



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**EFFECTOS DE LA INCLUSIÓN DE ACEITE DE
PESCADO SOBRE EL ESTADO
ANTIOXIDANTE EN PLASMA DE GALLINAS
DE POSTURA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTA

JOSÉ GUADALUPE CRUZ PÉREZ

ASESORES:

DR. ANTONIO DÍAZ CRUZ

MC SILVIA CARRILLO DOMÍNGUEZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**EFFECTOS DE LA INCLUSIÓN DE ACEITE DE PESCADP
SOBRE EL ESTADO ANTIOXIDANTE EN PLASMA DE
GALLINAS DE POSTURA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTA

JOSÉ GUADALUPE CRUZ PÉREZ

ASESORES:

DR. ANTONIO DÍAZ CRUZ

MC SILVIA CARRILLO DOMÍNGUEZ

MÉXICO, D.F.

2010

DEDICATORIA

Por que tengo la oportunidad de estar vivo y disfrutar de todas las cosas maravillosas que hay en la vida, por las caídas que he tenido y que ahora comprendo que son enseñanzas tuyas, por haberme permitido terminar este trabajo y por que todo lo que soy te lo debo a ti, este trabajo es tuyo... gracias **DIOS**

A mis padres, Pablo Cruz Rojas y
Rosa Pérez Vázquez,

No encuentro frases, ni palabras para agradecerles todo lo que me han dado durante este camino, su apoyo, comprensión, sabiduría y sobre todo su amor, fueron el impulso de cada día, para que yo haya concluido este trabajo, gracias por su paciencia y comprensión.

A mis hermanos, Fernando,
Adriana, Alejandra, Rosita,
Daniel y Edgar

Por que siempre he encontrado comprensión, motivación y sobre todo alegría, hermanos ustedes son parte de este gran logro. Que dios los bendiga siempre.

¡Infinitas gracias Amigos!

A todos ustedes que siempre estuvieron conmigo y me ayudaron a llegar a esta etapa de mi vida, gracias por su confianza, su apoyo, sus consejos y tantas cosas que aprendí de ustedes, siempre los llevare en mi mente y sobre todo en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi *alma mater*.

A la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme formado.

Al Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, por haberme apoyado en la realización de este trabajo.

A todo el personal que labora en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, en especial al MVZ Cuauhtémoc Nava Cuellar por compartir sus conocimientos y su gran apoyo en la elaboración de este trabajo.

Al Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Avícola, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo y en especial al MC Benjamín Fuentes Martínez por el gran apoyo en el análisis de este trabajo.

Al laboratorio 34 de la Unidad de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina por su apoyo y facilidades en la realización de este trabajo.

Al DGAPA-UNAM por financiar este trabajo IN201408 “Marcadores de Estrés Oxidativo como indicadores en la prevención y control de la mortalidad de pollo de engorda”.

A mis asesores: Dr. Antonio Díaz Cruz, por haberme dado la oportunidad de trabajar con éste gran equipo de investigación y sobre todo, por brindarme su amistad y su confianza; y a la MC Silvia Carrillo Domínguez por su amistad y su valioso tiempo brindado ha este trabajo.

A mi honorable jurado: Dr. María Therese Casaubon y Huguenin, Dr. Juan Manuel Cervantes Sánchez, MVZ Tomas Jinez Méndez, Dr. Antonio Díaz Cruz, MC Benjamín Fuentes Martínez.

Un agradecimiento especial Carmina Ruiz, Natalia Deveaux, Andrea Martínez, Romeo Pineda, Víctor Carrera, Ricardo Miros por estar siempre al pendiente de este trabajo y su valiosa amistad.

A todas las personas que de alguna manera participaron y/o apoyaron este proyecto.

CONTENIDO

	PAGINA
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMATICO.....	8
SISTEMA ANTIOXIDANTE NO ENZIMATICO.....	11
SITUACIÓN AVÍCOLA EN MÉXICO.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVO PARTICULAR.....	19
HIPOTESIS.....	20
MATERIAL Y METODOS.....	21
ANÁLISIS ESTADISTICO.....	27
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	36

RESUMEN

La inclusión de aceite de pescado en las dietas de gallinas de postura, se realiza con la finalidad de enriquecer el huevo con ácidos grasos poliinsaturados de tipo omega 3, sin embargo el uso de estos aceites pueden favorecer el desarrollo de un Estado Oxidativo del animal. El presente trabajo tiene como objetivo, evaluar el posible efecto prooxidante del aceite de pescado, a través de algunos indicadores metabólicos de estrés oxidativo (Malondialdehído, Capacidad Antioxidante y Actividad de la Glutacion Peroxidasa) en plasma de gallinas de postura, además de evaluar el probable efecto protector de tipo antioxidante de la vitamina E, Algas Marinas, y ácido linoleico conjugado bajo el mismo criterio experimental. Para tal fin se utilizaron gallinas de la estirpe Bovans White de 75 semanas de edad y distribuidas en 7 tratamientos con 5 réplicas y cada réplica con 6 aves, dando un total de 210 aves. Los tratamientos fueron los siguientes: **1.** Dieta Basal (DB), **2.** DB + 2.5% de Aceite de Pescado (AP), **3.** DB + 2.5% AP + 100mg/kg de Vitamina E; **4.** DB + 2.5% AP + 4% de Algas Marinas (AM); **5.** DB + 2.5% AP + 8% de AM; **6.** DB + 2.5% AP + 1% de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), **7.** DB + 2.5% AP + 2% de CLA. La duración del experimento fue de 5 semanas. Los muestreos para la obtención de plasma se realizaron a la 2ª y 4ª semana de haber iniciado el tratamiento y 3 semanas después de haber terminado el mismo (semana 8). A la 4ª y 8ª semana se encontró una diferencia menor en los niveles de Malondialdehído ($P < 0.05$), en cuanto a tiempo no se encontraron diferencias. La capacidad antioxidante a la 4ª semana solo obtuvo una diferencia estadística para el tratamiento con AM al 4% y en cuanto a tiempo se ve una reducción de los niveles de Fe^{2+} a la 4 semana; a la 8ª semana los valores de Fe^{2+} fueron menores para el tratamiento con AM 4% y CLA al 7%. Y en cuanto a tiempo la diferencia se observa a la 8 semana. La actividad de la Glutacion Peroxidasa no se encontró diferencias estadísticas en cuanto a tratamiento y tiempo. Proyecto financiado por UNAM-DGAPA: IN201408

INTRODUCCIÓN

Hace 2,500 millones de años, los primeros seres vivos surgieron en una atmósfera donde predominaban los procesos reductores de compuestos sencillos. El oxígeno molecular comenzó a acumularse en dicho ambiente por 900 millones de años, gracias al surgimiento de los primeros procesos fotosintéticos en las algas cianofíceas.¹ Posteriormente se desarrollaron los organismos aeróbicos, quienes por medio de la fosforilación oxidativa fueron capaces de extraer electrones de carbohidratos y lípidos. En dicho proceso, los electrones reducen al oxígeno consumido por la célula y dejan como productos finales, H₂O y ATP. La oxidación de estos sustratos, trae como beneficio un incremento cuantitativo en la producción de energía¹. Del total del oxígeno consumido por la célula, aproximadamente el 5% queda en un estado de reducción intermedia en la cadena respiratoria, lo que origina la formación del anión superóxido (O₂^{•-}), identificado como un radical libre (RL). Un radical libre puede definirse como cualquier átomo o molécula capaz de existir independientemente, que se caracteriza por poseer uno o más electrones desapareados, tal condición le confiere una reactividad muy elevada hacia la mayoría de los sustratos orgánicos. Un electrón desapareado es aquel que se encuentra solo en un orbital. El símbolo (●) designa la presencia de uno o más electrones desapareados. El efecto neto de la acción de los radicales libres es que sustraen un electrón u otra molécula transformando a esta última en un radical. Los radicales libres se encuentran dentro de un grupo de moléculas llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).¹⁻⁴ La clasificación de ROS se puede ver en el cuadro 1.

Cuadro 1. Especies Reactivas de Oxígeno.¹

RADICALES	NO RADICALES
Superóxido $O_2^{\bullet-}$	Peroxido de hidrogeno H_2O_2
Hidroxilo OH^{\bullet}	Ácido hipocloroso $HOCl$
Peroxilo RO^{\bullet}	Ozono O_3
Alkoxil RO^{\bullet}	Oxígeno singlete
Hidroxiperoxil HO_2^{\bullet}	Peroxinitrito $ONOO^-$

Clasificación de los ROS

Los ROS generados intracelularmente actúan tanto dentro como fuera de la célula. Su producción, accidental o deliberada ocurre en los siguientes procesos enzimáticos:

- a) Durante el metabolismo celular, la mitocondria consume oxígeno molecular y lo reduce secuencialmente hasta producir agua. Una pequeña fracción del oxígeno se metaboliza vía reducción univalente, formándose productos intermedios de esta reacción, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual por acción de la Superóxido Dismutasa (SOD, por sus siglas en inglés) se transforma en peróxido de hidrogeno (H_2O_2).⁵
- b) Los peroxisomas que contienen acetil CoA oxidasa, la dopamina β -hidroxilasa, la urato oxidasa y otras generan H_2O_2 como producto intermedio.⁵

- c) El sistema enzimático del citocromo P-450 constituye una defensa primaria contra varios xenobióticos que colateralmente forman $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 .⁵
- d) Los fagocitos: monocitos, neutrofilos y macrófagos, producen una descarga oxidante compuesta básicamente por $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , y HOCL como un mecanismo de defensa para la destrucción de patógenos invasores.⁵
- e) Sistema de la xantina deshidrogenasa el cual cataliza la oxidación de hipoxantina/xantina a ácido úrico donando electrones al NAD^+ en condiciones fisiológicas, pero en condiciones patológicas como isquemia y reperfusión, la xantina deshidrogenasa modifica la función de la deshidrogenasa a oxidasa, actividad que le facilita la liberación del $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 .⁶

Las fuentes exógenas de ROS son: la radiación, el humo del cigarro, algunos solventes orgánicos y pesticidas, productos de la oxidación de los lípidos en alimentos, micotoxinas, trauma, hiperoxia y el sobre ejercicio.¹

Algunos ROS son producto del metabolismo normal de la célula, por ejemplo el H_2O_2 , y sólo cuando rebasan sus concentraciones fisiológicas, se convierten en un factor desencadenante de alteraciones metabólicas en los seres vivos. La mayoría de las macromoléculas biológicas son susceptibles a ser oxidadas por algunos de los derivados reactivos del oxígeno.

Las proteínas, péptidos y aminoácidos también constituyen un blanco para los ROS. Se ha observado que la presencia de cantidades significativas de aminoácidos aromáticos o sulfurados en una estructura proteica la hacen más vulnerable.⁶ Algunos estudios *in vitro* mencionan que las proteínas sufren alteraciones localizadas en los sitios ligados a metales de transición, debido a la facilidad con que los metales ligados reaccionan con el H₂O₂ para formar iones hidroxilo que posteriormente atacan a los aminoácidos adyacentes⁶. Los productos del daño oxidativo de proteínas son la formación de peróxidos y carbonilos.

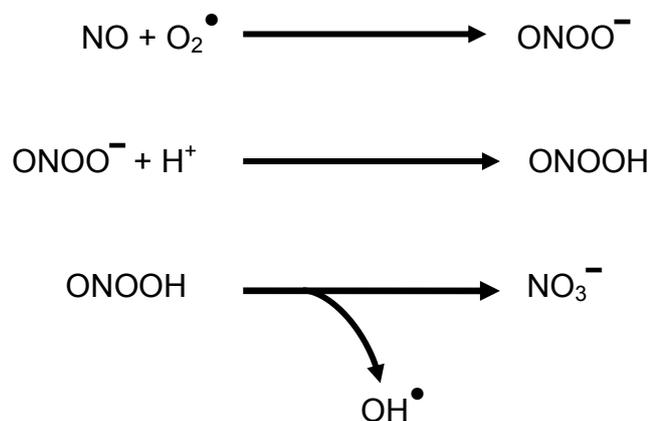
El ataque de los ROS al material genético trae como consecuencia la mutagénesis del ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés), modificación que se convierte en el origen de algunas patologías, como por ejemplo el cáncer.⁶ Otras de las modificaciones que sufre el DNA, es la oxidación de desoxirribosas, la ruptura y entrecruzamiento de cadenas y la modificación de las bases nitrogenadas, en donde la formación del nucleósido 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) constituye el principal producto del daño oxidativo al DNA. El mecanismo de reparación del DNA remueve los nucleosidos oxidados, para ser excretados por vía urinaria. El diseño de anticuerpos monoclonales específicos, acoplados a la técnica de ELISA, ha permitido la detección y cuantificación del 8-OHdG urinario.⁷

Sin embargo, las moléculas más lábiles son los lípidos.⁸ La peroxidación de los lípidos es particularmente destructiva, ya que se inicia cuando los RL atacan a un ácido graso poliinsaturado (PUFA, por sus siglas en inglés) y le quita un átomo de hidrógeno al grupo metilo adyacente al doble enlace. Entonces rápidamente esta molécula fija un átomo de oxígeno y se transforma en un

radical libre, identificado como “peroxil ácido graso” quien oxida a otro PUFA, iniciando así una serie de reacciones en cadena. Este proceso es conocido como lipoperoxidación (LPO). Los productos finales de la lipoperoxidación son lípidos peroxidados que al degradarse originan nuevos radicales libres y una amplia variedad de compuestos citotóxicos como aldehídos, entre los que destacan el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y el malondialdehído (MDA). Algunos estudios mencionan que el MDA es mutagénico en bacterias y en células de mamíferos y también es generadora de cáncer en ratas.⁹ Las consecuencias del daño en la estructura molecular del PUFA son más evidentes cuando estos lípidos forman parte de las membranas celulares, ya que alteran su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica.⁹

Otro grupo de moléculas que tienen propiedades reactivas son las que se generan a partir del óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés). Dichas moléculas dan lugar a un grupo llamado especies reactivas de nitrógeno (NRS, por sus siglas en inglés).

El NO por si mismo no daña las moléculas celulares, pero si NO se combina con el $O_2^{\bullet-}$, se genera peroxinitrito ($ONOO^-$), que si las desnaturaliza.¹



Cuando el ONOO^- esta en presencia de un protón (H^+) forma ácido peroxinitroso (ONOOH) el cual al transformarse en NO_3^- (nitrato), libera un radical hidroxilo (OH^\bullet), que también es dañino para los tejidos.

La producción de ROS se encuentra relacionada con algunos procesos metabólicos de la célula, y su síntesis no regulada, convierte la presencia de ROS en un factor de riesgo tóxico para ella. La célula regula la formación de ROS en un factor de riesgo tóxico para ella. La célula regula la formación de ROS a través de dos sistemas. “El sistema antioxidante enzimático”,¹⁰ el cual comprende las siguientes enzimas: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y tiorredoxinas (TXs), entre otras.^{1,10} El otro mecanismo de control de los niveles de ROS involucra la participación de las vitaminas E y C, ácido lipoico y los polifenoles, por mencionar algunos. A este sistema se le identifica como “sistema antioxidante no enzimático”.¹¹⁻¹³

Cuando existe un desbalance entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes (enzimático y no enzimático) se da un fenómeno conocido como Estrés Oxidativo. Las posibles causas son: disminución en la actividad de las enzimas que participan en el control de los niveles de ROS (SOD, GPx, catalasa, tiorredoxinas), una deficiencia en la dieta de antioxidantes, o bien un proceso infeccioso o inflamatorio, donde la producción de ROS puede verse incrementada mas allá de la capacidad antioxidante de la célula. De ahí que la condición de estrés oxidativo ha sido implicada en enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y cáncer, entre otras.^{1,14}

SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMATICO

Superóxido Dismutasa (SOD)

Es una metaloenzima que se encuentra distribuida en organismos consumidores de oxígeno, anaerobios tolerantes de oxígeno y algunos anaerobios obligados.¹ Se han reportado 3 tipos de SOD en humanos, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y SOD (Ec-SOD) esta última se encuentra extracelularmente. Cu/Zn-SOD se encuentra de manera abundante en el citosol y en menor cantidad en el núcleo. Mn-SOD es localizada en la matriz mitocondrial. Ec-SOD esta presente en el plasma atado al sulfato de heparina en la superficie celular de endotelio. Esta familia de enzimas es esencial para la defensa contra la toxicidad del anión superóxido. Ellas catalizan la siguiente reacción.^{1,15,16}



Glutación (GSH)

Es un tripéptido (Glu-Cys-Gly) que presenta una distribución variable y constituye el compuesto tiolico de bajo peso molecular más abundante en las células de los mamíferos. Sus propiedades químicas le permiten reaccionar con otros compuestos oxidantes. Se sabe que glutación tiene varias funciones fisiológicas dentro de las cuales está la defensa antioxidante, detoxificación de xenobioticos, modulación del sistema redox (GSH/GSSG), regulación de la respuesta inmune y regulación del metabolismo de leucotrienos y prostaglandi-

nas. El GSH juega un papel muy importante en la regeneración de otros antioxidantes no enzimáticos como vitamina C y E en su forma oxidada. La enzima específica para GSH es Glutatión Peroxidasa (GPx).^{16,17}

Glutatión Peroxidasa (GPx)

Existen varias clases y varias isoenzimas de GPx. Estas enzimas catalizan la remoción de peróxido de hidrógeno o de lipoperóxidos a través de una reacción acoplada a la oxidación del glutatión reducido (GSH). Las GPx's se localizan en el citosol, la mitocondria y en plasma. Estructuralmente están conformadas por cuatro monómeros y cada uno posee un átomo de selenio en forma de selenocisteína. El valor de K_M de la GPx citosólica para el peróxido de hidrógeno es más bajo comparado con el de la catalasa por lo que esta enzima se convierte en el principal regulador de los niveles de peróxido de hidrógeno en el citosol. En mamíferos, los niveles de GPx en plasma son bajos y su función es incierta, ya que la concentración de GSH se encuentra en el rango μmolar .^{1,16-18}

La GPx cataliza la siguiente reacción:



Catalasa

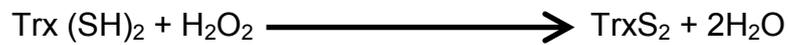
La catalasa es una enzima que posee 4 subunidades de proteínas, cada una contiene un grupo férrico hem. Esta enzima se encuentra en los peroxisomas y está en casi todos los tejidos animales, pero especialmente en el hígado y eritrocitos; En cerebro, corazón, pulmón y músculo esquelético la actividad de esta enzima es mucho menor. Su función es regular los niveles de H_2O_2 a través de la siguiente reacción.^{1,6}



Tiorredoxinas (Trx)

Cada célula se caracteriza por una concentración particular de electrones (estado redox), almacenados en muchos constituyentes celulares. El estado redox de la célula y sus oscilaciones determinan el metabolismo celular. Bajo condiciones fisiológicas, la célula controla en un rango muy estrecho el estado redox, similar a como regula el pH. Cambios en el estado redox modifican la función de muchas proteínas, debido a que ciertos residuos de Cisteínas (Cys) son muy sensibles a estos cambios. Estas cisteínas se encuentran en forma reducida (R-SH, tiol), pero pueden ser oxidados (R-S-S-R, puente disulfuro) por agentes oxidantes, como el peróxido de hidrógeno. La tiorredoxina y la tiorredoxin reductasa pertenecen a un grupo de proteínas identificado como peroxiredoxinas, cuya función es regular los niveles de peróxido de hidrógeno y

por lo tanto, de mantener el estado redox, evitando que la célula tenga en un estado oxidativo. .^{1,6}



SISTEMA ANTIOXIDANTE NO ENZIMATICO

Vitamina E

Por otro lado, la vitamina E (vit E) fue descubierta en 1922 como un factor necesario en la dieta de las ratas para su reproducción, estudios posteriores mostraron que la presencia de rancidez en la dieta de ratas y aves era la causa de varias patologías, las cuales eran corregidas por la adición de aceite vegetal en el alimento. Más tarde se demostró que el aceite contenía vit E, que es una molécula liposoluble y su estructura incluye 2 grupos claramente estudiados, tocoferoles y tocotrienos.¹⁹ Existen 8 formas naturales, pero la más potente es el α -tocoferol. La función de esta vitamina es mantener la integridad de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la membrana plasmática de la célula. La vit E es probablemente el más importante (pero no el único) inhibidor de las reacciones en cadena ocasionadas por la lipoperoxidación.¹ Está presente en el interior de las membranas plasmáticas y lipoproteínas de la sangre. La Vit E reacciona con los lípidos peroxil y alkoxil donando un hidrogeno a ellos. Durante esta reacción la Vit E es consumida y convertida en radical de vitamina E (Vit E[•]), perdiendo su función antioxidante. Sin embargo, el radical de Vit E[•] puede regresar a la forma activa (Vit E) a través del mecanis-

mo regenerador del sistema antioxidante, el cual descansa en el ácido lipoico (figura 2).^{1,19-21}

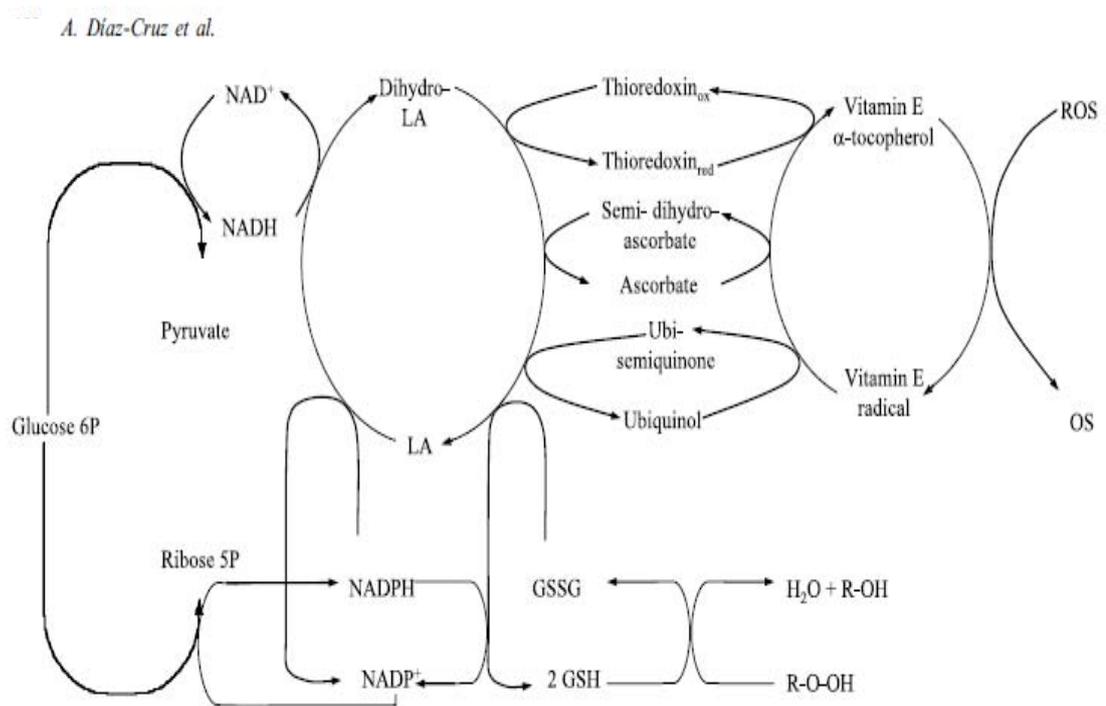
Vitamina C (Vit C)

La vit C o ácido ascórbico es un cofactor por lo menos para 8 enzimas, las cuales están involucradas en la biosíntesis de colágeno, además participan en la regeneración de la vitamina E (dona un electrón al radical de vitamina E) neutralizando al $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y HOCl. Durante esta reducción la Vit C, se convierte al radical semidehidroascorbato (Vit C[•]) la cual no es tan reactiva y puede ser regenerada a su forma original (Vit C) por el ácido lipoico (figura 1)^{11,21-22}

Ácido lipoico (LA)

El ácido lipoico (LA, por sus siglas en inglés) también es conocido como ácido alfa lipoico, ácido thiotico, y ácido 1, 2,-dithiolane-3 pentanoico. Se encuentra presente en células procariontes y eucariontes. El LA esta formado por una cadena de 8 carbonos, conteniendo dos grupos thiol.²³ Se encuentra unido como una lipoamida a un residuo lisina de las proteínas, participa como cofactor enzimático de las 2-oxo ácido dihidrogenasas en la síntesis de energía. El ácido lipoico es reducido a ácido dihidrolipoico (DHLA, por sus siglas en inglés), el cual es subsecuentemente reoxigenado por la lipoamina deshidrogenasa (Lip-DH) en la presencia de NADH. Por lo que el LA y el DHLA actúan acoplados como acarreadores de electrones del sustrato a la deshidrogenasa y al NAD^+ . EL LA se pueden encontrar en alimentos de origen animal.^{23,24} La

literatura menciona que el LA y DHLA quelan metales, actúan sinérgicamente con otros antioxidantes regenerando a estos cuando se encuentran en su forma inactiva y tienen efecto en la regulación de proteínas y genes involucrados en el metabolismo, por lo que el LA es nombrado “antioxidante universal”.²⁵



. Figura 1.¹¹

Fenoles

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, consideradas metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad. Dentro de los compuestos fenólicos podemos encontrar moléculas que se les han adjudicado propiedades antioxidantes: los fenoles, flavonoides, fluroglucinol y los fluorotaninos. Químicamente son sustancias que poseen un anillo benceno, con uno o mas grupos hidróxidos incluyendo derivados funcionales (esteres, metil esterres, glucidos, etc).¹ El comportamiento antioxidante puede estar relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipooxigenasa y captar radicales libres, Sin embargo, los polifenoles también pueden oxidarse y tomar el papel de prooxidantes *in vitro* ^{1,2} En la literatura se menciona que los flavonoides tienen un fuerte poder antioxidante contra O_2^\bullet , OH^\bullet , RO_2^\bullet , HOCL y ONOOH.²⁶ Actualmente existen reportes donde se menciona el papel protector de los compuestos fenólicos en las enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas y diabetes mellitus.^{13,26} Dentro de las fuentes de estas moléculas podemos citar a las frutas y sus jugos, extractos de plantas como infusiones, café, vino tinto, vegetales, cereales, chocolate y algas marinas.^{12-13,27-28} En particular las algas marinas (AM) están expuestas a diferentes fuentes oxidantes, como la combinación de luz y oxígeno, esto hace que sufran el ataque de diferentes formas de radicales libres. Las AM contienen en su estructura ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés), pero la ausencia del daño a estos, sugiere la presencia de varios sistemas de defensa.²⁹⁻³⁰ Se ha encontrado que las algas marinas contienen algunos com-

puestos fenólicos como el fluroglucinol y los flurotaninos responsables probablemente del efecto antioxidante que se les ha adjudicado.^{12,31-33}

Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

En los últimos años se ha encontrado que el ácido linoleico conjugado (CLA, por sus siglas en inglés) tiene propiedades anticancerígenas, antiateroescleróticas, inmunomoduladoras, antidiabéticas, contra la obesidad y muy recientemente propiedades antioxidantes, aunque esta última sigue siendo muy controversial. El CLA es un isómero posicional del ácido linoleico (C18:2, cis-9, cis-12).³⁴⁻³⁵ La carne y los productos derivados de los rumiantes son las principales fuentes de CLA en la dieta para humano y desde que al CLA se le atribuyeron varias propiedades, se ha intentado enriquecer con CLA algunos derivados de la industria avícola, por ejemplo la carne y el huevo.³⁶⁻³⁹

SITUACIÓN AVÍCOLA EN MÉXICO

México ocupa el quinto lugar a nivel mundial (figura 2) y el segundo a nivel continental en producción de huevo, sólo superado por los Estados Unidos, en el 2008, México tuvo una producción de 104 millones de cajas de huevo y una tasa de crecimiento de 4.1% en la última década, situándose junto con la carne de pollo como los productos de mayor dinamismo en el sector ganadero mexicano.⁴⁰

Es importante señalar que aunque el huevo ha enfrentado una fuerte crítica, por su contenido en colesterol, se sigue manteniendo como una de las

principales fuentes de proteína de origen animal. Actualmente los avicultores han enriquecido al huevo con ácidos grasos omega 3 (ω 3), para contrarrestar la imagen negativa que se le ha dado a este producto y darle un valor agregado.⁴¹ Se sabe que los ω 3 participan en la prevención de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer.⁴²⁻⁴³ Los avicultores han logrado esto a través de la adición de ingredientes con un alto contenido en ω 3, como son: el aceite de linaza ó aceite de pescado, que al mezclarse con el alimento pueden ser depositados en el huevo, vía la gallina de postura.⁴²

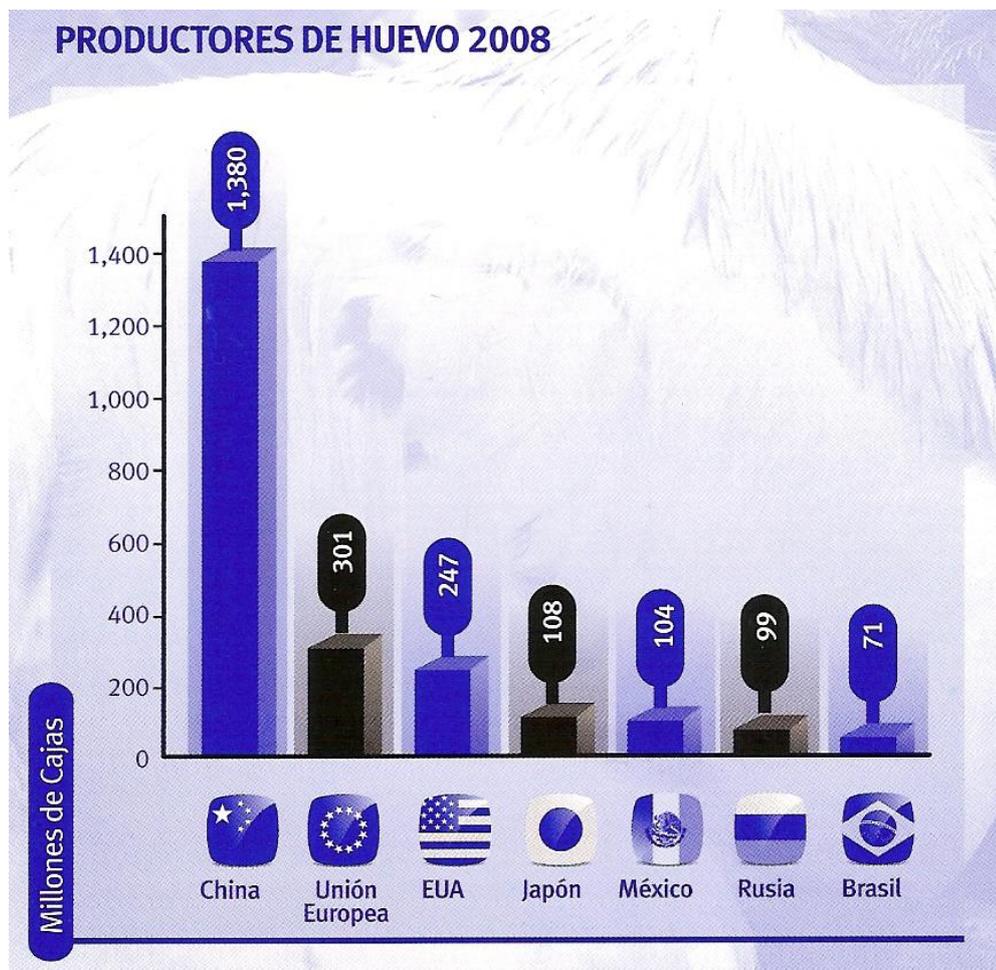


Figura 2. Fuente: Unión Nacional de Avicultores de México (UNA).⁴⁰

Contrariamente, estos aceites tienden a comportarse como agentes pro-oxidantes.⁴⁴⁻⁴⁶ Es posible que debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y convertirse así, en un factor de riesgo para el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo, de ahí que su uso podría modificar desfavorablemente los parámetros productivos del ave.

JUSTIFICACIÓN

La inclusión de aceite de pescado en la dieta de gallinas de postura es una práctica actual para enriquecer al huevo con PUFA ω 3. Sin embargo, un alto consumo de oxígeno debido a la demanda metabólica del ave y la presencia de PUFA, pueden favorecer el desarrollo de un Estado Oxidativo del animal. Por lo anterior se considera importante investigar si el consumo de aceite de pescado con un alto contenido en PUFA ω 3 posee un efecto de tipo prooxidante y si este efecto podría ser controlado con el uso de antioxidantes.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en plasma de gallinas de postura el efecto prooxidante del aceite de pescado, a través de algunos indicadores metabólicos de estrés oxidativo, para valorar el uso o no de antioxidantes en la dieta de las aves.

OBJETIVO PARTICULAR

Evaluar en plasma de gallinas de postura el efecto prooxidativo del aceite de pescado a través de la determinación de malonaldehído (MDA), Glutathion peroxidasa (GPx), y capacidad antioxidante/reducción férrica (FRAP), para identificar el estado oxidativo del ave.

HIPOTESIS

Los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en el aceite de pescado, favorecerán el desarrollo de un cuadro oxidativo en las gallinas de postura.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las pruebas de campo se realizaron en diciembre y enero del 2008, en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal (CEIEPAV) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en Santiago Zapotitlán, Delegación Tlahuac en el Distrito Federal, a una altura de 2,250 msm. El clima de la región esta clasificado como templado subhmedo, con una precipitación anual de 747 mm, siendo enero el mes más frío y mayo el más caluroso.⁴⁷

Se utilizó una caseta de ambiente natural, en jaulas tipo comercial, teniendo para cada ave un espacio vital de 500cm²/ave. Las gallinas utilizadas fueron de la estirpe Bovans White de 75 semanas de edad distribuidas de la siguiente manera: 7 tratamientos con 5 réplicas y cada réplica tenía 6 aves, dando un total de 210 aves (Cuadro 2).

Todas las dietas se formularon con base en sorgo-pasta de soya (Cuadro 3) y cubriendo las necesidades energéticas para la etapa de producción según el NRC⁴⁸. El acceso al alimento y agua de bebida fue *ad libitum* las dietas se elaboraron en la planta de alimentos del CEIEPAV.

Cuadro 1. Tratamientos

TRATAMIENTO 1	Dieta basal
TRATAMIENTO 2	Dieta basal + AP (2.5%)
TRATAMIENTO 3	Dieta basal + AP (2.5%) + vit E (100mg/kg)
TRATAMIENTO 4	Dieta basal + AP (2.5%) + AM (4%)
TRATAMIENTO 5	Dieta basal + AP (2.5%) + AM (8%)
TRATAMIENTO 6	Dieta basal + AP (2.5%) + CLA (1%)
TRATAMIENTO 7	Dieta basal + AP (2.5%) + CLA (2%)

AP (Aceite de pescado); vit E (Vitamina E); AM (Algas marinas); CLA (Ácido linoleico conjugado).

Cuadro 3. Composición de las dietas

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
DESCRIPCIÓN	TESTIGO	2.5% AP	2.5%AP + 100 mg/kg Vit E	2.5%AP + 4% AM	2.5%AP + 8% AM	2.5%AP + 1% CLA	2.5%AP + 2% CLA
SORGO MILO 9%	24,720	24,720	24,712	23,795	22,155	24,720	24,720
SOYA SOLV. 48%	8,164	8,164	8,164	8,384	8,774	8,164	8,164
CARBOBONATO DE CALCIO	4,955	4,955	4,955	4,347	3,842	4,995	4,995
ACEITE VEGETAL	1,000	0	0	0	0,220	0	0
ACEITE DE PESCADO (AP)	0	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
ORTOFOSFATO 1820	0,616	0,616	0,616	0,618	0,621	0,616	0,616
SAL (NaCl)	0,176	0,176	0,176	0,000	0	0,176	0,176
L-LISINA HCl	0,140	0,140	0,140	0,068	0	0,140	0,140
AVELUT POLVO 15	0,040	0,040	0,040	0,040	0,042	0,040	0,040
Toxisorb	0,040	0,040	0,040	0,040	0,042	0,040	0,040
ALIMET 88%	0,033	0,033	0,033	0	0	0,033	0,033
AVIRE D	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032
MINS-CEIEPA	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
CLORURO COLINA 60	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
VITS PONEDORAS	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
BACITRACINA	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
L-TREONINA	0,008	0,008	0,008	0	0	0,008	0,008
IQ	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
VITAMINA E	0	0	0,008	0,000	0	0	0
ALGAS (<i>Sargassum spp</i>)	0	0	0,000	1,600	3,200	0	0
ACIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA)	0	0	0,000	0	0	2,000	4,000
TOTAL	40	40	40	40	40	42	44

Se tomaron muestras de sangre con EDTA para obtener plasma, las muestras fueron centrifugadas a 1,500 rpm/10min,⁴⁹ y almacenadas en congelación 0°C hasta ser analizadas. La duración del experimento fue de 5 semanas, tomándose la primera como un periodo de adaptación, los muestreos se realizaron a la 2^a y 4^a semana de haber comenzado el experimento y 3 semanas después de haber terminado el mismo (8^a semana). Las determinaciones de los indicadores de estrés oxidativo del animal se efectuaron en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM.

Las muestras de plasma fueron sometidas a 3 diferentes determinaciones: TBAR's, FRAP y actividad GPx.

Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS)

Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y se tomó una alícuota de 100µL de plasma la cual fue colocada en tubos con 1mL de buffer de fosfatos 0.15M, pH 7.0, incubándose a 37°C por 30 min. Después se le adicionó 1mL de ácido acético al 20%, pH 2.5 más 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 8%, se agitó la mezcla y se sometió a ebullición por 60min. Al término de este tiempo los tubos se sumergieron en agua con hielo por 10 min, para detener la reacción. El siguiente paso fue agregar 1 mL de KCl al 2% y 5 mL de butanol, se agitó vigorosamente. Para finalizar se centrifugó a 5,000rpm durante 5 min. Se cuantificó la absorbancia a 532 nm. Para los cálculos correspondientes se realizó una curva con 1,1,3,3,-tetraethoxypropane (TEP) al 97% que se preparó previo al análisis de las muestras. El TEP fue preparado

de la siguiente manera: 73.2 µg de TEP fue diluido en 10 mL de HCl 0.1N y puesto en ebullición por 5 min e inmediatamente, el tubo se colocó en agua con hielo durante 5 min. Después se le agregó 90 mL de agua destilada, a esta solución se identificó como TEP 1. A partir de TEP1, se tomó 1 mL y se diluyó en 99 mL de agua destilada obteniendo el estándar para la curva (TEP 2).⁵⁰

Poder Antioxidante/Reducción Ferrica (FRAP)

Se preparó una solución identificada como mezcla de reacción, elaborada con buffer de acetatos 300 mM, pH 3.6 más hexahidrato de cloruro férrico 20 mM más 2,4,6,-Tris(2-pyridil)-s-triazine (TPTZ) 10 mM disuelto en HCl 40mM en una relación 10:1:1 respectivamente. En un tubo se agregaron 1.5 ml de la mezcla de reacción y 50 µl de plasma, se agitó vigorosamente y se incubó a 37°C por 10 min. Se cuantificó la absorbancia a 593 nm. Para los cálculos se utilizó una curva de Fe²⁺ (FeSO₄).⁵¹

Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)

Se preparó una solución identificada como mezcla de reacción con NADPH 0.2 mM, glutatión reducido 1mM (GSH) y la enzima glutatión reductasa 1UI/mL, disueltos en 1.6 mL de buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.0) por muestra. Se siguió el siguiente protocolo de trabajo:

TUBO	BUFFER	MEZCLA DE REACCIÓN	MUESTRA	REPOSO	H ₂ O ₂	LECTURA INICIAL	REPOSO	LECTURA FINAL
CONTROL	100µl	800 µl	---	5min	100 µl	DO _{ini}	5min	DO _{fin}
PRUEBA	50 µl	800 µl	50 µl	5min	100 µl	DO _{ini}	5min	DO _{fin}

Se pusieron todos los reactivos directamente en las cubetas que se utilizan para leer en el espectrofotometro, excepto el H₂O₂. Se incubó 5 min a T° ambiente, después de este tiempo se adicionó el H₂O₂ y se leyo inmediatamente a 340 nm (lectura inicial) y nuevamente a los 5 min (lectura final).⁵²⁻⁵³ Para los cálculos de NADPH oxidados se utilizaron las siguientes formulas:

Control	Muestra
$\frac{DO_{ini} - DO_{fin}}{\text{Tiempo (min)}} = \Delta A^{\text{control}}$	$\frac{DO_{ini} - DO_{fin}}{\text{Tiempo (min)}} = \Delta A^{\text{muestra}}$

Se sustituyeron los siguientes valores en la siguiente formula:

$$(\Delta A^{\text{muestra}} - \Delta A^{\text{control}}) 3215.43 = \text{nm de NADPH oxidado/min}$$

DO = densidad óptica

ΔA = absorbancia

3215.43 = coeficiente de extinción

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó un diseño estadístico completamente al azar con los 7 tratamientos con 5 réplicas, y 6 aves cada una. El análisis se realizó conforme al modelo completo de parcelas divididas en el tiempo que se describe a continuación:⁵⁴

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + d_{ik} + \beta_j + (a\beta)_{ij} + e_{ijk}$$
$$i = 1,2,3,4,5,6,7 \quad j = 1,2,3 \quad k = 1,2,4,5$$

donde:

μ = *media general*

α_i = *es el efecto del i-ésimo tratamiento*

d_{ik} = *es el error experimental aleatorio con un varianza σ_e^2*

β_j = *es el efecto tiempo*

$(a\beta)_{ij}$ = *interacción entre los tratamientos y tiempo*

e_{ijk} = *error experimental aleatorio con distribución normal en las mediciones repetidas con varianza σ_e^2*

RESULTADOS

Malondialdido (MDA)

El MDA es un intermediario del catabolismo de los ácidos grasos lipoperoxidados, que junto con otros metabolitos de la célula reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA), de modo que a estas moléculas se les identifica como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR's), por lo tanto, su identificación son un indicador de daño oxidativo. En el cuadro 4, se observa con respecto a la variable tratamiento, una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos 2, 4 y 7. Con relación a la variable tiempo, no se observó ninguna diferencia estadística. Por otro lado, en el cuadro 5, se expone, además de los datos obtenidos en la 2ª y 4ª semana, los datos registrados en la 8ª semana, así como los promedios por tratamiento y tiempo. Se aprecia a través de la significancia estadística un efecto de tiempo y de tratamiento.

CUADRO 4

	Dieta basal (1)	Dieta basal + AP (2)	Dieta basal + AP + Vit E100 mg/kg (3)	Dieta basal + AP + AM 4% (4)	Dieta basal + AP + AM 8% (5)	Dieta basal + AP + CLA 1% (6)	Dieta basal + AP + CLA 2% (7)	\bar{X}
2ª semana	<u>26.39</u> a	<u>40.03</u> a	<u>48.82</u> a	<u>33.36</u> a	<u>37.74</u> a	<u>38.99</u> a	<u>26.04</u> a	<u>35.91</u> a
4ª semana	<u>44.64</u> a	<u>26.46</u> ab	<u>11.38</u> b	<u>43.20</u> a	<u>29.23</u> ab	<u>31.84</u> ab	<u>25.07</u> ab	<u>30.26</u> a
\bar{X}	<u>35.51</u> ab	<u>33.24</u> a	<u>30.10</u> ab	<u>38.28</u> a	<u>33.48</u> ab	<u>35.41</u> ab	<u>25.55</u> b	

Niveles de equivalentes de MDA en plasma de gallinas de postura a las 2ª y 4ª semanas. Valores con distinta literal en el mismo renglón son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Valo-

CUADRO 5

	Dieta basal (1)	Dieta basal + AP (2)	Dieta basal + AP + Vit E100 mg/kg (3)	Dieta basal + AP + AM 4% (4)	Dieta basal + AP + AM 8% (5)	Dieta basal + AP + CLA 1% (6)	Dieta basal + AP + CLA 2% (7)	\bar{X}
2 ^a semana	<u>26.39</u> a	<u>40.03</u> a	<u>48.82</u> a	<u>33.36</u> a	<u>37.74</u> a	<u>38.99</u> a	<u>26.04</u> a	<u>35.91</u> a
4 ^a semana	<u>44.64</u> a	<u>26.46</u> ab	<u>11.38</u> b	<u>43.20</u> a	<u>29.23</u> ab	<u>31.84</u> ab	<u>25.07</u> ab	<u>30.26</u> a
8 ^a semana	<u>26.58</u> ab	<u>41.07</u> a	<u>28.06</u> ab	<u>29.92</u> ab	<u>16.19</u> b	<u>23.00</u> ab	<u>7.68</u> b	<u>24.64</u> b
\bar{X}	<u>32.54</u> ab	<u>35.85</u> a	<u>29.42</u> ab	<u>35.50</u> a	<u>27.72</u> ab	<u>31.28</u> ab	<u>19.06</u> b	

Niveles de equivalentes de MDA en plasma de gallinas de postura a las 2^a, 4^a y 8^a semanas. Valores con distinta literal en el mismo renglón son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Capacidad antioxidante (FRAP)

El principio de esta técnica se basa en una reacción de oxido-reducción, en donde el ión férrico (Fe^{3+}) se reduce a ión ferroso (Fe^{2+}) debido a la captación de un electrón proporcionado por los antioxidantes contenidos en la muestra. La concentración del ión ferroso se detecta por espectrofotometría y se reporta como nmolas de Fe^{2+} . La capacidad antioxidante está representada por una relación directa con respecto a la concentración de Fe^{2+} . Los resultados obtenidos en este estudio, son presentados en el cuadro 6, en donde se observa (desde el punto de vista estadístico ($P < 0.05$)), un efecto de tiempo a la segunda semana de muestreo. Con relación al tipo de tratamiento, solo se marca una diferencia estadística ($P < 0.05$) para el tratamiento 4. En el cuadro 6, se suman los datos sobre la capacidad antioxidante, obtenidos en la 8^a semana y en donde se observa que la significancia estadística en relación al

tiempo, se mantiene solo para la segunda semana y con respecto al tratamiento, observamos diferencias para los tratamientos 4 y 7.

CUADRO 6

	Dieta basal (1)	Dieta basal + AP (2)	Dieta basal + AP + Vit E100 mg/kg (3)	Dieta basal + AP + AM 4% (4)	Dieta basal + AP + AM 8% (5)	Dieta basal + AP + CLA 1% (6)	Dieta basal + AP + CLA 2% (7)	\bar{X}
2ª semana	<u>49.75</u> a	<u>42.29</u> a	<u>50.94</u> a	<u>42.46</u> a	<u>42.13</u> a	<u>47.03</u> a	<u>38.62</u> a	<u>45.74</u> a
4ª semana	<u>35.86</u> b	<u>41.18</u> a	<u>43.85</u> a	<u>32.84</u> a	<u>38.00</u> a	<u>41.20</u> a	<u>44.22</u> a	<u>39.59</u> b
\bar{X}	<u>42.80</u> ab	<u>41.73</u> a	<u>47.39</u> a	<u>37.65</u> b	<u>40.06</u> ab	<u>44.11</u> ab	<u>41.42</u> ab	

Niveles de nmol de Fe²⁺ en plasma de gallinas de postura a 2ª y 4ª. Valores con distinta literal en el mismo renglón son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

CUADRO 7

	Dieta basal (1)	Dieta basal + AP (2)	Dieta basal + AP + Vit E100 mg/kg (3)	Dieta basal + AP + AM 4% (4)	Dieta basal + AP + AM 8% (5)	Dieta basal + AP + CLA 1% (6)	Dieta basal + AP + CLA 2% (7)	\bar{X}
2ª semana	<u>49.75</u> a	<u>42.29</u> a	<u>50.94</u> a	<u>42.46</u> a	<u>42.13</u> a	<u>47.03</u> a	<u>38.62</u> a	<u>45.74</u> a
4ª semana	<u>35.86</u> b	<u>41.18</u> a	<u>43.85</u> a	<u>32.84</u> a	<u>38.00</u> a	<u>41.20</u> a	<u>44.22</u> a	<u>39.59</u> b
8ª semana	<u>50.89</u> cd	<u>42.00</u> d	<u>50.74</u> cd	<u>56.63</u> bc	<u>74.90</u> a	<u>66.21</u> ab	<u>48.27</u> cd	<u>55.66</u> a
\bar{X}	<u>45.56</u> abc	<u>44.16</u> bc	<u>48.51</u> abc	<u>43.97</u> c	<u>51.68</u> a	<u>51.48</u> ab	<u>43.70</u> c	

Niveles de nmol de Fe²⁺ en plasma de gallinas de postura a 2, 4 y 8 semanas. Valores con distinta literal en el mismo renglón son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Glutación peroxidasa (GPx)

La actividad de la enzima GPx se suma al grupo de indicadores metabólicos del Estrés Oxidativo, esta enzima regula la concentración de H₂O₂, y su actividad se determina por medio de una reacción acoplada, en donde se consume GSH, el cual es regenerado a través de una reacción de oxido-reducción, vía la enzima glutación reductasa. En esta reacción se libera NADP y cuyos niveles son determinados espectrofotométricamente, por lo tanto, el NADP se convierte en un indicador indirecto de la actividad de la enzima GPx. Los datos obtenidos de la determinación indirecta de la actividad de la GPx para la segunda y cuarta semana de tratamiento (Cuadro 8) y los resultados de la semana 8 post-tratamiento (Cuadro 9), de este experimento, no muestran ninguna diferencia estadística en cuanto a las variables tiempo y tratamiento.

Cuadro 8

	Dieta basal (1)	Dieta basal + AP (2)	Dieta basal + AP + Vit E 100 mg/kg (3)	Dieta basal + AP + AM 4% (4)	Dieta basal + AP + AM 8% (5)	Dieta basal + AP + CLA 1% (6)	Dieta basal + AP + CLA 2% (7)	\bar{X}
2ª semana	<u>239.50</u> a	<u>314.96</u> ab	<u>268.94</u> ab	<u>333.89</u> ab	<u>277.03</u> ab	<u>369.86</u> a	<u>398.80</u> a	<u>314.71</u> a
4ª semana	<u>312.33</u> a	<u>255.30</u> a	<u>229.07</u> a	<u>290.92</u> a	<u>263.75</u> a	<u>305.01</u> a	<u>224.76</u> a	<u>268.73</u> a
\bar{X}	<u>275.91</u> a	<u>285.13</u> a	<u>498.01</u> a	<u>312.40</u> a	<u>270.39</u> a	<u>337.43</u> a	<u>312.28</u> a	

Niveles de NADPH oxidado en plasma de gallinas de postura a 2ª y 4ª. Valores con distinta literal en el mismo renglón son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

Cuadro 9

	Dieta basal (1)	Dieta basal + AP (2)	Dieta basal + AP + Vit E 100 mg/kg (3)	Dieta basal + AP + AM 4% (4)	Dieta basal + AP + AM 8% (5)	Dieta basal + AP + CLA 1% (6)	Dieta basal + AP + CLA 2% (7)	\bar{X}
2ª semana	<u>239.50</u> b	<u>314.96</u> ab	<u>268.94</u> ab	<u>333.89</u> ab	<u>277.03</u> ab	<u>369.86</u> a	<u>398.80</u> a	<u>314.71</u> a
4ª semana	<u>312.33</u> a	<u>255.30</u> a	<u>229.07</u> a	<u>290.92</u> a	<u>263.75</u> a	<u>305.01</u> a	<u>224.76</u> a	<u>268.73</u> a
8ª semana	<u>283.41</u> ab	<u>299.38</u> ab	<u>197.66</u> b	<u>193.35</u> b	<u>278.76</u> ab	<u>342.23</u> a	<u>260.33</u> ab	<u>265.00</u> a
\bar{X}	<u>278.41</u> ab	<u>289.88</u> ab	<u>231.89</u> b	<u>272.72</u> ab	<u>273.15</u> ab	<u>339.03</u> a	<u>294.63</u> ab	

Niveles de NADPH oxidado en plasma de gallinas de postura a 2ª, 4ª y 8ª semanas. Valores con distinta literal en el mismo renglón son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

DISCUSIÓN

En este trabajo, el efecto prooxidante del aceite de pescado quedo de manifiesto cuando se midieron los niveles de MDA a la 8ª semana (Cuadro 5). A las tres semanas después de haber retirado de la dieta el aceite de pescado, se registro una disminución significativa en los niveles de MDA en el plasma, con respecto a la variable tiempo. Este dato sugiere, que durante el consumo de aceite de pescado, el ave produce MDA, y que en ausencia del aceite, no se observan esos niveles de producción. Lo anterior coincide con lo reportado por Garrido *et al*⁴⁴ quienes muestran un incremento en los niveles de MDA en eritrocitos de rata, alimentadas con aceite de sardina (10 g/kg de peso) por un periodo de 14 días, en el mismo sentido, Miret *et al*⁴⁵ indican que una dieta enriquecida con aceite de pescado modifica el metabolismo del hierro y promueve un aumento en los niveles de TBAR's (MDA) en plasma y eritrocitos de rata. Por otro lado, cuatro semanas de consumo de aceite de pescado fueron suficientes para causar una disminución en la disponibilidad de antioxidantes en el ave (Cuadro 6), debido probablemente a que estos fueron usados como protectores contra el efecto prooxidante del aceite de pescado. Atalay *et al*,⁴⁶ reportaron que el aceite de pescado incrementó la actividad de las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa en hígado de rata, demostrando así el efecto prooxidante del aceite, sin embargo, en este trabajo, el consumo de aceite de pescado no modifico la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en plasma, es probable que para esta especie, el plasma no sea la muestra idónea para demostrar la actividad de esta, a pesar de que en otras especies si se han observado cambios en la actividad de esta enzima a nivel de plasma.⁵⁵⁻⁶⁰

Con respecto a la variable tratamiento, en este experimento, ningún tratamiento (vitamina E, algas marinas y ácido linoleico conjugado) mostro un claro efecto antioxidante como el que se les adjudica en la literatura.^{12,19,20, 31-33,36,39} Sin embargo, si se aprecian diferencias numéricas, lo que significa que el consumo de aceite de pescado podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de un cuadro de estrés oxidativo en el animal.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados de este trabajo, se concluye que el uso de aceite de pescado como fuente de ácidos grasos ω 3 debe ser analizado con más detalle, ya que, como ha sido demostrado por varios autores y en este trabajo, posee un efecto prooxidante, que puede ser desde el punto de vista metabólico, más perjudicial para la salud del ave, que el beneficio productivo de enriquecer al huevo con este tipo de ácidos grasos.

Se propone considerar las siguientes sugerencias:

1. Aumentar el número de animales por repeticiones y número de repeticiones.
2. Seleccionar un solo antioxidante.
3. Revisar el tiempo de exposición al aceite de pescado.
4. Analizar el grado de rancidez del alimento
5. Tomar muestras en tiempo más cortos durante el experimento y después del experimento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3^{ed} ed. Oxford Science Publications 1999.
2. Miller JK, Brezezinska-Slebozinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci* 1993;76:2812-2823.
3. Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalyanaraman B, Mason RP. Contemporary issues in toxicology. Free radicals in toxicology. *Toxi Appl Pharma* 1993;120:168-178.
4. Serret G M. Los radicales libres y el proceso de lipoperoxidación como posible causa de daño hepático en pollos con síndrome ascítico. (Tesis de licenciatura), DF (México) México; UNAM 1996.
5. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidants nutrients. *FASEB J* 1987;1:441-445.
6. Nakazawa H, Genka Ch, Fujishima M. Pathological Aspects of Oxigens/free Radicals. *Japan J Physiol* 1996;46;15-32
7. Rimbach G, Höler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L. Methods assess free radicals and oxidative strees in biological systems. *Arch Anim Nutri* 1999;52:203-222.
8. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radicals in medicine. London (UK): Churchill Livingstone 1993:481-493.
9. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clinic Nutri* 1993;57(Suppl):715s-725s.
10. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-162.
11. Díaz A, Serret M, Ramirez G, Avila E, Guinzberg R, Piña E. Prophylactic action of lipoic acid on oxidative stress and growt performance in broilers at risk of developing ascites syndrome. *Avian Pathol* 2003;32:645-653.

12. Mantajun P, Mohamed S, Mustapha NM, Muhammad K and Ming CH. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J Appl Phycol* 2008;20:357-373.
13. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh. Polyphenols and beyond. *Am J Clin Nutr* 2005;81:215-217
14. Kehrer JP. Free radicals mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993;23:21-48
15. Hassan HM. Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases, free radical. *Biol & Med* 1988;5:377-385
16. Mates JM, Pérez GC, Nuñez CI. Antioxidant enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595-603.
17. Chandan K, Sen. Nutritional Biochemistry of cellular glutathione. *Nutr Biochem* 1997;8:660-672.
18. Brigelius FR, Wingler K, Müller C. Estimation of Individual Types of Glutathione Peroxidases. *Methods in Enzymology* 2002;347:101-112
19. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Rev Free radic Biol & Med* 2007;43:4-15
20. Azzy A, Stocker A. Vit E: non-antioxidant roles. *Prog Lip Res* 2000;39:231-255
21. Arrieta AM, Diaz- Cruz A, Ávila E, Guinzberg R, Piña E. Estado oxidativo hepático y comportamiento productivo en pollo de engorda, alimentado con dos Fuentes de selenio y niveles altos de vitamina E y C. *Vet Mex* 2002;31:113-119.
22. Arrigoni O, De Tullio MC. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Rev Biochem Biophy* 2002;1-19
23. Lodge K, Packer L, α -lipoic Acid. In: Gershwin ME, German BJ, editors. *Nutrition and Immunology: Principles and practice*. New Jersey: Human Press 2000:97-106.
24. Ramírez FG. Efecto del ácido lipoico en indicadores productivos y del estrés oxidativo en el pollo de engorda (tesis de licenciatura), DF (México) México; UNAM 2003.

25. Packer L, Witt E, Jürgen H. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995;19:227-250
26. Valko M, Dieter L, Moncol J, Mark TD, Cronin MM, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem & Cell Biol* 2007;39:44–84.
27. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidant? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Rev Arch Biochem Biophys* 2008;476:107-112.
28. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits vegetables, and Grain Products *J Agric Food Chem* 1998;46:4113-4117.
29. Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenols antioxidant and quality in food: vegetables. *J Agric Food Chem* 1998;46:3630-3634.
30. Matsuka R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T, Chichara M, Yamamoto Y, Niki E, Karube I. Acomparasion of screening methods for antioxidant activity in sweets. *J Appl Phycol* 1997;9:29-35
31. Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jimenez I, Pulido R, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J Sci Food Agric* 2001;81:530-534.
32. Pavia H, Aberg P. Spatial variation in polyphenolic content of *Ascophyllum nodosum* (fucales, Phaeophyta). *Hydrobiology* 1996;326/327:199-203.
33. Regan MA, GLombitza KW. Phlorotanins, brown algal polyphenols. In Round-Chapman. Ed *Progress in phycological Research*. Bioprocess, London 1986;130-132.
34. Ho YL, Hai RL. Trans-10, cis-12.conjugated linoleic acid isomer exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than cis-9, trans-11-conjugated licoleic acid isomer. *J Agric Food Chem* 2000;48:5469-5475
35. Ha YL, Storkson J, Pariza MW. Inhibition of benzo[a]-pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 1990;50:1097-1101.

36. Yu Liangli. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *J Agric Food Chem* 2001;49:3452-3456.
37. Aydin R. conjugated linoleic acid: chemical structure, sources and biological properties. *Rev J Vet Anim Sci* 2005;29:189-195.
38. Suksombat W, Samitayotin S, Lounglawan P. Effects of Conjugated linoleic acid supplementation in layer diet on fatty acid compositions of Egg Yolk and layer Performances. *Poult Sci* 2006;85:1603-1609
39. Zhang H.J, Guo Y, Tian J, Yuan J. Dietary conjugated linoleic acid improves antioxidant capacity un broiler chicks. *Brit Poult Sci* 2008;2:213-221
40. Union Nacional de Avicultores. *Avicola Mexicana* 2009 <http://www.una.com.mx>
41. Gallardo NJL, Villamar AL, Castillo MM, Guzmán VH. Situación actual y perspectiva de la producción de huevo para Plato en México 2003. SAGARPA: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg>
42. Gonzales-Esquerra R, Leeson S. alternatives for enrichment of eggs and chicken meat whit omega-3 fatty acids. *Canada J Anim Sci* 2001;81:295-305
43. Simopoulos AP. Symposium: role of poultry products in enriching the human diet whit n-3 PUFA. Human requeriment for n-3 polyunsaturated fatty acid. *Poult Sci* 2000;79:961-970
44. Garrido A, Gárate M, Campos R, Villa A, Nieto S, Valenzuela A. Increased susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress alter ingestion of high doses of fish oil: effect of aging and protective action of dl- α tocopherol supplementation. *J Nutr Biochem* 1993;4:118-122.
45. Miret S, Sàis MP Mitjavila MT. Effects of fish oil and olive oil-rich diets in airon metabolism and oxidative estress in the rat. *Brit J Nut* 2003;89:11-18
46. Atalay M, Laaksunen DE, Khasuna S, Kaliste-Korhonen E, Hänninen O, Sen CK. Vitamine E regulates changes in tissues antioxidants induced by fish and acute exercise. *Med Sci Exerc* 2000;32(3):601-607.

47. INEGI. Tlahuac. Cuaderno de información básica delegacional. INEGI. México 1992
48. National Research Council, Nutrient Requirements of Poultry, Ninth Revised Edition, National Academy Press Washinton DC.1994
49. Bush BM, Manual de laboratorio de análisis clínicos. España. Ed. Acribia 1982
50. Nickos A. Botsoglou, Dimitrios J. Fletouris, Georgios E, Papageorgios. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid, method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. J Agric Food Chem 1994;42:1931-1937.
51. Benzie FF, Strain JJ. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. In: Packer L, editors. Methods in Enzymology Part A. Academic Press:1999;Vol 229:15-27.
52. Flohé L, Günzler W. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol 1984;105:114-120.
53. Lawrence and Raymond F, Burk. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficit rat liver. Biochem Biophys Res Commun 1976;4:952-958
54. Kuehl R. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigación. Diseño de experimentos. 2^a Ed. EUA. Thompson Learning 2001
55. Atroshi F and Sankari S, Variation of eritrocite glutathione peroxidase activity in finn sheep. Res Vet Sci 1981;31;267-271
56. LaVronga MW, Combs GF. Evidence of hereditary facto affecting the chick's response to uncomplicated selenium deficiency. Poult Sci 1982;62:164-168
57. Lingaas F, Brun E, Frosliie A. Estimates of heritability for selenium and glutathione peroxidase levels in pigs. J Anim Breed Genet 1991;108:48-53
58. Mézez M, Eiben C, Virág G. Determination of glutathione peroxidase enzyme activity in blood plasma, red blood cells and liver of rabbits. Correlation between the enzyme activity and some production traits (in Hungarian). Proc. 6th Rabbit breeding day, PATE, Kaposvár, 121-126
59. Virág G, Mézes M, Szendrő Z, Romavári R, Radnai I and Biróné E. Moderate phenotypic relation ships betwen glutathione peroxidase activity and

carcass traits in rabbit could be partially determined by genetic effect Proc. 6th World Rabbit Congr. Toulouse, (1 suppl 2):381-384

60. Mendoza A. Suplementación de selenio y vitamina E en borregas primizas y sus efectos en variables reproductivas en periodo de anestro estacional. (Tesis maestría). Texcoco (Edo. México) México: Colegio de postgraduados, 2008.