreased meat luminosity and red color, but neither effect was apparent at the 320 ppm level. Addition of ALA had no effect on skin color. Meat tenderness and cooking loss decreased with ALA inclusion without affecting water holding capacity or drip loss. Initial pH (pH₁₅) was higher with added ALA, but stabilized 24 h post mortem; the 160 ppm treatment had a slightly more acid pH than the control. Further research is needed using more animals per replicate to determine the optimum ALA level for productive and meat quality parameters.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was financed by project PAPIIT-UNAM IN200910. SSG received a CONACYT scholarship to study a Masters in Science at the Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM, México.

End of english version

hasta tres días manteniéndose a 4 °C como lo hicieron otros autores⁽¹⁹⁾, lo que permitiría determinar si realmente se presenta un efecto por causa del tratamiento.

Cabe recordar que al suministrarse un antioxidante a los animales puede promoverse la integridad de la membrana celular de las fibras musculares, por lo cual éstas tendrán mayor capacidad de retener agua^(26,27), como se mostró únicamente en la prueba de pérdida de agua por cocción (40, 160 y 320 ppm), un resultado similar era esperado para las pruebas

de capacidad de retención de agua y pérdida por goteo, pero no fue así.

Los valores obtenidos de la medición del pH₁₅ en los tratamientos 40, 80 y 160 ppm fueron diferentes al testigo ($P < 0.05$), aunque la dosis de 320 ppm presentó un resultado similar al resto de las dosis, éste no fue diferente del testigo ($P > 0.05$). Por otro lado, para el caso de la lectura de pH₂₄ sólo el tratamiento de 160 ppm fue diferente del resto de las dosis ($P < 0.05$). Se sabe que el pH pueden influenciar el color de la carne⁽²⁸⁾, pues se ha reportado que al disminuir el pH el valor de L* se incrementa^(28,29,30); esto concuerda con los valores de pH inicial, donde el testigo y el tratamiento 320 ppm tuvieron los valores de pH más bajos y la luminosidad más alta, siendo los valores iguales en ambos, tanto de pH₁₅ como de L*.

Dos de los factores que pueden ejercer efecto sobre el valor del pH son la cantidad de glucógeno contenido en el tejido muscular y el mecanismo que convierte el glucógeno en ácido láctico^(31,32,33). Aun cuando en este trabajo no se midieron estas variables, una posible explicación podría ser que la dosis de 160 ppm pudo promover una mayor cantidad de glucógeno muscular por una conversión alimenticia más eficiente, pues obtuvo un valor de pH₂₄ menor que el testigo, aunque no fue diferente de los tratamientos 80 y 320 ppm, pero se sabe que la cantidad de glucógeno disminuye por estrés previo al sacrificio.

En conclusión y a diferencia de trabajos previos, no se observó un efecto de AAL sobre los parámetros productivos; sin embargo, el AAL a dosis elevadas inhibió el consumo en los animales y por ende disminuyó el peso. Los niveles bajos de AAL (40 y 160 ppm) disminuyeron la luminosidad y el color rojo de la carne, pero ese efecto desapareció cuando el nivel de AAL subió a 320 ppm. El AAL no mostró efecto en el color de la piel de las aves. La adición de AAL disminuyó la dureza de la carne y la pérdida por cocción sin afectar la

capacidad de retención de agua y la pérdida por goteo. El pH₁₅ de la carne aumentó con el AAL, pero éste se estabilizó a las 24 h *post mortem*, cuando sólo el tratamiento 160 ppm AAL produjo carne ligeramente más ácida que la carne testigo. Estudios adicionales con un mayor número de aves por repetición serán necesarios para determinar cuál es la dosis idónea de AAL que permita obtener los resultados deseados, tanto en granja como en calidad de la carne.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto PAPIIT-UNAM IN200910. Sergio Sigler Galván agradece la beca otorgada por el CONACYT para la realización de sus estudios de Maestría en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM, México.

LITERATURA CITADA

1. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México. Coordinación General de Ganadería. México. 2009.
2. Dransfield E, Sosnicki AA. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. *Poult Sci* 1999;78:743-746.
3. Nesbitt NM, Cicchillo RM, Lee KH, Grove TL, Booker SJ. Lipoic Acid Biosynthesis. In: Lipoic acid, energy, production, antioxidant activity and health effects. 1st ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press. Taylor & Francis Group; 2008:11-13.
4. Shen Q, Jones C, Kalchayanand M, Zhu M, Du M. Effect of dietary alpha-lipoic acid on growth, body composition, muscle pH, and AMP-activated protein kinase phosphorylation in mice. *J Anim Sci* 2005;83:2611-2617.
5. Wang Y, Li X, Guo Y, Chan L, Guan X. Alpha-lipoic acid increases energy expenditure by enhancing AMPK-PGC-1 α signalling in the skeletal muscle of aged mice. *Metabolism* 2010;59:967-976.
6. 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;59:7346-7352.
7. Berg E, Maddock K, Linville M. Creatine monohydrate supplemented in swine finishing diets and fresh pork quality:

- III. Evaluating the cumulative effect of creatine monohydrate and alpha-lipoic acid. *J Anim Sci* 2003;81:2469-2474.
8. Díaz CA, 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 Pathol* 2003;32:645-653.
 9. Halici M, Imik H, Koç M, Gümüş R. Effects of α -lipoic acid, vitamins E and C upon the heat stress in Japanese quails. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2012;96:408-415.
 10. Hamano Y. Effects of dietary lipoic acid on plasma lipid, in vivo insulin sensitivity, metabolic response to corticosterone and in vitro lipolysis in broiler chickens. *Br J Nutr* 2006;95:1094-1101.
 11. Le Bihan-Duval E, Debut M, Berri C, Sellier N, Santé-Lhoutellier V, Jégo Y, *et al.* Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genetics* 2008;9:53.
 12. Petracci M, Baéza E. Harmonization of methodology of assessment of poultry meat quality features. Working paper of WPSA Working Group 5. Poultry Meat. 2009.
 13. Le Bihan-Duval E, Millet N, Remignon H. Broiler meat quality: Effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters. *Poult Sci* 1999;78:822-826.
 14. CIE. Commission Internationale de l'Eclairage. 18th session. Londres, Inglaterra. CIE Publication. 1976;36.
 15. Alarcón A, Duarte J, Rodríguez F, Janacua H. Incidencia de carne pálida-suave-exudativa (PSE) y oscura-firma-seca (DFD) en cerdos sacrificados en la región del Bajío en México. *Téc Pecu Méx* 2005;43:335-346.
 16. Alarcón A, Gamboa J, Alonso F, Grado J, Janacua H. Efecto de variables críticas del sacrificio sobre las propiedades físico químicas de la carne de cerdo. *Téc Pecu Méx* 2006;44:53-66.
 17. Grau R, Hamm R. Eine einfache Methode zur bestimmung der wasserbindung im muskel. *Die Naturwissenschaften* 1953;40:29-30.
 18. Boakye K, Mittal GS. Changes in pH and water holding properties of Longissimus dorsi during beef ageing. *Meat Sci* 1993;34:335-349.
 19. Allen CD, Fletcher DL, Northcutt JK, Russell SM. The relationship of broiler breast color to meat quality and shelf – life. *Poult Sci* 1998;77:361-366.
 20. Lee WJ, Song KH, Koh EH, Won JC, Kim HS, Park HS, *et al.* Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332:885-891.
 21. Sohaib M, Anjum F, Khan M, Arshad M, Shahid M. Enhanced of lipid stability of broiler breast meat and meat products fed on alpha lipoic acid and alpha tocopherol acetate supplemented feed. *Lipids Health Dis* 2012;11:57.
 22. Chen P, Ma Q, Ji C, Zhang J, Zhao L, Zhang Y, *et al.* Dietary lipoic acid influences antioxidant capability and oxidative status of broilers. *Int J Mol Sci* 2011;12:8476-8488.
 23. Castellini C, Mugnai C, Dal Bosco A. Effect of organic production system on broiler carcass and meat quality. *Meat Sci* 2002;60:219-225.
 24. Imik H, Ozlu H, Gumus R, Atasever MA, Urcar S, Atasever M. Effects of ascorbic acid and α -lipoic acid on performance and meat quality of broilers subjected to heat stress. *Br Poult Sci* 2012;53:800-888.
 25. MacIntosh BR, Gardiner PF, McComas AJ. Muscle architecture and muscle fiber anatomy. In: *Skeletal muscle: Form and function*. 2nd ed. Champaign, Illinois, USA: Human Kinetics; 2006;3-21.
 26. Cai S, Wu C, Gong L, Song T, Wu H, Zhang L. Effects of nano-selenium on performance, meat quality, immune function, oxidation resistance, and tissue selenium content in broilers. *Poult Sci* 2012;91:2532-2539.
 27. Hu C, Wang D, Pan H, Zheng W, Zuo A, Liu J. Effects of broccoli stem and leaf meal on broiler performance, skin pigmentation, antioxidant function, and meat quality. *Poult Sci* 2012;91:2229-2234.
 28. Schilling M, Radhakrishnan V, Vizzier-Thaxton Y, Christensen K, Joseph P, Williams J, Schmidt T. The effects of low atmosphere stunning and deboning time on broiler breast meat quality. *Poult Sci* 2012;91:3214-3222.
 29. Pekel A, Demirel G, Midilli M, Yalcintan H, Ekiz B, Alp M. Comparison of broiler meat quality when fed diets supplemented with neutralized sunflower soapstock or soybean oil. *Poult Sci* 2012;91:2361-2369.
 30. Samuel D, Trabelsi S. Influence of color on dielectric properties of marinated poultry breast meat. *Poult Sci* 2012;91:2011-2016.
 31. McKee SR, Sams AR. The effect of seasonal heat stress on rigor development and the incidence of pale, exudative turkey meat. *Poult Sci* 1997;76:1616-1620.
 32. Duclos MJ, Berri C, Le Bihan-Duval E. Muscle growth and meat quality. Poultry meat and egg quality symposium. *J Appl Poult Res* 2007;16:107-112.
 33. Wang RR, Pan XJ, Peng ZQ. Effects of heat exposure on muscle oxidation and protein functionalities of pectoralis majors in broilers. *Poult Sci* 2009;88:1078-1084.
 34. Hamano Y, Sugawara S, Kamota Y, Nagai E. Involvement of lipoic acid in plasma metabolites, hepatic oxygen consumption, and metabolic response to a β -agonist in broiler chickens. *Br J Nutr* 1999;82:497-503.

Experimento 2

Animales

Se usaron un total de 100 pollitos recién eclosionados de la línea Ross 308, la cual es una línea desarrollada para la producción de pollos de engorda.

Tratamientos

Para el experimento en granja se usaron 4 tratamientos, utilizando 25 pollos por tratamiento organizados como se muestra en el cuadro 4, distribuidos en bloques al azar. Donde el material experimental fue dividido en 2 grupos de 4 unidades experimentales (UE). Cada grupo conformó un bloque donde las UE se asignaron de forma aleatoria, ocurriendo una vez por bloque.

Cuadro 4.- Diferentes dosis de ácido alfa lipóico usadas.

Tratamiento	Dosis	Animales
Control	0	25
Ácido Lipóico	40 ppm	25
Ácido Lipóico	80 ppm	25
Ácido Lipóico	160 ppm	25

Dichos animales siguieron el proceso de una engorda convencional, durante la cual se evaluó la ganancia de peso, el consumo, la conversión alimenticia y el peso final.

Los animales se mantuvieron en un horario de 24 horas luz durante los periodos más calurosos del experimento a fin de recuperar el consumo perdido durante el día.

Se aplicó una dosis única de coccidicida al día 11 de edad (Baycox, en agua de bebida) y una vacuna contra coriza (Volvac AC Plus, Emul Bacterin, SC) a los 15 días de edad.

Los animales fueron alimentados con el alimento comercial Etiqueta Dorada, de la marca Purina, el cual satisfacía las demandas energéticas de acuerdo a los

datos proporcionados por el NRC (3,200 kcal ME/kg). La alimentación consistió de 2 fases, cada una con las características mencionadas en el cuadro 5.

Los animales fueron pesados al inicio y al final del ciclo, cuando fueron sacrificados y se tomaron muestras de corazón, pechuga y pierna, las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarse a -70°C hasta su uso.

Cuadro 5.- Composición de las dietas de las diferentes fases de alimentación de los pollos.

	Iniciarina	Engordina
Humedad	12 %	12%
Grasa	2%	2.5%
ELN	46%	50%
Proteína	21%	21.5%
Fibra cruda	9%	6%
Cenizas	10%	8%
Energía bruta (cal/g) B.H.	4007.85	3965.98
Energía bruta (cal/g) B.S.	4408.76	4380.58

Capacidad total antioxidante (TAC)

La TAC se evaluó en el suero y se siguió el protocolo del QuantiChrom™ Antioxidant Assay Kit (DTAC-100). El resultado se expresa como equivalentes μM de trolox; la cual es una medida de la capacidad antioxidante de una sustancia dada en comparación con el estándar de Trolox, que es un análogo de la vitamina E.

Biogenesis mitocondrial

Microscopía electrónica

Se tomó de forma aleatoria un animal de cada tratamiento para muestrearlo en diferentes regiones del tejido muscular de la pechuga, de las piernas y del corazón a fin de observar si la cantidad de mitocondrias aumentó. Estas técnicas fueron realizadas por el Dr. Alfonso Cárbaz Trejo con el protocolo manejado por

la Unidad de Microscopia del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla.

Determinación por qPCR de la cantidad de DNA mitocondrial (mtDNA)

La cantidad de DNA mitocondrial se determinó por PCR de tiempo real, midiendo la expresión de los genes *ND1* (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1) y *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Song y Lewis, 2008). El total del DNA se extrajo con los reactivos de QIAamp DNA mini kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para la extracción de mtDNA se consideraron los siguientes puntos:

- Todos los pasos en los que se centrifugó se llevaron a cabo a temperatura ambiente (15-25°C).
- Se evitó congelar y descongelar de forma constante las muestras almacenadas, pues esto reduce el tamaño del DNA.

Antes de iniciar el trabajo con las muestras se consideraron las siguientes indicaciones:

- Las muestras debían encontrarse a temperatura ambiente (15-25°C).
- Se prepararon 2 baños secos, uno a 56°C para el paso 3, y otro a 70°C para el paso 5.
- Se colocó a temperatura ambiente el buffer AE o el agua destilada usada para la elución en el paso 11.
- Se aseguró que los buffers AW1 y AW2 fueron preparados con la cantidad de etanol (96-100%) indicada por cada botella y colocados a temperatura ambiente.
- Se revisó que el Buffer ATL y AL no contuvieran precipitados, y de ser así se disolvieron incubando los reactivos a 56°C.

El procedimiento de extracción se describe en el Anexo 3.

Para determinar la expresión de los siguientes genes:

- Nuclear respiratory factor 1 (*NRF1*)
- GA-binding protein alpha chain (*NRF2* o *GABPA*)
- Mitochondrial transcription factor A (*TFAM*)
- Sirtuin 1 (*SIRT1*)
- 5' AMP-activated protein kinase alpha subunit (*AMPK α 1*)
- Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (*PGC-1 α*)

Se realizó la extracción de RNA, posteriormente se hizo la retrotranscripción para obtener el DNAc y finalmente el qPCR.

Extracción de RNA

Las muestras fueron procesadas mediante el protocolo estándar manejado en el laboratorio RuMeN para la extracción de RNA con trizol y se describe en el Anexo 4.

Retrotranscripción, DNAc

Una vez comprobada la pureza e integridad del RNA se realizaron los cálculos pertinentes para ajustar la cantidad de muestra necesaria a tomar para obtener 2000 ng de RNA para realizar la retrotranscripción de cada muestra. Se mezclaron 1.5 μ l de DNAsa con 12 μ l de Buffer 5X y con la cantidad requerida de cada muestra (RNA + agua = 48.5 μ l), incubado esta mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto las muestras se incubaron a 70°C durante 5 minutos a fin de inactivar a la DNAsa.

Una segunda mezcla fue hecha añadiendo a cada muestra 18 μ l, los cuales contenían: 2 μ l de Oligo dT (Sigma), 2 μ l dNTP's, 2 μ l Super Script II, 2 μ l RNAsa Out, 4 μ l de Buffer 5X y 6 μ l de agua.

Las muestras se corrieron en el termociclador con un programa de 50 minutos a 42°C, 15 minutos a 70°C y 3 minutos a 4°C.

Con las muestras obtenidas se procedió a la realización del PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real (qPCR)

Esta técnica consiste en separar las dos cadenas del DNA a elevadas temperaturas a través de ciclos para realizar copias de ellas a bajas temperaturas usando oligonucleótidos específicos, los cuales han sido previamente diseñados y probados, para un gen en particular. La técnica en cuestión hace uso de la Taq Polimerasa, que es una enzima termoestable capaz de sintetizar DNA en presencia de trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP's).

La PCR se utilizó para la cuantificación del mtDNA (*ND1* y *GAPDH*) así como de el resto de genes problema (*TFAM*, *NRF1*, *NRF2*, *AMPK*, *PGC-1 α* y *SIRT1*), todas estas pruebas se realizaron en los tejidos de corazón, pechuga y pierna.

La identidad de los fragmentos obtenidos se corroboró mediante electroforesis en geles de agarosa, donde se verificó el peso molecular esperado. Posteriormente las muestras fueron secuenciadas en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los resultados obtenidos de la secuenciación eran comparados mediante el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI.

En el Cuadro 6 se muestran los oligonucleótidos usados para los genes problema así como los empleados para los genes endógenos; mostrando primero los ocupados para la cuantificación del mtDNA y, posteriormente los usados para el resto de los experimentos.

Cuadro 6. Secuencias usadas de referencia para la elaboración de los oligonucleótidos para qPCR.

Gen	Secuencia de Referencia (NCBI)	Posición de los oligonucleótidos (5' ----- 3')	Tamaño del fragmento (pb)
<i>ND1</i>	AB753756.1 Gallus gallus mitochondrial ND1 gene for NADH dehydrogenase subunit 1, partial cds, haplotype: individual 1	Forward: ATT TCT CCT AGC CAT ATC AAG C Reverse: TTA AGG TGT AAT TGC CGC TCA	179
<i>GAPDH</i>	NM_204305.1 Gallus gallus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA.	Forward: AAGGCTGAGAACGGGA AACT Reverse: ATCAGCTGAGGGAGCTG AGA	201
<i>TFAM</i>	NM_204100.1 Gallus gallus transcription factor A, mitochondrial (TFAM), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA	Forward: AGG ACT TTC ACC TAC GGC AAA Reverse: CGT ATC AGG TCT TCA CGT CCA	174
<i>NRF1</i>	NM_001030646.1 Gallus gallus nuclear respiratory factor 1 (NRF1), mRNA	Forward: TCT ACG CAT TTG AGG ATC AGC Reverse: GCC ACT GCA GAA TAA TTG ACT	220
<i>NRF2-GABPA</i>	NM_001007858.1 Gallus gallus GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa (GABPA), mRNA	Forward: TGC ACA TTA TTC CAG CAT CCG Reverse: GAA ATA CAG TCC CGA GCG TCT	214
<i>AMPKa1</i>	NM_001039603.1 Gallus gallus protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit (PRKAA1), mRNA	Forward: CTC TAT GCA CTG TTA TGT GGA Reverse: GTC CTG CTT AAA CCA TTC GT	204
<i>PGC1α</i>	NM_001006457.1	Forward:	216

	Gallus gallus peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PPARGC1A), mRNA	ATCCAGATCACCGTACA GTCC Reverse: TCCCTCAGATCTTTTCG GGTT	
<i>SIRT1</i>	NM_001004767.1 Gallus gallus sirtuin 1 (SIRT1), mRNA	Forward: TGCTCCCAGAAACGATC CCT Reverse: CCGGCTCCTGTCAAGAC CA	175
<i>RPLP0</i>	NM_204987.1 Gallus gallus ribosomal protein, large, P0 (RPLP0), mRNA	Forward: ATTGCTCCCTGTGATGT GACT Reverse: CACCCACTTTGTCTCCG GTCT	160
<i>PPIA</i>	NM_001166326.1 Gallus gallus peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA), mRNA	Forward: GGCTCCTGCTTCCACCG GAT Reverse: TTGCCGTCCAACCACTC GGTCT	227

En los Cuadros 7 a 15 se muestran los templados utilizados en cada uno de los genes problemas así como en los endógenos, mostrando primero los templados usados en la cuantificación mitocondrial y después los usados en el resto de los genes.

Templados usados para la cuantificación de mtDNA:

Cuadro 7. Templado para *ND1* como gen problema.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	10 min
Amplificación (x 40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	10 seg
	Alineación	60°C	10 seg
	Extensión	72°C	12 seg
Curva de fusión		95°C	1 seg
		60°C	1 min
		95°C	15 seg

Cuadro 8. Templado para *GAPDH* como gen endógeno.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	10 min
Amplificación (x 40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	10 seg
	Alineación	63°C	10 seg
	Extensión	72°C	12 seg
Curva de fusión		95°C	1 seg
		63°C	1 min
		95°C	15 seg

Templados usados para la cuantificación de genes involucrados en la biogénesis mitocondrial:

Cuadro 9. Templado *TFAM* como gen problema.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	10 min
Amplificación (x 40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	10 seg
	Alineación	60°C	10 seg
	Extensión	72°C	15 seg
Curva de fusión		95°C	1 seg
		55°C	1 min
		95°C	15 seg

Cuadro 10. Templado *NRF1* como gen problema.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	10 min
Amplificación (x 40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	10 seg
	Alineación	60°C	10 seg
	Extensión	72°C	15 seg
Curva de fusión		95°C	1 seg
		55°C	1 min
		95°C	15 seg

Cuadro 11. Templado *NRF2* como gen problema.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	10 min
Amplificación (x 40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	10 seg
	Alineación	60°C	10 seg
	Extensión	72°C	15 seg
Curva de fusión		95°C	1 seg
		55°C	1 min
		95°C	15 seg

Templados usados para la cuantificación de los genes sobre los que se espera que el AAL ejerza efecto:

Cuadro 12. Templado *AMPK1a* como gen problema.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	10 min
Amplificación (x 40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	10 seg
	Alineación	60°C	10 seg
	Extensión	72°C	15 seg
Curva de fusión		95°C	1 seg
		55°C	1 min
		95°C	15 seg

Cuadro 13. Templado *PGC1a* como gen problema.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	10 min
Amplificación (x 40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	10 seg
	Alineación	60°C	10 seg
	Extensión	72°C	15 seg
Curva de fusión		95°C	1 seg
		60°C	1 min
		95°C	15 seg

Cuadro 14. Templado *SIRT1* como gen problema.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	10 min
Amplificación (x 40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	10 seg
	Alineación	60°C	10 seg
	Extensión	72°C	12 seg
Curva de fusión		95°C	1 seg
		55°C	1 min
		95°C	15 seg

Cuadro 15. Templado *RPLP0* y *PPIA* como genes endógenos. Los cuales fueron seleccionados mediante el uso de los programas geNorm, NormFinder y BestKeeper.

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	10 min
Amplificación (x 40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	10 seg
	Alineación	60°C	10 seg
	Extensión	72°C	15 seg
Curva de fusión		95°C	1 seg
		60°C	1 min
		95°C	15 seg

Determinación de la actividad de la sirtuina1

Para determinar la actividad de la sirtuina1 se debe primero hacer una extracción nuclear, debido a que sólo era de interés medir la actividad de dicha proteína a nivel de tal organelo, eliminando la fracción citosólica que puede contener menores cantidades de ésta. Para ello las muestras de tejido fueron congeladas a -70°C inmediatamente después del sacrificio.

Posteriormente se prepararon las siguientes soluciones necesarias para la extracción nuclear.

Extracción nuclear

Cuadro 16.- Composición de los buffers usados en la extracción nuclear.

Reactivos	Buffer A	Buffer B	Buffer C
	0.5 M sacarosa	0.9 M Sacarosa	40% Glicerol
	50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl
	1mM EDTA	1mM EDTA	5 mM MgCl ₂
	25mM KCl	25mM KCl	0.1 mM EDTA

A todos los buffers se les agregó una pastilla de complete Mini (Roche) por cada 7 ml. Adicionalmente se añadieron otros inhibidores: aprotinina (10 µg/ml), leupeptina (1µg/ml), pepstatina (1 µg/ml), benzanidina (2.5 mM).

Para la extracción nuclear de los tejidos musculares de la pechuga, muslo y corazón se siguió el protocolo descrito en el Anexo 5.

En estos extractos nucleares se midió la actividad de la sirtuina1.

Actividad de la sirtuina1

Para determinar la actividad de la sirtuina 1 en los extractos nucleares de las muestras de musculo esquelético y corazón se siguieron las instrucciones del kit Fluor de Lys®-SIRT1 plus NAD⁺ (Enzo®. Life Sciences), según se describe en el Anexo 6.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados en un modelo completamente al azar, con el procedimiento de modelos lineales generales del SAS (SAS, 2008).

$$Y = \mu + T_j + \Sigma$$

Donde:

Y= variable de respuesta

μ = media poblacional

T_j = Efecto del j-ésimo tratamiento (j= 1 - 4)

Σ = Error experimental

Resultados

Granja Experimental

Como se ha mencionado en la introducción el AAL puede inhibir a la AMPK hipotalámica lo que disminuye el consumo voluntario en los animales. Esto se observa en la figura 2, donde al suministrar el AAL el peso de los animales comienza a disminuir, siendo la dosis 80 ppm la que menor peso alcanzó al finalizar el experimento. Aunque al parecer cuando la dosis de AAL aumenta, el efecto sobre la disminución en la ganancia de peso comienza a desaparecer, pues la dosis 160 ppm mostró un resultado igual tanto para el control como para la dosis 80 ppm.

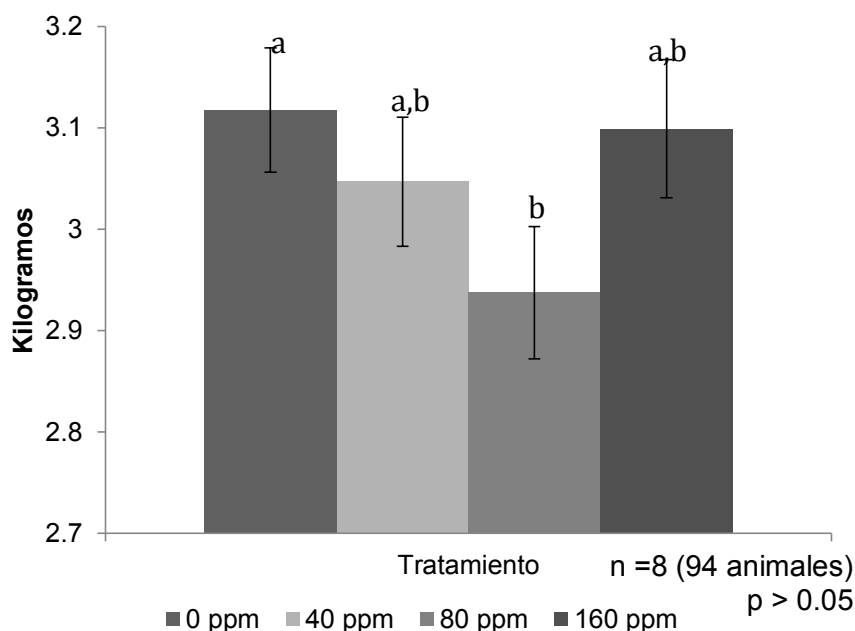


Figura 5.- Efecto de AAL administrado en el alimento sobre el peso final de pollo de engorda.

Los resultados mostrados en la figura 3 son consistentes con lo mencionado en el párrafo correspondiente al peso final, pues al administrar el AAL el consumo de los animales disminuyó, siendo el tratamiento de 80 ppm el que presentó menor consumo, y por ende el menor peso.

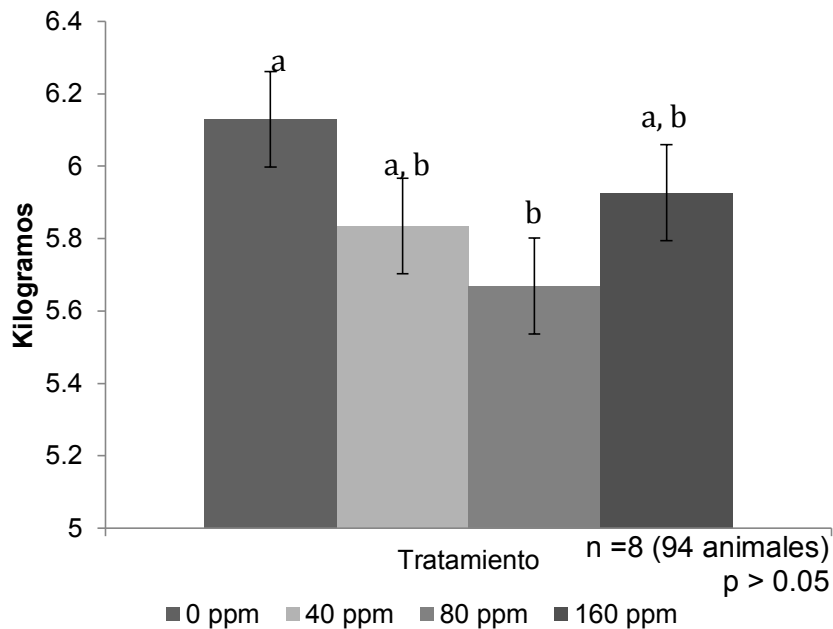


Figura 6.- Efecto del AAL sobre el consumo total de alimento en pollos de engorda, a lo largo de 7 semanas.

Las figuras 4 y 5 mostradas a continuación indican que a pesar de tener diferencias en el peso y consumo, los resultados para la eficiencia alimenticia y conversión alimenticia fueron iguales, probablemente debido a que la n (94 animales) usada en este experimento fue menor que en el experimento 1 (1000 animales) presentado en el apartado anterior.

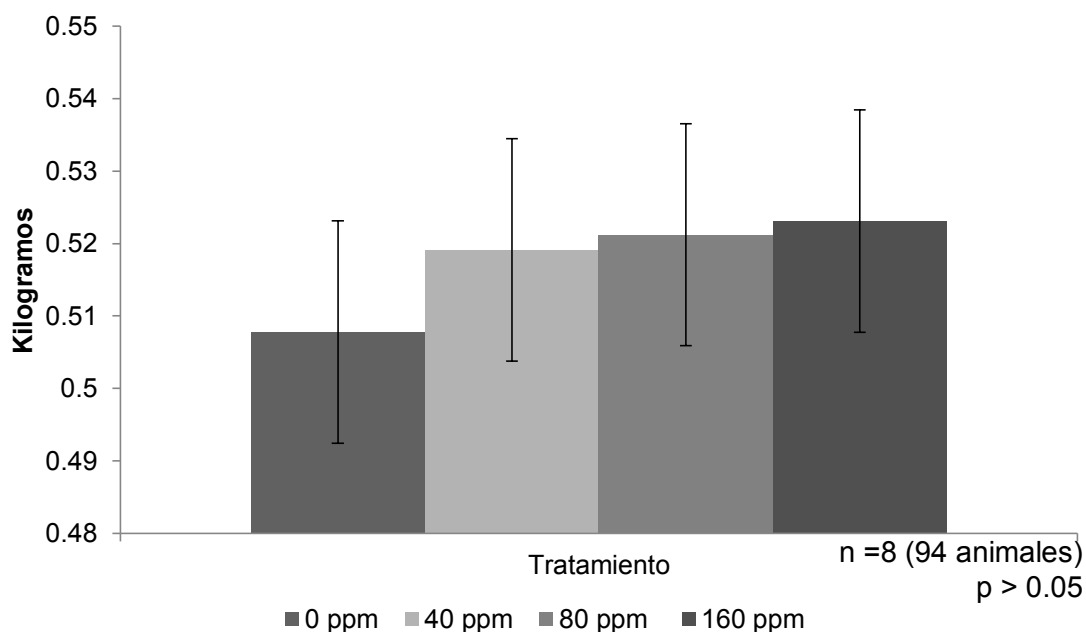


Figura 7.- Efecto del AAL sobre la eficiencia alimenticia en pollos de engorda al finalizar 7 semanas.

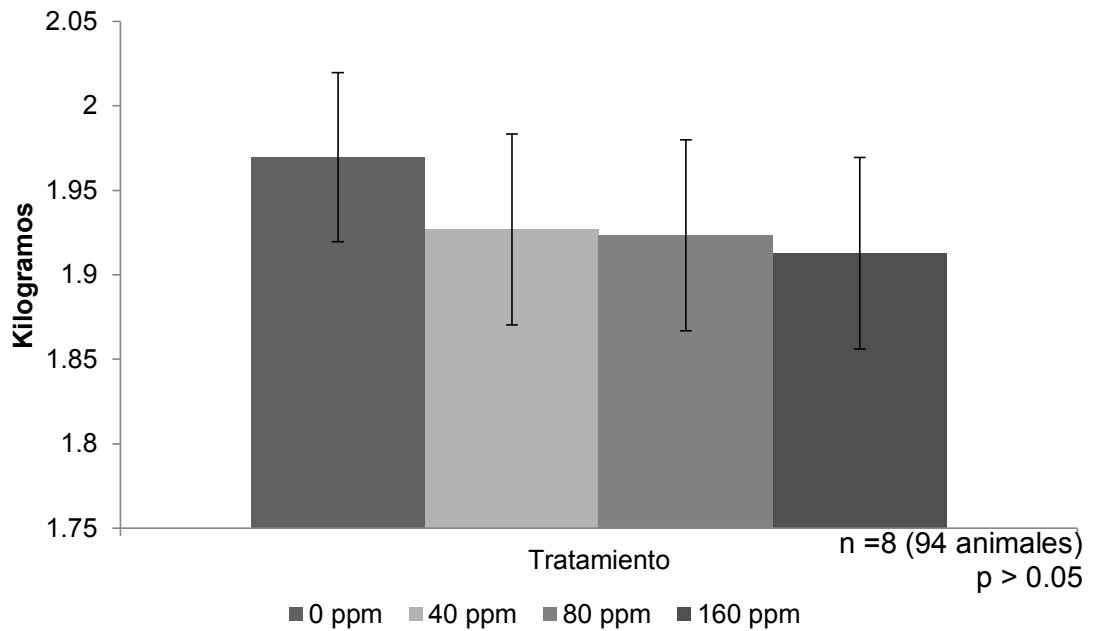


Figura 8.- Efecto del AAL sobre la conversión Alimenticia en pollos de engorda al finalizar 7 semanas.

La figura 6 muestra lo esperado al suministrar un antioxidante, como el AAL, pues todos los tratamientos tuvieron mayor TAC que el control, aunque la TAC no fue diferente entre ellos indicando que la respuesta no fue dosis-dependiente o que una “n” mayor es requerida para observar diferencias entre tratamientos.

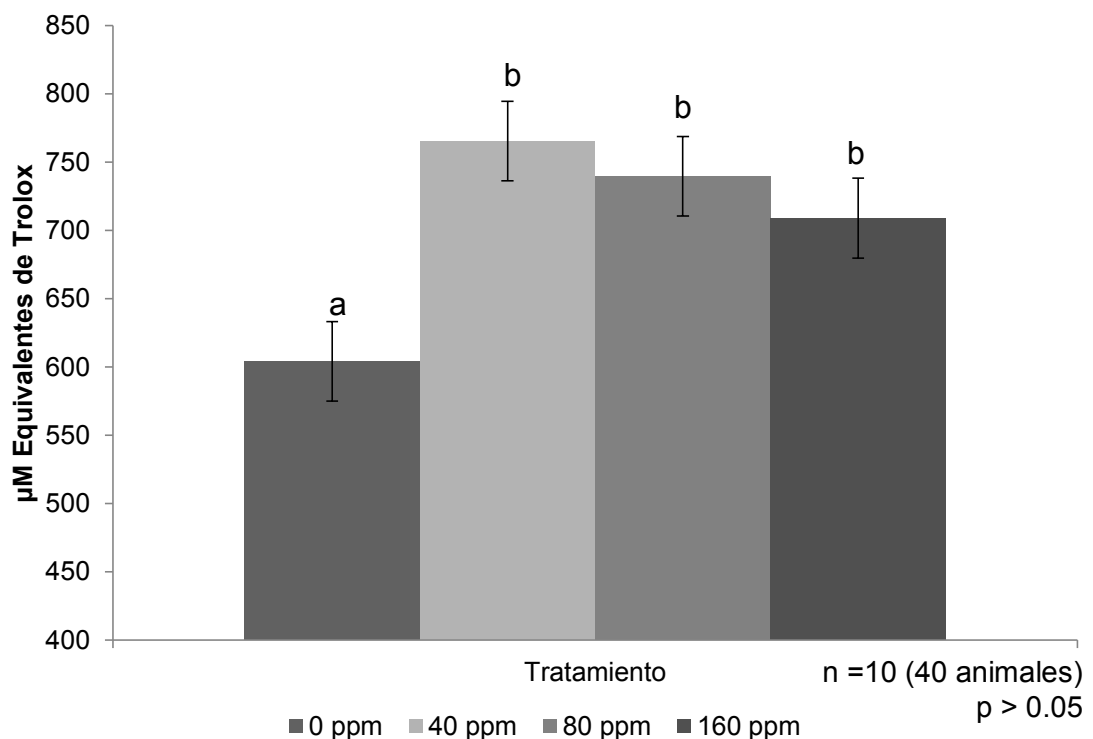


Figura 9.- Efecto del AAL sobre la capacidad Total Antioxidante en suero en pollos de engorda a la 7 semana de producción.

Biogénesis mitocondrial

Microscopía electrónica

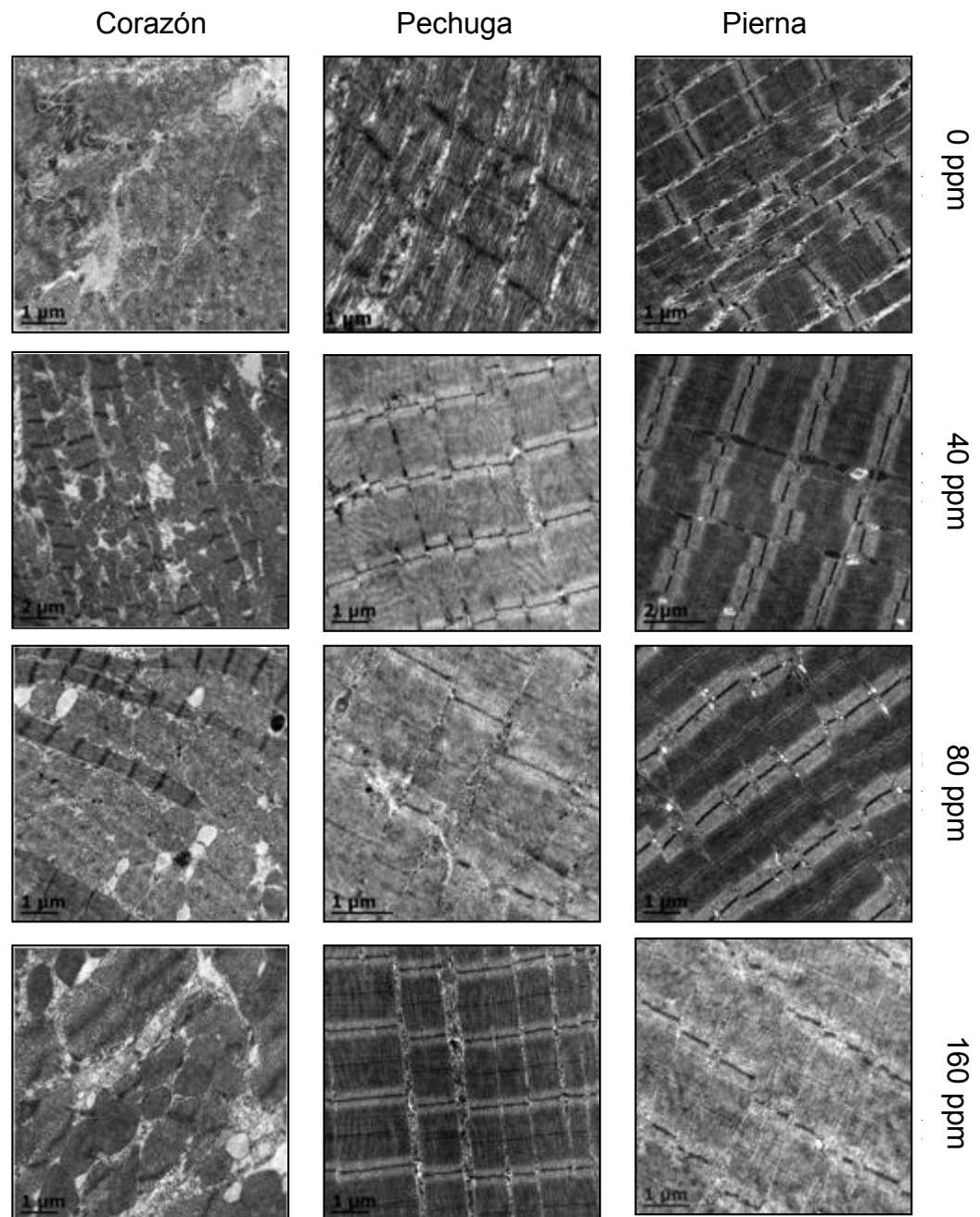


Figura 10.- Efecto del AAL sobre la biogénesis mitocondrial, así como sobre la integridad de las miofibrillas, de las mitocondrias y la deposición de colágena.

El AAL eficientiza el uso de los ácidos grasos, por lo que al suplementarlo en el alimento a dosis de 40 y 80 ppm la cantidad grasa disminuyó en el músculo cardiaco, figura 7, no siendo así en el tratamiento de 160 ppm, que presentó un comportamiento similar al del control.

En la figura 7 se presenta como el AAL afectó en las diferentes dosis la integridad de la miofibrilla cardíaca. Teniendo como punto de partida el grupo control, el AAL a dosis de 40 y 80 ppm mejoró notablemente la integridad de la miofibrilla cardíaca, efecto que comenzó a declinar en la dosis de 160 ppm.

La figura 7 también muestra la cantidad e integridad de las mitocondrias en las miofibrillas cardíacas. Ambas características fueron afectadas positivamente por el AAL, mostrando una notable mejoría con las dosis de 40 y 80 ppm comenzado a declinar hacia la dosis 160 ppm.

En experimentos anteriores se observó que los animales alimentados con AAL presentaron una mayor fuerza de corte en los músculos de la pechuga; como se puede apreciar en la figura 7 en la sección correspondiente a los cortes de pechuga, esto debido a que el AAL aumenta la cantidad de colágena en las miofibrillas al mismo tiempo que promueve la integridad de estas.

En la sección de cortes de pierna el AAL presentó un comportamiento similar al observado en los cortes de corazón, donde la integridad de las miofibrillas del tejido en cuestión aumentó en las dosis 40 y 80 ppm, posteriormente el efecto comenzó a disminuir hacia la dosis 160 ppm.

Actividad de la sirtuina1

Las figuras 8, 9 y 10 muestran los efectos de las diferentes dosis de AAL en la dieta sobre la actividad de la sirtuina1 en el músculo estriado y cardíaco. El objetivo de tomar 1 lectura cada 5 minutos durante 35 minutos era garantizar que la reacción hubiera alcanzado su punto máximo en el ensayo, a partir del cual la fluorescencia comenzaría a disminuir.

Con la finalidad de conocer el punto de inflexión de cada una de las curvas se obtuvieron las ecuaciones para todos los experimentos, a partir de las cuales se sacó la primera derivada con el programa Derive v6.1. y poder así resolver las ecuaciones, lo que permitió conocer los valores precisos para determinar el

grado de diferencia en los resultados de la actividad de la sirtuina1 entre los tratamientos en corazón, pechuga y pierna.

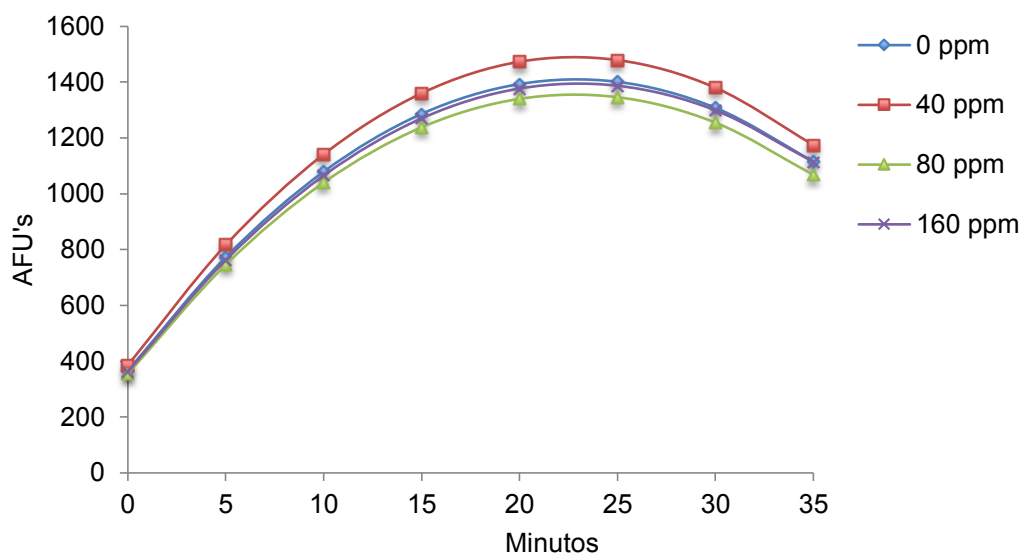


Figura 11.- Efecto del AAL sobre la activación de sirtuina1 en corazón.

A continuación se muestran las ecuaciones obtenidas para cada uno de los tratamientos 0, 40, 80 y 160 ppm respectivamente $y = 365.9 + 91.3x - 2x^2$, $y = 385.4 + 96.7x - 2x^2$, $y = 354.4 + 87.9x - 2x^2$, $y = 362.1 + 89.7x - 2x^2$, $p < 0.0001$ $R^2=0.66$, $p < 0.0001$ $R^2=0.66$, $p < 0.0001$ $R^2=0.65$, $p < 0.0001$ $R^2=0.68$.

Cuadro 17.- Valores de la primera derivada a partir de las ecuaciones de regresión de la actividad de la sirtuina1 en el corazón de pollos tratados con diferentes niveles de AAL en la dieta.

Tratamiento	X (tiempo)	y (UFA's)
0 ppm	22.8639	1409.6338
40 ppm	22.8198	1489.4174
80 ppm	22.7854	1355.2778
160 ppm	23.0093	1394.6377

Como se puede observar para el caso de la figura 8 que corresponde al efecto del AAL sobre la actividad de la sirtuina1 en el músculo cardíaco fue el tratamiento de 40 ppm el que presentó una mayor actividad según los valores observados en el cuadro 17.

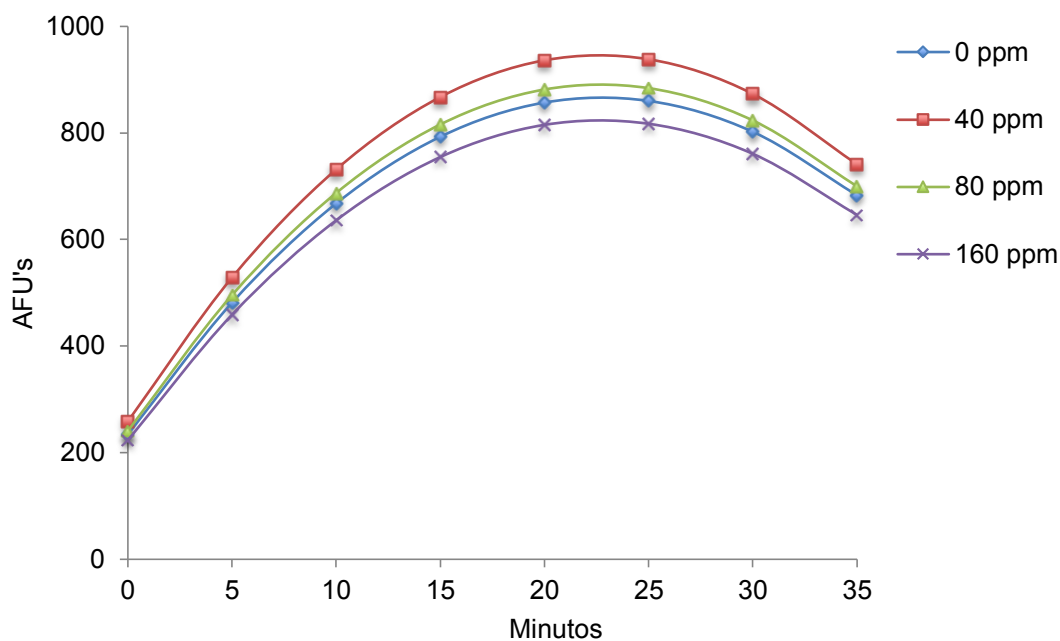


Figura 12.- Efecto del AAL sobre la activación de sirtuina1 en pechuga.

A continuación se muestran las ecuaciones obtenidas para cada uno de los tratamientos 0, 40, 80 y 160 ppm respectivamente $y = 233.7 + 55.6x - 1x^2$, $y = 258 + 60.7x - 1x^2$, $y = 240 + 57x - 1x^2$, $y = 223 + 53x - 1x^2$, $p < 0.0001$ $R^2=0.57$, $p < 0.0001$ $R^2=0.61$, $p < 0.0001$ $R^2=0.60$, $p < 0.0001$ $R^2=0.55$.

Cuadro 18.- Valores de la primera derivada a partir de las ecuaciones de regresión de la actividad de la sirtuina1 en la pechuga de pollos tratados con diferentes niveles de AAL en la dieta.

Tratamiento	x (tiempo)	y (UFA's)
0 ppm	22.7558	866.1133
40 ppm	22.6477	945.5176
80 ppm	22.7023	890.5661
160 ppm	22.6776	823.3596

En la figura 9 correspondiente al efecto del AAL sobre la actividad de la pechuga, la dosis 40 ppm presentó mayor actividad de acuerdo a los resultados del cuadro 18, repitiéndose el efecto positivo de esta dosis que se observó en corazón.

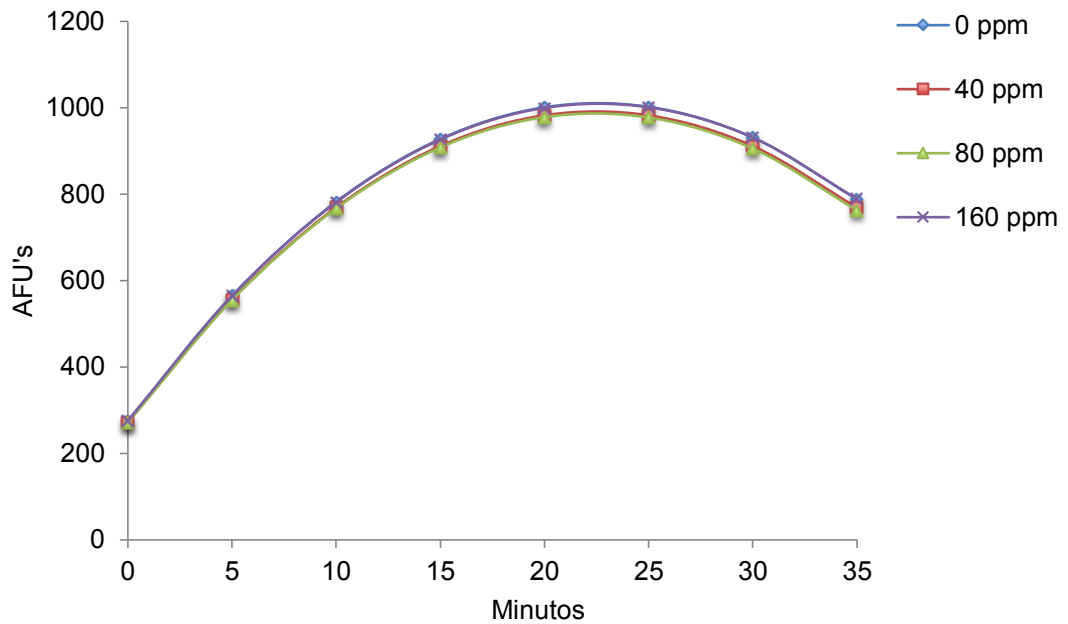


Figura 13.-Efecto del AAL sobre la activación de sirtuina1 en pierna.

A continuación se muestran las ecuaciones obtenidas para cada uno de los tratamientos 0, 40, 80 y 160 ppm respectivamente $y = 275 + 65x - 1x^2$, $y = 272 + 64x - 1x^2$, $y = 271 + 64x - 1x^2$, $y = 275 + 65x - 1x^2$, $p < 0.0001$ $R^2=0.61$, $p < 0.0001$ $R^2=0.55$, $p < 0.0001$ $R^2=0.60$, $p < 0.0001$ $R^2=0.64$.

Cuadro 19.- Valores de la primera derivada a partir de las ecuaciones de regresion de la actividad de sirtuina1 en la pierna de pollos tratados con diferentes niveles de AAL en la dieta.

Tratamiento	x (tiempo)	y (UFA's)
0 ppm	22.5842	1010.5793
40 ppm	22.4981	991.2588
80 ppm	22.4407	986.6484
160 ppm	22.6133	1009.3906

Para los resultados de la actividad de sirtuina1 obtenidos en pierna, se puede observar que el AAL no presentó ningún efecto sobre la proteína en cuestión.

qPCR

Los cuadros del 20 al 25 presentan los coeficientes de correlación para el mtDNA y los genes involucrados en la biogénesis mitocondrial.

En el cuadro 20 correspondiente al corazón se puede apreciar que los tratamientos 40 y 80 ppm fueron los que mostraron una mayor correlación positiva para *TFAM-NRF2*, además el tratamiento 80 ppm también mostró una correlación positiva para *TFAM* y *NRF2* con respecto a la cantidad de mtDNA. El tratamiento 160 ppm presentó correlaciones positivas entre *NRF1-NRF2*, *TFAM-NRF2* y *ND1-mtDNA*.

El cuadro 21 muestra las correlaciones obtenidas de la pechuga donde el tratamiento 160 ppm presentó una mayor correlación positiva para *NRF1-NRF2*, *TFAM-NRF2*, seguido por el tratamiento 0 y 80 ppm, finalmente el tratamiento 40 ppm sólo una alta correlación positiva entre *TFAM-NRF2*, similar a la observada en el tratamiento 160 ppm.

Los coeficientes correspondientes a pierna se encuentran en el cuadro 22, donde la mayoría de los coeficientes de correlación son muy similares entre los tratamientos, exceptuando por los valores de correlación positiva del tratamiento 0 ppm que se presentaron entre *NRF1-FAM*, *NRF2-mtDNA* y *TFAM-mtDNA* que no se presentaron en ningún otro tratamiento; y una correlación negativa observada entre *NRF1-mtDNA* en el tratamiento 40 ppm. Los resultados arrojados en este cuadro muestran un comportamiento diferente a los presentados en corazón y pechuga, pues al parecer en el músculo de la pierna el AAL no ejerció un efecto positivo sobre la biogénesis mitocondrial al no presentarse diferencias en los valores de las correlaciones positivas entre los tratamientos.

Los cuadros del 23 al 25 muestran los coeficientes de correlación de los genes sobre los que se piensa el AAL ejerció efecto para activar vías promotoras de la biogénesis mitocondrial.

El cuadro 23 presenta las correlaciones obtenidas del corazón, donde claramente se puede observar como los valores de *PGC-1 α -AMPK1 α* se

correlacionan positivamente en todos los tratamientos, así como se observa en el tratamiento 0 ppm una correlación altamente negativa entre *AMPK1a-SIRT1*, mientras que la correlación *SIRT1-PGC1a* se vuelve menos negativa en el tratamiento 40 ppm en comparación con 0 ppm.

Las correlaciones resultantes para la pechuga se presentan en el cuadro 24, donde los valores arrojados para *PGC-1a-AMPK1a* indican que el AAL ejerció un efecto positivo sobre estos, siendo los resultados muy similares entre los tratamientos 40, 80 y 160 ppm.

Para el caso de la pierna los valores de correlación se presentan en el cuadro 25, donde la correlación positiva entre *AMPK1a-PGC-1a* fue similar en los tratamientos 0, 40 y 80 ppm, disminuyendo en el tratamiento 160 pm.

Cuadro 20.- Coeficientes de correlación para el mtDNA y los mRNA involucrados en la biogénesis mitocondrial en corazón, por efecto de AAL en la dieta.

Corazón	0 ppm				40 ppm				80 ppm				160 ppm			
	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>
mtDNA	-0.38	-0.78*	-0.50*	-0.59*	-0.41	0.44	0.40	0.08	0.27	0.74*	0.70*	-0.32	-0.07	-0.72*	-0.31	0.75*
<i>NRF1</i>	1	0.45*	0.75*	-0.31	1	0.12	0.11	-0.88*	1	0.48	0.37	0.04	1	0.46	0.86*	0.10
<i>TFAM</i>		1	0.80*	0.46*		1	0.98*	-0.06		1	0.95*	0.24		1	0.77*	-0.59*
<i>NRF2</i>			1	-0.01			1	-0.01			1	0.21			1	-0.18

Cuadro 21.- Coeficientes de correlación para el mtDNA y los mRNA involucrados en la biogénesis mitocondrial en pechuga por efecto del AAL en la dieta.

Pechuga	0 ppm				40 ppm				80 ppm				160 ppm			
	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>
mtDNA	0.10	-0.01	-0.17	-0.01	-0.02	-0.07	0.19	-0.02	0.07	0.14	-0.15	0.08	-0.26	0.29	0.21	0.32
<i>NRF1</i>	1	0.58*	0.88*	-0.39	1	0.44	0.33	0.18	1	0.44	0.59*	0.06	1	0.49	0.72*	0.02
<i>TFAM</i>		1	0.56*	-0.25		1	0.86*	0.22		1	0.77*	-0.27		1	0.90*	0.44
<i>NRF2</i>			1	-0.16			1	-0.10			1	0.06			1	0.21

Cuadro 22.- Coeficientes de correlación para el mtDNA y los mRNA involucrados en la biogénesis mitocondrial en pierna por efecto del AAL en la dieta.

Pierna	0 ppm				40 ppm				80 ppm				160 ppm			
	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>	<i>NRF1</i>	<i>TFAM</i>	<i>NRF2</i>	<i>ND1</i>
mtDNA	0.00	0.53*	0.53*	0.28	-0.56*	-0.14	-0.25	-0.58*	0.21	0.35	0.25	-0.37	0.17	-0.07	-0.21	0.00
<i>NRF1</i>	1	0.59*	0.79*	0.17	1	0.45	0.71*	0.16	1	0.50	0.71*	-0.07	1	0.14	0.52	0.17
<i>TFAM</i>		1	0.91*	0.32		1	0.86*	0.12		1	0.91*	-0.31		1	0.84*	-0.02
<i>NRF2</i>			1	0.27			1	-0.08			1	-0.11			1	-0.06

Cuadro 23.- Coeficientes de correlación de los mRNA de Sirt1, AMPK1a y PGC-1a por efecto del AAL en corazón.

Corazón	0 ppm		40 ppm		80 ppm		160 ppm	
	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>
<i>AMPK1a</i>	-0.74*	0.87*	-0.44	0.92*	-0.23	0.86*	-0.18	0.84*
<i>SIRT1</i>	1	-0.66*	1	-0.53*	1	-0.44	1	0.14

Cuadro 24.- Coeficientes de correlación de los mRNA de Sirt1, AMPK1a y PGC-1a por efecto del AAL en pechuga.

Pechuga	0 ppm		40 ppm		80 ppm		160 ppm	
	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>
<i>AMPK1a</i>	-0.22	0.56*	-0.32	0.83*	-0.14	0.74*	-0.20	0.85*
<i>SIRT1</i>	1	0.06	1	-0.38	1	-0.36	1	-0.41

Cuadro 25.- Coeficientes de correlación de los mRNA de Sirt1, AMPK1a y PGC-1a por efecto del AAL en pierna.

Pierna	0 ppm		40 ppm		80 ppm		160 ppm	
	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>	<i>SIRT1</i>	<i>PGC-1a</i>
<i>AMPK1a</i>	-0.30	0.80*	-0.06	0.82*	0.09	0.81*	-0.11	0.65*
<i>SIRT1</i>	1	-0.19	1	0.05	1	0.11	1	0.18

Discusión

Respuesta productiva

Los resultados presentados en la parte productiva no fueron los esperados, pues se oponen a lo observado en los estudios previos realizados en nuestro laboratorio. Consideramos que esto puede deberse al número de animales empleados (n) en este experimento, pues al calcular la “n” con los resultados obtenidos se obtuvo que esta debió de ser de 360 animales en total, usando 80 animales por tratamiento, muy por arriba de los 25 animales usados, además se debieron de distribuir en 8 corrales por tratamiento, requiriendo de un total de 32 corrales, cuando solo se tenían 8 en total, 2 por tratamiento.

Aunque se debe recordar que en el experimento 1, donde se usaron 0, 40, 80, 160 y 320 ppm, los efectos del lipóico sobre la ganancia de peso, y su influencia sobre el consumo fueron congruentes con lo reportado en la literatura (Arshad *et al.*, 2011, Hamano, 2006, Shen *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2010).

Capacidad antioxidante

Los resultados de la TAC mostraron lo que se esperaba al suministrar cualquier antioxidante en la dieta, pues la TAC aumento con respecto al control, sin embargo, no ocurrió lo observado en otros experimentos como los de Parveen *et al.* (2013), donde a mayor dosis suministrada de antioxidante mayor era el efecto observado. Para el caso aquí presentado no hubo diferencias entre los tratamientos, todos fueron mayores que el control, y sólo se presentó una tendencia a disminuir conforme se aumentaba la dosis. Se debe recordar que en este experimento la TAC fue evaluada en el suero, y no en los tejidos, como lo hizo Parveen *et al.* (2013) evaluando únicamente a los antioxidantes circulantes.

Biogénesis mitocondrial

Microscopia electrónica

Los resultados arrojados por la microscopía electrónica mostraron que la grasa en las fibras del corazón disminuyó en las dosis de 40 y 80 ppm (Figura 7), comenzando a aumentar hacia la dosis de 160 ppm, pero sin llegar a ser tan alta como la grasa contenida en el control.

Respecto a la integridad de las miofibrillas y la cantidad de mitocondrias e integridad de estas, se observa la misma tendencia donde las dosis de 40 y 80 ppm tienen el mejor desempeño mientras que en las dosis de 160 ppm comienza a ver la declinación de su efecto, sin llegar al nivel del control. Como ya se sabe el AAL promueve el uso de los ácidos grasos en el tejido muscular y previene su deposición (Evans y Goldfine, 2000; Lee *et al.*, 2005), sin embargo puede ser que la elevada tasa de crecimiento en el caso de los animales sometidos a 160 ppm haya provocado una degeneración de las fibras musculares (Hosoyama *et al.*, 2009), así como pérdida en la arquitectura de algunas de las mitocondrias, siendo sustituido el tejido muscular dañado de forma crónica por tejido adiposo (Shefer *et al.*, 2004; Brack *et al.*, 2007), aunque al parecer el daño provocado no fue tan grave como para promover la deposición de tejido fibroso, sólo se observan los indicios de una degeneración grasa (Natarajan *et al.*, 2010). Los resultados para la integridad de las miofibrillas del muslo muestran un comportamiento similar a las del corazón, por lo que se puede deducir lo mismo de este tejido.

Respecto a los resultados de la pechuga, se obtuvo que la colágena aumento con el tratamiento. Estas observaciones concuerdan con las pruebas de calidad de la canal del experimento 1, en donde las pechugas de los animales que consumían las mayores dosis de AAL presentaban una menor terneza, lo que explica que fueron más duras debido a que tenían mayor cantidad de colágena y menor cantidad de tejido adiposo, aunque en ninguno de los 2 experimentos se evaluó si éstas presentaban el problema del “White striping” en cuyo caso la

dureza sería dada además por el tejido fibroso que sustituía a las fibras musculares dañadas.

Los resultados aquí mostrados señalan que al parecer la pechuga usada para microscopía electrónica no presentaba “White striping” debido a que la integridad de las fibras no disminuyó en ningún momento, como ocurrió para el caso del corazón o el muslo. Solo llegó a un punto donde al parecer la mejoría en la integridad de las fibras ya no era tan evidente como con el primer tratamiento (40 ppm).

En estas pruebas se observó que efectivamente el AAL promueve la integridad de las membranas mitocondriales como se determinó en otros experimentos (Perveen *et al.*, 2013), aunque al los resultados del corazón (160 ppm) indican que cuando el desgaste del tejido es grave el AAL no es suficiente para mantener la integridad de la miofibrilla ni de las membranas mitocondriales.

Actividad de la sirtuina1 y PCR en tiempo real

Se ha observado en experimentos previos que el AAL reduce el peso corporal al suprimir a la AMPK hipotalámica (Kim *et al.*, 2004), como se presentó en los resultados obtenidos en la sección correspondiente a las variables productivas (Figuras 2 y 3).

En el músculo el AAL incrementa la actividad de la AMPK, lo que provoca un aumento en la sensibilidad a la insulina, la absorción de glucosa y la oxidación de ácidos grasos (Eason *et al.*, 2002; Evans y Goldfine, 2000; Lee *et al.*, 2005). El AAL también eleva los niveles de la ATGL e inhibe la producción de sintasa de ácidos grasos (FAS), eficientizando su uso para la B-oxidación y reduciendo la acumulación de lípidos en células C₂C₁₂ expuestas a elevadas concentraciones de glucosa. Dando de esta forma un tejido energéticamente más eficiente, lo que permitió que los animales ganaran mayor peso en otros experimentos citados, y aunque en éste trabajo no se presentó dicha ganancia en los pollos tratados, probablemente por la “n” usada, eso no significa que no se presentara tal eficiencia energética en el tejido muscular, por lo cual fue

necesario la realización de otros experimentos que permitieran observar a nivel celular y molecular lo que ocurría en el músculo de las aves.

Las figuras 8 y 9 muestran una mayor actividad de la sirtuina1 para el tratamiento de 40 ppm, lo que indica que el AAL a esa dosis en la dieta aumenta la actividad de esta enzima. Este aumento en la actividad puede explicarse de la siguiente manera: como ya se sabe la sirtuina1 se encuentra regulada por los niveles de NAD^+ , la concentración de nicotinamida (NA) y por la actividad de la nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT). Por lo tanto es necesario que los niveles de NAD^+ se incrementen, lo cual ocurre por efecto del AAL cuando este ingresa a la célula y es convertido a dihidrolipoato por la lipoamida deshidrogenasa mitocondrial o por el sistema tiorredoxin/tiorredoxina reductasa, ya que estos acoplan la conversión de NADH en NAD^+ , provocando un incremento en el ratio NAD^+/NADH (Vinciguerra *et al.*, 2010).

Otra forma en que el AAL puede aumentar los niveles de NAD^+ intracelulares es a través de la AMPK, pues como se sabe el AAL puede activar a AMPK (Lee *et al.*, 2005) la cual al encontrarse fosforilada promueve la actividad de NAMPT, enzima encargada de convertir la NA en NAD^+ (Brenmoehl y Hoeflich 2013; Menzies y Hood, 2012; Vinciguerra *et al.*, 2010).

Por medio de estas dos vías el AAL aumenta los niveles de NAD^+ que finalmente llevan a la activación de la sirtuina1 como se muestra en la figura 11.

Sin embargo, en el músculo de la pierna no se observaron cambios en la actividad de la sirtuina1, por lo que se puede inferir que para el caso del músculo rojo el AAL no ejerce el mismo efecto sobre la sirtuina1 como lo hizo en el músculo cardiaco y la pechuga, constituida por músculo blanco. Cabe recordar que en experimentos previos realizados en el laboratorio se determinó que la ganancia de peso observada en los animales tratados fue debida a un aumento principalmente en el tejido de la pechuga, por lo cual era de esperarse que el efecto del AAL se reflejara en esta parte de la canal.

Como se puede observar en la figura 7, el AAL aumentó la cantidad de mitocondrias en el músculo cardíaco al mismo tiempo que promovió la integridad en las crestas mitocondriales, resultados que se corroboraron con las

correlaciones obtenidas en el cuadro 17 así como en el cuadro 20, donde se observó que el AAL mejoró los valores para los genes involucrados directamente en la biogénesis mitocondrial (*TFAM-NRF2*, *mtDNA-TFAM*, *mtDNA-NRF2*, *NRF2-NRF1*) así como en los genes encargados de activar dicha vía (*AMPK1a-PGC-1a*, *SIRT1-PCG-1a*).

Para lograr tal efecto el AAL activa a AMPK (Lee *et al.*, 2005), la cual ya fosforilada puede a su vez fosforilar a PGC-1a promoviendo su actividad. PGC-1a se encuentra en el citosol acetilada y puede estar además fosforilada o no, cuando la sirtuina1 se encuentra activa desacetila a PGC-1a y si PGC-1a no se encuentra fosforilada puede migrar al núcleo (Zhong y Mostoslavsky, 2011). En el núcleo la sirtuina1 desacetila a LKB1 que se encarga de fosforilar a AMPK para que posteriormente AMPK fosfore a la PGC-1a que ha migrado al núcleo y entonces pueda formar un complejo junto con MyoD y la sirtuina1 promoviendo así la propia transcripción de PGC-1a (Figura 11) (Amat *et al.*, 2009; Handschin *et al.*, 2003).

PGC-1a ya fosforilada es capaz de activar la transcripción de genes encargados de la biogénesis mitocondrial como son *NRF1/2* (Evans y Scarpulla, 1990; Virbasius *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1999) y también de promover a transcripción de *SIRT3*. Una vez que se activa *NRF1* este puede desencadenar la transcripción de *TFAM* el cual migra hacia la mitocondria y se encarga de activar la transcripción de las 13 proteínas que son codificadas por el genoma mitocondrial (Menzies y Hood, 2012), dentro de las cuales se encuentran las subunidades de la cadena de transporte de electrones y por ende se localiza ND1 como parte de la subunidad 1 (Hood, 2001). Todas las vías mencionadas se resumen en la figura 11.

AMPK1a así como con *PGC-1a*. La figura 11 plantea el esquema de interacciones entre todos estos elementos dentro de la célula muscular.

Conclusiones

En el presente trabajo no fue posible reproducir los resultados obtenidos en la parte productiva en experimentos anteriores, debido a la “n” utilizada.

La TAC mostró ser mayor en los tratamientos que en el control, por lo que efectivamente el suministrar AAL en el alimento mejora la capacidad antioxidante de los animales y les permite enfrentar mejor los retos causados por la producción y el estrés.

El AAL promovió en músculo cardíaco y esquelético, la biogénesis mitocondrial y la integridad de las membranas mitocondriales, también mejoró la integridad de las miofibrillas, los resultados en conjunto indican que la dosis de 40 ppm es la mejor, similar a lo ocurrido en los experimentos de calidad de la canal, tal como se observó en el experimento 1.

Los resultados mostrados en estos experimentos indican que el AAL promueve la biogénesis mitocondrial en el músculo cardíaco principalmente mediante un aumento en la actividad de la sirtuina1 vía AMPK, involucrando en la ruta a PGC-1a, provocando así un aumento en la cantidad de mitocondrias en el tejido muscular lo que le confiere una mayor cantidad de energía disponible para sus funciones metabólicas. Al mismo tiempo al suministrar el AAL como un antioxidante le es posible al tejido muscular responder a los eventos oxidativos que se suscitan dentro de las células consecuencia del aumento de mitocondrias y de la producción de energía. Estos hallazgos plantean una perspectiva interesante para el AAL como un aditivo no nutricional usado para la producción animal.

Sin embargo, estos experimentos muestran apenas una vista parcial del panorama, debido a que es necesario conocer otros eventos metabólicos que se llevaban a cabo en el tejido muscular como la β -oxidación y la glucólisis, así como monitorear los niveles de glucosa disponible en el suero de los animales.

Referencias

- Alarcón A, Gamboa J, Alonso F, Grado J, Janacua H. Efecto de variables críticas del sacrificio sobre las propiedades físico químicas de la carne de cerdo. *Técnica Pecuaria México* 2006; 44(1):53-66.
- Allen CD, Fletcher DL, Northcutt JK, Russell SM. The relationship of broiler breast color to meat quality and shelf-life. *Poult Sci.* 1998; 77(2):361-366.
- Alvarado ZC. Calidad de la carne de pollo. XXII Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura; 2012 mayo; Panamá, 2012.
- Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD. *J Biol Chem.* 2009; 284(33):21872-21880.
- 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; 59(13):7346-7352.
- Asmundson, V. S., and I. M. Julian. Inherited muscle abnormality in the domestic fowl. *J. Hered.* 1956; 47:248–252.
- Bauermeister, L. J., A. U. Morey, E. T. Moran, M. Singh, C. M. Owens, and S. R. McKee. Occurrence of white striping in chicken breast fillets in relation to broiler size. *Poult. Sci.* 2009; 88 Suppl. 1:33 Abstr.
- Boudry G, David ES, Douard V, Monteiro IM, Le Huërou-Luron I, Ferraris RP. Role of intestinal transporters in neonatal nutrition: carbohydrates, proteins, lipids, minerals, and vitamins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; 51(4):380-401.
- Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, Rando TA. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science.* 2007; 317(5839):807–810.

Brenmoehl J, Hoeflich A. Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3. *Mitochondrion*. 2013; 13(6):755-761.

Chen WL, Kang CH, Wang SG, Lee HM. α -Lipoic acid regulates lipid metabolism through induction of sirtuin 1 (SIRT1) and activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*. 2012; 55(6):1824-1835.

Dam H, Prange I, Søndergaard E. Muscular degeneration (white striation of muscles) in chicks reared on vitamin E deficient, low fat diets. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1952; 31(2):172-184.

Díaz-Cruz A, Serret M, Ramírez G, Avila 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 Pathol*. 2003; 32(6):645-653.

Dransfield E, Sosnicki AA. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. *Poult Sci*. 1999; 78(5):743-746.

Eason RC, Archer HE, Akhtar S, Bailey CJ. Lipoic acid increases glucose uptake by skeletal muscles of obese-diabetic ob/ob mice. *Diabetes Obes Metab*. 2002; 4(1):29-35.

Evans JL, Goldfine ID. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2000; 2(3):401-413.

Evans MJ, Scarpulla RC. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev*. 1990; 4(6):1023-1034.

FAO, 2013. *Statistical Yearbook 2013. World food and agriculture of the United Nations*. Rome.

FAO, 2015. *Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. Producción y Sanidad Animal. Calidad de la carne*.

Fujiwara K, Hosaka H, Nakagawa A, Motokawa Y. Lipoate-Protein Ligase A: Structure and Function. In: *Lipoic Acid, energy, production, antioxidant activity*

and health effects, Patel SM & Packer L, editors. Los Angeles, CA: CRC Press. 2008, 217-219.

Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Christiansen JA. Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie*. 1992; 74(3):225-237.

Halıcı M, Imik H, Koç M, Gümüş R. Effects of α -lipoic acid, vitamins E and C upon the heat stress in Japanese quails. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2012; 96(3):408-415.

Hamano Y, Sugawara S, Kamota Y, Nagai E. Involvement of lipoic acid in plasma metabolites, hepatic oxygen consumption, and metabolic response to a beta-agonist in broiler chickens. *Br J Nutr*. 1999; 82(6):497-503.

Hamano Y. Effects of dietary lipoic acid on plasma lipid, in vivo insulin sensitivity, metabolic response to corticosterone and in vitro lipolysis in broiler chickens. *Br J Nutr*. 2006; 95(6):1094-1101.

Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(12):7111-7116.

Hermier D. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *J Nutr*. 1997; 127(5 Suppl):805S-808S.

Hochleithner, M. Biochemistries. In *Avian Medicine: Principles and Application*. B. W. Ritchie, G. J. Harrison, and L. R. Harrison, editors. Wingers Publishing Inc., Lake Worth, FL, 1994: 223-245.

Hoffman, WE and Solter PF. Diagnostic enzymology of domestic animals. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML, editors. Academic Press, Burlington, MA, 2008: 351–378.

Hood DA. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2001; 90(3):1137-1157.

Hoving-Bolink AH, Kranen RW, Klont RE, Gerritsen CL, de Greef KH. Fibre area and capillary supply in broiler breast muscle in relation to productivity and ascites. *Meat Sci.* 2000; 56(4):397-402.

Hosoyama T, Ishiguro N, Yamanouchi K, Nishihara M. Degenerative muscle fiber accelerates adipogenesis of intramuscular cells via RhoA signaling pathway. *Differentiation.* 2009; 77(4):350-359.

Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP- activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(29):12017–12022.

Julian I and Asmundson V. Muscular dystrophy of the chicken. In *Muscular Dystrophy in Man and Animals*. G Bourne and M Godarz, editors. Hafner, New York, NY, 1963:458–498.

Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports.* 2000; 10(6):332-337.

Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG, Ryu JW, Song HS, Yun JY, Namgoong IS, Ha J, Park IS, Lee IK, Viollet B, Youn JH, Lee HK, Lee KU. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2004; 10(7):727-733.

Klasing, KC. Nutritional diseases. In *Diseases of Poultry*, 12th ed. Saif YM, Fadley AM, Glisson JR, McDougald IR, Nolan IK and Swayne DE, editors. Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, 2008: 1027–1054.

Kuttappan VA, Brewer VB, Apple JK, Waldroup PW, Owens CM. Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult Sci.* 2012a; 91(10):2677-2685.

Kuttappan VA, Lee YS, Erf GF, Meullenet JF, McKee SR, Owens CM. Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of white striping. *Poult Sci.* 2012b; 91(5):1240-1247.

Kuttappan VA, Brewer VB, Mauromoustakos A, McKee SR, Emmert JL, Meullenet JF, Owens CM. Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult Sci.* 2013a; 92(3):811-819.

Kuttappan VA, Shivaprasad HL, Shaw DP, Valentine BA, Hargis BM, Clark FD, McKee SR, Owens CM. Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. *Poult Sci.* 2013b; 92(2):331-338.

Lee DH, Park DB, Lee YK, An CS, Oh YS, Kang JS, Kang SH, Chung MY. The effects of thiazolidinedione treatment on the regulations of aquaglyceroporins and glycerol kinase in OLETF rats. *Metabolism.* 2005; 54(10):1282-1289.

Machlin LJ, Shalkop WT. Muscular degeneration in chickens fed diets low in vitamin E and sulfur. *J Nutr.* 1956; 10;60(1):87-96.

MacRae VE, Mahon M, Gilpin S, Sandercock DA, Mitchell MA. Skeletal muscle fibre growth and growth associated myopathy in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Br Poult Sci.* 2006; 47(3):264-272.

Mahon, M. Muscle abnormalities: Morphological aspects. In *Poultry Meat Science—Poultry Science Symposium Series*. Richardson RI and Mead GC, editors. CABI Publishing, Wallingford, UK, 1999; 25:19–64.

McKee SR, Sams AR. The effect of seasonal heat stress on rigor development and the incidence of pale, exudative turkey meat. *Poult Sci.* 1997; 76(11):1616-1620.

Menzies KJ, Hood DA. The role of SirT1 in muscle mitochondrial turnover. *Mitochondrion.* 2012; 12(1):5-13.

Mora O, Álvarez CJ, Pérez R, González L, Vargas C, Shimada A, Piña E. Lipoic acid promotes the down-regulation of hepatic gene expression in broilers. *En prensa.* 2015.

Moreno R. *Calidad de la Carne de Pollo*, Nutreco R&D. Food Research Centre. Toledo. 2005.

Natarajan A, Lemos DR, Rossi FM. Fibro/adipogenic progenitors: a double-edged sword in skeletal muscle regeneration. *Cell Cycle*. 2010; 9(11):2045-2046.

Nesbitt NM, Cicchillo RM, Lee KH, Grove TL, Booker SJ. Lipoic acid biosynthesis. In: *Lipoic Acid, energy, production, antioxidant activity and health effects*, Patel SM & Packer L, editors. Los Angeles, CA: CRC Press. 2008, 11-13.

NMX-FF-080-SCFI-2006. Productos Avícolas – Carne de Pollo de Engorda en Canal y en Piezas – Clasificación.

Northcutt JK. Factores que afectan la calidad de la carne de aves. *Mundo Lácteo y Cárnico*. 2004, Noviembre/Diciembre.

Parveen R, Asghar A, Anjum FM, Khan MI, Arshad MS, Yasmeen A. Selective deposition of dietary α -lipoic acid in mitochondrial fraction and its synergistic effect with α -tocopherol acetate on broiler meat oxidative stability. *Lipids Health Dis*. 2013; 12:52.

Ré mignon H, G. Marché, and F. H. Richard. Consequences de la selection sur la vitesse de croissance sur les propriétés des fibres musculaires chez le poulet *in: Proceedings of the XI European Symposium on the Quality of Poultry Meat*. Vol 1. Tours, France. 1993, 59–65.

Ross, Suplemento de nutrición del pollo de engorde, 2009.

Ross, Objetivos de rendimiento, 2012.

Saadoun A, Leclercq B. In vivo lipogenesis of genetically lean and fat chickens: effects of nutritional state and dietary fat. *J Nutr*. 1987; 117(3):428-435.

SAGARPA, 2007-2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. PNP, Programa Nacional Pecuario 2007-2012. México.

SAGARPA, 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en Unidades de Producción de Pollo de Engorda. 1º Edición.

SAGARPA, 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Boletín de prensa. Aumentó 89.5% el consumo de carne por persona en México en dos décadas. México (Jal).

Sandercock DA, Barker ZE, Mitchell MA, Hocking PM. Changes in muscle cell cation regulation and meat quality traits are associated with genetic selection for high body weight and meat yield in broiler chickens. *Genet Sel Evol.* 2009; 41:8.

Schreurs FJ, van der Heide D, Leenstra FR, de Wit W. Endogenous proteolytic enzymes in chicken muscles. Differences among strains with different growth rates and protein efficiencies. *Poult Sci.* 1995; 74(3):523-537.

Shefer G, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z. Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt 22):5393-5404.

Shen QW, Jones CS, Kalchayanand N, Zhu MJ, Du M. Effect of dietary alpha-lipoic acid on growth, body composition, muscle pH, and AMP-activated protein kinase phosphorylation in mice. *J Anim Sci.* 2005; 83(11):2611-2617.

Shen W, Liu K, Tian C, Yang L, Li X, Ren J, Packer L, Cotman CW, Liu J. R-alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine complementarily promote mitochondrial biogenesis in murine 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia.* 2008; 51(1):165-174.

Shimada A. Aditivos. En *Nutrición animal*, Shimada A, editor. México D.F. México Trillas, 2007: 221-230.

Smith DP, Fletcher DL. Chicken breast muscle fiber type and diameter as influenced by age and intramuscular location. *Poult Sci.* 1988; 67(6):908-913.

Soike D, Bergmann V. Comparison of skeletal muscle characteristics in chicken bred for meat or egg production: II. Histochemical and morphometric examination. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1998a; 45(3):169-174.

Soike D, Bergmann V. Comparison of skeletal muscle characteristics in chicken bred for meat or egg production. I. Histopathological and electron microscopic examination. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1998b; 45(3):161-167.

Song GJ, Lewis V. Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertil Steril*. 2008; 90(6):2238-2244.

Sosnicki A, Cassens RG, McIntyre DR, Vimini RJ, Greaser ML. Incidence of microscopically detectable degenerative characteristics in skeletal muscle of turkey. *Br Poult Sci*. 1989; 30(1):69-80.

Sosnicki AA, Cassens RG, Vimini RJ, Greaser ML. Histopathological and ultrastructural alterations of turkey skeletal muscle. *Poult Sci*. 1991; 70(2):349-357.

UNA, 2015. Unión Nacional de Avicultores. Indicadores Económicos. Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2014. Disponible en: URL: <http://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos>

Valentine BA and McGavin MD. Skeletal muscle. In *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. Zachary JF and McGavin MD, editors. Elsevier Mosby, St. Louis, MO, 2012: 871–919.

Vinciguerra M, Fulco M, Ladurner A, Sartorelli V, Rosenthal N. SirT1 in muscle physiology and disease: lessons from mouse models. *Dis Model Mech*. 2010; 3(5-6):298-303.

Virbasius JV, Virbasius CA, Scarpulla RC. Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev*. 1993; 7(3):380-392.

Voet DJ, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentals of Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, NJ: Wiley. 2013, 581–620.

Wang Y, Li X, Guo Y, Chan L, Guan X. Alpha-Lipoic acid increases energy expenditure by enhancing AMPK-PGC-1 α signaling in the skeletal muscle of aged mice. *Metabolism*. 2010; 59(7):967-976.

Wilson BW, Nieberg PS, Buhr RJ, Kelly BJ, Shultz FT. Turkey muscle growth and focal myopathy. *Poult Sci*. 1990; 69(9):1553-1562.

Winder WW, Holmes BF. Insulin stimulation of glucose uptake fails to decrease palmitate oxidation in muscle if AMPK is activated. *J Appl Physiol.* 2000; 89(6):2430–2437.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 1999; 98(1):115-124.

Zhong L, Mostoslavsky R. Fine tuning our cellular factories: sirtuins in mitochondrial biology. *Cell Metab.* 2011; 13(6):621-626.

Anexos

Anexo 1

Capacidad total antioxidante

Procedimiento de acuerdo al protocolo del fabricante

1.- Estándares y muestras. Todos los reactivos y muestras se colocaron a temperatura ambiente. Brevemente se centrifugó el Reactivo B y el Estándar antes de abrirlos.

Se mezclaron 5 μ L del estándar con 245 μ L de H₂O destilada (concentración final 1mM de Trolox). Se diluyeron los estándares como se muestra en la tabla siguiente. Se transfirieron 20 μ L de cada uno de los estándares en los pozos de una placa traslúcida de fondo plano de 96 pozos.

No	1mM de Trolox + H ₂ O	Vol (μ L)	Trolox (μ M)
1	100 μ L + 0 μ L	100	1000
2	60 μ L + 40 μ L	100	600
3	30 μ L + 70 μ L	100	300
4	0 μ L + 100 μ L (Blanco)	100	0

Se transfirieron 20 μ L de cada muestra en cada uno de los pozos de la placa de 96, colocando cada muestra por duplicado.

2.- Ensayo. Se preparó suficiente Reactivo de Trabajo para los pozos con muestras y estándares mezclando, por cada pozo de ensayo, 100 μ L del Reactivo A y 8 μ L del Reactivo B, formando el Reactivo de Trabajo. Se añadieron 100 μ L del Reactivo de Trabajo a todos los pozos del ensayo. Se cubrió la placa para mezclar y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

3.- las muestras se leyeron a una densidad óptica (OD) 570nm en un lector de placa, el cual en este caso fue un Varioskan™ Flash Multimode Reader de Thermo Scientific™.

Para las muestras cuyos valores salieron del rango de la curva se realizaron diluciones a fin de asegurar que la TAC entrara en la condición lineal de 1.5 a

1000 μM de los equivalentes de Trolox. Los resultados obtenidos se multiplicaron por el factor de dilución usado, en este caso 1:2.

Cálculos

Se sustrajo el valor de la OD del blanco (#4) de la OD de todos los estándares y de las muestras. Se graficó la $\Delta\text{OD}_{570\text{nm}}$ contra las concentraciones estándar y se determinó la pendiente y la curva estándar. Calculando la TAC de la muestra con la siguiente fórmula:

$$\text{TAC} = \frac{\text{OD}_{\text{muestra}} - \text{OD}_{\text{blanco}}}{\text{Pendiente } (\mu\text{M}^{-1})} \times n \quad (\text{Equivalentes de Trolox } \mu\text{M})$$

La $\text{OD}_{\text{muestra}}$ y la $\text{OD}_{\text{blanco}}$ corresponden a los valores de la $\text{OD}_{570\text{nm}}$ de la muestra y el H_2O blanco (estándar #4). n es el factor de dilución.

Anexo 2

Microscopía electrónica

Procesamiento:

- 1.- El tejido se cortó en piezas de 1 mm^3 , se fijó en glutaraldehído al 3% en buffer de cacodilato de sodio 0.1 M y pH 7.4.
- 2.- Se fijó a 4°C por 2 horas en inmersión. Se lavó 3 veces, cada una de durante 15 minutos, en el buffer de cacodilato de sodio + 8.5% de sacarosa y se realizó la posfijación con tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en el mismo buffer de cacodilato. Lavando la muestra nuevamente después de esto con el buffer de cacodilato 3 veces, durante 15 minutos en cada ocasión.
- 3.- Se trató con un lavado de ácido tánico para eliminar el exceso de osmio y se lavó con cacodilato de sodio una vez más.
- 4.- La muestra entonces se deshidrató con concentraciones ascendentes de etanol partiendo del 10%, pasando por el 96% hasta llegar al absoluto (100%), realizando 2 cambios cada 10 minutos. Finalmente se cambió el solvente por óxido de propileno, haciendo 2 cambios de 30 minutos para infiltrar la resina.
- 5.- La resina se colocó en moldes y se dejó polimerizar por 36 horas a 60°C en el horno.
- 6.- Para determinar el área de interés en el tejido se realizaron cortes histológicos de $0.5\text{-}1\mu\text{m}$, los cuales se recolectaron en un portaobjetos, se fijaron

con calor y se tiñeron con azul de ortotoluidina. Se observaron en el microscopio óptico.

7.- Cuando se determinó el área de interés en el tejido, se cortó cada bloque en el ultramicrotomo, obteniendo fragmentos de 60 – 90 nm, los cuales se montaron en rejillas de cobre de 300 mesh y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, ambos al 2%. Los cortes se observaron en el microscopio electrónico de transmisión JEOL, modelo JEM-1010, a 80 Kv.

Anexo 3

DNA mitocondrial

Procedimiento:

- 1.- Se tomó una muestra del tejido almacenado. Determinando la cantidad de tejido y evitando que excediera los 25 mg.
- 2.- Mecánicamente la muestra de tejido fue disuelta. Colocando los 25 mg de tejido en un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml conteniendo un máximo de 80 µl de PBS, donde la muestra se procesó en hielo con un homogenizador de tejidos (IKA Ultra-Turrax homogenizer) evitando que esta se calentara. Finalmente se añadió 100 µl de Buffer ATL.
- 3.- Se añadió 20 µl de proteinasa K, usando un vortex para mezclarlo, y se incubó en un baño seco a 56°C en un “overnight” hasta que el tejido se encontró completamente lisado.
- 4.- El tubo se centrifugó brevemente para remover todas las gotas de la tapa del tubo.
- 5.- Se agregaron 200 µl del Buffer AL a la muestra, mezclando durante 15 segundos en el vortex, e incubando a 70°C por 10 minutos. Nuevamente se centrifugó brevemente para remover las gotas de la tapa.
- 6.- Se añadieron 200 µl de etanol (96-100%) a la muestra, mezclando en el vortex por 15 segundos y posteriormente centrifugando brevemente para eliminar los residuos de la tapa.
- 7.- La mezcla obtenida se colocó en una columna de centrifugación QIAamp mini la cual a su vez se encontraba en un tubo recolector de 2 ml. La columna se cerró firmemente y centrifugó a 6,000 g (8,000 rpm) por 1 minuto, de ser

necesario se aumentó la velocidad pues la solución debía atravesar la columna por completo. La columna posteriormente fue colocada en un tubo recolector limpio y el tubo recolector anterior se descartó junto con el filtrado.

8.- Cuidadosamente se añadieron 500 µl del Buffer AW1 a la columna y se centrifugó a 6000 g por 1 minuto.

9.- Se añadieron 500 µl del Buffer AW2 y se centrifugó a máxima velocidad (20,000 g o 14,000 rpm) durante 3 minutos. Se descartó el filtrado y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad por 1 minuto, descartando el tubo con el filtrado.

10.- La columna se colocó en un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml, y se le agregó 200 µl del Buffer AE con el que se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar a 6,000 g por 1 minuto.

11.- Las muestras fueron cuantificadas en espectrofotómetro nanodrop (NANODROP 1000, Thermo Scientific) para determinar la cantidad de mtDNA contenida en cada una de ellas.

Anexo 4

Extracción de RNA

1.- Se tomó una muestra de 50-100 mg la cual fue homogenizada mecánicamente con un IKA Ultra-Turrax homogenizer en 1 ml de trizol, colocando la muestra en hielo, evitando que el tubo se calentara.

2.- Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).

3.- Se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de trizol usado, mezclando vigorosamente en el vortex durante 15 segundos a 1 minuto. Se incubó 2-3 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).

4.- Se centrifugó por 15 minutos a 12,000 g.

5.- La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, donde se adicionaron 0.5 ml de isopropol mezclando por inversión.

6.- Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).

7.- después se colocó en hielo, incubándose por 5 minutos.

8.- Se centrifugó a 12,000 g, decantando el sobrenadante.

9.- Se colocó 1 ml de etanol por cada ml de trizol usado y se centrifugó a 7,500 g por 5 minutos.

10.- Se decantó y se colocó nuevamente 1 ml de etanol, repitiendo el paso anterior. Después de decantar e dejó secar.

11.- La muestra fue reconstituida en 50-30 μ l de agua libre de rnsa (1 μ l de RNAsa out por cada 500 μ l de agua) según el tamaño del pellet.

12.- Las muestras fueron cuantificadas en el espectrofotómetro nanodrop (NANODROP 1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) para determinar la cantidad de RNA contenida en cada una de ellas. Los valores obtenidos corresponden a la concentración de ácido nucleico en ng/ \square L y también a las relaciones entre las absorbancias de la muestra a 260 y 280 nm, así como a 260 y 230 nm.. La relación 260/280 indica la pureza del ácido nucleico, los valores de pureza de RNA oscilan alrededor de 2.0. Mientras que la relación 260/230 es un indicador secundario de la pureza de los ácidos nucleicos y comúnmente se encuentra en el rango de 1.8-2.2. La obtención de valores menores a estos indica la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes.

La integridad del RNA también se evaluó por medio de electroforesis en geles de agarosa.

Anexo 5

Extracción nuclear

1.- Se colocaron en un tubo 5ml/g de tejido del buffer A y se homogenizó evitando calentar la muestra, por lo que el tubo se colocó en hielo.

2.- En otro tubo se colocaron 15 ml del buffer B y sobre este se decanto el homogenizado del buffer A creando un gradiente, quedando en la fase superior el homogenizado con el buffer A.

3.- Se centrifugó a 4°C a 1500 g durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml del buffer C. Las muestras se alicuotaron y almacenaron a -70°C para su posterior uso.

Anexo 6

Fluor de Lys®-SIRT1 plus NAD⁺

Reactivos:

BML-SE239-0100 SIRT1 (Sirtuina 1, hSir2^{SIRT1})(recombinante de humano)

BML-KI177-0005 Fluor de Lys-SIRT1, sustrato desacetilado, concentración de stock 5 mM en 100 µl.

BML-KI176-1250 Fluor de Lys Developer II Concentrado (5x) en 250 µl.

BML-KI282-0500 NAD⁺ (Sustrato de la sirtuina), concentración de stock 50 mM en 500 µl.

BML-KI283-0500 Nicotinamida (Inhibidor de la sirtuina), concentración de stock 50 mM en 500 µl.

BML-KI284-0010 Resveratrol (Activador de la sirtuina), concentración de stock 100 mM, resuspendiendo 10 mg en 0.44 ml de etanol.

BML-KI285-0010 Suramina sódica (Inhibidor de la sirtuina), concentración de stock 25 mM, resuspendiendo 10 mg en 0.27 ml de buffer de ensayo.

BML-KI142-0030 Fluor de Lys, Estándar desacetilado, concentración de stock 10 mM disuelto en 30 µl de dimetilsulfoxido (DMSO).

BML-KI286-0020 Buffer de ensayo.

Consideraciones antes de iniciar:

Los reactivos se descongelaron calentándolos con los dedos, una vez descongelados todos se colocaron de inmediato en hielo.

Se usó la placa opaca blanca proporcionada por el kit debido a que aumenta la señal obtenida.

Las muestras se compararon a un "tiempo cero" y a un control negativo sin enzima.

Preparación de los reactivos:

Se preparó una dilución de los sustratos Fluor de Lys-SIRT1, sustrato desacetilado y de NAD⁺ en buffer de ensayo; llevándolos a una concentración de 64 µM y 3 mM, respectivamente, en la mezcla que será usada en la primera fase.

Justo antes de usarse en la segunda fase, se preparó la mezcla de Fluor de Lys Developer II y nicotinamida (2mM), donde un ml de la mezcla contenía 760 µl de buffer de ensayo, 200 µl de Developer II 5x y 40 µl de nicotinamida 50 mM.

Ensayo:

La tabla muestra la cantidad usada para cada una de las muestras en la fase I.

	Buffer de Ensayo	SIRT1	Solvente, control o muestra de SIRT1	Substrato Fluor de Lys®-SIRT1 plus NAD ⁺	Volumen Total
Blanco (Sin enzima)	35 µl	0	0	15 µl	50 µl
Tiempo cero	30 µl	5 µl	0	15 µl	50 µl
Control	20 µl	15 µl	0	15 µl	50 µl
Control etanol	25 µl	0	10 µl	15 µl	50 µl
Resveratrol (Control +)	20 µl	5 µl	10 µl	15 µl	50 µl
Suramina (Control -)	20 µl	5 µl	10 µl	15 µl	50 µl
Muestras	20 µl	0 µl	15 µl	15 µl	50 µl

En cada pozo se cargaron 50 µl de manera dividida, 25 µl correspondían a 10 µl del buffer de ensayo más la SIRT1 ó el solvente control ó la muestra con SIRT1. Los siguientes 25 µl correspondían a 10 µl del buffer de ensayo más 15 µl del sustrato Fluor de Lys®-SIRT1 plus NAD⁺.

Se colocaron los 25 µl de la fase I en los pozos correspondientes.

Se calentó la placa y la solución del Substrato Fluor de Lys®-SIRT1 plus NAD⁺ a 37°C.

La reacción de la fase I inició al agregar 25 µl del Substrato Fluor de Lys®-SIRT1 plus NAD⁺, mezclando ligeramente. No se añadió Substrato Fluor de Lys®-SIRT1 plus NAD⁺ a los pozos correspondientes al “tiempo cero”.

Se incubó la placa durante 45 minutos a 37°C para que la reacción de la fase I se llevara a cabo. Al finalizar este periodo la reacción se detuvo añadiendo 50 µl de la mezcla de Developer II 1x y nicotinamida 2 mM. En este momento se

añadió 25 μl de la mezcla Substrato Fluor de Lys®-SIRT1 plus NAD^+ a los pozos correspondientes al “tiempo cero”.

La placa se incubó a 37°C durante 45 minutos.

Las muestras se leyeron por duplicado en el equipo Varioskan® Flash de Thermo Scientific a una longitud de onda de excitación de 365 nm y se detectó en una longitud de emisión de 465 nm. Se tomaron 7 lecturas a intervalos de 5 minutos para asegurar que la señal fluorescente se había desarrollado por completo.

Curva estándar:

Usando el buffer de ensayo se prepararon diluciones del reactivo Fluor de Lys, Estándar desacetilado para la realización de la curva. Las concentraciones usadas fueron 0, 2.5, 5, 10, 20 y 40 μM .

Se colocaron 50 μl de cada una de las diluciones, y para el punto cero se colocaron 50 μl de buffer de ensayo.

Se preparó el reactivo Developer II a una concentración 0.2x en buffer de ensayo.

Se mezclaron 50 μl de Developer II con 50 μl de cada dilución del estándar y se incubó a 25°C durante 10 minutos.

Las muestras se leyeron por duplicado en el equipo Varioskan® Flash de Thermo Scientific a una longitud de onda de excitación de 365 nm y se detectó en una longitud de emisión de 465 nm.

La señal fluorescente (eje y) fue graficada contra la concentración del estándar desacetilado (eje x). Determinando la pendiente como $\text{AFU}/\mu\text{M}$.