

147
2es



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACION DE LOS NIVELES DE GLUTATION
SANGUINEO DE GALLINAS DE POSTURA
ALIMENTADAS CON DIFERENTES FUENTES
DE PIGMENTOS**

FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
MIRIAM LOPEZ CARMONA

ASESORES:

- MSC. MVZ. ALMA E. BOCHA HERNANDEZ**
- MSC. MVZ. ERNESTO AVILA GONZALEZ**
- DBA. MARTHA ZENTELLA DE PIÑA**
- MVZ. JOSE MAURO ARRIETA ACEVEDO**





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 está 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.

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN
SANGUÍNEO DE GALLINAS DE POSTURA
ALIMENTADAS CON DIFERENTES FUENTES DE
PIGMENTOS.**

Tesis presentada ante la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista
por

LÓPEZ CARMONA MIRIAM.

Asesores:
MSc. MVZ. Alma E. Rocha Hernández
MSc. MVZ. Ernesto Avila González.
Dra. Martha Zentella de Piña.
MVZ. José Mauro Arrieta Acevedo.

México, D.F., 1995.

DEDICATORIA

A mi madre, quien con amor, dedicación y esmero, me ha apoyado en todos los aspectos de mi vida, impulsando mis proyectos, y dándome el aliento necesario para seguir adelante. Con todo mi amor te dedico este trabajo.

A mis hermanos Diana, Paty, Rosario, Luis y Juana, a quienes debo gran parte de este trabajo y con quienes a pesar de todo he muy estado unida, esperando que sigamos trabajando juntos para seguir adelante.

A Alain E., Eduardo, Diana A, Felix y Eduardo, estas cinco bellas personas que al integrarse a la familia, han dado luz y alegría a nuestra familia.

A ellos, quienes con mucho trabajo han logrado seguir adelante
quienes no vacilan en respaldar sus costumbre y su forma de ver la vida
quienes a pesar de quinientos años de abuso y explotación, siguen
quienes viven y dejan vivir, libres, con el sol a cuestas mirandolos.

A ellos, que son parte de la naturaleza y que viven en armonia con ella
quienes se entremezclan con las plantas y animales y no les estorban
quienes tienen el tiempo de mirar al horizonte, y disfrutar de su belleza
quienes no necesitan de un reloj, o calendario para saber que hacer

A ellos, que viven y disfrutan la vida y no la destruyen
quienes no necesitan periódicos o aparatos para estar al día
quienes viven y sufren y gozan cada momento de su vida
quienes se han esforzado por respetar la vida, aunque no sea humana.

A ellos, por los mucha gente lucha sin que nadie se los pida
quienes son explotados, culpados y despreciados
quienes si soportan y callan son buenos
pero si gritan y exigen son malos

A ellos, que no tienen nada, que no son nadie,
que todos pensabamos que no existían,
a ellos dedico tambien mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola.

Al Laboratorio 5 de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

A la Ing. Susana Ramírez Ruiz Esparza, responsable del Comité de Becas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por el apoyo recibido para la realización de este trabajo

Al Msc. Ernesto Avila González, por su confianza, apoyo y valioso tiempo, que espero no haber defraudado.

A las Dras. Marta Zentella de Piña y Alma E. Rocha Hernández, quienes me brindaron su confianza y apoyo, para el desarrollo de esta tesis.

A el MVZ. J. Mauro Arrieta A., por el apoyo, confianza, esfuerzo y amistad que espero perdure por muchos años.

A los MVZs. Ezequiel Sanchez y Elizabeth Posadas, por la sonrisa, la confianza y la amistad que me han brindado.

A los MVZs. Sara Caballero, Guillermo Tellez, Here A. Rodríguez, Luis Corona, miembros del Jurado de la defensa de Tesis, por las valiosas aportaciones que le hicieron al presente trabajo.

Al los MVZs. Gloria, Jaime, Juan y Paco, quienes me apoyaron siempre en la toma de muestras, preparación del alimento que se realizó en la granja y además el saludo y la sonrisa de cada día.

A los trabajadores del CEIEPA y del laboratorio 5 de Bioquímica, en especial a Don Chon, quien siempre se esmero en el cuidado de las gallinas.

Al MC. Sergio Corona y a la MVZ. Ivonne Caballero Cruz, por el interes, el tiempo y la asesoría recibida para el desarrollo del presente trabajo.

A Agustín Carmona y Sara Pedraza, por apoyarnos, desde hace ya muchos años.

A Oscar Trejo, Sandra Ugalde y Oscar Martínez, por brindarme alegrías, tristezas, triunfos, logros, compañía, diversión y vida durante casi diez años de amistad incondicional y de apoyo mutuo.

A Ana M. Cañedo, por ser tan buena amiga y una bella persona con quien puedo contar siempre.

A Leticia López, M. Leticia Murcio y Elsa V. Alvarez, por compartir momentos de esfuerzo, amistad y trabajo, y espero sigamos teniendo muchos logros.

A Lilia A. Reyes, con quien a pesar de haberla tratado por poco tiempo, ha sido para mí una magnífica amiga, compañera de momentos tristes y alegres, además de ser muy comprensiva.

A Néstor Castro, por su tiempo y espacio.

A Sisson, Unamuno, chispita, Chetos, Nacho, Minerva, Issac, Teresa, Omar Gabriel y a todos los que compartimos momentos de alegría, tristeza y amistad dentro y fuera de la Facultad.

A Leonardo Valderrama M., con quien durante mucho tiempo he conservado una bella amistad, y que aunque lejos, lo recuerdo con mucho cariño.

A Tere Torres, quien además de brindarme su casa, me ha brindado una parte más importante: su amistad.

A Carlos Dávila, quien me ha apoyado en momentos difíciles y al que en poco tiempo he llegado a considerar una magnífica persona y un gran amigo.

A Lucero, Nacho, José Luis, Luis, Miriam, Romano, Favio, Ovi, Jorge, Humberto, Vero y todos los demás ENAHnos, que me han brindado su compañía y su apoyo para terminar este trabajo.

GRACIAS

El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola , de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, así mismo, los análisis de laboratorio se realizaron en el laboratorio 5 del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, con el apoyo del proyecto de la Dirección General de apoyo al Personal Académico (DGAPA) (Proyecto No. IN210094), y del Programa Universitario de Alimentos (PUAL).

CONTENIDO.

	<u>Página</u>
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
Hipotesis.....	18
Objetivo.....	18
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSIÓN.....	28
6. LITERATURA CITADA.....	33
7. CUADROS.....	41
8. FIGURAS.....	43

RESUMEN

LÓPEZ CARMONA MIRIAM. Determinación de los niveles de glutatión sanguíneo de gallinas de postura alimentadas con diferentes fuentes de pigmentos. (Bajo la dirección de Msc.MVZ. Alma E. Rocha H., MSc.MVZ. Ernesto Avila G., Dra. Martha Zentella de P., MVZ. J. Mauro Arrieta A.).

El uso de pigmentos en la alimentación de las aves reviste gran importancia; sin embargo, se desconoce si estos, pueden modificar los niveles de glutatión total en sangre. El objetivo de este estudio, fue el de cuantificar la reserva de glutatión total en sangre de gallinas de postura, en cuyo alimento se añadieron pigmentos, para formar cinco diferentes tratamientos, los cuales consistieron en: sin pigmentos (tratamiento 1); xantofilas amarillas naturales (tratamiento 2); xantofilas amarillas y rojas naturales (tratamiento 3), xantofilas amarillas naturales y xantofilas rojas sintéticas (tratamiento 4) y xantofilas amarillas naturales y sudanes (tratamiento 5). Durante cada una de las 8 semanas que duró este experimento, se realizó el registro de los parámetros productivos de las gallinas, en los cuales no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos. En la evaluación del color de la yema de huevo con el abanico colorimétrico de Roche, se notó un aumento en la coloración de la yemas de huevo de las gallinas a las que se les adicionó pigmentos amarillos y rojos en el alimento, encontrando valores en la escala de Roche, de 1 para el tratamiento 1 de 3.8, para el tratamiento 2; para los tratamientos 3 y 4, 10.4 y 10.7 respectivamente, y 13.9 para el tratamiento 5. La medición con un colorímetro de reflectancia, en cuanto a brillantez, intensidad de rojo e intensidad de amarillo, indicaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), existiendo efectos a la adición de los pigmentos amarillos y rojos en estas variables. En cuanto a los niveles de glutatión total sanguíneo evaluados en las gallinas, se observó que los pigmentos modifican las reservas de glutatión total sanguíneo. En la primera semana de experimentación se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos 2, 3, 4 y 5 con respecto al tratamiento 1 (testigo). El glutatión en sangre por cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC) y por el método de Akerboom, no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a los niveles de glutatión reducido y glutatión total respectivamente; sin embargo, el método utilizado para el HPLC, arrojó datos importantes en cuanto el glutatión oxidado, donde se encontró un valor más bajo para el tratamiento 5, que incluyó sudanes y los más altos para los tratamientos 4 y 1 respectivamente ($P < 0.05$); lo que sugiere, que la mayor parte de los sudanes son eliminados por la yema de huevo y una parte de sudanes son eliminados por la gallina a través de la conjugación de glutatión.

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN SANGUÍNEO DE GALLINAS DE POSTURA ALIMENTADAS CON DIFERENTES FUENTES DE PIGMENTOS.

INTRODUCCIÓN.

Los aditivos alimenticios incluyen un amplio número de compuestos que se agregan al alimento de las aves para mejorar la textura, la fabricación de pastillas “pellets”, evitar la pérdida de nutrientes, formación de compuestos tóxicos y un aspecto importante, mejorar el peso de las aves, la conversión alimenticia y la calidad de los productos avícolas (14). Hoy en día es prácticamente universal el uso de aditivos en las raciones que se suministran a las aves en las explotaciones comerciales, y son escasas las investigaciones que evalúan los posibles efectos que esto provoca a nivel celular (5).

Dentro del rubro de los aproximadamente 3000 aditivos alimenticios usados en México, se puede citar a los pigmentantes, los aglutinantes, los saborizantes, los antioxidantes y los antibióticos, cada uno de ellos con un gran número de productos y marcas comerciales (43). En cuanto a los productos alimenticios que han sido pigmentados, la investigación sobre la preferencia de los consumidores ha confirmado que equivocadamente se asocia calidad con intensidad de pigmentación asumiendo que una tonalidad naranja en las yemas de huevo y en la piel de los pollos de engorda es mucho mejor (9, 46, 59).

La coloración de la yema es, después del color del cascarón y la frescura del producto, el tercer criterio de calidad más citado por los consumidores. Hasta el valor 9-10 de la escala del Abanico colorimétrico Roche, el color puede clasificarse como amarillo; más allá de esta cifra se trata de un color naranja cada vez más oscuro (53). La obtención de una coloración fuerte (oscura, por encima de 10 en la escala de Roche) no se puede lograr solo con pigmentos amarillos y requiere la participación de pigmentos rojos(5, 14, 53).

Cuando el aporte alimentario de xantófilas amarillas supera las 20 ppm, el contenido de pigmentos de la yema también aumenta, pero la apreciación visual del color amarillo se estabiliza. Para poder superar este inconveniente visual, se utilizan pequeñas cantidades (1 ppm) de pigmentos rojos. Cuando se añaden estos pigmentos rojos a dietas con menor cantidad de xantófilas amarillas, que aseguren una buena coloración amarilla de fondo (próxima a 9, en la escala del Abanico colorimétrico de Roche), se puede obtener una coloración naranja constante (próxima a 13) en la yema (53).

Los pigmentantes que se adicionan representan del 1 al 2% del costo del alimento avícola para gallina en México, y a pesar de esto no se conocen exactamente los efectos que estos provocan en las aves y su repercusión en el metabolismo celular del hombre (5, 14, 59).

Los pigmentos que se utilizan en la industria avícola en general provienen de materias primas, como: la flor de compasúchil, la harina de chile, el maíz amarillo, el gluten de maíz y la harina de alfalfa, principalmente (4, 43, 47). También se utilizan en México, carotenoides sintéticos amarillos y rojos (5,

14), así como colorantes que no están permitidos en varios países por su posible efecto tóxico como los sudanes (5, 14).

Los pigmentos se han clasificado de la siguiente manera (5, 36, 43, 45):

I- LIPOCROMOS:

I. 1. Sudanes

I. 2. Anilinas

II. CAROTENOIDES:

II. 1. Carotenoides:

II. 1. 1. B-carotenos

II. 2. Oxicarotenoides:

II. 2. 1. Xantofilas naturales:

II. 2. 1. 1. Luteína

II. 2. 1. 2. Zeaxantina

II. 2. 1. 3. capxantina

II. 2. 2. Xantofilas sintéticas:

II. 2. 2. 1. Ácido B-apo-carotenoico

II. 2. 2. 2. Cantaxantina

II. 2. 2. 3. Citranaxantina

I. LIPOCROMOS:

Son colorantes de alta especificidad para teñir la grasa corporal a la cual le proporcionan un color naranja, entre estos, se encuentran los sudanes que mezclados con otros colorantes (anilinas, rojo escarlata y otros), pueden aumentar la intensidad del color de la piel del pollo de engorda y la yema de huevo, de una escala amarillo a rojo (43).

El Sudán III (1-4(p-phenylazo) 2- Naphthalenol. $C_{22}H_{16}N_4O$); tiene un poder colorante café rojizo. Es insoluble en agua; es soluble en cloroformo y ácido acético glacial. Es moderadamente soluble en alcohol, éter, acetona, aceites volátiles y glicerol caliente. Se usa como colorante, también es usado para el tinte de tinciones de muestras patológicas de tejidos animales y vegetales, los cuales son teñidos de rojo, excepto la celulosa de las membranas que no puede ser coloreada. Está aprobado por la Feed and Drug Administration (FDA), para uso externo solamente (38).

La Ley General de Salud en México, en su artículo 621, dice: "Se prohíbe el empleo, suministro y expendio de huevo que presente alguna o varias de las siguientes características: estar alterado, presentar mal olor o sabor; estar sucio, con cáscara manchada de sangre o excremento; tener la clara de color verdoso; tener el disco germinal desarrollado; estar incubado; estar desprovisto de yema; estar contaminado con bacterias u hongos; que la cámara de aire sea mayor de 5 mm. de altura; que presente fracturas; que presente cuerpos extraños o parásitos; que se encuentre laminada la clara y poco

consistente, y QUE PROVENGAN DE AVES EN CUYO ALIMENTO SE LE HAYA ADICIONADO COLORANTES DE LOS DENOMINADOS "SUDANES"(31).

No obstante esto último los sudanes por su bajo costo se emplean comunmente en dietas de gallinas *.

A través de la investigación realizada durante el año 1993, por el Comité Técnico de Normalización Nacional de Alimentos Balanceados de la Gerencia de Normalización y Calidad de la Camara Nacional de la Industria de la Transformación (CANACINTRA, 1993). Se identificó que, aproximadamente el 45% de los huevos producidos en el país, fueron positivos al uso de colorantes azoicos no permitidos. Los sudanes ocasionan graves daños a la salud pública, ya que, por su composición química, se metabolizan y almacenan en el hígado y se transforman en productos carcinogénicos, son liposolubles y tienen efectos aditivos y nocivos a largo plazo (27, 54).

II. CAROTENOIDES:

Son compuestos orgánicos lipídicos que se encuentran en forma de ester, son clasificados como hidrocarburos y presentan 40 carbonos en su molécula, son solubles en disolventes apolares y en grasas e insolubles en agua. Estos son clasificados a su vez en dos grupos principales carotenos y oxicarotenoides (4, 5, 36, 45).

* comunicación personal del Dr. Ernesto Avila González.

Los carotenos son una serie de hidrocarburos polihénicos y el de mayor importancia es el B- caroteno, el cual es precursor de la vitamina A y no pigmenta la piel, ni el tejido adiposo animal (26, 36, 43).

Los oxicarotenoides en su estructura de hidrocarburos contienen oxígeno, a estos se les conoce también como xantofilas y en su forma natural se encuentran esterificadas a ácidos grasos (4, 5, 6, 7, 36, 42, 43).

Dentro de las xantofilas naturales se encuentran más de 400 compuestos, y solo algunos tienen características pigmentantes importantes (43). Las principales xantofilas naturales son: La luteína, que se encuentra presente en varios pastos, la alfalfa y la flor de Cempasúchil (*Tagetes erecta*), y que proporciona un color amarillo. La zeaxantina, que se encuentra en el gluten de maíz y en el maíz amarillo (*Zea maiz*) y proporciona un color anaranjado. La capxantina, que proviene de los chiles del género *Capsicum*, proporciona colores que varían del rojo al anaranjado. La cantaxantina la cual se encuentra en los hongos, en las plumas de flamingo y en la cubierta externa de algunos peces y crustáceos, la cual proporciona un color rojo. La mioxantofila, que proviene de la alga Spirulina, que proporciona un color café (36, 43).

Las xantofilas sintéticas son el ácido B-apocarotenoico, que es fuente de xantofilas amarillas, la cantaxantina fuente de pigmentos rojos al igual que la citranaxantina (5, 43).

Absorción y metabolismo de los Oxicarotenoides.

La luteína (xantófila amarilla pigmentante), se encuentra disponible libre en los productos hidrolizados de xantofilas de flor de cempasúchil por lo que su absorción se efectúa en el duodeno y en la parte superior del yeyuno, el resto de los carotenoides son absorbidos en la parte superior y media del ileon. La luteína, el principal carotenoide en una dieta de aves, puede ser acetilada para formar luteína monoéster y luteína diéster, los ésteres pueden ser deacilados para formar otra vez luteína (15, 23).

Luteína (suero) > Luteína (tejido) > Luteína monoéster(tejido) >Luteína diéster (tejido)

La mayoría de los carotenoides deben ser saponificados en el tracto gastrointestinal, para que puedan ser absorbidos más fácilmente por el intestino. La saponificación *in vitro* de las xantófilas, principalmente las que se encuentran en la flor de cempasúchil, duplica la tasa de absorción intestinal por quedar libre la luteína y no esterificada a los ácidos grasos (36). La absorción de las xantófilas esta directamente relacionada con la absorción de grasa (4, 5, 6, 36).

La absorción de los pigmentos de la dieta se mejora con la presencia de grasas insaturadas y se reduce por almacenamiento excesivamente prolongado de los alimentos (por regla general, un 30 a 100% de los pigmentos se destruyen al cabo de 3 meses) (26, 53). Para que las xantófilas puedan

cumplir con su función pigmentante, se asimilan a nivel intestinal, son transportadas por la sangre y se depositan en el hígado. En los pollos de engorda se movilizan hacia la piel, los tejidos grasos y los tarsos y en las gallinas de postura llegan hasta el ovario, en donde se almacenan y son eliminadas parcialmente en las yemas de huevo (4, 5).

La elección de los pigmentos a utilizar depende también de la eficacia con que la gallina los transfiere al huevo; esta eficacia es variable, pero siempre, es bastante baja. La xantofila roja que mejor se transfiere es la cantaxantina (53).

El proceso de pigmentación.

Uno de los grandes retos que enfrentan., tanto el nutriólogo, como el patólogo y el productor avícola es lograr resultados de pigmentación eficiente, esto se alcanza a lo largo de una serie de eventos, que se inicia, en el caso de la utilización de la flor de cepasúchil, con una buena selección de semillas de la flor, cuidado del cultivo, recolección de la flor, procesamiento del producto, cria de los pollos, hasta un extremoso cuidado en el procesamiento del pollo de engorda. Puede decirse que no existe evento alguno dentro del manejo, alimentación o salud del pollo que no se interrelacionen con el resultado final de la pigmentación (15, 47).

Para lograr una buena pigmentación se requieren revisar varios factores, entre ellos se mencionan los siguientes:

- Pigmentación natural de alta biodisponibilidad: Los animales no tienen la capacidad de sintetizar los oxicarotenoides, por lo cual deben llegar a ellos a través de la alimentación. La materia prima (flor del cempasúchil y frutos de *Capiscum*) para obtener estos pigmentos debe ser sometida a una previa deshidratación, después es sometida a un proceso de extracción, saponificación, estabilización e integración del pigmento. Un pigmento natural de buena calidad deberá poseer un excelente perfil de oxicarotenoides estables en estado libre, además ser integrado a vehículos adecuados con el fin de aportar al ave un producto de alta biodisponibilidad. Durante la fabricación del alimento se debe tener especial cuidado en la dosificación del pigmento y en su proceso de mezclado, para que la distribución de los pigmentos sea uniforme. Además de que la mezcla debe tener un adecuado balance nutricional y se debe evitar la presencia de componentes que afecten a los pigmentos, por ejemplo: grasas rancias, falta de antioxidantes o antioxidantes de mala calidad, aflatoxinas, organoclorados, organofosforados, metales pesados, entre otros (15).

GLUTATIÓN.

Antecedentes del glutatión.

En 1921, se aísla de diferentes tejidos una molécula dipeptídica, a la que llamo glutatión, por encontrar en ella la presencia de cisteína y ácido glutámico, y se observó que esta era fácilmente oxidable. En 1929, determinan su estructura por medio de análisis químicos con ácidos y bases, estableciendo que era una unión entre tres aminoácidos no esenciales (ácido glutámico, cisteína y glicina). Para 1953, se estudian sus propiedades químicas, su transformación metabólica, sus fuentes como coenzima y su relación con entidades patológicas. En 1970, se realizan estudios sobre los niveles de glutatión en eritrocitos de carnero. En 1971 y 1973, se hace un modelo como intento de explicar el mecanismo de acción del glutatión, encontrando gran relación con el ciclo de la gama-glutamilcisteína. En 1976 se enfatiza la relación del glutatión con el metabolismo de las drogas y sustancias endógenas del hígado. En el periodo de 1979 a 1989 se determinaron niveles de glutatión de diferentes tejidos, asociando algunos datos a diversos estados patológicos de tejidos (1, 10, 18, 63).

Actualmente la literatura cita al glutatión como un tripéptido (gamma-glutamilcisteinglicina) compuesto de ácido glutámico, cisteína y glicina, este tripéptido es resistente a la peptidasa, y su metabolismo es único (1, 3, 8).

El glutatión se encuentra en la mayoría de las células participando en múltiples funciones, entre las que se encuentran, proteger a las células de la peroxidación lipídica, regulación de la actividad enzimática de la célula (1, 2, 16, 17, 18, 60, 61, 62), modulación de la síntesis proteica, (manteniendo los niveles de tioles en las proteínas) (1, 25), metabolismo de agentes electrofílicos (radicales libres), neutralización de peróxidos que se liberan por los macrófagos (22), el glutatión también participa en la síntesis de leucotrienos (8), regula la actividad enzimática de la célula normal (3, 22, 62, 63). También interviene en la síntesis de hormonas esteroideas y de las prostaglandinas E2 y F2a (19, 52), en el transporte de bilirrubina y pigmentos biliares a través de la membrana (30), además interviene en la homeostasis del Ca (52, 63).

Síntesis del glutatión.

Su síntesis se lleva a cabo principalmente en el hígado de donde posteriormente se transporta al resto de las células (8, 25, 62); dicha síntesis es muy diferente a la que ocurre en el resto de los peptidos grandes (el RNA no está involucrado), y esta consiste en dos pasos: primero se une el ácido glutámico a la cisteína, por medio de la enzima γ -glutamilsintetasa, después se une a la glicina por medio de la glutatión sintetasa formando glutatión reducido (8).

El glutatión se encuentra en dos formas, la reducida (GSH) que es soluble en agua, y la oxidada (GSSG) que es insoluble en agua. La suma de glutatión reducido (GSH) más glutatión oxidado (GSSG) se conoce como glutatión total (1, 3, 18).

En su forma reducida el glutatión posee un grupo sulfhidrilo libre y actúa como amortiguador de sulfhidrilos que mantiene en estado reducido, la cisteína de la hemoglobina y otra proteínas del eritrocito, además participa en los mecanismos de desintoxicación al reaccionar con el peróxido de hidrogeno y los peroxidos orgánicos (1, 8, 50, 57).

En su forma oxidada el glutatión tiene dos moléculas de glutatión unido por un enlace a un grupo sulfhidrilo-cisteína (3, 8, 19).

Los estudios realizados sobre la capacidad detoxificante del glutatión revelan que dicha molécula juega un papel muy importante en la protección celular frente a la acción de ciertos xenobióticos, remoción de hidroperoxidos, protección contra los efectos de la radiación ionizante, mantenimiento del estado sulfhidrilo de las proteínas y modulación de la actividad enzimática por intercambio de disulfuros (1, 8).

Este compuesto reviste gran interés en el area de la nutrición ya que el organismo lo utiliza para diversas reacciones:

- Los niveles de dos de las enzimas más importantes en el metabolismo el GSSG y del GSH pueden estar determinados por la dieta, los cuales en caso de deficiencias pueden ser prevenidos por la adición de cisteína o metionina (8, 17, 61)
- El glutatión esta involucrado en el transporte de aminoácidos y en el ciclo g-glutamil (8, 57)

- El GSH es enzimáticamente conjugado con xenobioticos electrofilicos y juega un importante papel en su detoxificación. (3, 8, 22)
- El GSH es imprescindible para mantener la estructura nor. mal de glóbulo rojo y conservar la hemoglobina en forma ferrosa (8, 57).

El glutatión interviene en los procesos de oxido-reducción que estan mediados por dos grupos enzimáticos básicos:

1. Las reductasas dentro de las cuales se encuentran la glutatión reductasa y la tioredoxina reductasa, la primera cataliza la transformación de GSSG a GSH, en la cual interviene el NADPH (1, 8, 11, 37, 57).
2. Las oxidasas, las principales son: la glutatión peroxidasa y la mercapto piruvato transferasa, que tienen por objetivo principal neutralizar la citotoxicidad de las moléculas altamente reactivas a las que se les ha llamado radicales libres (8, 56).

La glutatión peroxidasa cataliza la reducción de peroxidos de hidrogeno o de hidroperoxidos. Este sistema es muy importante para la protección de células del daño oxidativo. El selenio es un componente esencial de esta enzima y la concentración de esta enzima se reduce cuando existen deficiencias de selenio en la dieta (8, 20, 40, 41).

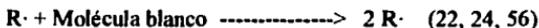
Las enzimas glutatión transferasas, son un grupo de enzimas con un papel relevante en la detoxificación de algunos xenobióticos (8, 25, 32, 58).

RADICALES LIBRES.

Los radicales libres, son moléculas independientes que poseen un electrón impar en el último orbital que las hace moléculas inestables, capaces de asociarse con cualquier átomo, siendo por esto altamente tóxicos (22).

La peroxidación de lípidos insaturados se ha estudiado en la grasa y aceites que se oxidan (rancidez) al permanecer expuestos al aire, pero el estudio de la peroxidación se ha extendido a los organismos biológicos por la variedad de enfermedades en que se involucran (13, 56).

Los compuestos implicados en el daño celular son principalmente compuestos relacionados con el oxígeno (12, 52). Algunos de los más comunes son: el ión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peróxido lipídico (ROO), y el oxígeno, de los cuales el ($OH\cdot$) es de los más tóxicos, tiene un radio de acción de 30 Å a nivel local inicialmente, y su daño se extiende al generar más radicales libres (reacción en cadena):



Los radicales se forman durante los procesos metabólicos de la célula durante la cascada de la cadena respiratoria, por la reducción incompleta de moléculas y por la transformación de xenobióticos (48, 56).

Los radicales libres se unen a los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana formando dienos conjugados, proceso que puede ser cuantificado por la formación de malondialdehído (56).

FACTORES QUE INCREMENTAN LA FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES.

La ausencia de glucosa disminuye las concentraciones de GSH por lo que las células blanco quedan más expuestas al daño por radicales (3). Dentro del mecanismo de oxidación se reduce la concentración de ATP y NADPH+, disminuye la reserva de GSH por lo que los niveles de Ca intracelular aumentan estimulando las proteasas que filtran iones metálicos exacerbando la lipoperoxidación (22, 42).

Algunos métodos para detectar a los radicales libres son la espectroscopia, por los medios indirectos también se evalúa la lipoperoxidación a través del malondialdehido (MDA) o el dinitrofenilo que es proporcional al MDA (13, 52).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS XANTOFILAS

La habilidad de la xantofilas (cantaxantina, zeaxantina y astaxantina) como antioxidantes rompedores de cadena fue investigado mediante la peroxidación de liposomas de fosfatidilcolina (PC), bajo condiciones atmosféricas usuales en lípidos solubles y generadores de radicales hidrosolubles. Estas xantofilas retardan la propagación de la reacción de formación de los hidroperóxidos de la PC-OOH, atrapan radicales peroxil y son acarreadores de enlaces, pero sus efectos fueron menores al efecto protector del alfa tocoferol. Las xantofilas dietarias pueden, por lo tanto, estar ayudando en la resistencia de la membrana fosfolipídica contra el daño de la oxidación en vivo (29, 34, 39, 49).

Estudios epidemiológicos sugieren que las xantofilas como componentes dietarios se asocian con una baja incidencia de cáncer. Estas xantofilas dietarias son defensas antioxidantes contra los radicales oxhidril y los derivados de la fosforilación lipídica, los cuales están involucrados en el cáncer humano, sin embargo, se sabe que es pequeño el efecto antioxidante de las xantofilas contra la peroxidación lipídica que ocurre en los constituyentes biológicos (49).

En la actualidad es común el uso de aditivos (pigmentantes) en la alimentación avícola, sin embargo sus efectos no han sido demostrados en su totalidad, por lo que este trabajo trata de aportar algunos conocimientos sobre los efectos que provoca la adición de pigmentantes en los niveles de glutatión sanguíneo.

HIPOTESIS

a) No existe diferencia en la reserva de glutatión total sanguíneo de gallinas que consumen pigmentos en la ración, con respecto a gallinas que consumen alimento sin pigmento.

b) Existe diferencia en la poza de glutatión total sanguíneo, de gallinas que consumen alimento con sudanes.

OBJETIVO

Caracterizar la reserva de glutatión total sanguíneo, de gallinas de postura que consumen raciones con combinaciones de pigmentos amarillos y rojos utilizados comercialmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en Zapotitlán, Tlahuac, D.F., con una altitud promedio de 2250 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), entre los paralelos 19° y 15' de latitud oeste; bajo condiciones de clima templado húmedo, siendo el mes de enero el más frío y mayo el mes más caluroso, con una precipitación pluvial media de 747 mm. anuales. Las determinaciones de Glutación fueron realizadas en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la UNAM.

Se utilizaron 180 gallinas ponedoras Leghorn, de la estirpe Dekalb Delta, con 59 semanas de edad, alojando 3 aves por jaula, en una caseta convencional. Las aves fueron divididas en 15 grupos, con 12 gallinas cada uno; distribuidos aleatoriamente en la caseta.

Se empleó un diseño experimental completamente al azar, el cual consistió en la adición de varias sustancias pigmentantes en el alimento:

- Tratamiento I; sin sustancias pigmentantes (grupo testigo).
- Tratamiento II; 9.0 ppm de xantófilas saponificadas de flor de cempasúchil*
- Tratamiento III; 9.0 ppm de xantófilas saponificadas de flor de cempasúchil y 4.0 ppm de xantófilas saponificadas de frutos de Capsicum**

* Avelut amarillo (Productos vegetales del centro. S. A. de C.V.)

** Avelut rojo (Productos vegetales del centro S. A. de C.V.)

*** Lucantin rojo (BASF)

- Tratamiento IV; 9.0 ppm de xantófilas saponificadas de flor de cempasúchil y 2.0 ppm de xantofílas rojas sintéticas (cantaxantina)**.
- Tratamiento V; 9.0 pm de xantófilas saponificadas de flor de cempasúchil y 9.0 ppm de sudanes.

El alimento fue preparado en la planta de alimentos del CEIEPA (Cuadros 1, 2), considerando las necesidades establecidas por el National Research Council (NRC) y las recomendaciones del manual de la estirpe (44). Durante el experimento que duró ocho semanas se les suministró agua y alimento a libre acceso.

Se registró el consumo de alimento, la producción de huevo y el peso del mismo semanalmente, durante las ocho semanas de experimentación, además se llevó el programa de iluminación correspondiente hasta completar a la luz natural con la artificial a 16 hrs. diarias. También se monitoreo la pigmentación de las yemas de huevo en la quinta semana de experimentación, para lo cual se utilizó el abanico colorimétrico de Roche (1993) y un colorímetro de reflectancia Minolta CR-200, en el sistema CIELAB de brillantez (L), intensidad del rojo (a), e intensidad del amarillo (b), realizando las mediciones en todos los huevos puestos durante el último día de esa semana.

Además durante el tiempo que duró la prueba, una vez por semana (a excepción de la 7ª semana) se tomó un mililitro de sangre a partir de la vena braquial, en tubos Vacutainer heparinizados. Se homogeneizó la muestra rápidamente. Posteriormente la muestras con el anticoagulante, se mezcló con un mililitro de ácido perclórico al 2m + EDTA 4mM como desproteinizante, obteniéndose una solución 1:1 V/V. Manteniéndolas en hielo, al igual que el ácido perclórico. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 5000 r.p.m. a 0

°C en una centrifuga. Se decantó el sobrenadante en tubos de ensaye que fueron sellados con parafilm, consevandose congeladas en un refrigerador, a -51 °C, hasta su análisis. El procedimiento anterior se realizó con las muestras obtenidas de la primera a la sexta semana del tratamiento. Cabe señalar que todas las soluciones empleadas permanecieron en hielo a 4 °C.

ANÁLISIS DE LA MUESTRA.

Los procedimientos de análisis empleados para las muestras de sangre fueron: HPLC [High Performance Liquid Chromatography] (35), a las ocho semanas de experimentación y el método de Akerboom (1), durante todo el estudio; los cuales se describen a continuación:

MÉTODO HPLC (35)

Con el método por HPLC, se realizó la derivatización de la muestra mediante los siguientes pasos:

1. Se colocan 0.5 ml. de la muestra centrifugada
2. Se le adicionan 20 μmol /500 μl de gama glu-glu
3. Se le aplica 50 μl de 100 de ácido Iodoacético en 0.2 nM - cresol púrpura (0.0208 gr /ml de cresol púrpura, con el cual la muestra se torna rosa
4. Se añade 0.5 ml de KOH-KHCO (40ml / 160 ml), se mezcla perfectamente y esta mezcla se colorea de púrpura, se guarda en la obscuridad durante 30 min. a temperatura ambiente.
5. Se le agrega finalmente 1 ml de Flouro Di Nitro Benzeno (FDNB), se tapa con parafilm y se mezcla, se guarda en la oscuridad a 4 °C, y el día siguiente se filtra y se coloca en viales de color ámbar para analizarse en el

cromatografo, el cual ya previamente fue calibrado con estándares de diferentes concentraciones de glutatión.

MÉTODO DE AKERBOOM (1)

1. Encendido del espectrofotómetro
2. Calibración del espectrofotómetro a 412 nanómetros de absorbancia, con luz ultravioleta visible y calibrar a cero
3. En cinco cubetas de cuarzo se deposita 1 ml. de la solución Buffer de fosfatos (pH 7.0) a una temperatura ambiente (21 °C aprox.)
4. Colocar con una micropipeta Hamilton 5, 10, 20, 30, 50 μ l de la solución estándar respectivamente en las cubetas de cuarzo.
5. Con otra pipeta Hamilton, se colocan 20 μ l de NADPH (2 mg / 0.5 NaHCO₃ al 0.5%)
6. Con una pipeta Hamilton limpia se colocan 20 μ l de la enzima glutatión reductasa (6 unidades / ml Buffer)
7. Agitar suavemente evitando la formación de burbujas y dejar reposar por dos minutos
8. Introducir la cubeta a la celdilla del espectrofotómetro y recalibrar a cero nuevamente
9. Depositar 20 μ l de ácido di-tionitrobenzoico (DTNB) (0.75 mg / 0.5 ml de Na HCO₃ al 0.5 %)
10. Inmediatamente después de depositado el DTNB se marca el tiempo de inicio, hasta que se cumplan 5 minutos.
11. Se agita la cubeta de cuarzo con su respectiva muestra
12. Pasados los 5 minutos se introduce inmediatamente la cubeta en la celdilla del espectrofotómetro para realizar la lectura de la absorbancia.

13. Si las lecturas obtenidas a partir de los estándares corresponden a las establecidas en un rango previamente establecido, se dice que los reactivos y el estándar son adecuados, de no ser así, se tendrá que iniciar nuevamente hasta que las lecturas sean las esperadas.

14. Posteriormente se sustituyen los estándares por una alicuota de 10 µl de la muestra problema y se realiza el mismo procedimiento para obtener la absorbancia de cada muestra.

En cada cambio de muestra fueron lavadas perfectamente las cubetas de cuarzo con agua corriente, desionizada y etanol al 99.9%.

Los reactivos al igual que la muestra se conservaron en recipientes con hielo (4 °C aprox.) durante el tiempo empleado para el análisis.

Al final del trabajo, los datos de las variables obtenidas, fueron sometidas a un análisis de varianza conforme a un diseño completamente al azar. Cuando existieron diferencias estadísticas al 5 o al 1% entre tratamientos, las medias se compararon con la prueba de Tukey (55).

RESULTADOS

En las variables productivas registradas en las aves: consumo de alimento, porcentaje de postura, conversión alimenticia, peso promedio de huevo y la masa del huevo diario por gallina, no se encontraron diferencias estadísticas ($P>0.05$), y puede ser apreciado en las figuras 1, 2, 3, 4 y 5.

En cuanto a la variable de pigmentación, a la quinta semana de experimentación, se midió el color de las yemas de los huevos visualmente, mediante el abanico colorimétrico de Roche. Se puede observar en la figura 6, que la pigmentación aumento en la dieta sin pigmentos a un valor cercano al 4 al adicionar xantofilas amarillas, cuando se adicionaron xantofilas rojas naturales a partir de frutos del *Capsicum* o de origen sintético (cantaxantina), a la dieta que ya contenía xantofilas amarillas, el valor de pigmentación fue de 10.4 y 10.7, respectivamente, lo que muestra el efecto aditivo de estas xantofilas rojas sobre la pigmentación de la yema de huevo. Finalmente se puede observar que la adición de sudan a la dieta con xantofilas amarillas produjo una mayor coloración en las yemas de huevo, que la obtenida por xantofilas naturales y sintéticas.

En las figuras 7, 8 y 9, se pueden observar en forma gráfica los datos obtenidos en cuanto al color de la yema del huevo, medidos con el colorímetro de reflectancia. Se puede apreciar que la brillantez de las yemas de huevo fueron menores con la adición de pigmentos rojos naturales, sintéticos o

sudanes. En la figura 8 se presenta el enrojecimiento observado en las yemas de los huevos. Se puede notar que las yemas de huevo provenientes de gallinas que no recibieron pigmentos en el alimento que consumieron la dieta de xantofilas amarillas tuvieron valores negativos a rojo. Por otro lado, en las dietas con xantofilas rojas naturales y sintéticas y sudanes los valores fueron siempre positivos, y el tratamiento con sudan tuvo un valor significativamente mayor ($P < 0.05$).

Finalmente en cuanto a coloración de la yema de huevo se refiere, se presenta en la figura 9, el amarillamiento obtenido con los distintos tratamientos. Se observa que el amarillamiento aumentó significativamente con la adición de xantofilas amarillas a la dieta (tratamientos 2, 3, 4 y 5), siendo menor el grado de amarillamiento para la dieta que incluyó sudanes, sin embargo, el tratamiento testigo tuvo un menor grado de amarillamiento ($P < 0.05$).

La cuantificación de Glutación Total (GT), en sangre se realizó durante 8 semanas, la medición de la reserva de GT se obtuvo mediante el método de Akerboom (1) durante las primeras 6 semanas y con el método de Akerboom y por HPLC para la 8ª semana.

En la figura 10, se muestran los datos, de una semana antes de iniciar los tratamientos, en la que se realizaron las mediciones de GT, en la sangre de las gallinas fueron en promedio de 1.19.

En la primera semana de tratamiento, se encontraron cambios considerables en los niveles de GT (Figura 11), los tratamientos en los cuales se incluyeron xantofilas naturales amarillas, rojas naturales y sintéticas o sudanes, presentaron valores significativamente más altos, en comparación con el grupo testigo ($P < 0.05$).

En las semanas consecutivas de la 2ª a la 8ª, en que se realizaron las mediciones correspondientes de GT, no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre los diferentes tratamientos (Figura 10).

En la Figura 10, podemos observar un comparación global, de los resultados obtenidos (cuadro 3) por medio del método de Akerboom para las diferentes semanas del tratamiento, en la cual, se hizo un promedio de los valores obtenidos para cada semana de experimentación y para todos los tratamientos, mediante esta se puede comprobar que en la segunda semana de experimentación se obtuvieron los valores significativamente ($P < 0.05$) más altos para el GT, los cuales son mayores que en la semana anterior y en las semanas subsecuentes.

En la octava semana de experimentación se realizó una última medición por medio del HPLC y el método de Akerboom. Se encontró por el método del HPLC, que el Glutación reducido (GSH) (Figura 13), no mostraba variaciones significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos. Sin embargo al obtener los valores de Glutación oxidado (GSSH), se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos como se puede advertir en la Figura 14. El tratamiento 5 que incluyó sudanes en la dieta presentó un valor menor,

en comparación con los tratamientos 4 y 1 donde se incluyeron xantofilas amarillas naturales más xantofilas rojas sintéticas (cantaxantina) y no se incluyeron pigmentos (tratamiento 1 o testigo) respectivamente, sin pigmentos, los cuales tuvieron los valores más altos. En cuanto a los valores para GT por el método de Akerboom (Figura 12), los datos a las ocho semanas fueron semejantes entre los distintos tratamientos ($P>0.05$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos respecto a los parámetros productivos evaluados en las gallinas utilizadas para el presente estudio (consumo de alimento, porcentaje de postura, conversión alimenticia, peso promedio del huevo y masa de huevo diaria por ave), no mostraron diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos, lo cual coincide a lo señalado por diferentes autores (5, 14), quienes aseguran que este tipo de aditivos cumplen con la función de proporcionar color a las yemas de huevo, sin modificar el rendimiento productivo de las aves.

La coloración de la yema de huevo obtenida con las cantidades de pigmento utilizadas, corresponden a niveles de uso comercial en las explotaciones avícolas; asimismo, la evaluación del color se realizó mediante la utilización del Abanico colorimétrico de Roche y por un colorímetro de reflectancia, los cuales son ampliamente utilizados a nivel comercial para evaluar la eficiencia de los pigmentantes (5). Por otra parte, los resultados obtenidos en cuanto a la coloración de la yema de huevo y las dosis empleadas están de acuerdo a lo señalado por diversos autores (5, 14, 43).

Algunos autores han reportado que el organismo utiliza la vía del glutatión para desintoxicarse de diversos compuestos, lo cual puede hacerse por medio de la oxidación, o en su caso, por la conjugación de compuestos con la cisteína, del GSH y este conjugado es desechado por medio de la bilis como ácido mercaptúrico (1, 8, 19, 40, 41).

Por otra parte, los carotenoides han sido incluidos como antioxidantes rompedores de cadena y en estudios realizados en pollos, se observó que participan en el ataque contra los radicales peroxil y por lo tanto pueden estar ayudando en la resistencia de la membrana celular contra la oxidación en vivo (29, 34, 36, 39, 49).

En este trabajo se encontró un aumento en el GT a la primera semana de tratamiento, lo cual concuerda con lo descrito por algunos investigadores (2, 28, 51), que mencionan que algunos xenobióticos tienen la capacidad de inducir algunos sistemas antioxidantes, lo cual puede o no beneficiar al organismo.

Los resultados obtenidos sugieren una relación positiva a la adición de pigmentos (xantofilas) a la dieta, y un aumento en los niveles de glutatión en la sangre de las gallinas, en la primera semana de tratamiento, lo cual permite suponer que los carotenoides además de tener una capacidad antioxidante, también pueden tener una capacidad de aumentar las defensas antioxidantes en la sangre (2, 29, 34, 36).

Dado que la síntesis de glutatión, se lleva a cabo principalmente en el hígado y de allí se distribuye a los diferentes tejidos (8, 25, 62, 63) y que se ha mencionado (4, 5, 26, 53), que las xantofilas, son asimiladas a nivel intestinal, transportadas al hígado y de allí se distribuyen a la piel, los tejidos grasos, los tarsos y en la gallinas de postura llegan al ovario, donde se almacenan y son eliminadas en las yemas de huevo. Esto servirá de base para indicar que los niveles de GT, encontrados en las siguientes semanas de tratamiento fueron similares a los identificados antes de iniciar el tratamiento y a los del tratamiento testigo (sin pigmentos), lo cual sugiere que las xantofilas permanecen poco tiempo en el hígado ya que se movilizan al ovario para

formar la yema de huevo, por lo tanto su capacidad de inducción, puede ser inconstante.

Enkvetchakul et al., 1995 (16, 17), han informado que los niveles de GSH obtenidos por el método de HPLC, en algunas especies de aves presentan un valor entre 25 y 50 % menor que los mamíferos, ya que el metabolismo de la aves es más dinámico, además se ha observado que es ligeramente más alta la reserva de este compuesto cuando se trata de líneas de aves más pesadas.

Los valores encontrados en este estudio oscilaron entre 142 y 149 nmolas/ml de GSH, determinados por HPLC, estos valores concuerdan con los valores señalados por Enkvetchakul et al (16).

El GSSG, ha sido señalado, como uno de los compuestos que aumentan sus niveles en la presencia de radicales libres (1, 8, 50, 57). Los niveles de GSSG, indican una reducción de compuestos y por lo tanto estar actuando en la detoxificación de los mismos (2, 8, 25, 56).

Los niveles encontrados de GSSG variaron entre 4.7 y 11.8 nmolas/ml. El tratamiento 4 en que se adicionaron xantofilas amarillas naturales + cantaxantina y en el tratamiento 1 o testigo (sin pigmento) , tuvieron los valores más altos y el tratamiento donde se incluyeron xantofilas amarillas naturales más sudanes se obtuvo el valor más bajo. Los tratamientos a los que se les adicionaron solo xantofilas naturales en la dieta tuvieron valores intermedios de 7.2 y 9.3 nmolas/ml (tratamientos 2 y 3 respectivamente).

Enkvetchakul et al., 1995 (16), menciona que el acelerado metabolismo de las aves propicia que los niveles GSH de este sistema, sean diferentes a los que existentes en los mamíferos (1), y debido a esto, metabolizan una mayor cantidad de compuestos tóxicos que los mamíferos.

Los sudanes se han clasificado como hidrocarburos policíclicos, que presentan en su estructura enlaces azo (N=N) y que tambien son llamados colorantes azoicos (2, 33, 37), además se asume que el 45% de los huevos que se consumen en México, contienen colorantes azoicos no permitidos (CANACINTRA, 1993) y debido a su estructura han sido indicados como compuestos tóxicos, y pueden inducir sistemas de biotransformación en el higado, pero hasta el momento no se ha dado una descripción detallada del mecanismo (21), en ocasiones una intensa actividad de este sistema (citocromo P 450, RNA y proteínas, entre otros), resulta conveniente, por que propicia la formación de compuestos menos tóxicos o facilmente eliminables, pero en otras ocasiones los productos resultantes son más tóxicos que los primitivos.

Se ha publicado que el metabolismo de los compuestos azoicos se da por medio de una reacción de oxidación y reducción, que pertenece a la fase I de la biodegradación de sustancias tóxicas por el organismo, aunque esta reacción no es del todo benéfica, ya que de esta fase, se forman anilinas que tambien son sustancias tóxicas, para el organismo (2, 33).

Por otro lado, Jauge (28), menciona que los hidrocarburos policíclicos son eliminados del organismo, mediante el ácido mercaptúrico, el cual se forma mediante la unión del la cisteína del GSH, con el compuesto tóxico, mediante la acción de la enzima glutatión transferasa, y con la formación de este conjugado el compuesto tóxico puede ser eliminado a través de la bilis, lo cual puede explicar el descenso de GSH y GSSG encontrado en las gallinas que consumieron sudanes.

De los resultados obtenidos en el presente estudio se puede inferir:

1. En el presente trabajo se pudo constatar que la reserva fisiológica de GT en la gallina ponedora alimentada con diferentes pigmentos utilizados a nivel comercial.

2. El GT de la gallina ponedora de aproximadamente 60 semanas de edad, varió entre 0.94 y 1.31 μ molas de GT por ml de sangre determinado por el método de Akerboom y 145 nmolas por ml de sangre de GSH y 9 nmolas de GSSG por ml de sangre determinado por el método de HPLC.

3. La adición de sudanes, tuvo valores significativamente menores para GSSG y numericamente menores para el GSH, con respecto a la adición de carotenoides, lo cual se puede deber a la excreción de los conjugados de sudanes y glutatión, por medio de la bilis en forma de ácido mercaptúrico, y por ende explicado por una disminución de los valores de glutatión en la sangre de las gallinas.

4. Para futuros estudios con pigmentantes utilizados en la alimentación de gallinas se recomienda separar los eritrocitos del plasma, para determinar los niveles de GSH y GSSG en plasma y eritrocito por separado y verificar si el aumento en el GT observado al inicio del tratamiento con carotenoides, es debido a un aumento en la síntesis de glutatión dentro del eritrocito o bien un aumento en la exportación hepática de glutatión hacia el organismo por medio del plasma.

LITERATURA CITADA.

1. Akerboom, T.P.M.: Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfide in biological samples. Met. Enzymol., 77:372-382 (1981).
2. Amdur, M.O., Dovel, J. and Klaassen, C.: Casarett and Doull's Toxicology. Ed. Mc. Graw Hill, Inc., 4^a ed., U.S.A. 1991.
3. Andreoli, P.S., Mallet, C.P. and Bergtein, J.M.: Role of glutathione in protecting endothelial cells against hydrogen peroxide oxidant injury. J. Lab. Clin. Med., 108:190-198 (1986).
4. Arce, M.J., Vázquez, P.C., López, C.C., y Avila, G.E.: Xantófilas en dietas para pollos de engorda. Sint. Av., 6:16-18 (1990).
5. Avila, G.E., Shimada, S.A., y Llamas, L.G.: Anabólicos y aditivos en la producción pecuaria. Edit. Consultores en producción animal., México., 1990.
6. Belitz, H.D., and Grosch, W.: Química de los alimentos. Edit. Acribia. Zaragoza, España., 1988.
7. Beraud, M., Bories, G., Boudere, y Cl., Carrera, G.: Toxicología y seguridad de los alimentos. Edit. Omega., España., 1990.
8. Beutler, E.: Nutritional and metabolic aspects of glutathione. Annu. Rev., 9:287-302 (1989).
9. Blas, C., y Mateos, G.G.: Nutrición y alimentación de las gallinas ponedoras. Edit. Mundi-Prensa-Aedos, España, 1991.
10. Brigelius, R., Muckel, C., Theodorus, P.M., Akerboom, T.P.M., and Sies, H.: Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein disulfides

- and its relationship to glutathione dilucide. Biochem. Pharmac., 32 (17): 2529-2534 (1983).
11. Caballero, C. I.: Correlación de los niveles de Glutación sanguíneo, hepático, cardíaco y gonadal en el pollo de engorda al que se adicionaron nitrofuranos en el alimento y en el agua de bebida a dosis terapéuticas; Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México D.F., 1993.
12. Campbell, C. T., and Hayes, J. R.: The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. Toxicol. Appl. Pharmac., 35: 199-222 (1976).
13. Comporti, M., and Benedetti, A.: Biology of disease: Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. Lab. Inv., 53: 599-623 (1985)
14. Cuca, G.M., Avila, G.E., y Pro, M.A.: Alimentación de las aves. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México, 1990.
15. Dussan, G.L.: La pigmentación, trabajo de equipo. III Jornada Médico Avícola. Div. de Educ. Cont., FMVZ, UNAM, 1992.
16. Enkvetchakul, B., Anthony, N.B., and Bottje, W.G.: Liver and Blood Glutathione in Male Broiler Chichens, Turkey and Quail. Poult Sci., 74:885-859 (1995).
17. Enkvetchakul, B., and Bottje, W.G.: Influence of Diethyl and Cisteine on Tissue Glutathione and Growth in broiler chickens. Poult Sci., 74:864-873 (1995).
18. Fuentes, H.V.O.: Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Edit. Interamericana. México, 1985.
19. Fujita, T., Yamamoto, T., Tabata, M., Veno, T. and Fujimoto, Y.: Defects of reduced glutathione and cysteine on prostaglandine synthesis in rabbit kidney medulla slices. Biochem. Phyol., 83:29-31 (1986).

20. Garcia, L.R.: Relaciones nutricionales de la vitamina E y el selenio. VII Ciclo de Conferencias Internacionales sobre Avicultura. AMENA, 1987.
21. Goodman, L.S.: Las bases farmacológicas de la Terapéutica/ Goodman y Gilman. 8ª Ed., Edit. Médica Panamericana. México, 1991.
22. Halliwell, B.: Oxidants and human disease: some new concepts. FASEB J., 1:348-352 (1987).
23. Hamilton, P.B., and Tyczkowski, J.R.. Luteina as model-dihydroxycarotenoid for the study of pigmentation in chickens. Poult. Sci., 65:1141-1145 (1986)
24. Harisch, G., and Mahmoud, M.F.: The glutathione Status in the liver and cardiac muscle of rats after starvation. Physiol. Che., 361: 416-420 (1989).
25. Harper , K.R., y Murray, P.A.: Bioquímica., Edit.: El manual moderno. México D.F., 1988.
26. Hencken, H.: Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. Poult. Sci., 71 (4): 711-717 (1992).
27. Jacobs, M.B. The Chemical analysis of food and food products., 3ª ed. Van Nostrand. Company, Inc., Princeton, New Jersey, U.S.A., pag 686-687, 1965.
28. Jauge, P. y Femicola, N.: Nociones básicas de Toxicología. Centro de Estudios avanzados del I.P.N., México, 1985.
29. Krinsky, N.I., Deneke, S.M.: Intaction of oxigen and oxy-radicals with carotenoids. J. Natl. Cancer Inst. 69 (1): 205-209 (1982).
30. Kosower, N.S.: The glutathione status cells. Inter. Rev. Cytol. Acad. Press, Inc. 54:109-153 (1978).
31. Ley General de Salud. Edit. Porrúa, 5a. Edición, México 1987.

- 32.Liv, L.F., and Tam, M:F.: Nucleotide sequence of class mu glutathione S-transferasa from chicken liver. Biochem. Biophys. Acta, 3:343-344 (1990).
- 33.Loomis, T.A.: Essentials of Toxicology. Ed. Lea & Febiger. 3^a ed., U.S.A., 1978.
- 34.Marchand, L.L., and Yoshizawa, C.N., Kofonel, L.N., Hankin, J.H., and Goodman, M.T.: Vegetable consumption and lung cancer risk: a population based case-control study in Hawaii. J. Natl. Cancer Inst.:82(4): 282-284 (1990).
- 35.Martin, J., and White I.N.H.: Fluorimetric determination of oxidised and reduced glutathione in cell and tissues by high-performance liquid chromatography following derivatization with dansyl chloride. J. of Chromatog., 568:219-225 (1991).
- 36.Marusich, W.L., and Bavernfeind, Ch.J.: Carotenoids as colorants and vitamina A precursors: Technological and nutritional aplications. Edit. Academic Press Inc., N.Y., 1981.
- 37.Mallery, S.R and Laufman, H.B.: Association of cellular thiol redox status with mitogen-induced calcium metabolization and cell cycle progression in human fibroblasts. J. Cell. Biochem., 45: 82-92 (1991).
- 38.Merck Index. An Enciclopedia of chemicals, drug and biologicals. 10a. edición. Edit. Merck & Co., Inc. U.S.A., 1993.
- 39.Micozzi, M.S., Beecher, G.R., Taylor, P.R., and Kachik, F.: Carotenoids analyses of selected raw and cooked food associated with a lower risk for cancer. J. Natl. Cancer Inst.: 82 (4): 282-284 (1990).
- 40.Miyazaky, S.: Effect of chemicals on glutatione peroxidasa of chick liver. Res. Vet. Sci, 51: 120-122 (1991).

41. Miyazaki, S., and Motoi, Y.: Tissue distribution of monomeric glutathione peroxidase in broiler chicks. Res. Vet. Sci.: 53 (1): 47-51 (1992)
42. Multon, J.I.: aditivos y axiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. Edit. Acribia., España, 1988.
43. Necoechea, R.R., y Márquez, M.L.: Manual de aditivos y suplementos para la producción animal. Edit. Manual agrario., México, 1987.
- 44.: Nutrient Requirements of domestic animals. No. 2, National Academy Science. 6 Nat. Res Council, Washington, D.C. (1979).
45. Nelson, E.Ch.: Productos pigmentantes líquidos de un programa de alimentación de pollos de engorda. Kemin Ind. (1989).
46. Ochoa, R.R., y Rios, H.M.A., López, C.C.: Características de los pigmentos utilizados en las raciones para aves. VII ANECA. 1982.
47. O' Norton, M.: Manual de producción avícola. Edit. Manual Moderno, 1986.
48. Panfili, E., Sandri, G., and Ernster, L.: Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria. FEBS. 290: 35-37 (1991).
49. Peng, B. L., Nagao, A., Terao, J., Tanaka, K., Suzuki, T., and Takama, K.: Antioxidant activity of xanthophyll on peroxyl radical-mediated phospholipid peroxidation. Biochem et Bioph Acta. 1126: 178-184 (1992).
50. Reischl, E., and Drafre, A.L.: Glutathione mixed disulfides and heterogeneity of chickens hemoglobins. Comp. Biochem. Physiol.: 102 (4): 849-853 (1992).
51. Reppeto, M. Toxicología Fundamental. Ed. Científico Médica, Barcelona, España, 1981.

52. Reyes, Q. M.: Efecto de los aluminosilicatos y de la aflatoxina B1 dietéticos sobre la concentración de glutatión sanguíneo en el pollo de engorda. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México, D.F., 1993.
53. Sauveur, B.: El huevo para consumo: Bases productivas. De. Mundi-Prensa-Aedos. 1993.
54. Secretaría de Salud. Reglamento de la Ley Federal de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Diario Oficial de la Federación del 18 de enero de 1988.
55. Snedecor and Cochran: Statistical methods. De. The Iowa State University Press., Ames, Iowa. USA., (1971).
56. Southorn, P.A.: Free radicals in medicine, chemical nature and biological reactions. Clin. Proc. Dep. Anesthesiol., 63:381-389 (1988).
57. Stryer, L.: Bioquímica. Edit. Reverte, España 1990.
58. Taylor, X.C., Spencer, J.B., and Ketterer, B.S.R.: The human glutathione S-transferase P1-1 gene: modulation of expression by retinoic acid and insulin. J. Biochem. 292 (3): 845-850 (1993).
59. Tirado, F.J.: Efecto pigmentante de las xantófilas en el pollo de engorda. Sint. Avic., 3:28-35 (1990).
60. Williams, W.D.: Origin and impact of color of consumer preference for food. Poult. Sc., 71:744-776 (1992).
61. Williamson, J.M., Boettcher, B. and Meisteer, A.: Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis. Proc. Nat. Acad. Sc., 79:6246-6247 (1982).

62. Zentella de P. M., Rocha, H.A.E., and Díaz, B. A.: Blood Glutathione status in alcoholic liver disease., Biochem. of Dis., Congress Center. Nagoya, Japan. Page 80-84 (1992).
63. Ziegler, D.M.: Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. Ann. Rev. Biochem., 54:305-329 (1985).

CUADRO 1
COMPOSICIÓN DE LA DIETA BASE UTILIZADA EN LAS GALLINAS A LA
CUAL SE LE ADICIONARON DIFERENTES PIGMENTOS.

INGREDIENTES	KGS / TONELADA
SORGO 9%	609.95
PASTA DE SOYA 45%	233.05
ANTIOXIDANTE	0.30
ACEITE	28.96
CARBONATO DE CALCIO	108.26
ORTOFOSTATO	12.49
SAL	3.50
DL-METIONINA	1.32
L-LISINA	0.08
COLINA 60%	0.09
VITAMINAS Y MINERALES*	2.00

*Cuca et al (13)

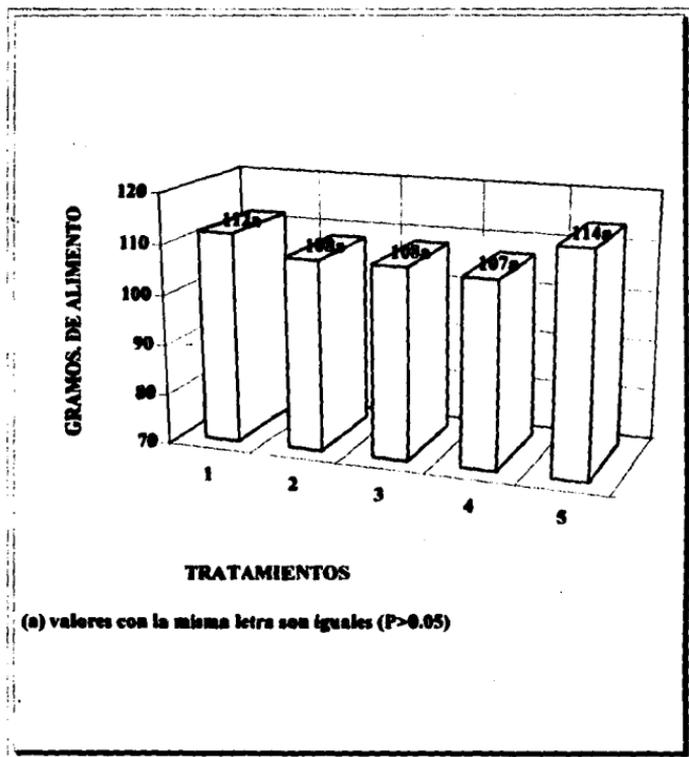
**Cuadro 2. ANALISIS CALCULADO DE LA DIETA BASE
UTILIZADA EN LAS GALLINAS A LA CUAL SE LE ADICIONARON
PIGMENTOS.**

PROTEINA %	15.50
LÍPIDOS %	1.7
METIONINA + CISTINA %	0.63
FOSFORO DISPONIBLE %	0.37

Cuadro 3. Promedio y desviación estandar de las concentraciones de GT, en sangre de gallinas a las cuales se les adicionaron diferentes pigmentos en el alimento.

1	1.19 ± 0.15	1.19 ± 0.15	1.04 ± 0.12	1.11 ± 0.28	1.23 ± 0.23	1.34 ± 0.12	1.32 ± 0.18	0.97 ± 0.05	1.17 ± 0.13
2	1.19 ± 0.15	2.37 ± 0.56	1.18 ± 0.36	1.33 ± 0.22	1.31 ± 0.21	1.42 ± 0.20	1.35 ± 0.28	0.94 ± 0.15	1.39 ± 0.42
3	1.19 ± 0.15	1.95 ± 0.17	1.29 ± 0.29	1.23 ± 0.20	1.23 ± 0.10	1.47 ± 0.13	1.16 ± 0.17	0.90 ± 0.11	1.30 ± 0.31
4	1.19 ± 0.15	2.11 ± 0.43	1.32 ± 0.31	1.28 ± 0.20	1.30 ± 0.11	1.07 ± 0.07	1.20 ± 0.14	0.87 ± 0.14	1.29 ± 0.36
5	1.19 ± 0.15	2.55 ± 0.36	1.08 ± 0.21	1.38 ± 0.25	1.37 ± 0.19	1.28 ± 0.23	1.41 ± 0.15	1.01 ± 0.14	1.41 ± 0.48
promedio	1.19 ± 0.15	2.03 ± 0.53	1.18 ± 0.12	1.27 ± 0.10	1.29 ± 0.06	1.31 ± 0.16	1.29 ± 0.10	0.94 ± 0.06	1.31

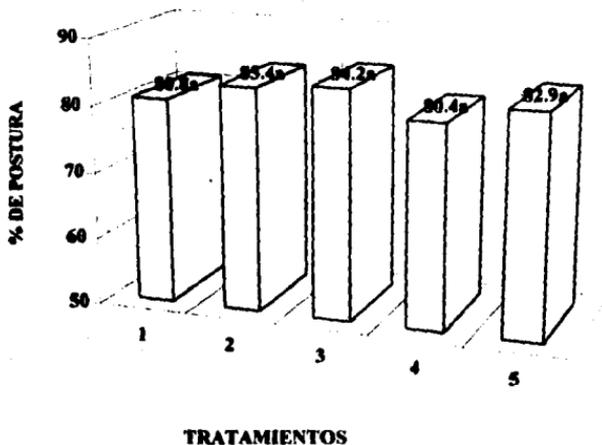
Figura. 1. Consumo diario de alimento por gallina , durante la adición de sustancias pigmentantes en el alimento.



TRATAMIENTOS:

- 1. sin pigmento
- 2. pigmento amarillo natural
- 3. pigmento amarillo natural + rojo natural
- 4. pigmento amarillo natural + rojo sintético 43
- 5. pigmento amarillo natural + sudán

Figura 2 . Producción de huevo de gallinas de postura alimentadas con diferentes sustancias pigmentantes.

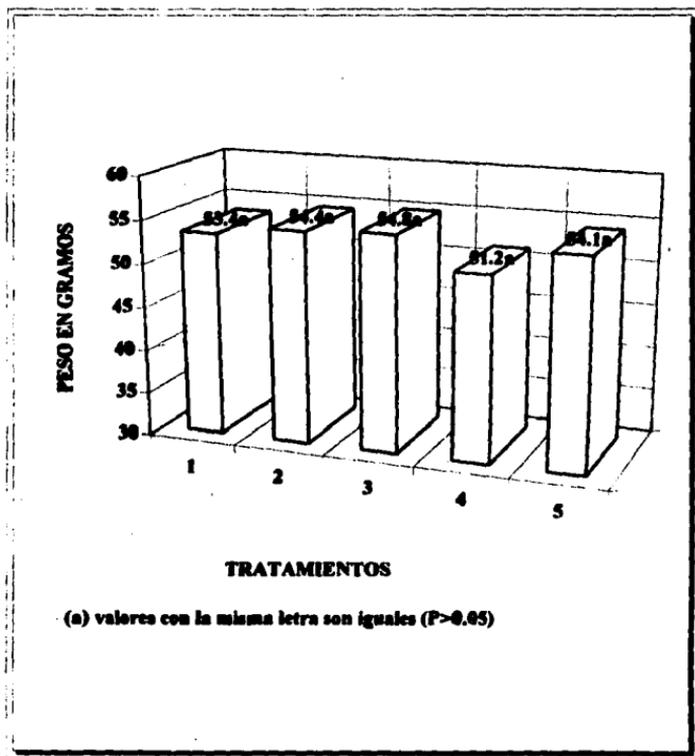


(a) valores con la misma letra son iguales ($P > 0.05$)

TRATAMIENTOS:

1. sin pigmento
2. pigmento amarillo natural
3. pigmento amarillo natural + rojo natural
4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
5. pigmento amarillo natural + sudán

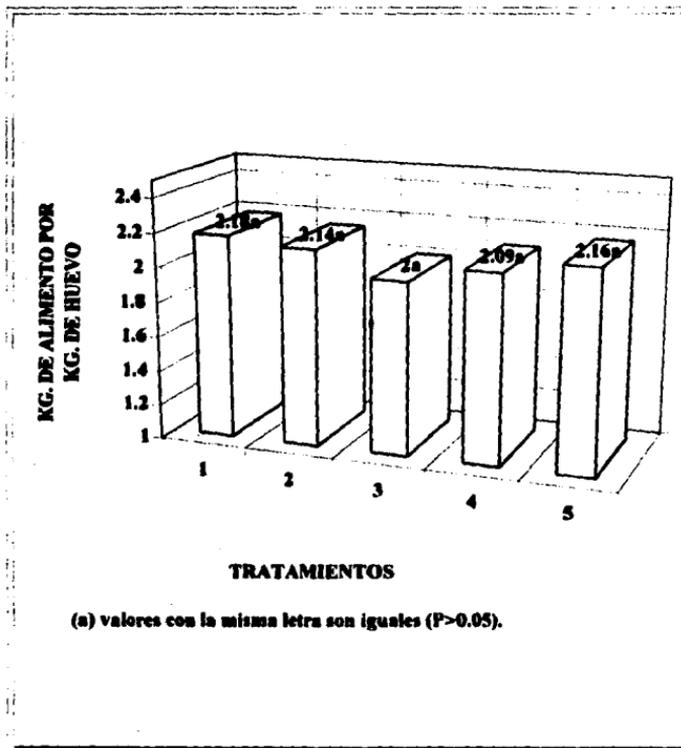
Figura 3. Peso del huevo de gallinas a las que se les incluyeron pigmentos en el alimento.



TRATAMIENTOS:

1. sin pigmento
2. pigmento amarillo natural
3. pigmento amarillo natural + rojo natural
4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
5. pigmento amarillo natural + sudán

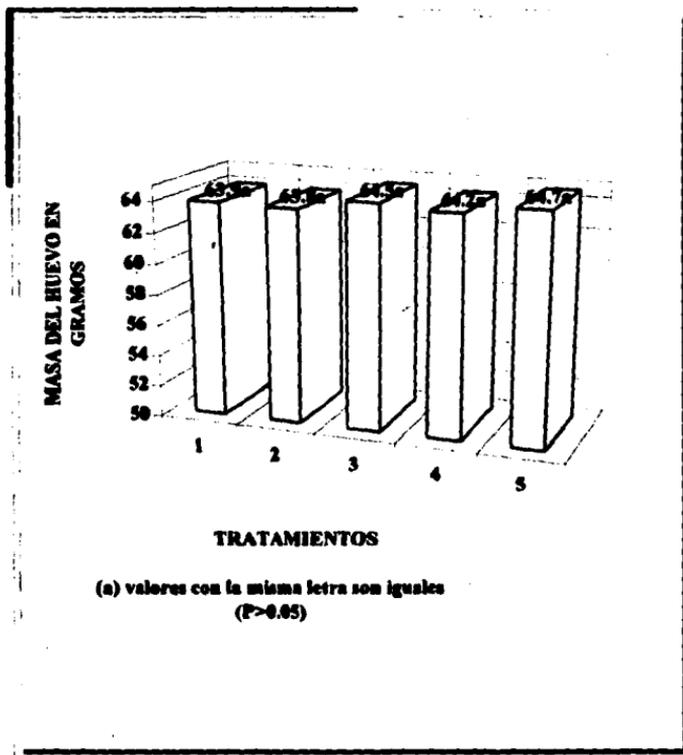
Figura 4. Conversión alimenticia al adicionar pigmentos en el alimento.



TRATAMIENTOS:

- 1. sin pigmento
- 2. pigmento amarillo natural
- 3. pigmento amarillo natural + rojo natural
- 4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
- 5. pigmento amarillo natural + sudán

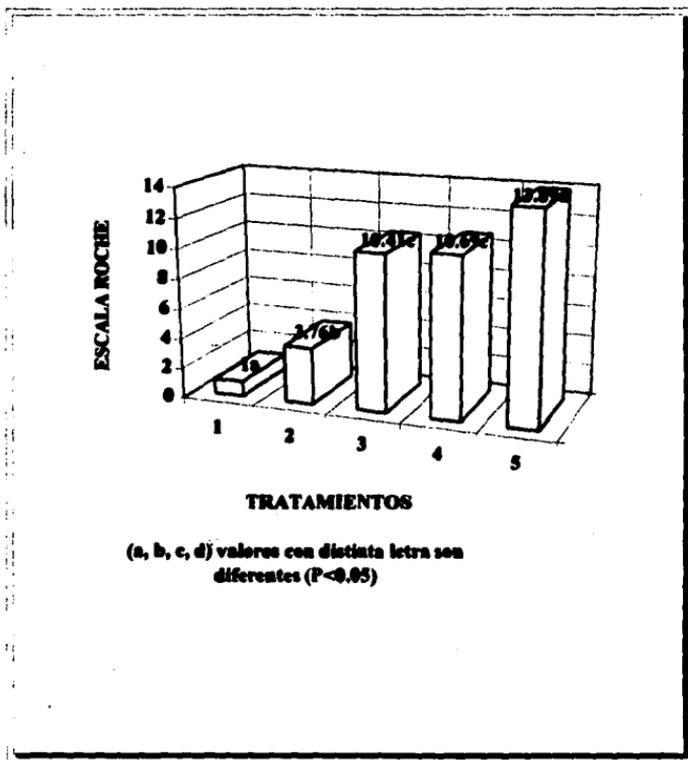
Figura 5. Masa del huevo diario por gallina, para los diferentes tratamientos.



TRATAMIENTOS:

1. sin pigmento
2. pigmento amarillo natural
3. pigmento amarillo natural + rojo natural
4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
5. pigmento amarillo natural + sudán

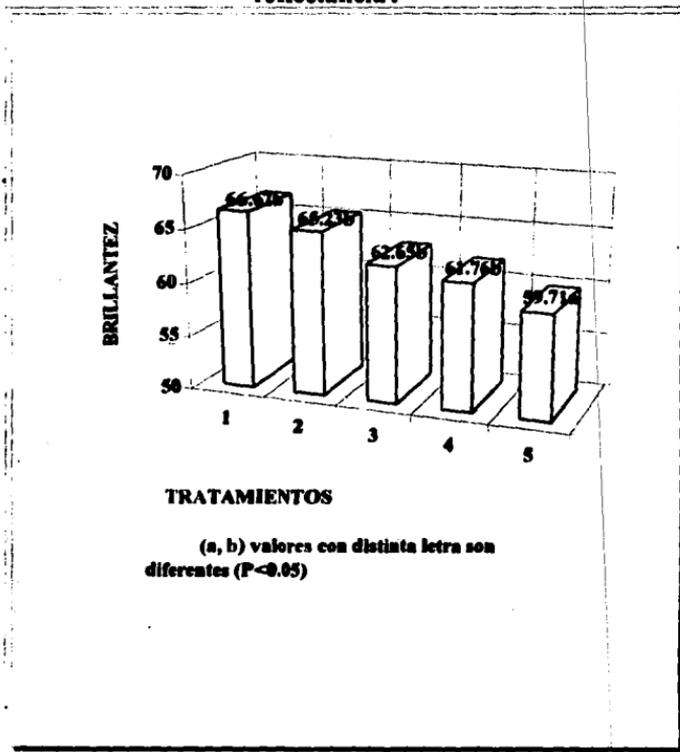
Figura 6. Medición de color de la yema de huevo, utilizando el Abanico colorimétrico de Roche (1993).



TRATAMIENTOS:

1. sin pigmento
2. pigmento amarillo natural
3. pigmento amarillo natural + rojo natural
4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
5. pigmento amarillo natural + sudán

Figura 7. Brillantez de la yema de huevo de gallinas de postura con diferentes pigmentos en la dieta, evaluada por un colorímetro de reflectancia .

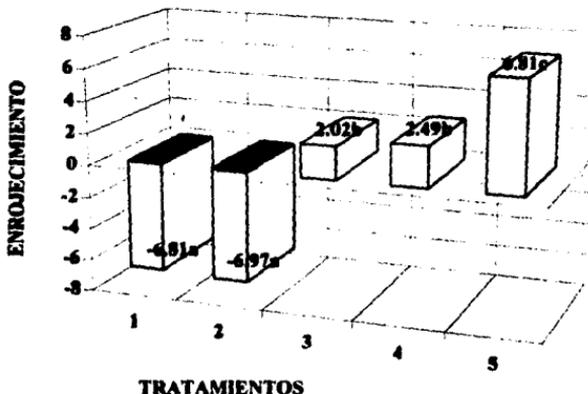


TRATAMIENTOS:

1. sin pigmento
2. pigmento amarillo natural
3. pigmento amarillo natural + rojo natural
4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
5. pigmento amarillo natural + sudán

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 8. Intensidad de rojo en las yemas de huevo de gallinas utilizadas en el presente estudio, determinada por un colorímetro de reflectancia.

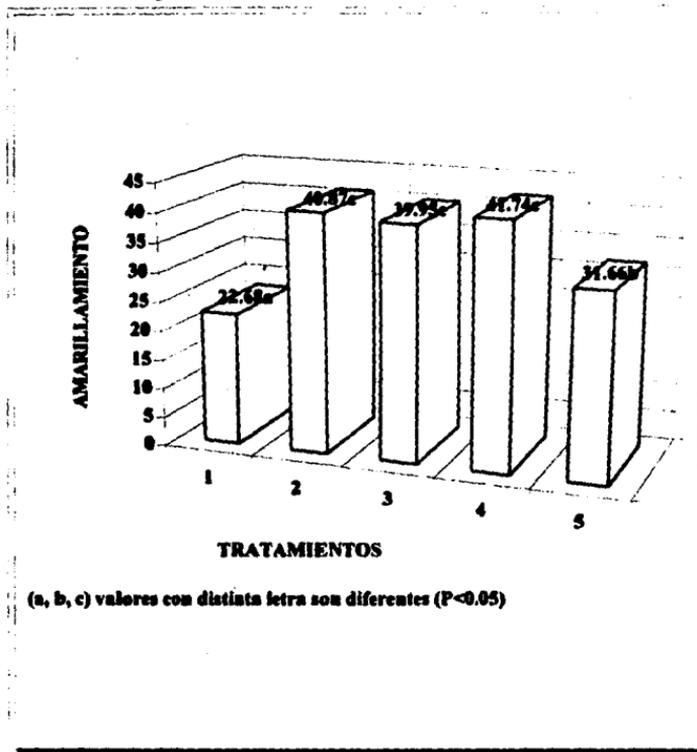


(a, b, c) valores con distintas letra son diferentes
($P < 0.05$)

TRATAMIENTOS:

1. sin pigmento
2. pigmento amarillo natural
3. pigmento amarillo natural + rojo natural
4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
5. pigmento amarillo natural + sudán

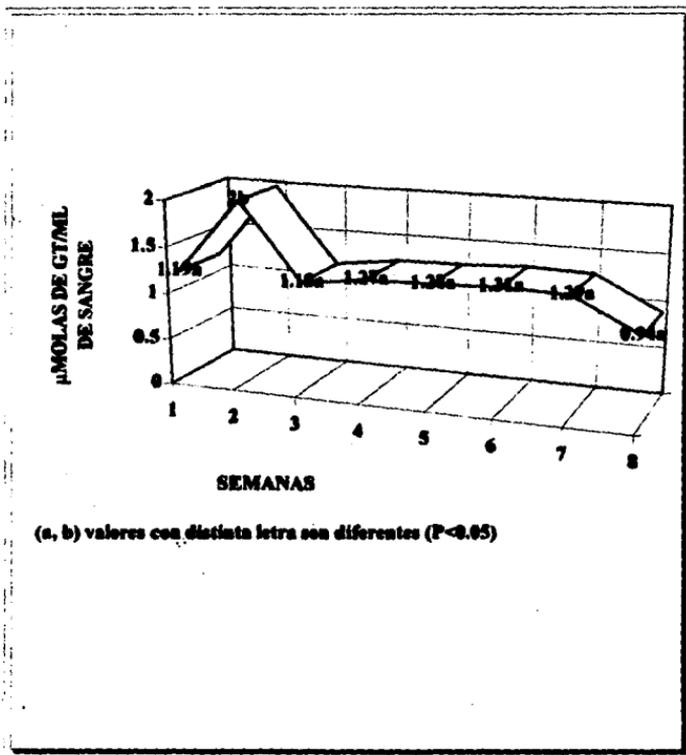
Figura 9. Intensidad de amarillos en el huevo de gallinas de postura a las que se les adicionaron sustancias pigmentantes en el alimento, evaluada por un colorímetro de reflectancia.



TRATAMIENTOS:

1. sin pigmento
2. pigmento amarillo natural
3. pigmento amarillo natural + rojo natural
4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
5. pigmento amarillo natural + sudán

Figura 10. Glutación Total promedio en sangre (resumen semanal).



SEMANAS DE TRATAMIENTO:

1. una semana antes

2. primera

3. segunda

4. tercera

5. cuarta

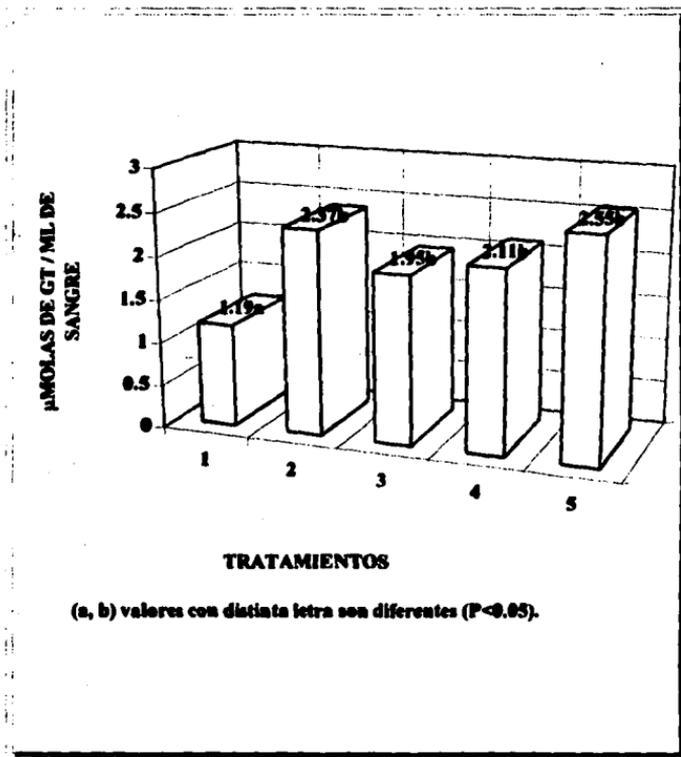
6. quinta

7. sexta

8. octava

Figura 11. Reserva de glutatión total en sangre de gallinas de postura alimentadas con diferentes pigmentos.

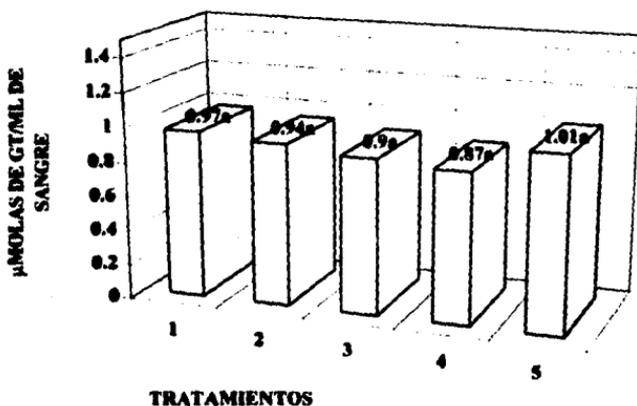
SEMANA 1.



TRATAMIENTO:

1. sin pigmento
2. pigmento amarillo natural
3. pigmento amarillo natural + rojo natural
4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
5. pigmento amarillo natural + sudán

Figura 12. Glutación Total en sangre de gallinas adicionadas con diferentes pigmentos.
SEMANA 8



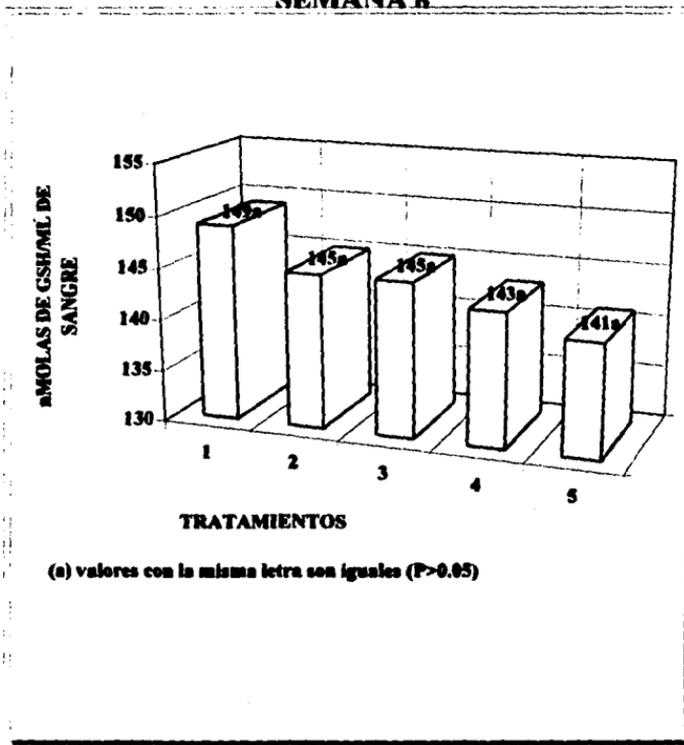
(a) valores con la misma letra son iguales ($P > 0.05$)

TRATAMIENTOS:

1. sin pigmento
2. pigmento amarillo natural
3. pigmento amarillo natural + rojo natural
4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
5. pigmento amarillo natural + sudan

Figura 13. Reserva de GLUTATIÓN REDUCIDO, en sangre de gallinas a las que se les adicionaron diferentes pigmentos.

SEMANA 8

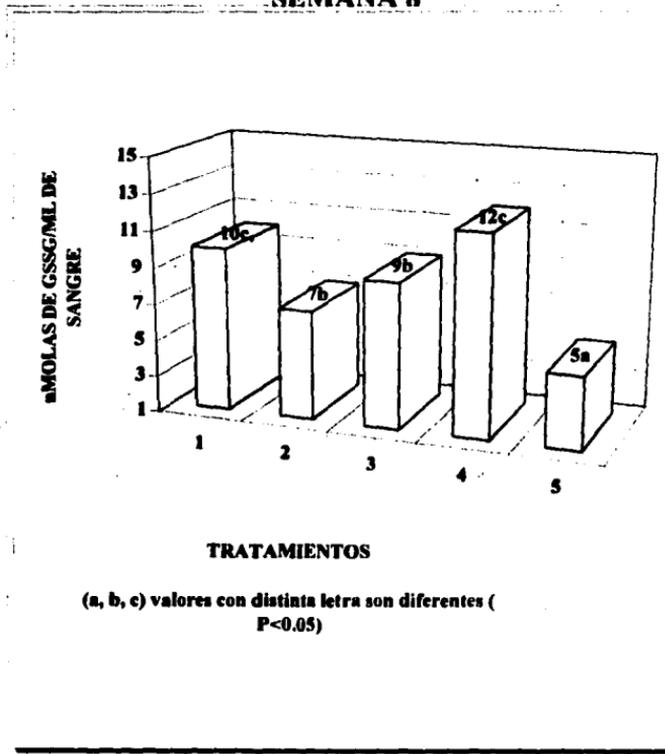


TRATAMIENTOS:

1. sin pigmento
2. pigmento amarillo natural
3. pigmento amarillo natural + rojo natural
4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
5. pigmento amarillo natural + sudan

Figura 14. Reserva de GLUTATIÓN OXIDADO, de gallinas a las que se les adicionó diferentes pigmentos.

SEMANA 8



TRATAMIENTOS:

1. sin pigmento
2. pigmento amarillo natural
3. pigmento amarillo natural + rojo natural
4. pigmento amarillo natural + rojo sintético
5. pigmento amarillo natural + sudan