



133
24
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**LOS RADICALES LIBRES Y EL PROCESO DE
LIPOPEROXIDACION COMO POSIBLE CAUSA DE
DAÑO HEPATICO EN POLLOS CON SINDROME
ASCITICO**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A ,**
MAURILIO SERRET GONZALEZ

**ASESORES: MVZ M en C ANTONIO DIAZ CRUZ
M en C RAQUEL GUINZBERG PERRUSQUIA
QFB YOLANDA SALDAÑA BALMORI
DR ENRIQUE PIÑA GARZA**



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**LOS RADICALES LIBRES Y EL PROCESO DE LIPOPEROXIDACION
COMO POSIBLE CAUSA DE DAÑO HEPATICO EN POLLOS CON
SINDROME ASCITICO**

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

por

Maurilio Serret González

Asesores:

MVZ M en C Antonio Díaz Cruz

M en C Raquel Guinzberg Perrusquía

QFB Yolanda Saldaña Balmori

Dr Enrique Piña Garza

México, D.F., 1996

DEDICATORIA

A mis padres:

Mercedes y Salomón. Por su ejemplo, de por sí admirable. Por la confianza que depositaron en mí y su ayuda incondicional, ya que sin ella no hubiera podido dar este paso, el primero, pero el más grande y el más importante.

A mis hermanos:

Rafael y Alonso. Muy en especial para ellos, porque estuvieron conmigo en todo momento a lo largo de la carrera y en cualquier circunstancia. Gracias por todo.

A mis tíos:

Ella y Darío. Por toda la ayuda y apoyo que recibí de ellos, ya que fueron parte fundamental de este logro.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Al Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina

Al Laboratorio 5 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina

Al Laboratorio 34 de la Unidad de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por su apoyo y facilidades para la realización de este trabajo.

A mis asesores: M en C Raquel Guinzberg Perrusquía, QFB Yolanda Saldaña Balmori y Dr. Enrique Piña Garza.

A los miembros del jurado: Dr. Leopoldo Paasch Martínez, Dr. Ernesto Avila González, MVZ M en C Carlos López Coello y MVZ M en C Luis Corona Gochi.

Al MVZ Roberto Señas Cuesta

A Silvia Arroyo Martínez

A Gaspar Enrique Palacios Argoytia

A Marco Antonio Flores Ramírez

A Alfonso Lozada Carmona

A Gonzalo Villar Patiño

A Rodrigo Merino Barba

A todos los que forman parte del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A todos mis compañeros y amigos.

Especialmente al MVZ Antonio Díaz Cruz por darme la oportunidad de formar parte de este excelente equipo de trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVO	16
HIPOTESIS	16
MATERIAL Y METODOS	17
RESULTADOS	22
DISCUSION	23
CONCLUSIONES	27
LITERATURA CITADA	29
CUADROS	40
FIGURAS	46

RESUMEN

SERRET GONZALEZ, MAURILIO: Los radicales libres y el proceso de lipoperoxidación como posible causa de daño hepático en pollos con síndrome ascítico (Bajo la dirección de: MVZ Antonio Díaz Cruz, M. en C. Raquel Guinzberg Ferrusquía, QFB Yolanda Saldaña Balmori, Dr. Enrique Piña Garza).

En la avicultura comercial el síndrome ascítico (SA), ha adquirido una importancia relevante, debido a las grandes pérdidas económicas que presenta por su elevada mortalidad. Este problema ha resultado en una consecuencia de los avances en el ciclo de desarrollo del pollo de engorda, que al reducirse cada vez más puede dar lugar a hipoxia, condición importante para el desarrollo del SA.

En el presente trabajo se utilizaron pollos de engorda de 6 semanas de edad, los cuales fueron divididos en dos lotes; el testigo y pollos con signos de SA. Las aves se sacrificaron y se extrajo el hígado en el cual se determinó el grado de lipoperoxidación a través de las técnicas de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de dienos conjugados (DC). Los resultados obtenidos muestran un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en el grado de lipoperoxidación hepática para los pollos con signos de SA, medido por la técnica de TBARS, en comparación con los pollos testigo; no así para los valores con la técnica de DC, en donde la concentración más alta pero no significativa ($p > 0.2$) corresponde a las aves con signos de SA. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se observa un incremento en el grado de lipoperoxidación en el hígado de los pollos con SA, ocasionado por un aumento en los niveles basales de radicales libres generados durante la presentación de este síndrome.

INTRODUCCION

SINDROME ASCITICO

En los últimos años, la avicultura comercial del pollo de engorda ha obtenido grandes avances en los indicadores productivos comerciales, principalmente al disminuir su ciclo de producción, mejorando el crecimiento, su conversión alimenticia y la calidad de la canal (15, 38, 39, 42, 57). Sin embargo, este beneficio ha tenido un costo metabólico que se refleja en nuevos problemas que causan elevada mortalidad en las parvadas, como es el caso del síndrome ascítico (SA). El SA ha cobrado mayor importancia debido a las grandes pérdidas económicas que representa por su elevada incidencia y su alta mortalidad, que dependiendo de la severidad del caso es de 4 % a 30 % (3, 40, 56, 57).

En un inicio se aceptaba que el SA se presentaba a partir de la tercera semana de edad, pero en la actualidad es frecuente encontrar aves que desde el primer día de vida son afectadas, presentándose la máxima mortalidad hacia la sexta semana (7, 34, 38, 42, 56).

Definición

Se ha designado con diferentes nombres al acúmulo de líquido en la cavidad abdominal, sin embargo existe una diferencia entre los términos ascitis y síndrome ascítico. En términos generales, la ascitis es una manifestación patológica producida por causas generales de edema y es conocida como: edema aviar, bolsa

de agua, enfermedad del edema. En cambio en el síndrome ascítico se ven involucrados los sistemas cardíaco y pulmonar, de donde reciben los siguientes nombres: síndrome de hipertensión pulmonar, síndrome de falla cardíaca, ascitis hipóxica, edema de las alturas y síndrome ascítico (5, 31, 43, 56, 61). Es importante señalar que no obstante esta diferencia, a nivel campo, se llegan a utilizar estos términos indistintamente.

El SA es un cuadro patológico que se caracteriza por una alteración funcional de los sistemas cardíaco y pulmonar, disfunción que ha llegado a ser identificada en los primeros días de vida y cuyas manifestaciones clínicas son observables a la cuarta semana de edad o antes, siendo lo más sobresaliente la distensión progresiva del abdomen y entre las características anatómo-patológicas más frecuentes destacan: hipertrofia cardíaca derecha, hidropericardio, hepatomegalia y congestión generalizada (31, 34, 38, 40, 42, 56).

Etiología

Por los signos y lesiones de este proceso patológico, es difícil definir una etiología única; su presentación incluye factores genéticos, medio ambientales, nutricionales, infecciosos y de manejo, posiblemente los factores genéticos y nutricionales son los de mayor importancia (2, 3, 5, 36, 38, 42).

Ya que una serie de factores desencadenan la presentación del SA en aves, se mencionan a continuación los más comunes. **Nutricionales;** debido a dietas altas en energía (4, 62). **Ambientales;** tales como temperatura ambiental baja

dentro de la caseta, así como altos niveles de amoníaco y humedad, polvo, presencia de monóxido y dióxido de carbono o deficiente ventilación en la misma (40, 46, 61). **Genéticos**; estirpes con elevada velocidad de crecimiento (53, 57, 62, 67). **Anatomo-fisiológicos**; al comparar los pulmones del gallo silvestre con los del pollo de engorda, estos últimos son anatómicamente menos eficientes para el intercambio gaseoso, presentan una barrera aerohemática tisular 28 % más gruesa, la capacidad del volumen pulmonar es 20 % inferior y la difusión de oxígeno de la barrera tisular aerohemática es 25 % menor (38, 56); **Manejo**; incluye una inadecuada oxigenación en las incubadoras y nacedoras, pollos sometidos a programas prolongados de iluminación, así como la cría de pollos a bajas temperaturas o la elevada densidad de población (5, 53). **Infecciosos**; enfermedades que afectan el sistema respiratorio como por ejemplo micoplasmosis y aspergilosis (35, 45, 46, 56). **Sexo**; son más susceptibles los machos que las hembras (65, 66).

Patogenia

El origen del SA se centra en la condición de hipoxia (1, 15, 29, 48, 65), esto lo reveló un estudio realizado en pollos de engorda sujetos a hipoxia inducida experimentalmente, en donde se encontraron resultados hematológicos y morfológicos similares a aquellos observados en pollos de la misma edad pero con SA (46, 47, 48, 70). La hipoxia desencadena como fenómeno compensatorio el aumento del hematocrito, lo que incrementa la viscosidad de la sangre y el trabajo cardíaco, disfunción que se manifiesta en una hipertrofia de ventrículo derecho y elevación de la presión sanguínea de la arteria pulmonar (1, 40). Por otro lado se ha

demostrado que el músculo liso vascular del pulmón es determinante en la hipertensión pulmonar a elevadas altitudes; el aumento de la presión sanguínea de la arteria pulmonar se transmite progresivamente a los capilares pulmonares provocando: una hipertensión pulmonar, dilatación del ventrículo derecho y un cierre inadecuado de la válvula tricúspide. Bajo esta condición la insuficiencia cardíaca, promueve un aumento en la presión hidrostática de todo el sistema venoso, ocasionando con esto, una congestión crónica pasiva (31, 40, 42, 56, 65).

Estas alteraciones funcionales que se presentan en el sistema cardiopulmonar durante el desarrollo del SA, repercuten de manera importante en el hígado e intestino delgado, de donde se ha reportado el origen de una extravasación de plasma y su acúmulo en la cavidad abdominal (56).

El SA en el pollo de engorda presenta las siguientes características:

a) Signos

Las aves afectadas presentan disnea, erizamiento de plumas, dificultad para caminar, posición de pinguino cuando el abdomen se encuentra muy distendido, cresta cianótica, puede presentarse diarrea, en casos severos retraso en el crecimiento y muerte repentina (40).

b) Lesiones

Las alteraciones anatómo-patológicas más comunes son; cardiomegalia, hidropericardio, congestión pulmonar, el bazo y los riñones están aumentados de tamaño, el hígado aparece congestionado y también aumentado de tamaño en

casos agudos o bien de menor tamaño y endurecidos, con bordes redondeados en casos crónicos y la presencia de fluido en la cavidad abdominal (38).

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo se hace con base en la historia clínica, observación de signos y lesiones características aunque con pronóstico desfavorable (59).

Control y prevención

Toda medida tendiente a reducir la tasa metabólica, limitará la presentación del SA. Debe evaluarse el costo-beneficio de toda medida que se implemente y cada evaluación será específica para cada situación particular en las diversas explotaciones. En general, se instrumentan medidas tendientes a la protección del sistema cardio-pulmonar (5).

Actualmente se están aplicando programas de restricción alimenticia para el control del SA, dentro de ellas destacan dos; la cuantitativa, que es restringir el consumo de alimento y que puede ser limitando el tiempo de acceso al alimento en forma manual, y la cualitativa la cual consiste en usar bajos niveles de proteína y alimentos energéticos, que pueden ser a través de un cambio en la formulación o bien con una dilución de la dieta (4, 5, 63).

RADICALES LIBRES

Generalidades

En los últimos años el interés por los radicales libres (RL) ha venido en aumento, por lo que se ha estudiado la función y el papel que estos desempeñan en la salud y la enfermedad. De manera especial la investigación se ha dirigido hacia los RL que provienen de las reacciones del oxígeno, debido a que se encuentran ampliamente distribuidos en los seres vivos y son característicos de los sistemas aeróbicos (17, 25, 27).

A pesar de que el oxígeno es indispensable para la vida aeróbica, es potencialmente tóxico y su utilización en los procesos metabólicos sólo es posible si los organismos cuentan con una gama de moléculas que los protejan de los derivados del oxígeno llamados radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($-OH$) y singulete de oxígeno ($^1O_2^*$) (14, 30).

Los radicales de oxígeno son capaces de destruir bacterias e inactivar enzimas. También pueden interactuar con lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, alterando la estructura y la función de los componentes celulares (14, 17).

Definición

Los RL son derivados de átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital externo (Figura 1), lo que los vuelve

entidades extremadamente reactivas, ya que buscan satisfacer tal desequilibrio sustrayendo o adicionando electrones a otros átomos o moléculas (Figura 2), las que a su vez se pueden convertir en radicales libres, este último mecanismo puede dar lugar a reacciones en cadena, es decir a la propagación del fenómeno inicial (6, 10).

Radicales libres derivados del oxígeno

El oxígeno molecular (O_2) al absorber 22 Kcal de energía se convierte en una molécula reactiva, el singulete de oxígeno representado como $^1O_2^*$ (Figura 1); puede transformarse en otro: $^1O_2^{**}$ por la absorción de 15 Kcal más de energía, su vida es efímera y se convierte rápidamente en el singulete $^1O_2^*$. En la formación de singuletes no hay adición de electrones, sino se trata de una redistribución de los mismos en el último orbital (6,28).

Por otro lado, cuando la molécula de oxígeno acepta un electrón, se convierte en el radical superóxido, este se representa con el signo negativo del anión y un punto que indica que se trata de un radical libre (O_2^-) (Figura 1); fisiológicamente el radical superóxido es producido durante el proceso de fosforilación oxidativa en la mitocondria (1.5 % del O_2 total consumido) (10, 22). Además, también es generado por las células fagocitarias que utilizan a este RL como un mecanismo de defensa; en estas células las reacciones que conducen a la producción del radical superóxido y otros compuestos como el peróxido de hidrógeno, hipoclorito, el singulete de oxígeno y las cloramínas (Figura 3), se debe a procesos inmunológicos, que provocan una elevación espectacular del

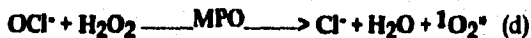
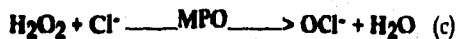
metabolismo de los leucocitos polimorfonucleares y de los macrófagos, con un súbito aumento del consumo del oxígeno, evento conocido como explosión respiratoria. En la membrana citoplásmica de estas células se encuentra un complejo enzimático denominado NADPH-oxidasa, que cataliza la siguiente reacción la cual es importante mencionar aquí por el hecho de producir O_2^- (30, 58):



Otra de las enzimas de particular importancia en relación con la presencia de RL en las células es la superóxido-dismutasa (SOD) localizada en el citoplasma del fagocito, la cual cataliza la siguiente reacción:

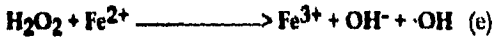


Notese así mismo que los leucocitos polimorfonucleares liberan en el medio, al mismo tiempo que peróxido de hidrógeno, una enzima denominada mieloperoxidasa (MPO), que utiliza el poder oxidativo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para transformar los halogenuros en hipohalogenuros, según las siguientes reacciones:

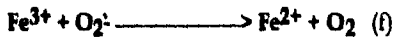


Como se observa en este conjunto de reacciones, el aumento en el consumo de oxígeno durante la descarga respiratoria de los fagocitos está destinado a producir una gran cantidad de metabolitos de oxígeno, que tienen poder bactericida, aún cuando no todos sean propiamente radicales libres (33).

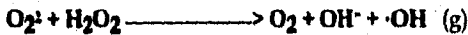
El peróxido de hidrógeno formado en la reacción (b), a pesar de no ser un radical libre, tiene una importancia fundamental ya que, en presencia de los metales de transición como el Cu^+ o el Fe^{2+} , da lugar al radical hidroxilo y al ión hidroxilo conforme a la reacción de Fenton:



Es conveniente hacer notar que en este proceso, el radical superóxido se convierte en un alimentador de Fe^{2+} , a través de la siguiente reacción (26, 28):



La dismutación del radical superóxido que produce peróxido de hidrógeno (reacción b), el que a su vez, se descompone en el radical hidroxilo con intervención del Fe^{2+} (reacción e) y la regeneración de este último por medio del radical superóxido (reacción f), constituye el ciclo de Haber-Weiss:



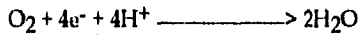
El radical hidroxilo formado (reacción g) es el más importante, ya que es un oxidante muy reactivo que interactúa con casi todas las moléculas que se encuentran en los organismos (14, 58).

Defensas biológicas

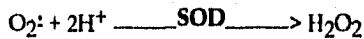
Todas las células cuentan con diversos mecanismos de protección natural para manejar la carga fisiológica de radicales libres generados en las células, ya sea

impidiendo su formación o neutralizándolos una vez formados, entre estos sistemas protectores se encuentran los siguientes :

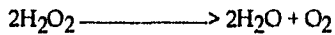
a) Sistema citocromo-oxidasa: Existe a nivel mitocondrial y consiste en evitar la reducción univalente del oxígeno, por reducción tetravalente, sin liberar intermediarios (Figura 4) (21,33):



b) Superóxido-dismutasa (SOD): Es una familia de metaloenzimas (dependientes de Zn^{2+} , Cu^{2+} , y Mn^{2+}) que catalizan la dismutación del radical anión superóxido para dar peróxido de hidrógeno (reacción b) (22, 33).



c) Catalasa: Cataliza la transformación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno, en dos moléculas de agua más una molécula de oxígeno (33).



d) Peroxidasas: Catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno por diversos donadores de electrones: dentro de estas enzimas destaca la glutatión-peroxidasa, que cataliza la siguiente reacción:



e) β -carotenos, vitamina E y vitamina C: Los β -carotenos neutralizan al singulete de oxígeno, una molécula de esta puede inactivar centenares de moléculas de oxígeno singulete mediante un mecanismo de apagador (quenching) físico: la energía del singulete de oxígeno se utiliza para convertir la forma *cis* del

β -caroteno en su isómero *trans*, y viceversa. El α -tocoferol o vitamina E es de particular importancia porque neutraliza al radical hidroxilo, formando un radical tocoferilo que, por ser estable, suspende la cadena de reacciones generadoras de RL. La vitamina C o ascorbato, reacciona con el radical tocoferilo regenerando la vitamina E y convirtiéndose en el radical ascorbilo ($A\cdot$), también muy estable; por esto se le considera como un antioxidante indirecto (22, 37, 69).

PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LA FISIO-PATOLOGIA

Lipoperoxidación

Los fosfolípidos de las membranas contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, estos ácidos grasos no saturados son susceptibles de combinarse con un RL del oxígeno para la formación de peróxidos, a este proceso se le denomina lipoperoxidación. Los ácidos grasos poliinsaturados son muy vulnerables a la peroxidación, ya que los dobles enlaces carbono-carbono debilitan la unión carbono-hidrógeno del átomo de carbono vecino. El radical hidroxilo ($\cdot OH$) que es el principal responsable de la oxidación lipídica, al atacar los ácidos grasos poliinsaturados (Figura 5), abstrae un átomo de hidrógeno y crea un radical libre (I), que es estabilizado por un rearrreglo interno formando un dieno conjugado (II), el cual reacciona rápidamente con una molécula de oxígeno para dar un radical lipoperoxilo (III). Este radical lipoperoxilo puede atacar a un lípido vecino, sustrayéndole un átomo de hidrógeno, para producir un hidroperóxido y un nuevo radical (IV). Una alternativa es que a partir de él, se formen los peróxidos

cíclicos (V), los que pueden por un lado, conducir a la formación de endoperóxidos (VI) por acción de la ciclooxigenasa, continuándose la vía de la degradación para dar lugar a la formación de sus productos terminales: el malondialdehído (MDA) entre otros aldehídos (VII) (24, 26, 27, 73).

El proceso de lipoperoxidación daña severamente a las membranas, produciendo pérdida de su fluidez, de su capacidad secretora y de los gradientes iónicos transmembranales de la membrana plasmática y las de los organelos celulares (17).

Isquemia-reperfusión

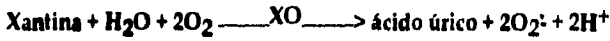
Un tejido isquémico sufre hipoxia o anoxia por un periodo de tiempo mas o menos prolongado. La isquemia por sí misma, si es prolongada, producirá daño tisular y muerte celular. Es importante mencionar que el daño mayor ocurre cuando hay perfusión del órgano o del tejido, es decir, cuando el oxígeno molecular regresa con la restitución parcial o total de la circulación sanguínea (Figura 6) (17, 32, 58).

Bajo condiciones adecuadas de oxigenación la xantina-deshidrogenasa (XDH) cataliza la siguiente reacción:



Cuando el aporte de oxígeno disminuye, la producción de ATP decrece, bajo estas condiciones y en presencia de Ca^{2+} citosólico, se activa una serie de

proteínas, siendo una de estas, la responsable de transformar de manera irreversible la actividad de la xantina-deshidrogenasa, en xantina-oxidasa (XO) (17), cuya participación es fundamental en el catabolismo de nucleótidos de adenina; la degradación del ATP ocasiona la acumulación tisular de hipoxantina (22). Si en este momento aumenta el flujo de oxígeno al tejido, la xantina-oxidasa cataliza la siguiente reacción:



Después del restablecimiento de la circulación sanguínea, el daño se debe a la producción excesiva del radical superóxido, y como corolario del peróxido de hidrógeno y del radical hidroxilo que se forman a partir del superóxido, según se revisó en las páginas anteriores (10, 19).

Fagocitosis

La explosión respiratoria de los fagocitos activados no llenan una necesidad energética, sino que está dirigida a la producción de metabolitos del oxígeno, destinados a destruir a las bacterias invasoras. Pero esta defensa puede producir daño en el mismo ambiente en el que actúan los fagocitos (58).

Inflamación

Los fagocitos activados liberan también ácidos grasos insaturados a partir de los fosfolípidos, por la activación de las fosfolipasas A₂ y C. La liberación de ácido araquidónico, en particular, determina su utilización en las vías de la

ciclooxigenasa y de la lipooxigenasa que dan lugar a la formación de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y otros derivados, los cuales son promotores de la formación de radicales libres derivados de oxígeno. En conjunto promueven la vasodilatación, la agregación plaquetaria y la leucotaxis, con lo que el proceso se hace autosostenido (60).

JUSTIFICACION

La mayoría de los trabajos experimentales relacionados con el S.A. se han centrado a explicar la fisiopatología del síndrome a partir de las alteraciones observadas en los sistemas respiratorio y cardiovascular, con el propósito de encontrar un diagnóstico temprano que pueda indicar la presencia del padecimiento. Se ha concluido que la falla en el corazón reduce la velocidad del tránsito sanguíneo, lo que conlleva a un estasis en los órganos (congestión crónica pasiva) especialmente en el hígado e intestino donde se encuentra el origen del fluido ascítico (1, 38, 51, 52, 59). Tomando en cuenta la importancia económica que representa el síndrome ascítico en la industria del pollo de engorda, es de gran valor realizar investigaciones sobre las alteraciones metabólicas del hígado ocasionadas por el SA, para encontrar una pauta que nos indique la posible prevención o tratamiento del mismo.

OBJETIVO

Cuantificar el grado de lipoperoxidación generado por la presencia de radicales libres del oxígeno en el hígado de pollos con síndrome ascítico, por medio de las técnicas de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de dienos conjugados (DC).

HIPOTESIS

El daño hepático encontrado en los pollos con síndrome ascítico involucra un proceso de lipoperoxidación el cual es generado por la presencia de radicales libres del oxígeno.

MATERIAL Y METODOS

Para el estudio se utilizaron pollos de engorda de la estirpe Arbor Acres de 6 semanas de edad, provenientes de una granja comercial ubicada en Tlalpizahuac Estado de México, a una altitud de 2,250 metros sobre el nivel del mar. Las determinaciones se efectuaron en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La población con la cual se trabajó fué de 32 animales, misma que se dividió en dos grupos de 16 pollos:

- I. Pollos sin signos de síndrome ascítico (testigo) y
- II. Pollos con signos de síndrome ascítico.

METODOS DE DETECCION DE LOS RADICALES LIBRES DE OXIGENO

La presencia de un electrón impar le da características físicas particulares a la molécula, la que puede ser medida directamente por técnicas como la espectroscopía con luz ultravioleta y visible (UV/VIS), resonancia paramagnética y electroquímica, quimioluminiscencia, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), entre otras; sin embargo en ocasiones estas aproximaciones son frecuentemente limitadas por su baja concentración y corta vida media de la mayoría de los RL. Una manera con la que se puede medir el nivel de los radicales

libres derivados de los ácidos grasos, dependen en gran medida de los productos formados en la reacción, tales como el malondialdehído y los dienos conjugados, entre otros, los cuales se miden espectrofotométricamente a 532 nm y 240 nm respectivamente. (11, 16, 19, 24, 49, 64).

Técnica de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Las aves fueron anestesiadas con éter, de inmediato se obtuvo una porción del hígado de aproximadamente 10 gramos, en algunos de los pollos (cinco testigo y tres con SA) también se realizaron determinaciones para ver si existía el mismo comportamiento en corazón; el tejido se homogeneizó en agua destilada fría y se filtró a través de una gasa de algodón. Se tomó una alícuota del filtrado de 200 microlitros, para ser incubado en tubos de ensaye con 1.0 ml buffer de fosfatos 0.15 M a un pH de 7.0, por 30 minutos a 37°C. Después se adicionó 1.5 ml de ácido acético al 20% a un pH de 2.5 y 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.8%; la mezcla se colocó en baño de agua a ebullición durante 45 minutos, al término del cual los tubos se colocaron en agua con hielo, después de 10 minutos se agregó 1 ml de KCl al 2% y 5 ml de butanol-piridina (15:1), se mezcló vigorosamente, finalmente se centrifugó a 5,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos, en la fase orgánica (Figura 7) se cuantificó la absorbancia espectrofotométrica a 532 nanómetros (54, 55, 71, 72). La concentración de TBARS se cuantificó por medio de la siguiente fórmula:

$$A_s = E \cdot b \cdot c$$

Donde: A_s = absorbancia

E = coeficiente de extinción molar = 1.56×10^5 mM cm (11)

b = longitud de la celda = 1 cm

c = concentración

despejando a c, la formula queda como sigue:

$$c = \frac{As}{E \cdot b}$$

Ejemplo:

Promedio As = 0.048 (primer dato del cuadro 1)

$$= 0.048 / 1.56 \times 10^5 \cdot 1$$

$$= 3.08 \times 10^{-7} \times 4.2 \text{ ml (volumen total)}$$

$$= 1.29 \times 10^{-6} \times 5 \text{ (corrección por volumen)}$$

$$= 6.45 \times 10^{-6} \text{ moles de TBARS / ml}$$

$$= 6.45 \text{ nanomoles de TBARS / ml}$$

Técnica de dienos conjugados

Se agregaron 8.0 ml de cloroformo-metanol (2:1) a 0.2 ml del homogenado filtrado, agitándose en vortex durante 2 minutos y se centrifugó a 3,000 rpm por 5 minutos; se separa 5 ml de la fase superior, dicha fase se lava con 2 ml de agua destilada, para luego realizar una segunda centrifugación; finalmente se retiró la fase inferior para su lectura a 240 nm (12).

A partir de las lecturas se hizo el cálculo con la misma fórmula que se aplicó en TBARS, donde el coeficiente de extinción molar para DC es el siguiente:

$$E = 2.52 \times 10^4 \text{ mM cm (11).}$$

Ejemplo:

Promedio $A_s = 0.032$ (primer dato cuadro 3)

$$= 0.032 / 2.52 \times 10^4 \cdot 1$$

$$= 1.27 \times 10^{-6} \times 8.3 \text{ ml (volumen total)}$$

$$= 10.54 \times 10^{-6} \times 5 \text{ (corrección por volumen)}$$

$$= 52.698 \times 10^{-6} \text{ moles de DC / ml}$$

$$= 52.69 \text{ nanomoles de DC / ml}$$

Proteínas por el método colorimétrico de Bradford

Es necesario determinar la cantidad de proteína que está presente en el homogenizado para poder calcular tanto a los de dienos conjugados (DC) y de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como nanomoles por miligramo de proteína. El método consiste en realizar una curva patrón de diferentes concentraciones de albúmina (0, 20, 40, 60, 80, y 100 microgramos) y colocar en otros tubos 50 l de los problema con una dilución 1:20; a todos los tubos, tanto de la curva como de los problemas se les completa a 100 l con buffer Tris-KCl-EDTA. A todos los tubos se les agregó 5 ml de reactivo de Bradford y se cuantificó la absorbancia a 595 nm (9); la lectura del problema se transforma mediante la curva de albúmina en g de proteína y luego se corrige por la dilución.

Cálculo:

Promedio $A_s = 0.327$

Valor en la curva = $37.7 \text{ mg/ml} \times 20$ (1a dilución)

$$= 754 \text{ mg/ml} \times 20 \text{ (2a dilución)}$$

$$= 15080 \text{ mg/ml} / 1000$$

= 15.08 mg/ml

Retomando los datos de TBARS:

6.45 nmoles/ml y 15.08 mg/ml de proteína

= 0.428 nmoles de TBARS / mg de proteína

Retomando los datos de DC:

52.69 nmoles/ml y 15.08 mg/ml de proteína

= 3.49 nmoles de DC / mg de proteína

Análisis estadístico

Los datos se compararon estadísticamente con la prueba de hipótesis de "t" de student, respecto a medias de datos independientes (23).

RESULTADOS

Determinaciones de TBARS en hígado

El Cuadro I, muestra los valores de TBARS encontrado en homogenado de hígado de pollos testigo de 6 semanas de edad en donde se observa que la concentración promedio de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico fué de 0.403 ± 0.089 nmoles/mg de proteína. El Cuadro II, muestra los niveles de TBARS obtenidos en hígados de pollos con signos de síndrome ascítico, en donde se reporta una concentración promedio de 0.952 ± 0.306 nmoles/mg de proteína.

Determinaciones de DC en hígado

El Cuadro III, muestra los niveles de DC en homogenado de hígado de pollos testigo, donde el valor promedio obtenido fué de 5.786 ± 2.315 nmoles/mg de proteína, ligeramente mayor a lo encontrado en homogenado de hígado de pollos con signos de SA (4.631 ± 1.398 nmoles/mg de proteína, Cuadro IV).

Determinaciones de TBARS en el corazón

Con respecto a los niveles de TBARS encontrados en homogenado de corazón de cinco pollos testigo y tres con signos de síndrome ascítico, los valores promedio fueron de 0.432 ± 0.083 nmoles/mg de proteína (Cuadro V) y de 1.134 ± 0.505 nmoles/mg de proteína respectivamente (Cuadro VI).

DISCUSION

No obstante que se trata de dos tejidos diferentes llama la atención que los niveles basales de TBARS tanto en homogenado de hígado como de corazón dan valores similares; además en ambos se observa un incremento de 236.22 % y 262.26 % (Cuadros I, II y V, VI; Figuras 8 y 9), en los valores obtenidos para hígado y corazón respectivamente en pollos con SA, estos últimos valores son indicativos de un alto grado de lipoperoxidación en estos órganos. Con respecto a los valores obtenidos de dienos conjugados (Figura 10), no tienen una correlación entre éstos y los de TBARS, que son el producto final del proceso de lipoperoxidación y que como se señala en la Figura 3 los DC también se forman en etapas previas a las del malondialdehído, la principal molécula generadora del cromógeno que reacciona en presencia del ácido tiobarbitúrico. No existe una explicación satisfactoria a esta falta de correlación entre los dos indicadores del proceso de lipoperoxidación ensayados en este trabajo. La presencia de un exceso de RL del oxígeno, presentes en los diferentes tejidos de las aves con SA, al afectar los lípidos membranales provocarían al menos desde el punto de vista teórico (Figura 5), una elevación de los DC y una similar de los TBARS. Una posibilidad para aclarar tal diferencia reside en que el estudio reportado por Cawood y col. (1983) (12), en el cual originalmente se propuso la medición de los RL por la cuantificación de DC, las determinaciones se hicieron a partir de fluidos biológicos: suero humano, bilis, jugo duodenal y productos de lipoperoxidación *in vitro*, mientras que nuestro estudio se realizó en el homogenado hepático; a parte hay que considerar la información en la literatura, que la mejor cuantificación de los dienos conjugados se realiza precisamente en la fracción microsomal.

Los resultados de TBARS indican un daño en la membrana citoplasmática de las células hepáticas y cardíacas producido por el proceso de lipoperoxidación (LP), este daño provoca que la membrana se altere y que el líquido intracelular sea vertido al exterior, también pueden verse afectadas las paredes vasculares, influyendo con esto en la salida del plasma sanguíneo y del líquido intracelular hacia la cavidad abdominal, además de la hipertensión que se tiene en estos órganos por la estasis y la congestión crónica pasiva.

Los resultados obtenidos en este trabajo, coinciden con lo reportado por Lozada (1995) (41), en cuanto a hígado se refiere, él encuentra en los pollos con SA, un aumento gradual en la concentración de TBARS a partir de la cuarta semana de edad y que los niveles más altos son observados entre la 6ª y 7ª semanas, es importante mencionar que en este mismo órgano Nava (1995) (50) y Villanueva (1995) (68), reportan una alteración funcional en el metabolismo del nitrógeno y carbohidratos respectivamente; por otro lado, los resultados obtenidos en corazón son el primer reporte de una alteración molecular en este órgano en el caso de aves con SA.

Basado en los resultados del estudio, se propone en la Figura 11 la secuencia de sucesos moleculares que suceden durante el desarrollo del SA:

En las aves con SA, la LP se inicia por la hipoxia, que es el factor desencadenante del SA, proceso que estimula la actividad de las enzimas fosfolipasa A₂ y fosfolipasa C para la liberación del ácido araquidónico; el cual es metabolizado vía las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa, con la subsecuente

producción de prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LT) que son importantes mediadores químicos del proceso inflamatorio (60); y responsables de la respuesta inflamatoria generalizada, la infiltración y agregación de linfocitos polimorfonucleares (PMN). En este sentido los PMN activados como respuesta a la inflamación forman a los radicales libres de oxígeno (RLO) para inactivar a posibles agentes extraños; al no haber los antígenos adecuados, estos RLO producen daño en el medio inmediato, afectando a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Por otro lado los fagocitos activados liberan ácido araquidónico, por medio de las fosfolipasas A₂ y C para la formación de nuevas PG, TX y LT, acentuando así la inflamación. Los leucotrienos son responsables de la vasoconstricción de la microvasculatura del pulmón, coincidiendo con lo que menciona Maxwell y Robertson en 1993 (48) de que existe una vasoconstricción de arterias y arteriolas, lo que es un factor determinante en la hipertensión pulmonar (HP). Por otro lado, en sus hallazgos hematológicos Maxwell *et al* (1986b) (44) mencionan una policitemia como otro factor que contribuye a la HP y células inflamatorias, en particular formas inmaduras y heterófilos maduros que fueron observados a menudo en el corazón y en el hígado, entendiéndose con ello que hay una respuesta inflamatoria importante (13).

Díaz *et al* (1995) (18), proponen la presencia de un cuadro de estrés oxidativo, en el pollo con SA, debido a un desbalance entre el estado oxidante y antioxidante del ave, proceso que desencadena un daño potencialmente metabólico. Así el estrés oxidativo puede estar involucrado en procesos de mutagénesis, carcinogénesis, lipoperoxidación y fragmentación de proteínas, así como alteración en el metabolismo de carbohidratos; esto se complementa con lo

reportado por Bottje y Enkvetchakul (8) que proponen un estado de lipoperoxidación en aves con SA al encontrar un desgaste de los antioxidantes celulares (20).

CONCLUSIONES

Existe un alto grado de lipoperoxidación en el hígado de pollos con signos de síndrome ascítico en relación a los pollos testigo o normales, medido por la presencia de TBARS.

Daño celular por el proceso de peroxidación lipídica en la membrana, el que es generado por la presencia de radicales libres del oxígeno.

En corazón de pollos con SA también fué observado un alto grado de lipoperoxidación.

Según los estudios realizados hasta ahora relacionados con la LP, se puede decir que este proceso es consecuencia de la hipoxia, esto es, que se presenta paralelamente con los sucesos compensatorios a la misma, y por lo tanto, que la LP está involucrada directamente en la patogenia del síndrome ascítico, pero no se puede aseverar que ésta origine al SA.

Existe un estrés oxidativo en el ave por el desbalance que hay entre la producción de los radicales libres de oxígeno y los mecanismos de defensa para estabilizarlos con que cuenta el organismo.

Parte del fluido ascítico tiene su origen en el hígado posiblemente debido al daño lipoperoxidativo.

Se confirma la importancia que representa la hipoxia dentro de la etiología del SA.

Se necesitan más estudios para poder definir exactamente la participación de la LP en la patogenia del SA.

LITERATURA CITADA

- 1.- Alemán, M. A., Paasch, L. H. y Montaña, R. L.: La hipoxia en la patogenia del síndrome ascítico del pollo de engorda. *Veterinaria México*, 21:23-28 (1990).
- 2.- Arce, M. J., Soto, C. G. y Avila, G. E.: Efecto de la presentación física del alimento con relación a la incidencia del síndrome ascítico del pollo de engorda. *Técnica Pecuaria Méx.*, 51:37-43 (1986).
- 3.- Arce, M. J., López, C. C. y Vásquez, P. C.: Análisis de la incidencia del síndrome ascítico en el valle de México. *Téc. Pec. Méx.*, 25(3):338-342 (1987).
- 4.- Arce, M. J.: Restricción de alimento manual y diferentes densidades de nutrientes en las dietas para el control del síndrome ascítico en el pollo de engorda. *Memorias XI Ciclo de Conferencias Internacionales Sobre Avicultura*. México D.F. 37-54 (1993).
- 5.- Arce, M. J.: Consideraciones para reducir el síndrome ascítico en pollo de engorda. *Memorias Ronda Latinoumericana en Biotecnología*. México D.F., p. 1-20 (1994).
- 6.- Aust, S. D., Chignell, C. F., Bray, T. M., Kalyanaraman, B. and Mason, R. P.: Contemporary issues in toxicology. Free radicals in toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 120:168-178 (1993).
- 7.- Berger, M. M.: Ascitis y medio ambiente. 6º Congreso Nacional de la AMENA, Acapulco Gro., 35-43 (1993).

- 8.- Bottje, G. W., Enkvetchakul B.: Potential role of antioxidants and lipid peroxidation in ascites syndrome, *AFIA* (1994).
- 9.- Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254 (1976).
- 10.- Brown, S. A. and Hall, E. D.: Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of shock and trauma, with focus on central nervous system injuries. *JAVMA*, 200(12):1849-1858 (1992).
- 11.- Buege, J. A. and Aust, S. D.: Microsomal lipid peroxidation. *Microsomal Electron Transport and Cyt P-450*, 30:302-310 (1990).
- 12.- Cawood, P., Wickens, D. G., Iversen, S. A., Braganza, J. M. and Dormandy, T. L.: The nature of diene conjugation in human serum, bile and duodenal juice. *FEBS*, 162(2):239-243 (1983).
- 13.- Charles L.M.: Citopatología del síndrome ascítico. *Memorias de la VIII convención anual de ANECA*. Ixtapa Zihuatanejo; 225-227 (1983).
- 14.- Chiu, D., Kuypers, F. and Lubin, B.: Lipid peroxidation in red cells. *Seminars in Hematology*, 26(4):257-276 (1989).
- 15.- Coleman, M. y Coleman, G.: Detenga ascitis antes del nacimiento. *Industria Avícola*, 39(7):10-15 (1992).

- 16.- Comporti, M.: Biology of disease. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Laboratory Investigation*, 53(6):599-623 (1985).
- 17.- Deby, C.: Bioquímica del oxígeno. *Mundo Científico*, 11(111):287-295 (1990).
- 18.- Díaz, C. A., Nava, C. C., Villanueva, L. R., Serret, G. M., Guinzberg, P. R. y Piña, G. E.: Alteraciones metabólicas en el hígado de pollo con síndrome ascítico. XX Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Acapulco, Gro. (1995)
- 19.- Dipak, K. D., Engelman, M. R.: Mechanism of free radical generation during reperfusion of ischemic myocardium. *Esmann, Flushing, N.Y.* pag. 99-128 (1986).
- 20.- Enkvetchakul, B., Bottje, W., Anthony, N. and Moore, R.: Compromised antioxidant status associated with ascites in broilers. *Poultry Science*, 72:2272-2280 (1993).
- 21.- Fernandez, V., Barrientos, X., Kipreos, K., Valenzuela, A. and Videla, L. A.: Superoxide radical generation NADP oxidasa activity and cytochrome P 450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state; relation to lipid peroxidation. *Endocrinology*, 117:496-501 (1985).
- 22.- García, P. J., García, T. B., Morán, S. M., Céspedes, M. E., Clapes, H. S. y Olenbe, E. S.: Radicales libres: impacto médico. *Bol. de Educ. Bioq. (BEB)*, 13(3):77-81 (1994).

- 23.- Gill, J. L.: Design and analysis of experiments in the animal and medical sciences. Volume 1, *The Iowa State University Press* (1978).
- 24.- Girotti, A. W.: Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1:87-95 (1985).
- 25.- Gutteridge, J. M. and Halliwell, B.: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS*, 15:129-135 (1990).
- 26.- Hatherill, J. R., Till, G. O. and Ward, P. A.: Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents and Actions*, 32(3/4):351-358 (1991).
- 27.- Halliwell, B. and Gutteridge, J.: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press Oxford. *Second edition*, 188-250 (1989).
- 28.- Halliwell, B. and Gutteridge, J.: Role of free radical and catalytic metal ion in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85 (1990).
- 29.- Hernández, A.: Hypoxic ascites in broilers: a review of several studies done in Colombia. *Avian Diseases*, 31:658-661 (1987).
- 30.- Hicks, J.J, Díaz, Z.J.C.(editores): Bioquímica e Inmunología. Facultad de Medicina, UNAM capítulo 18:353-362 (1988).
- 31.- Huchzermeyer, F. W. and De Ruyck, A. M.: Pulmonary hypertension syndrome associated with ascites in broilers. *Veterinary Record*, 119:94 (1986).

- 32.- Janero, D. R., Hreniuk, D. and Sharif, H. M.: Hydrogen peroxide-induced oxidative stress to the mammalian heart-muscle cell (cardiomyocyte): lethal peroxidative membrane injury. *Journal of Cellular Physiology*, 149:347-364 (1991).
- 33.- Janssen, Y. M., Van Houten, B., Borm, P. J. and Mossman, B. T.: Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Laboratory Investigation*, 69(3):261-273 (1993).
- 34.- Julian, R. J., Friars, G. W., French, H. and Quinton, M.: The relationship of right ventricular hypertrophy, right ventricular failure, and roaster chickens. *Avian Diseases*, 31(1):130-135 (1986).
- 35.- Julian, R.J. and Goryo, M.: Pulmonary aspergillosis causing right ventricular failure and ascites in meat-type chickens. *Avian Pathology*, 19:643-654 (1990).
- 36.- Lamas da, S. J. M., Dale, N., and Batista, L. J.: Effect of pelleted feed on the incidence of ascites in broilers reared at low altitudes. *Avian Diseases*, 32: 379-378 (1988).
- 37.- Lawrence, J. M., and Bendich, A.: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, 1:441-445 (1987).
- 38.- López, C. C., Arce, M. J., Avila, G. E., Vásquez P. C.: Investigaciones sobre el síndrome ascítico en pollos de engorda. *Ciencia Veterinaria*, 5:13-48 (1991).

- 39.- López, C. C.: Repercusiones económicas en la aplicación de programas de alimentación como paliativos para el control del síndrome ascítico. *Memorias XI Ciclo de Conferencias Internacionales Sobre Avicultura*. México, D.F., p. 203-228 (1993).
- 40.- López, C. C., Arce, M. J., Avila, G. E., Hargis, B.: Manual del productor para el control del síndrome ascítico III. *U.S. Feed Grains Council*, México D.F. (1994).
- 41.- Lozada, C. A.: Efecto del piroxicam sobre el grado de lipoperoxidación en hígados de pollos con síndrome ascítico y su relación con el comportamiento productivo. Tesis de Maestría. *FMVZ, UNAM* (1995).
- 42.- Machorro, V. E. y Paasch, M. L.: Evaluación del efecto de la hipertensión pulmonar en la presentación del síndrome ascítico en México. *Veterinaria Mex.* 16:15-19 (1985).
- 43.- Maxwell, M. H., Robertson, G. W. and Spence, S.: Studies on an ascites syndrome in young broilers. 1. Haematology and pathology. *Avian Pathology*, 15:511-524 (1986).
- 44.- Maxwell, M. H., Robertson, G. W. and Spence, S.: Studies on an ascites syndrome in young broilers. 2. Ultrastructure. *Avian Pathology*, 15:525-538 (1986).
- 45.- Maxwell, M. H., Anderson, I. A. and Dick, L. A.: The incidence of ectopic cartilaginous and osseous lung nodules in young broiler fowls with ascites and various other diseases. *Avian Pathology*, 17:487-493 (1988).

- 46.- Maxwell, M. H., Dick, I. A., Anderson, I. A. and Mitchell, M. A.: Ectopic cartilaginous and osseous lung nodules induced in the young broiler by inadequate ventilation. *Avian Pathology*, 18:113-124 (1989).
- 47.- Maxwell, M. H., Spence, S., Robertson, G. W. and Mitchell, M. A.: Haematological and morphological responses of broiler chicks to hypoxia. *Avian Pathology*, 19:23-40 (1990).
- 48.- Maxwell, M. H. and Robertson, G. W.: Hipoxia a nivel de mar: indicadores ultracitoquímicos en pollos de engorda en iniciación con síndrome ascítico. *XI Ciclo de Conferencias Internacionales Sobre Avicultura*, México D.F., p. 19-36 (1993).
- 49.- Mazzanti, R., Moscarella, S., Bensi, G., Alta, V.E. and Gentilini, P.: Hepatic lipid peroxidation and aldehyde deshydrogenase activity in alcoholic and non alcoholic liver disease. *Alcohol & Alcoholism*, 24(2):121-128 (1989).
- 50.- Nava, C. C.: Determinación de los niveles de amonio en hepatocitos aislados y medición de los niveles séricos de ácido úrico en pollos con signología de síndrome ascítico. Tesis de Licenciatura. *FMVZ, UNAM* (1995).
- 51.- Odom, T. W., Hargis, B. M., López, C. C., Arce, M. J., Ono, Y. and Avila, G. E.: Use of electrocardiographic analysis for investigation of ascites syndrome in broiler chickens. *Avian Diseneses*, 35(4):738-744 (1991).

- 52.- Odom, T. W., Rosenbaum, L. M. and Hargis, B. M.: Evaluation of vectorelectrocardiographic analysis of young broiler chickens as a predictive index for susceptibility to ascites syndrome. *Avian Diseases*, 36(1):78-83 (1992).
- 53.- Odom, T. W.: La relación entre la genética, la incubación y el ambiente después del nacimiento con el desarrollo del síndrome ascítico en el pollo de engorda. *Memorias XI Ciclo de Conferencias Internacionales Sobre Avicultura*. México D.F., p. 167-179 (1993).
- 54.- Ottolenghi, A., Bernheim, F. and Wilbur, K. M.: The inhibition of certain mitochondrial enzymes by fatty acids oxidized by ultraviolet light or ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophys*, 56:157-165 (1955).
- 55.- Ottolenghi, A.: Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 79:355-363 (1959).
- 56.- Paasch, M. L.: Desarrollo de algunas investigaciones sobre el síndrome ascítico en México. *Ciencia Veterinaria*, 5:1-11 (1991).
- 57.- Pro, M. A.: Mejoramiento genético y factores ambientales: su impacto en el síndrome ascítico en pollos de engorda. *Memorias Seminario Internacional Ambiente-Producción Animal*. Montecillo, Edo. de México, p. 38-52 (1994).
- 58.- Rochat, M. C.: An introduction to reperfusion injury. *The Compendium. Small Animal*, 13(6):923-929 (1991).

- 59.- Ruiz, G. A.: Efecto de la restricción del tiempo de acceso al alimento en pollo de engorda con malfunciones cardíacas, sobre la incidencia del síndrome ascítico. Tesis de Maestría. *Fac. de Med. Vet. y Zoot., UNAM.* (1994).
- 60.- Sackman, J.E., Pain. Part II. Control of pain in animals. *Compendium on continuing education for the veterinary practitioner*, 13(12):181-191 (1991).
- 61.- Scheele, C. W., De Wit, W., Frankenhuis, M. T. and Vereijken, P. F.: Ascites in broilers. 1. Experimental factors evoking symptoms related to ascites. *Poultry Science*, 70:1069-1083 (1991).
- 62.- Scheele, C. W., Decuyper, E., Vereijken, P. F. and Schreurs, F. J.: Ascites in broilers. 2. Disturbances of metabolic rate and fat metabolism. *Poultry Science*, 71:1971-1984 (1992).
- 63.- Shlosberg, A., Berman, E., Bendheim, J. and Plavnik, I.: Control early feed restriction as a potential means of reducing the incidence of ascites in broilers. *Avian Diseases* 35 :681-684 (1991).
- 64.- Slater, T. F.: Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 105; 183-293.
- 65.- Stuart, J. C.: Síndrome de ascitis-muerte súbita-neumonía. *Selecciones Avícolas*, 33(8):540-552 (1991).

- 66.- Tobar, M.: Las modernas líneas de las estirpes y la patología del manejo. *Selecciones Avícolas*, marzo (1994) España.
- 67.- Vega, S. C.: Actividades de las hormonas triyodotironina, hormona del crecimiento, IGF-I y corticosterona en el síndrome ascítico. *Memorias XI Ciclo de Conferencias Internacionales Sobre Avicultura*, México D.F., p. 1-18 (1993).
- 68.- Villanueva, L. R.: Efecto delo síndrome ascítico sobre la capacidad gluconeogénica del hepatocito aislado de pollo y sobre los niveles séricos de TGO y TGP. Tesis de Licenciatura. *FMVZ, UNAM* (1995).
- 69.- Vishwa, N. S.: A current perspective on nutrition and exercise. *Journal Nutrition*, 122:760-765 (1992).
- 70.- Yersin, A. G., Huff, W. E., Kubena, M. H., Harvey R. B., Witzel, D. A. and Giroir, L. E.: Changes in haematological, blood gas, and serum biochemical variables in broilers during exposure to simulated high altitude. *Avian Diseases*, 36(2):189-196 (1992).
- 71.- Zentella, P. M., Hernandez, T. A., Saldaña, B. Y., Díaz, B. A. and Piña, E.: Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *FEBS*, 298(2,3):123-125 (1992).
- 72.- Zentella, P. M., Saldaña, B. Y., Hernandez, T. A. and Piña, E.: Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and

thiobarbituric acid reactive substances. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 17(6):1228-1232 (1993).

73.- Zentella, P. M., Corona, G. S. y Saldaña, B. Y.: Toxicidad del oxígeno: papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. *BEB*, 13(3):87-93 (1994).

Cuadro I. Niveles de TBARS en homogenado de hígado de pollos testigo (sin SA), de 6 semanas de edad.

No. pollo	PROTEINA				TBARS		
	Lectura D.O. 595 nm	Media	µg/ml en la muestra	mg/ml	Lectura D.O. 532 nm	Media	nmoles /mg proteína
1	0.329 0.326	0.327	37.7	15.08	0.050 0.046	0.048	0.430
2	0.428 0.372	0.400	45.9	18.4	0.066 0.060	0.063	0.463
3	0.316 0.400	0.358	41.1	16.4	0.067 0.065	0.066	0.542
4	0.339 0.456	0.397	45.4	18.2	0.075 0.072	0.074	0.543
5	0.454 0.510	0.482	55.2	22.1	0.060 0.046	0.053	0.324
6	0.329 0.326	0.327	37.7	15.1	0.048 0.049	0.049	0.439
7	0.380 0.346	0.363	41.3	16.5	0.046 0.044	0.045	0.368
8	0.376 0.410	0.393	45.0	18.0	0.043 0.046	0.045	0.337
9	0.428 0.372	0.400	45.9	18.4	0.044 0.047	0.046	0.339
10	0.380 0.346	0.363	41.3	16.5	0.055 0.054	0.055	0.446
11	0.376 0.410	0.393	45.0	18.0	0.036 0.038	0.037	0.227
12	0.454 0.510	0.482	55.2	22.1	0.065 0.055	0.060	0.367
13	0.517 0.544	0.531	47.8	19.1	0.052 0.052	0.052	0.367
14	0.554 0.603	0.579	52.0	20.8	0.077 0.075	0.076	0.494
15	0.587 0.578	0.583	52.5	21.0	0.072 0.073	0.073	0.467
16	0.535 0.473	0.504	52.7	21.1	0.043 0.057	0.050	0.245
PROMEDIO							0.403
DESVIACION ESTANDAR							± 0.089
ERROR ESTANDAR							± 0.022

Cuadro II. Resultados de TBARS del homogenado de hígado de pollos con SA, a la 6ª semana de edad.

No. pollo	PROTEINA				TBARS		
	Lectura D.O. 595 nm	Media	µg/ml en la muestra	mg/ml	Lectura D.O. 532 nm	Media	nmoles /mg proteína
1	0.286 0.281	0.28	32.7	13.1	0.093 0.073	0.083	0.857
2	0.337 0.367	0.35	40.3	16.1	0.060 0.057	0.058	0.493
3	0.267 0.389	0.33	37.7	15.1	0.140 0.130	0.135	1.209
4	0.318 0.364	0.34	39.3	15.7	0.112 0.132	0.123	1.057
5	0.364 0.318	0.34	39.3	15.7	0.139 0.139	0.139	1.195
6	0.359 0.392	0.38	42.8	17.1	0.053 0.045	0.049	0.387
7	0.557 0.551	0.55	39.0	15.6	0.064 0.076	0.070	0.606
8	0.550 0.528	0.54	48.2	19.3	0.248 0.191	0.219	1.535
9	0.675 0.591	0.63	34.5	13.8	0.102 0.101	0.102	0.998
10	0.432 0.418	0.42	42.2	16.9	0.144 0.092	0.118	0.994
11	0.539 0.521	0.53	50.3	20.1	0.169 0.191	0.180	1.208
12	0.570 0.552	0.56	53.4	21.4	0.164 0.236	0.200	1.264
13	0.670 0.631	0.65	51.7	20.7	0.110 0.135	0.123	0.803
14	0.668 0.663	0.67	60.2	24.1	0.199 0.182	0.191	1.070
15	0.490 0.539	0.52	44.5	17.8	0.119 0.104	0.112	0.850
16	0.510 0.698	0.60	43.5	17.4	0.092 0.092	0.092	0.714

PROMEDIO	0.953
DESVIACION ESTANDAR	± 0.306
ERROR ESTANDAR	± 0.077

Cuadro III. Datos de dienos conjugados (DC) en homogenado de hígado de pollos testigo, (sin SA) a las 6 semanas de edad.

No. pollo	PROTEINA				DIENOS CONJUGADOS		
	Lectura D.O. 595 nm	Media	µg/ml en la muestra	mg/ml	Lectura D.O. 240 nm	Media	nmoles /mg proteína
1	0.329 0.326	0.327	37.7	15.1	0.020 0.044	0.032	3.49
2	0.428 0.372	0.400	45.9	18.4	0.064 0.095	0.079	7.09
3	0.316 0.400	0.358	41.1	16.4	0.086 0.105	0.096	9.62
4	0.339 0.456	0.397	45.4	18.2	0.095 0.089	0.092	8.34
5	0.454 0.510	0.482	55.2	22.1	0.055 0.050	0.053	3.95
6	0.329 0.326	0.327	37.7	15.1	0.060 0.058	0.059	6.44
7	0.380 0.346	0.363	41.3	16.5	0.050 0.053	0.052	5.18
8	0.376 0.410	0.393	45.0	18.0	0.056 0.053	0.055	5.03
9	0.373 0.427	0.400	45.9	18.4	0.088 0.062	0.075	6.73
10	0.380 0.346	0.363	41.3	16.5	0.020 0.020	0.020	1.99

PROMEDIO	5.786
DESVIACION ESTANDAR	± 2.315
ERROR ESTANDAR	± 0.732

Cuadro IV. Datos de DC en homogenado de hígado de pollos con SA a las 6ª semana de edad.

No. pollo	PROTEINA				DIENOS CONJUGADOS		
	Lectura D.O. 595 nm	Media	µg/ml en la muestra	mg/ml	Lectura D.O. 240 nm	Media	nmoles /mg proteína
1	0.384 0.422	0.40	46.5	18.6	0.034 0.034	0.03	3.01
2	0.286 0.281	0.28	32.7	13.1	0.018 0.055	0.04	4.66
3	0.337 0.367	0.35	40.3	16.1	0.049 0.052	0.05	5.11
4	0.267 0.389	0.33	37.7	15.1	0.055 0.069	0.06	6.77
5	0.318 0.364	0.34	39.3	15.7	0.050 0.050	0.05	5.45
6	0.364 0.318	0.34	39.3	15.7	0.047 0.054	0.05	5.34
7	0.557 0.551	0.55	39.0	15.6	0.034 0.040	0.04	2.40
8	0.559 0.501	0.53	47.8	19.1	0.050 0.050	0.05	4.31

PROMEDIO	4.631
DESVIACION ESTANDAR	± 1.398
ERROR ESTANDAR	± 0.494

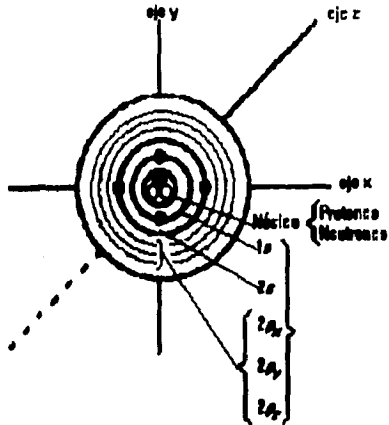
Cuadro V. Niveles de TBARS en homogenado de corazón de pollos testigo (sin SA) de 6 semanas de edad.

No. pollo	PROTEINA				TBARS		
	Lectura D.O. 595 nm	Media	µg/ml en la muestra	mg/ml	Lectura D.O. 532 nm	Media	nmoles /mg proteína
1	0.193 0.168	0.181	25.1	10.04	0.040 0.032	0.036	0.484
2	0.429 0.485	0.457	51.0	20.40	0.061 0.056	0.059	0.387
3	0.442 0.444	0.443	41.7	16.67	0.066 0.069	0.068	0.547
4	0.469 0.466	0.468	42.2	16.88	0.045 0.040	0.043	0.340
5	0.439 0.425	0.432	36.5	14.60	0.044 0.043	0.044	0.402

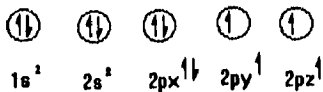
PROMEDIO	0.432
DESVIACION ESTANDAR	± 0.083
ERROR ESTANDAR	± 0.037

Cuadro VI. Niveles de TBARS en homogenado de corazón de pollos con SA, a la 6ª semana de edad.

No. pollo	PROTEINA				TBARS		
	Lectura D.O. 595 nm	Media	µg/ml en la muestra	mg/ml	Lectura D.O. 532 nm	Media	nanoles /mg proteína
1	0.188 0.210	0.199	27.7	11.08	0.085 0.051	0.068	0.829
2	0.208 0.224	0.216	20.1	8.05	0.052 0.050	0.051	0.856
3	0.382 0.416	0.399	33.3	13.31	0.150 0.188	0.169	1.716
PROMEDIO							1.134
DESVIACION ESTANDAR							± 0.505
ERROR ESTANDAR							± 0.291



Configuración atómica del oxígeno con sus ocho electrones (e-)



CONFIGURACION MOLECULAR

	1s	2s	2p _x	2p _y	2p _z
Estado base O ₂	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ \uparrow	\uparrow \uparrow
Singlete ¹ O ₂	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	\uparrow \uparrow
Singlete ¹ O ₂	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	\uparrow \uparrow	\uparrow \uparrow
Superóxido O ₂ ⁻	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	\uparrow \uparrow
Ión peróxido ROO ⁻	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	\uparrow \uparrow
Peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$
Hidróxido OH ⁻	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ \uparrow

Figura 1. Configuración atómica y molecular del oxígeno (adaptado de Halliwell *et al*, 28).

electrón (e^-) con giro a la izquierda



Atomo A con e^- desapareados



e^- con giro a la derecha

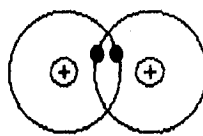


Atomo B con e^- desapareados



electrones con espines opuestos

(a)



Atomos AB ligados o solapados con e^- apareados



(b)

Figura 2. a) electrones desapareados en átomos o moléculas diferentes (A y B).
b) electrones apareados en una molécula (AB).

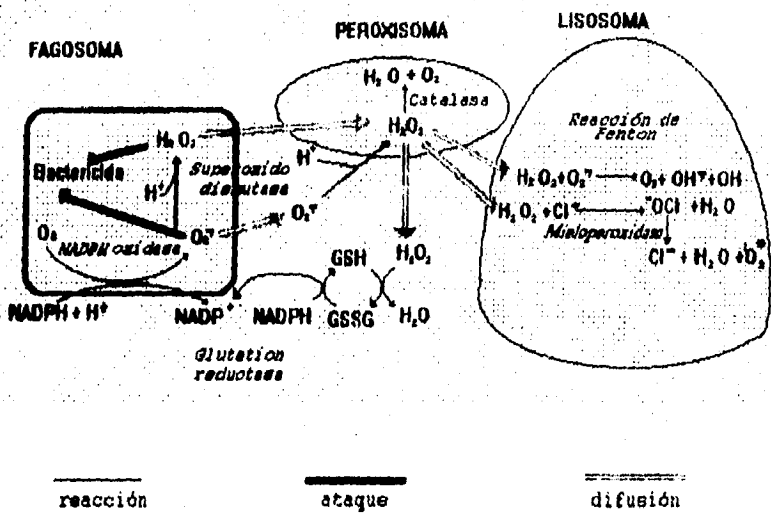


Figura 3. Formación de radicales de oxígeno bactericidas, en el interior de una célula fagocitaria y mecanismos de protección citoplasmática (tomado de Hicks et al., 30)

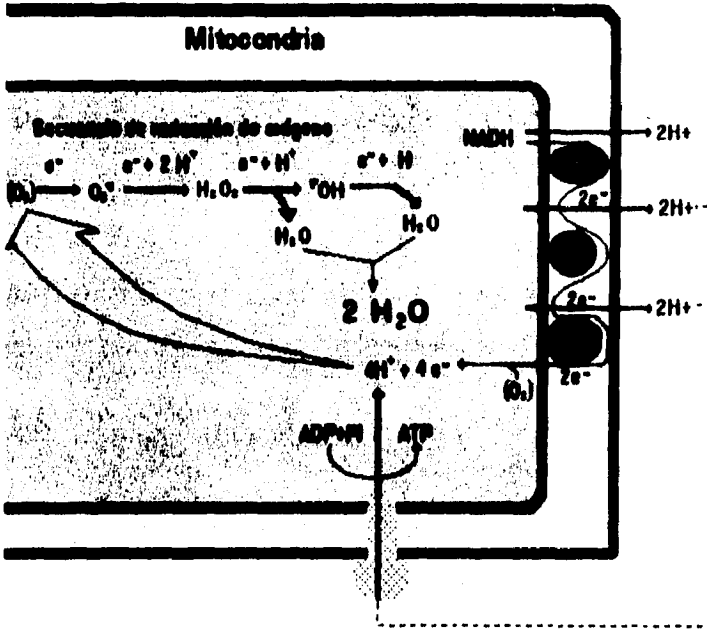


Figura 4. Proceso normal del oxígeno, utilizado en la cadena respiratoria, en donde una molécula de oxígeno toma cuatro hidrógenos (protones) y cuatro electrones, formando dos moléculas de agua y generando una gama de radicales libres, que quedan unidos al sitio activo de la citocromo-oxidasa evitando que se difundan al resto de la célula (adaptado de Hicks, 30).

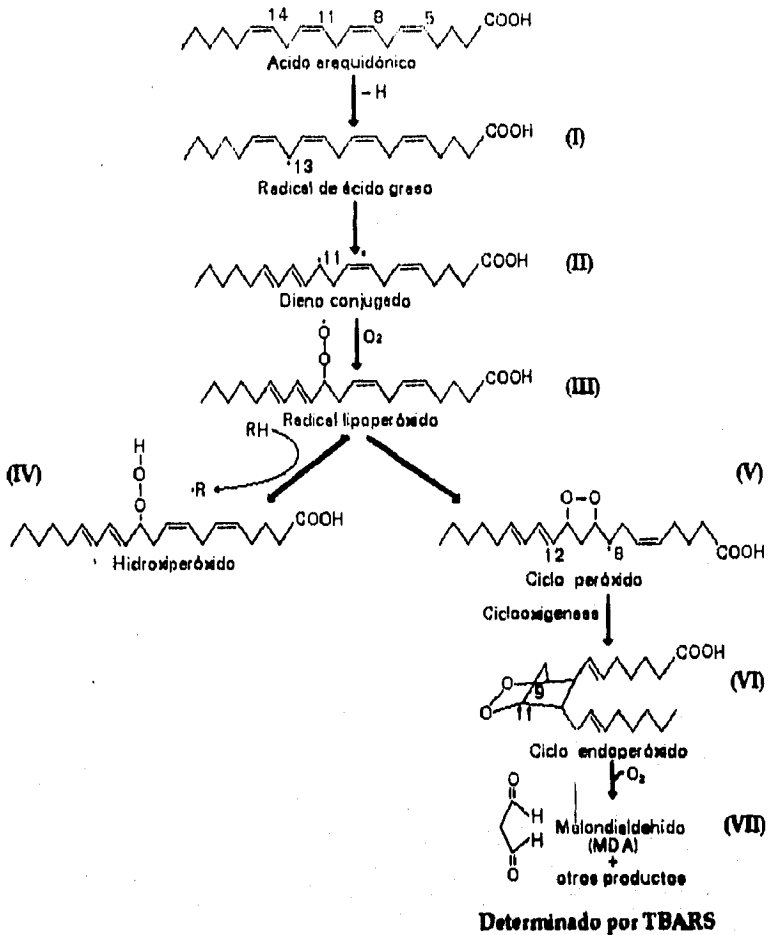


Figura 5. Mecanismo de lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas (tomado de Zentella *et al*, 73).

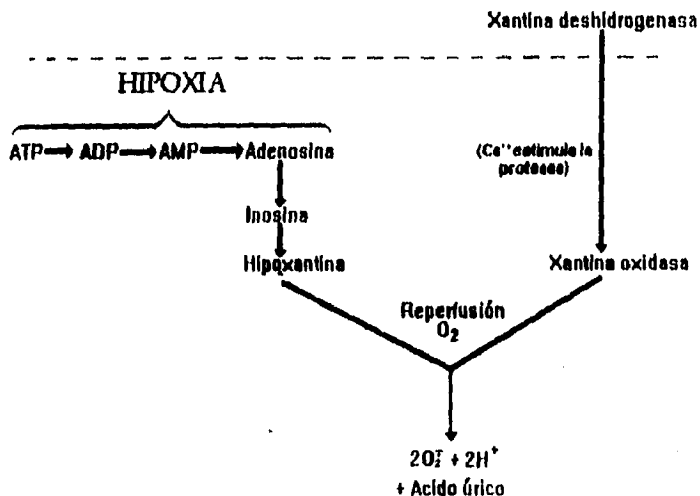


Figura 6. Producción del radical superóxido en un estado de hipoxia-reoxigenación. La xantina-oxidasa convierte a la hipoxantina en xantina (tomado de Halliwell *et al*, 28).

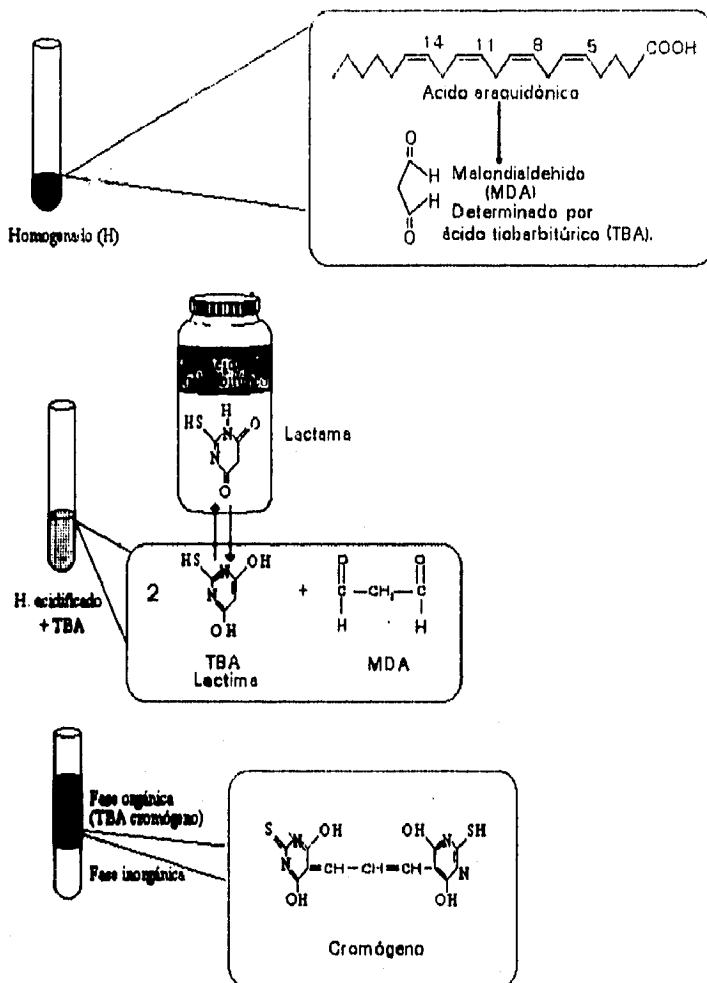


Figura 7. Técnica de ácido tiobarbitúrico: La muestra del hígado homogenizado se mantiene en un pH ácido para favorecer la forma lactima, finalmente dos moléculas de TBA reaccionan con una de MDA para formar un cromógeno (adaptado de Zentella *et al*, 72).

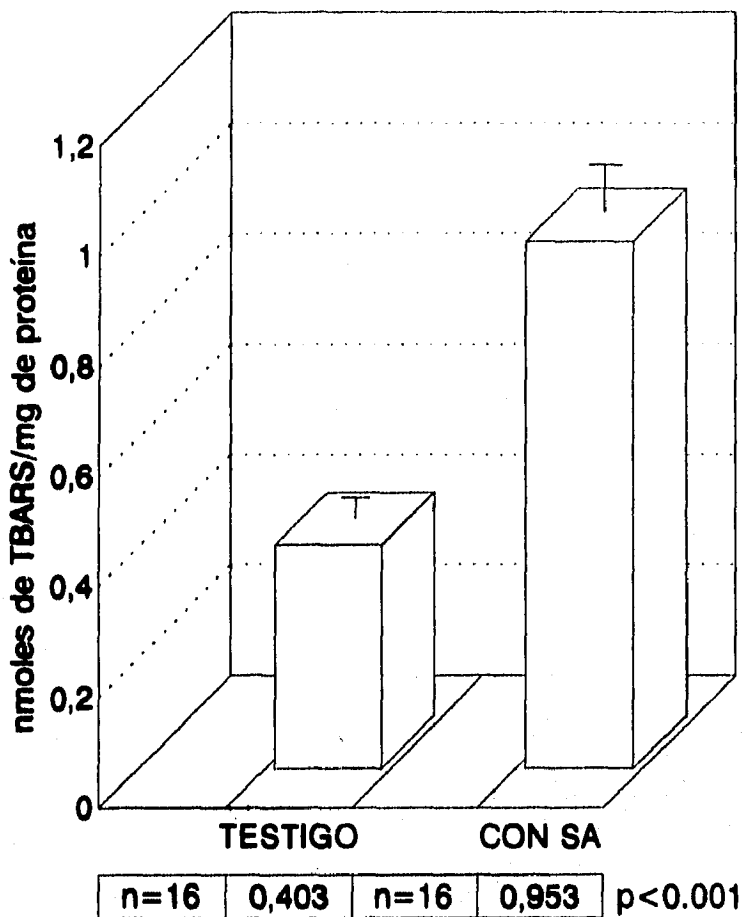


Figura 8. Lipoperoxidación en hígado de pollos con y sin SA de 6 semanas de edad medido como sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)

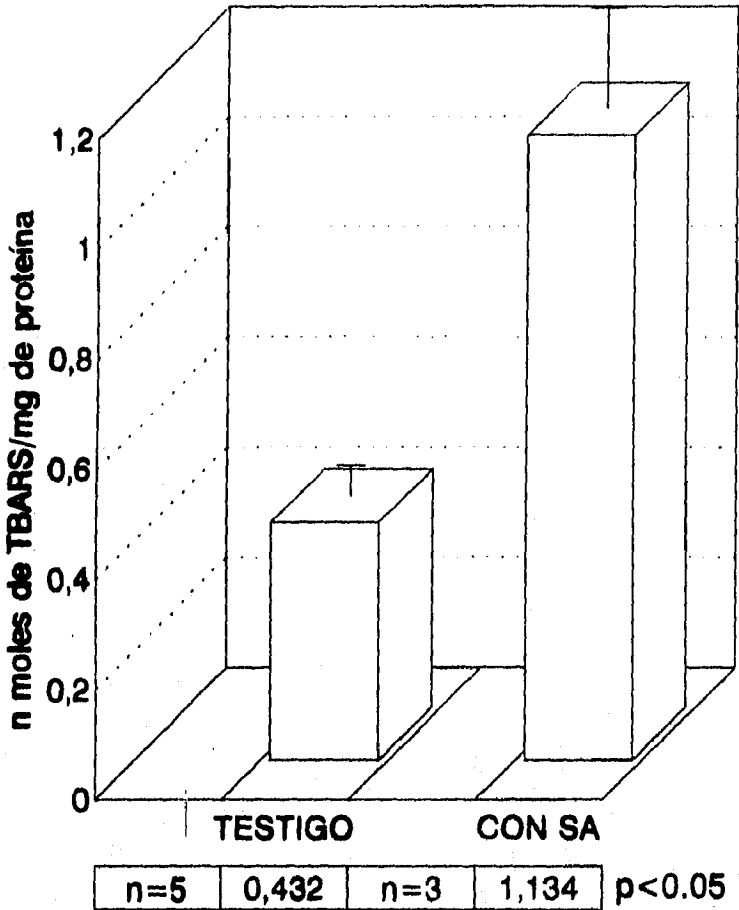


Figura 9. Lipoperoxidación en corazón de pollos con y sin SA de 6 semanas de edad medido como sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)

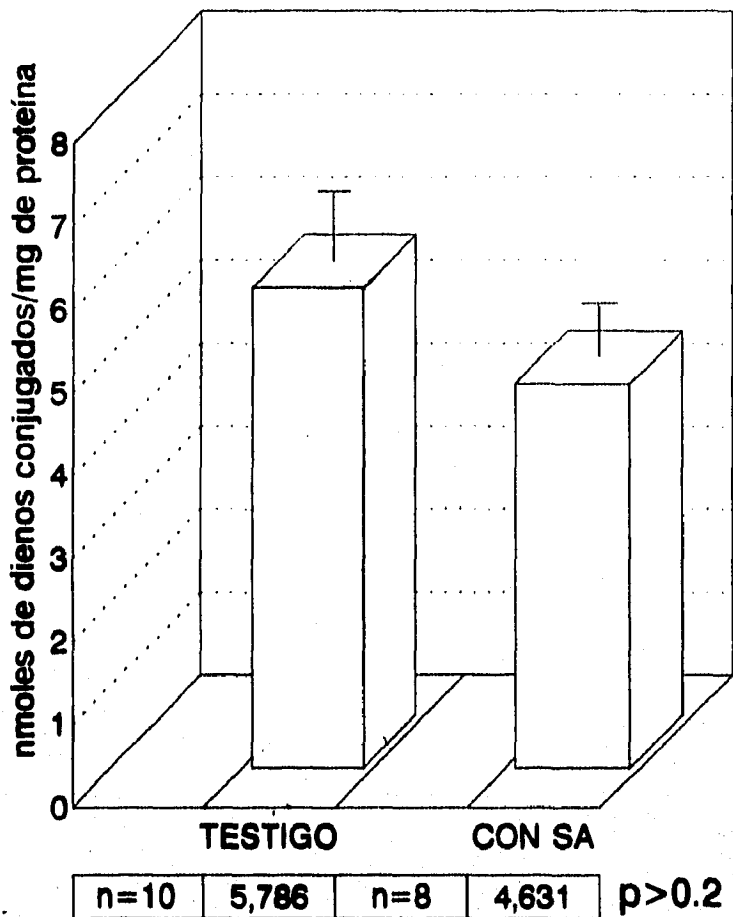


Figura 10. Lipoperoxidación en hígado de pollos con y sin SA de 6 semanas de edad medido como dienos conjugados (DC)

FACTORES DESENCADENANTES DEL SINDROME ASCITICO

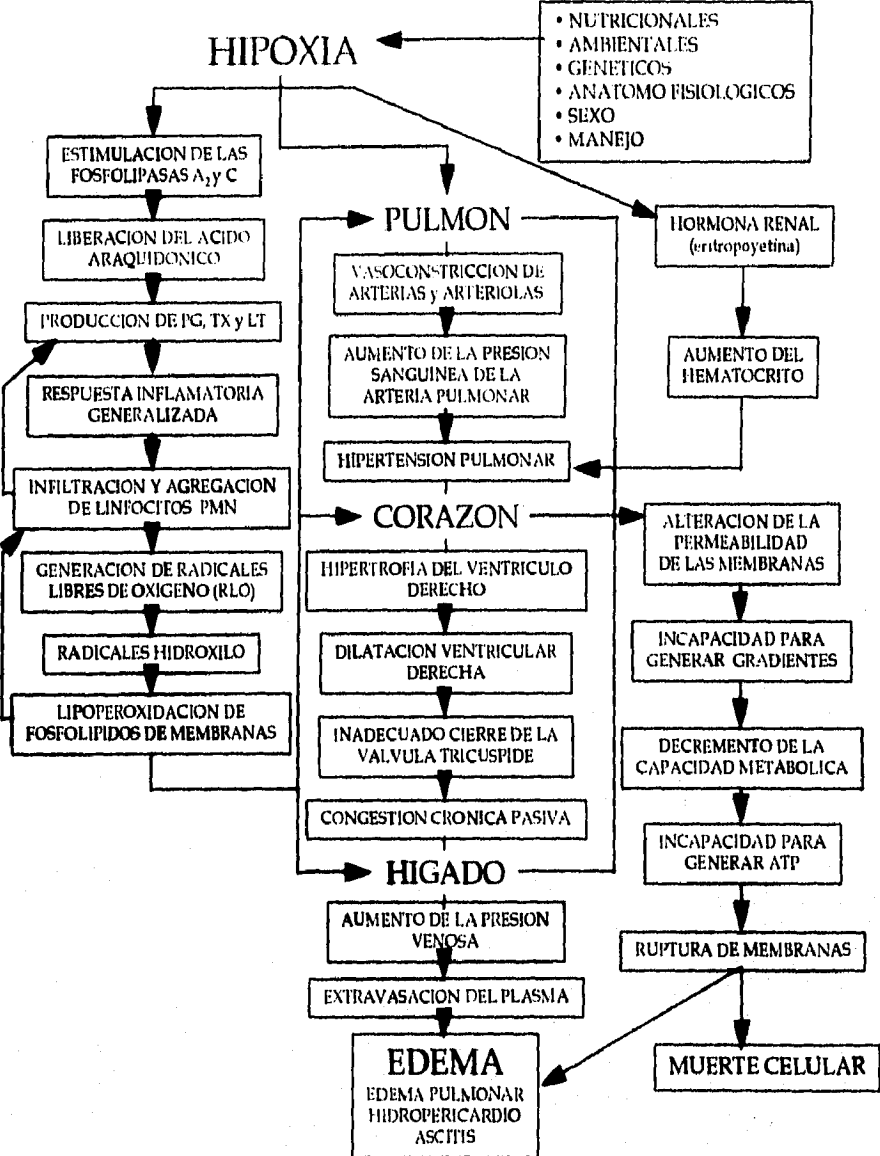


Figura 11. Eventos moleculares propuestos durante el desarrollo del SA.