

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



TESIS

**EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y CÁSCARA DE NARANJA COMO
INMUNOESTIMULANTE Y REDUCTOR DE CORTISOL EN OVINOS DE
ENGORDA EN CONDICIONES DE ESTRÉS**

PRESENTA

MVZ SELENE GUADALUPE GARCÍA MONTERO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

MARZO DE 2017



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSGRADO CONJUNTO**



TESIS

**EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y CÁSCARA DE NARANJA COMO
INMUNOESTIMULANTE Y REDUCTOR DE CORTISOL EN OVINOS DE
ENGORDA EN CONDICIONES DE ESTRÉS**

PRESENTA

MVZ. SELENE GUADALUPE GARCÍA MONTERO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA



EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO Y CÁSCARA DE NARANJA COMO
INMUNOESTIMULANTE Y REDUCTOR DE CORTISOL EN OVINOS DE
ENGORDA EN CONDICIONES DE ESTRÉS

Aprobación de tesis por el comité particular de

MVZ Selene Guadalupe García Montero

Dr. Marco Antonio Cantú Martínez
Asesor Principal

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila
Co-Asesor

Dr. Hugo Bernal Barragán
Co-Asesor

Dr. Héctor Fimbres Durazo
Co-Asesor

GRAL. ESCOBEDO, N.L.

MARZO DE 2017

DEDICATORIAS

*A mis padres,
la Sra. Alma Elza Montero Gámez y el Sr. Ernesto García Medina, por siempre
contar con su apoyo incondicional y motivarme para alcanzar y concluir cada una
de mis metas.*

*A mi hermano Diego y mi sobrino Darío,
por siempre contagiarme de su alegría y entusiasmo.*

*Al MVZ Víctor Manuel Ortiz Castillo,
por su constante apoyo y palabras correctas en el momento exacto.*

*A toda la familia,
que han compartido conmigo a lo largo de este camino, y también para aquellos que
por algún motivo ya no están con nosotros.*

*A mis amigos y compañeros,
por su ayuda cuando lo llegue a necesitar.*

AGRADECIMIENTOS

*A mis padres,
Alma Elza Montero Gámez y Ernesto García Medina, por todo que ellos saben han hecho y han conseguido, para hacer de mí una persona de bien, ¡GRACIAS PAPIS, LO LOGRARON!*

*A la persona que ha estado a mi lado todo este tiempo,
Víctor Ortiz,
lo cual estaré eternamente agradecida, por su valioso y gran apoyo, gracias por existir.*

*A mis asesores,
Dr. Marco Antonio Cantú Martínez, Dr. Hugo Bernal Barragán, Dr. Héctor Fimbres, Dra. Diana Zamora, por su apoyo y comprensión en todo este tiempo.*

*A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y la Facultad de Agronomía,
por su cómoda estancia durante el periodo de mi preparación.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT,
por el apoyo económico que se me ha brindado para realizar este trabajo.*

*Al Sr. Jaime Quintanilla,
por el préstamo de sus instalaciones para la realización de este trabajo de investigación.*

*A mis compañeros,
MVZ Carolina Montiel y MV Alejandro Rodríguez, por la ayuda que me dieron en este trabajo.*

*A los Doctores,
Alicia Marroquín, Francisco Picón y Fernando Sánchez, por el apoyo con algunas instalaciones de sus respectivos laboratorios y sugerencias en el trabajo.*

*A las técnicas de laboratorio,
Nydia y Julia, por su ayuda en algunas partes del trabajo.*

Y a todos aquellos que de alguna manera aportaron y enriquecieron el presente.

¡Gracias!

ABREVIATURAS

µl: microlitros

a: animal

AA: ácido ascórbico

ac's: anticuerpos

ACTH: hormona adrenocorticotropa

ADA: ácido L-dehidroascórbico

AOAC: Association of Official Analytical Chemist

CN: cáscara de naranja

CN+AA: cáscara de naranja más ácido ascórbico

CRB: Complejo Respiratorio Infeccioso Bovino

CRH: hormona liberadora de corticotropina

d: día

Da: daltons

dL: decilitros

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EFSA: European Food Safety Authority

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

g: gramos

GC: grupo control

GCN: grupo con cáscara de naranja

GCNDR: grupo con cáscara de naranja y con dosis de referencia de ácido ascórbico

GDR: grupo con dosis de referencia de ácido ascórbico

GLO: L-gulonolactona oxidasa

GLUT 1: Glucose Transporter 1

HHA: Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

HR: humedad relativa

IgE: inmunoglobulina E

IgG: inmunoglobulina G

kg: kilogramos

km: kilómetro

m: metros

m²: metros cuadrados

MAPK p38: P38 mitogen-activated protein kinases

mg: miligramos

ml: mililitros

mm: milímetro

N/L: Neutrófilos/Linfocitos

NA: no aplica

NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

ng: nanogramos

nm: nanómetros

°C: grados centígrados

P: probabilidad

pH: potencial hidrógeno

ppm: partes por millón

PROGAN: Programa de Producción Pecuaria Sustentable y Ordenamiento Ganadero y Apícola

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: rotaciones por minuto

SEGOB: Secretaría de Gobernación

SGA: Síndrome General de Adaptación

SNA: sistema nervioso autónomo

SNC: Sistema Nervioso Central

SVTC-1: Sodium-dependent Vitamin C Transporter 1

SVTC-2: Sodium-dependent Vitamin C Transporter 2

TEM: temperatura ambiental

TH1: linfocitos T helper 1

TH2: linfocitos T helper 2

TMB: tetrametilbenzidina

TNF α : alfa tumor necrosis factor

TR: temperatura rectal

UI: unidades internacionales

UPP: Unidad de Producción Pecuaria

X²: ji cuadrada

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIAS	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCIÓN	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. HIPÓTESIS	22
4. ANTECEDENTES	23
4.1 Ácido ascórbico	23
4.1.1 Historia	23
4.1.2 Alimentos ricos en ácido ascórbico	24
4.1.3 Cáscara de naranja como fuente de ácido ascórbico	24
4.1.4 Otros alimentos ricos en ácido ascórbico	25
4.2 Biosíntesis del ácido ascórbico	25
4.2.1 Estructura del ácido ascórbico	26
4.2.2 Propiedades del ácido ascórbico	26
4.3 Órganos donde se encuentra el ácido ascórbico	27
4.4 Absorción	27
4.5 Degradación	28
4.6 Excreción	28
4.7 Importancia	29
4.7.1 Funciones fisiológicas	29
4.8 Requerimientos	31

4.8.1 Problemas por la falta de ácido ascórbico	31
4.9 Efecto del ácido ascórbico	32
4.9.1 Rumiantes	33
4.10 Función del ácido ascórbico como inmunoestimulante	34
4.11 Influencia del AA en el bienestar animal	36
4.11.1 Mecanismo del estrés	37
4.12 Métodos para la cuantificación de ácido ascórbico	41
4.12.1 Cuantificación en alimentos	41
4.12.2 Cuantificación en organismo	42
4.13 Diversos estudios con ácido ascórbico	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	46
5.1 Área de estudio	46
5.2. Colecta en campo	46
5.3 Método para la obtención de sangre	47
5.4 Temperaturas. Humedad relativa	48
5.4.1 Temperatura rectal	48
5.4.2 Temperatura ambiental y humedad relativa	48
5.5 Pesaje	49
5.6 Procesamiento de muestras en el laboratorio	49
5.6.1 Sangre completa	49
5.6.2 Cortisol	52
5.6.3 Proteínas totales, Albuminas y Globulinas	53
6. RESULTADOS	54
6.1 Temperaturas y humedad relativa	54
6.1.1 Temperatura ambiental y humedad relativa	54
6.1.2 Temperatura rectal	55
6.2 Hemograma	56
6.2.1 Relación Neutrófilos/Linfocitos en diferencial de sangre	56
6.3 Proteínas totales: Relación albúminas/globulinas	59
6.4 Cortisol	62

6.5 Peso final de los animales	65
7. DISCUSIÓN	66
8. CONCLUSIÓN	69
9. LITERATURA CITADA.....	70
10. ANEXOS	79
ÍNDICE DE ANEXOS	79

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios relacionados con la administración de AA en diferentes especies animales.....	44
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ácido ascórbico y su conversión a ácido dehidroascórbico	26
Figura 2. Antioxidantes vs Radicales libres.....	34
Figura 3. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, liberación de glucocorticoides desde la corteza adrenal, y Eje simpático-adrenomedular liberación de adrenalina desde la médula adrenal	39
Figura 4. Reacción de oxidación del ácido ascórbico	41
Figura 5. Humedad relativa y temperatura ambiental que se estuvo registrando durante los 30 días del estudio	54
Figura 6. Temperatura rectal registrada de los animales en los cuatro tratamientos respectivamente.....	55
Figura 7. Resultados de la relación de la cantidad de neutrófilos por tratamiento	57
Figura 8. Relación de cantidad de neutrófilos por día de muestreo	58
Figura 9. Interacción de la cantidad de linfocitos con el día de muestreo	59
Figura 10. Relación de los resultados de proteínas totales por día de muestra....	60
Figura 11. Resultados de la cantidad de albúminas en suero en los diferentes días de muestreo	61
Figura 12. Resultado de la cantidad de globulinas en suero registradas durante los días de muestreo	62
Figura 13. Resultados de cortisol sérico en las diferentes tomas de muestra	63
Figura 14. Cantidad de animales que presentan una reducción y una no reducción de cortisol sérico del día 0 al día 15 del periodo experimental.....	64
Figura 15. Cantidad de animales que presentan una reducción y una no reducción de cortisol sérico en el periodo comprendido por el estudio, día 0 a día 30.....	64
Figura 16. Resultados de los pesos registrados durante las tres tomas de peso durante el periodo experimental.....	65

RESUMEN

La engorda de ovinos realizada bajo un sistema de producción intensivo, ocasiona problemas debido al estrés causado por una alta densidad y eventual manejo zootécnico deficiente. En el presente trabajo se evalúa el efecto de administrar suplementos de Ácido Ascórbico (AA) y cáscara de naranja (CN) a la dieta, como alternativa para reducir los niveles de cortisol y estimular el sistema inmunitario, evaluando los efectos sobre algunos parámetros hematológicos y ganancia de peso. Se utilizaron 60 machos ovinos entre 16-27 kg, con 2 meses de edad. Los animales se dividieron en cuatro grupos, con 15 animales por grupo. Al grupo Control no se le ofreció ningún suplemento de AA o CN. Al grupo 2 se le administró AA en agua purificada (75 mg/kg). Al tercer grupo, se le administró CN (100 g por animal). Al cuarto se le ofrecieron ambos suplementos (AA y CN). Los animales fueron alojados en tres corrales, en los que se tuvo la posibilidad de aplicar individualmente los tratamientos correspondientes. Tres muestras de sangre se colectaron antes, durante y después de los 30 días del experimento, para determinar parámetros hematológicos y la concentración de cortisol. El peso del animal se registró antes, durante y después del experimento. Los resultados indicaron una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la ganancia de peso debida a la administración de CN, ya que se obtuvo mayor ganancia de peso al final del periodo experimental (28.4 kg) que a los demás tratamientos. Las concentraciones de cortisol sérico mostraron una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos, revelando que los animales que recibieron sólo AA presentaron una reducción de cortisol en suero en comparación con los demás. Esto nos demuestra que la administración del AA

contribuye a reducir los niveles de cortisol sérico y que los animales alimentados con CN aumentan su peso.

ABSTRACT

Feedlot sheep production performed under intensive production system, causes problems mainly caused by stress associated with high density and poor animal management. Administration of supplements based on ascorbic acid (AA) and dried citrus peel is thought to help reducing cortisol levels and stimulate the immune system, as well as to have effects on some hematological parameters and weight gain. Sixty male sheep between 16-27 kg and 2 months old were blocked by weight and assigned into four groups (treatments) designed for the experiment. Group one (control group) did not received any supplementation. Group two received AA in purified water (75 mg/kg). Group three was given dried citrus peel (100 g per animal); and group four was offered both supplements (AA and orange peel). Animals were housed in three group pens. Blood samples were collected before starting, during and at the end of the 30 day experiment for determination of hematologic parameters and cortisol. The body weight was recorded at the same time of the blood sample collection. The body weight results indicated a significant difference ($P<0.05$) between the treatments administrated to animals. Blood serum cortisol was significant different ($P<0.05$) among treatments, with those animals receiving only the administration of AA showing a reduction of the serum cortisol concentration in comparison with other groups. In conclusion, administration of AA helps to improve the welfare of feedlot animals under stress lowering serum cortisol. Supplementation of dried citrus peel increased the weight gain of the animals.

1. INTRODUCCIÓN

Alrededor del mundo la producción ovina por lo general se realiza bajo un sistema de producción extensivo, es decir, en pastoreo, ya que desempeña una ventaja en la economía de los productores, ahorrando en los costos de producción. Pero a la vez esto resulta susceptible a diversas variables como lo son las condiciones climáticas, sequías extremas, lo que causa una importante carencia de alimento en este tipo de sistema de producción (Partida *et al.*, 2013).

En México hasta el año 2010, se tienen registradas cerca de 53,000 unidades de producción pecuaria (UPP) con una distribución total ovina de un 23% en el norte del país (PROGAN, 2010). Este tipo de producción se lleva a cabo en diversos sistemas productivos, sin embargo, dos de los más importantes son: el sistema extensivo y el sistema intensivo, el primero, basado en el pastoreo con el uso mínimo de suplementos y/o aditivos, y el segundo, donde los ovinos son engordados con dietas basadas en concentrado, con un mayor manejo zootécnico (Mendoza *et al.*, 2007).

En el caso del sistema intensivo, se requiere de un manejo controlado, para obtener la mínima mortalidad de animales, además del mayor peso de cordero al finalizar la engorda con la mejor eficiencia alimenticia posible. De manera que los animales se encuentran en condiciones de alta densidad animal. El espacio recomendado por animal es de 2.5 m², lo cual no se lleva a cabo, es por eso que llegan a presentarse situaciones estresantes agudas y de corto plazo que elevan los niveles de adrenalina y situaciones estresantes a largo plazo, que aumentan los niveles de cortisol, deprimiendo su sistema inmune, llegando a provocar patologías

y hasta la muerte (Álvarez, 2008; González *et al.*, 2013). Estas condiciones generalmente afectan el bienestar del animal por la generación de estrés (González *et al.*, 2013; Santamaría *et al.*, 2015), volviéndose esta situación negativa cuando se presenta en exceso, resultando en diversos problemas en el animal, provocando el esfuerzo para mantener el equilibrio entre sí mismo y su ambiente, la producción del animal y la rentabilidad de la producción (Moberg y Mench, 2000; Roca, 2011; González *et al.*, 2013).

Para esto es necesario establecer estrategias para reducir los efectos de estas situaciones negativas, causadas por los factores mencionados. Una de estas estrategias es agregar a la dieta o administrar modificadores del consumo, como lo son los aditivos, los cuales tienen diversos objetivos. Un objetivo es el satisfacer las necesidades alimenticias de los animales, al actuar como coccidiostatos o histomonostatos, influir positivamente en las características del alimento, así como de los productos que se obtienen del animal, en la repercusión del medioambiente de la producción, así como en la propia producción, en la actividad de los animales, y, por último, el de mayor importancia para este trabajo en su bienestar (Carro *et al.*, 2006; Partida *et al.*, 2013).

Ácido ascórbico (AA) es uno de los aditivos que se han utilizado, principalmente por ser barato, no tóxico, no tener un tiempo de retiro y por ser de fácil administración, por lo que representa un gran valor en el campo (Kassab y Mohammed, 2014). El ácido ascórbico es considerado un importante antioxidante por sus propiedades reducción – oxidación (redox), por lo que se ha utilizado para el tratamiento de condiciones de estrés. Algunos autores han descrito que AA es la

primera defensa en sangre contra los radicales libres por medio de su transformación a ácido dehidroascórbico (donando un electrón), que fácilmente puede nuevamente convertirse en ascorbato, dependiendo de la condición del tejido en el que se esté llevando a cabo, ya que si éste se encuentra alterado la capacidad reversible se reduce, quedando solo la función inactivadora de radicales libres (Ceddia *et al.*, 2005; Barbany y Javierre, 2006; Kassab y Mohammed, 2014). El ácido ascórbico tiene influencia en la movilidad fagocítica celular y la quimiotaxis (Black y Hidirglou, 1996). Existen informes de que la suplementación AA mejora la función inmune y mejora la resistencia a la infección (Kim *et al.*, 2012). También se ha descrito que disminuye los efectos negativos del estrés ambiental en rumiantes, aves y rata. Se ha descrito su efecto de dar protección a la integridad de las células del sistema inmune, incluso se ha demostrado una proliferación linfocitaria con su administración (Sunil *et al.*, 2010). Estudios realizados por algunos investigadores en animales han sugerido fuertemente que la suplementación con AA reduce la liberación de cortisol inducida por el estrés (Brody *et al.*, 2002).

A pesar de que los ovinos, son una de las especies que posee la enzima L-gulonolactona oxidasa (GLO) necesaria para la síntesis de su propio AA (Black y Hidirglou, 1996), Kassab en el 2014 describe que en un entorno específico y en condiciones fisiológicas específicas, la cantidad de AA producido por el animal puede ser insuficiente para cumplir con su requerimiento (Kassab y Mohammed, 2014).

El AA existe contenido en un alto nivel en frutas y verduras, tales como las fresas, las naranjas, el brócoli y el pomelo, entre otras. El AA natural y sintético es

idéntico químicamente, de manera que no se conocen diferencias en sus actividades biológicas o su biodisponibilidad (Johnston y Luo, 1994).

En Nuevo León la cáscara de naranja es un recurso natural que está disponible en grandes cantidades, ya que se considera un desperdicio en diversas empresas que se dedican a la elaboración de productos citrícolas, ubicadas en los municipios de Allende, Montemorelos, General Terán, Hualahuises, Linares y Rayones, denominándose a esta región zona citrícola (Ordóñez, 2007). Es por eso que la cáscara de naranja podría ser utilizada como una fuente de AA ya que posee aproximadamente $16,3 \pm 1,4$ mg por cada 100 g de muestra seca de harina de cáscara de naranja, además de otros microminerales como calcio, magnesio y zinc (Rincón *et al.*, 2005).

Conociendo la situación de estrés en los sistemas de producción de la engorda de ovinos, se sugiere la implementación de estrategias de manejo como la administración de aditivos como el ácido ascórbico y la cáscara de naranja como reductor de cortisol en sangre y la estimulación del sistema inmune, con el fin de mejorar la producción y evitar enfermedades del ganado ovino destinado a la engorda.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la administración de ácido ascórbico y de cáscara de naranja en la reducción de cortisol en sangre y de la estimulación del sistema inmune en ganado ovino destinado a la producción de engorda.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar la concentración de cortisol en sangre antes (día 0), durante (día 15) y después (día 30) de la administración de los tratamientos por medio de la técnica de inmunoensayo ELISA (Bio-Cortisol de Grupo Mexlab®).

2.- Determinar el efecto en la ganancia de peso mediante la administración de los tratamientos de ácido ascórbico y cáscara de naranja, durante y al peso final del animal.

3. Determinar la relación de células blancas (Neutrófilos/Linfocitos), así como el incremento de las globulinas y albúminas presentes antes, durante y después de la aplicación de los tratamientos.

3. HIPÓTESIS

La administración de ácido ascórbico, así como de la cáscara de naranja reduce los niveles de cortisol, estimula el sistema inmune, y apoya en la ganancia de peso en los ovinos de engorda sometidos a estrés de manejo y adaptación.

4. ANTECEDENTES

4.1 Ácido ascórbico

4.1.1 Historia

En el año de 1720, Kramer un cirujano de la armada británica observó que el escorbuto de los soldados se curaba gracias al consumo de vegetales frescos, pero no de vegetales secos. En el año de 1747, el médico James Lind observó lo similar a Kramer, que los signos y síntomas del escorbuto mejoraban al suministrar a los pacientes zumo de limón o de naranja (Bolet, 2004; Palacios, 2013). En 1789, Darby, usó aceite de hígado de vaca como terapia, lo cual sirvió como estímulo para realizar posterior experimentación continuada hasta el siglo XX (Bolet, 2004).

En 1830 el doctor Elliotson, profesor de Medicina de la Universidad de Londres propuso que la enfermedad escorbuto era causada por una deficiente dieta. Entre 1906 y 1912, el bioquímico inglés Sir Frederick Hopkins sospechaba que esta enfermedad era a causa de dietas deficientes en nutrientes desconocidos, ya que en ratas sometidas a una dieta de productos “purificados”, al suministrarles diariamente una pequeña cantidad de leche fresca, se mejoraba crecimiento (Bolet, 2004; Palacios, 2013). La sustancia contenida en estos productos como frutas y de otra índole sería denominada más tarde como vitamina C (Palacios, 2013). En 1928 el profesor de química de la Universidad de Budapest, Albert Szent, aisló esta vitamina del pimiento verde, hecho por el cual se le otorgó el premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 1937 (Bolet, 2004). El efecto que tiene la vitamina C, fue descrito por el médico James Lind, pero en sí la sustancia fue nombrada de esa manera por los científicos Axel Holst y Theodor Brun (Palacios, 2013); y en 1933

esta vitamina fue denominada como ácido ascórbico (AA) por Albert Szent (Castro, 1994).

4.1.2 Alimentos ricos en ácido ascórbico

Las principales fuentes de vitamina C son frutas, hortalizas y varios tipos de hojas. El plátano contiene la cantidad exacta que necesita el humano de esta vitamina. Las hojas verdes con tonalidad oscura, como las del amaranto y la espinaca contienen más AA que las que se encuentran pálidas (repollo, lechuga). Los alimentos de origen animal como la carne, pescado, leche y huevo contienen muy poca cantidad de AA, pero a pesar de esto también pueden abastecer con esta vitamina. El calor destruye con facilidad al AA, por lo cual una larga cocción del alimento puede causar la destrucción de una gran cantidad de AA contenida en el alimento (Latham, 2002).

Se pueden encontrar las siguientes cantidades de AA por cada 100 g de los alimentos: naranja 50 mg, kiwi 500 mg, limón 80 mg y pimientos rojos 200 mg. Productos lácteos, pan y frutos secos apenas lo aportan. El ácido ascórbico que contienen los medicamentos son químicamente idénticos a la forma natural y no hay diferencia alguna en cuanto a actividad o biodisponibilidad (Valdés, 2006).

4.1.3 Cáscara de naranja como fuente de ácido ascórbico

Los frutos cítricos que abastecen al ganado bovino aportan una cantidad adecuada de fibra y vitaminas, además de que los aceites esenciales de éstos tienen un efecto antibiótico natural para el mismo ganado. En estudios previos se

ha demostrado la aptitud del uso de la pulpa de naranja es una fuente de alimentación, que estimula la acción antimicrobiana intestinal (Ventura, 2011). Se ha reportado también que la cáscara y la pulpa de naranja no tiene problemas para la aceptación de consumo por el ganado. El problema principal de este producto es su transporte, por la humedad contenida en el mismo. Se ha observado en experimentos en campo en ganado ovino, que al realizar pellets de este producto (corteza de naranja), se disminuye la cantidad de *Salmonella* intestinal en estos animales (Ventura, 2011).

4.1.4 Otros alimentos ricos en ácido ascórbico

El ácido ascórbico se encuentra en frutas cítricas, así como en la fresa, la piña, el melón, plátano y uvas. También la pueden proveer los vegetales, como la col de Bruselas, los espárragos y las espinacas. Los productos animales también contienen esta vitamina y la abastecen como lo es la carne, el hígado y la leche. Es conocido que la cocción y el envasado de estas fuentes de ácido ascórbico pueden provocar la pérdida de sus propiedades, así como destruirla (Hernández y Sastre, 1999). También la acerola, soja, brócoli, pimientos, kiwi, pomelo y tomate poseen el mayor contenido de esta vitamina (Serra y Cafaro, 2007).

4.2 Biosíntesis del ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un importante antioxidante por sus propiedades redox. Se ha informado que el ascorbato influye en la movilidad fagocítica celular y la quimiotaxis. La mayoría de las especies animales son capaces de sintetizarlo,

gracias a la enzima L-gulanolactona oxidasa, que realiza la conversión de ácido gulónico a gulanolactona y así sintetizando AA. Se ha indicado que, en los rumiantes, es de gran importancia en condiciones de estrés por frío, por lo que requiere de mayor cantidad, ya que su síntesis se ve afectada en esas condiciones (Black y Hidiroglou, 1996).

4.2.1 Estructura del ácido ascórbico

El ácido L-ascórbico (Figura 1) es la forma enol de la 2-ceto-1-gulofurano lactona (Hernández y Sastre, 1999).

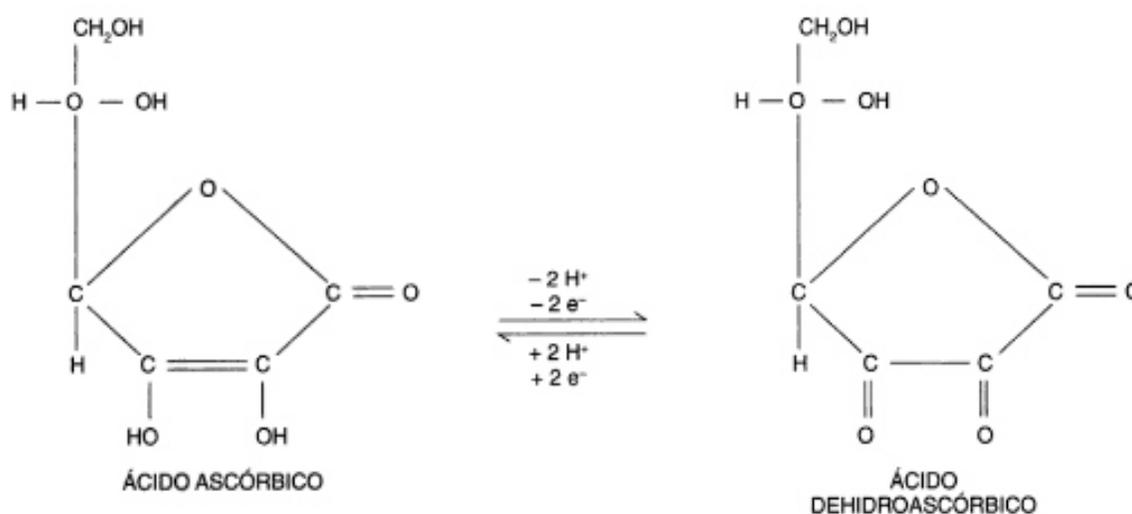


Figura 1. Estructura del ácido ascórbico y su conversión a ácido dehidroascórbico
(Hernández y Sastre, 1999)

4.2.2 Propiedades del ácido ascórbico

El ácido ascórbico tiene un peso molecular de 173.13 Da. Es un compuesto hidrosoluble ácido, con características altamente reductoras, esto gracias a la estructura del enediol y su posibilidad para ionizar el hidroxilo en el carbono 3, formando un anión que puede ser estabilizado por resonancia. El isómero L es la

forma natural de la vitamina, el cual tiene propiedades nutricionales (Serra y Cafaro, 2007).

4.3 Órganos donde se encuentra el ácido ascórbico

El AA se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de los tejidos del cuerpo, existe un equilibrio entre el ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico (EFSA, 2013). Se encuentra en el plasma y en concentración alta en la corteza y cuerpo lúteo (Mollinedo y Carrillo, 2014).

4.4 Absorción

En los seres humanos el ácido ascórbico es esencial para todas las funciones biológicas, incluidas reacciones enzimáticas y antioxidantes. Se absorbe en el intestino delgado en un proceso activo que depende de sodio, siendo SVTC-1 (*sodium-dependent vitamin C transporter 1*), el transportador selectivo para L del AA y el ácido L-dehidroascórbico (ADA), pero no para la molécula de glucosa; también se cuenta con el SVTC-2. Ambos transportadores son similares en su estructura y funcionalidad, aunque estos se distribuyen en órganos diferentes, ya que SVCT-1 se encuentra en intestino, pulmón e hígado, mientras que SVCT-2 está en ojo y cerebro. El AA puede también ser incorporado a diversas células como lo son neutrófilos y células del sistema nervioso a través de transporte facilitado a través de poros de la membrana o por proteínas de transporte específicas, de una membrana biológica, en respuesta a una concentración o gradiente electroquímico, facilitado, no específico, mediado por el transportador de

glucosa GLUT 1, el cual solo transporta las formas oxidadas, tanto del ácido ascórbico, como del ácido L-dehidroascórbico. Este mecanismo depende de las concentraciones de glucosa que se encuentren en plasma sanguíneo.

El AA purificado, también puede ser administrado vía oral, intravenosa, subcutánea e intramuscular (Serra y Cafaro, 2007).

4.5 Degradación

Por su estructura química el AA es fuertemente sensible a la degradación por un sin número de factores. Por ejemplo, el pH, algunas enzimas, la concentración de oxígeno presente, algunos catalizadores metálicos, la concentración inicial del ácido, así como también la relación de ácido ascórbico y ácido L-dehidroascórbico. La degradación de este compuesto se da mediante procesos oxidativos, por la donación de dos electrones. Primero se convierte a un mono-anión de ascorbato y con la pérdida de un consecutivo electrón se convierte en ADA. Éste se encuentra susceptible a la hidrólisis del anillo lactona, por lo que puede hidrolizarse y produce 2,3-dicetogulónico, el cual es degradado por medio de una decarboxilación y pierde su valor nutricional (Serra y Cafaro, 2007).

4.6 Excreción

Dos metabolitos del ácido ascórbico han sido reportados, el oxalato y el ácido ascórbico-2-sulfato. El AA es desechado rápidamente cuando el umbral renal plasmático de 1.5 mg/100 ml es excedido (Hernández y Sastre, 1999). Éstos metabolitos son eliminados a través de la orina y el sudor (Mollinedo y Carrillo,

2014). También se elimina por heces una fracción del AA que no haya sido absorbido (Valdés, 2006).

4.7 Importancia

4.7.1 Funciones fisiológicas

El AA tiene propiedades antioxidantes, en la medida en que disminuyen la propagación de radicales libres. El AA por su fuerte propiedad reductora destruye radicales libres transformándose en ácido dehidroascórbico. Fácilmente puede de nuevo transformarse en ascorbato, dependiendo de las condiciones del tejido. Si el tejido se encuentra alterado se reduce esta capacidad, limitándose solo a su función inactivadora del AA sobre radicales libres.

La función inactivadora del AA sobre radicales libres puede ser mediante dos mecanismos:

Acción primaria, siendo cofactor de reacciones de intercambio de electrones en reacciones metabólicas, que inactivan radicales libres de tipo superóxidos, hidroxilos, peroxilos y nitróxidos, relacionados con peroxidación de lípidos y daño oxidativo sobre DNA y proteínas. Reduciendo especies reactivas de oxidación particularmente nocivas, como oxígeno y nitrógeno reactivo. Reduciendo algunos metales oxidados, como hierro y cobre.

Acción secundaria, reduciendo reacciones redox del organismo, como la del glutatión. Regenerando el alfa-tocoferol (vitamina E) y los carotenoides, los cuales protegen tejidos y estructuras orgánicas, proteínas plasmáticas, líquido seminal y granulocitos neutrófilos durante la inflamación. A nivel celular y tisular, actúa

protegiendo el daño oxidativo del material genético, previniendo la carcinogénesis y mutaciones.

Su acción sobre el colágeno es de gran importancia ya que actúa como cofactor reductor de los iones férrico y cúprico, en la hidroxilación de la prolina y la lisina, necesarios para la síntesis y estabilidad de la triple hélice del colágeno (Barbany y Javierre, 2006).

El AA, en sus formas de ácido L-ascórbico y ácido semidehidroascórbico, reduce radicales oxidativos donando un electrón, proceso en el cual es convertido en ácido semidehidroascórbico o dehidroascórbico, respectivamente. Junto a la vitamina E se ha demostrado que es capaz de suprimir la apoptosis.

El AA es transportado a diversos tejidos, incluyendo cuerpo lúteo, por transportadores dependientes de energía y sodio, SVCT1 y SVCT2, los cuales han sido descritos en diversas especies. En Humano, cerdo, conejillo de indias, ratas y ratones se tienen las secuencias primarias de éstos transportadores proteicos, aunque no se han descrito en ovejas. Son altamente conservativos, siendo probable que las ovejas también los expresen, con estudios realizados se encontró una homología de estos receptores con el humano (90%), el cerdo (90%), la rata (87%) y el ratón (87%) (Ceddia *et al.*, 2005).

El ácido ascórbico cuenta con otras funciones no enzimáticas:

1. Favorece la absorción del hierro con la reducción a un estado ferroso, en el estómago.
2. Protege de la oxidación a la Vitamina A, Vitamina E y algunas del Complejo B.

3. Es considerado un antioxidante biológicamente importante. Se ha reportado que bajo cantidades adecuadas de antioxidantes como el AA y el β -caroteno en la dieta reducen el riesgo de presentación de cáncer.
4. El AA es necesario para el metabolismo de la tirosina, así como para la hidroxilación del colesterol a ácido cólico.
5. Además es indispensable para la conversión de 3,4 dihidroxifeniletamina en noradrenalina, 4-butirobetaína en carnitina y triptamina en 5-hidroxitriptamina que es la serotonina (Hernández y Sastre, 1999).

4.8 Requerimientos

La dosis diaria recomendada en humanos es de 75 mg/día en mujeres y 90 mg/día en hombres. En nuestro organismo se encuentra disponible una cantidad de AA de entre 1.2 y 2 g, siendo aproximadamente 20 mg por kg de peso. La vida media de este compuesto es de 10 a 20 días (Valdés, 2006). En rumiantes es desconocido el requerimiento de este compuesto, y aunque no se considera un nutriente esencial, bajo ciertas condiciones físicas y fisiológicas específicas es necesaria su suplementación (Kim *et al.*, 2012).

4.8.1 Problemas por la falta de ácido ascórbico

En algunas encuestas realizadas en diversos países de América Latina, Asia y África, se muestra que una gran cantidad de las poblaciones consumen cantidades de ácido ascórbico menores a las consideradas esenciales o recomendadas.

La enfermedad clásica causada por estas deficiencias es el escorbuto, aunque esta ya no es tan común actualmente, pero si es frecuente en campos de refugiados, durante la hambruna y en cárceles. El escorbuto se presenta por la falta de vasos sanguíneos pequeños y capilares débiles y frágiles, por lo que sangran y provocan hemorragias en diversos lugares del organismo. La carencia subclínica de este compuesto también puede provocar una pobre cicatrización de heridas o úlceras, una anomalía en el nivel de ácido ascórbico plasmático, puede inducir una anemia durante el embarazo (Latham, 2002).

En los animales, lo más relevante de la deficiencia de este compuesto es que produce una menor resistencia al estrés (Rodríguez y Barrio, 2005). Se ha demostrado que la deficiencia de AA puede reducir la formación de carnitina, resultando en una acumulación de triglicéridos en sangre, dando una fatiga física.

Si el lugar de síntesis de AA, el hígado, se encuentra dañado, su suministro en rumiantes se encontrará afectado, ya que el AA dietético es fácilmente degradado en rumen, siendo más propensos a deficiencias los animales con hepatopatías (Kim *et al.*, 2012).

4.9 Efecto del ácido ascórbico

Uno de los métodos que se han utilizado para el control del estrés es el ácido ascórbico (AA), el cual es considerado un importante antioxidante por sus propiedades redox. Además, tiene influencia en la movilidad fagocítica celular y la quimiotaxis (Black y Hidioglou, 1996). Existen informes de que la suplementación AA mejora la función inmune y mejora la resistencia a la infección (Kim *et al.*, 2012).

Estudios en animales han sugerido que la suplementación con AA reduce la liberación de cortisol inducida por el estrés, además de otros indicadores del mismo, lo que lleva a evitar la mortalidad por la exposición excesiva a un estresor. El AA está relacionado directamente con la atenuación del mecanismo suprarrenal (Brody *et al.*, 2002).

Otra de las capacidades del AA es su acción sobre el colágeno, ya que actúa como cofactor reductor de los iones férrico y cúprico, en la hidroxilación de la prolina y la lisina, necesarios para la síntesis y estabilidad de la triple hélice del colágeno (Barbany y Javierre, 2006). También se ha encontrado que junto a la vitamina E es capaz de suprimir la apoptosis (Ceddia *et al.*, 2005).

4.9.1 Rumiantes

Dado que la mayoría de las especies animales son capaces de sintetizar el AA en el hígado, gracias a la enzima L-gulanolactona oxidasa, que realiza la conversión de ácido gulónico a gulanolactona, a menudo no se considera al AA como un nutriente esencial. A pesar de esto se ha reportado una baja de las concentraciones plasmáticas durante el estrés patológico y térmico. Se ha descrito que la síntesis de AA comienza en terneros de entre 2 y 3 semanas de vida, por lo que un joven ternero obtiene AA de la leche, aunque su contenido es bajo (Kim *et al.*, 2012). El AA se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de los tejidos del organismo, incluyendo tejidos endocrinos y leucocitos (Kim *et al.*, 2012), existiendo un equilibrio entre el AA y el ácido dehidroascórbico. Se ha indicado que, en los rumiantes, es de gran importancia en condiciones de estrés por frío, por lo

que requiere de mayor cantidad, ya que la síntesis de éste se ve afectada en tales condiciones (Black y Hidiroglou, 1996; EFSA, 2013).

4.10 Función del ácido ascórbico como inmunoestimulante

El ácido ascórbico se ha investigado especialmente en seres humanos y animales de laboratorio, en torno a sus características de oxidación y reducción reversible (Matsui, 2012).

En su papel de antioxidante, AA es una de las primeras defensas en sangre contra los radicales libres por medio de su transformación a ADA (Ceddia *et al.*, 2005; Barbany y Javierre, 2006) que ayuda a la movilidad fagocítica celular y la quimiotaxis de leucocitos (Black y Hidiroglou, 1996; Matsui, 2012) debido a la protección de la integridad de las células del sistema inmune (Hidiroglou *et al.*, 1997) (Figura 2), mejorando la función de la respuesta inmune y causando la resistencia a la infección (Kim *et al.*, 2012).

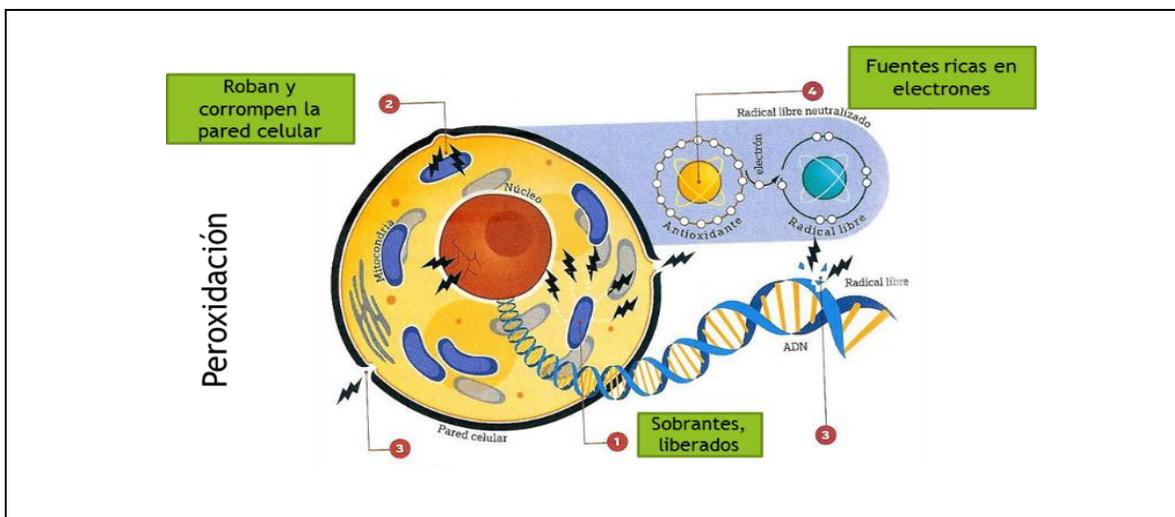


Figura 2. Antioxidantes vs Radicales libres

Imagen tomada de <http://www.consejosfitness.com/que-son-los-radicales-libres>

Protege a neutrófilos contra el estrés oxidativo eliminando especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales causan daño celular y tisular, llevando a la progresión de enfermedades (Pohanka *et al.*, 2012) además estimula la producción de interferón, lo cual genera una protección en las células contra un ataque viral (Matsui, 2012).

La cantidad de AA necesario para mejorar la respuesta inmune en rumiantes, puede ser mayor que la que se proporciona en dosis normales para las necesidades nutricionales (Hidiroglou *et al.*, 1997).

En cuanto a la regulación del sistema inmune, no se conoce bien cuál es la función del AA. Sin embargo, se tiene descrito por algunos autores un efecto potenciador sobre la producción de algunos isotipos de inmunoglobulinas. En ratas al administrar dosis altas de AA, y exponerlas a un antígeno, estimula la respuesta de TH1, es decir, produce respuestas proinflamatorias necesarias para atacar parásitos intracelulares y resistir respuestas autoinmunes, siendo el interferón gamma la principal citocina de este tipo. También disminuye el nivel de IgG e IgE; de manera contraria podría suprimir vías relacionadas con el TNF α , NF- κ B, proteína quinasa C y MAPK p38 (Berger, 2000; Pohanka *et al.*, 2012).

Es por eso que se sugiere que en animales de granja que son susceptibles al estrés oxidativo, debido a la exigencia de una alta productividad y eficiencia económica (Kobayashi *et al.*, 2009), la administración de este tipo de antioxidantes puede ayudar a la mejora de estas complicaciones.

4.11 Influencia del AA en el bienestar animal

El bienestar animal se define como el estado de salud mental y salud física de un animal que se encuentra en armonía con su medio ambiente. La presencia o ausencia de estrés, se ha considerado un indicador potencial de éste concepto (González *et al.*, 2013; Santamaría *et al.*, 2015).

Para que se lleve a cabo en un establecimiento productivo de manera adecuada, de acuerdo a lo descrito por González *et al.*, el animal debe de contar con una serie de libertades:

1º Vivir libre de desnutrición (hambre y sed).

2º Libre de temor y angustia.

3º Libre de molestias tanto físicas como térmicas.

4º Vivir libre de enfermedades (lesiones y dolor).

5º Contar con la libertad para presentar su comportamiento natural (González *et al.*, 2013).

Cuando un animal se ve afectado en una o más de estas libertades y/o percibe una situación de miedo o amenaza para llevar a cabo sus propósitos productivos, puede presentarse el estrés. El estrés es considerado como una respuesta biológica del individuo, cuando uno o más factores influyen interna o externamente en el animal (temperatura, manejo, alimentación, adaptación, etc.). Esto provoca que el animal se esfuerce para mantener el equilibrio entre sí mismo y su entorno. Cuando el estrés se torna excesivo y negativo, éste presenta una situación de disestrés, siendo la verdadera amenaza para el animal (Moberg y Mench, 2000; Roca, 2011).

El correcto funcionamiento de un organismo, se mantiene por medio de la homeostasis, que constantemente se ve obligada a actuar frente a factores exógenos llamados estresores (estímulo ambiental capaz de afectar la homeostasis), provocando estrés. El estrés altera el equilibrio de las funciones del animal (Álvarez, 2008). Los estresores generan respuestas que perjudican no sólo el bienestar del animal, sino también, en una proporción variable, la calidad del producto que se obtiene (Damián y Ungerfeld, 2013). Dependiendo de la intensidad y duración del estímulo se desencadenan respuestas tanto en el comportamiento como fisiológicas, las cuales afectan estructuras somáticas y viscerales del animal, provocando alteraciones nerviosas, endocrinas y metabólicas (Carmen, 2005).

4.11.1 Mecanismo del estrés

De acuerdo a Vélez y Uribe el mecanismo de estrés está basado en dos conceptos: el Síndrome de Emergencia y el Síndrome General de Adaptación (SGA) (Vélez y Uribe, 2010). Enfatizaremos en el segundo concepto, ya que es el tema de interés y donde se tiene una acción del AA. El SGA, corresponde a una teoría de adaptación, el cual consta de tres fases:

1. La respuesta inmediata, automática, defensiva y antiinflamatoria, dada por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), en el cual actúa el Sistema Nervioso Central (SNC) (Figura 3).
2. Resistencia, el organismo intenta superar, adaptarse y afrontar la presencia de estresores (factores de amenaza). En esta fase también participa el eje hipotálamo-

hipófisis-adrenal, pero en este caso se normalizan los niveles de corticoesteroides, desapareciendo así la sintomatología.

3. Reacción de agotamiento, en esta fase el estímulo crónico sobrepasa los niveles que el organismo resiste, ocasionando un aumento de la actividad endocrina, afectando los sistemas y aparatos orgánicos, pudiendo ocasionar la muerte (Vélez y Uribe, 2010; Damián y Ungerfeld, 2013).

En los establecimientos de producción animal, se generan cotidianamente situaciones de estrés, por el estricto manejo zootécnico (ej. descole, extracción de sangre, pesaje, vacunación, desparasitación, corte de pezuñas, destete, transporte, etcétera) y por la densidad animal en ellas. Esto genera agentes estresantes agudos y de corto plazo, que elevan los niveles de adrenalina inmediatamente por ser respuestas a una situación de miedo y/o amenaza, y agentes estresantes a largo plazo (confinamiento y/o hacinamiento, aislamiento social, temperaturas altas) aumentando los niveles de cortisol permanentemente, afectando de modo significativo la función reproductiva por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, su crecimiento, deprimiendo su sistema inmune, llegando a provocar patologías y muerte (Álvarez, 2008; González *et al.*, 2013).

La suplementación de AA, participa de manera importante en la mejora de las condiciones, reduciendo la liberación de cortisol inducida por el estrés, además de otros indicadores del mismo, lo que lleva a evitar la mortalidad por la exposición excesiva a un estresor. El AA está relacionado directamente con la atenuación del mecanismo suprarrenal, según lo mencionado por Brody *et al.*, 2002.

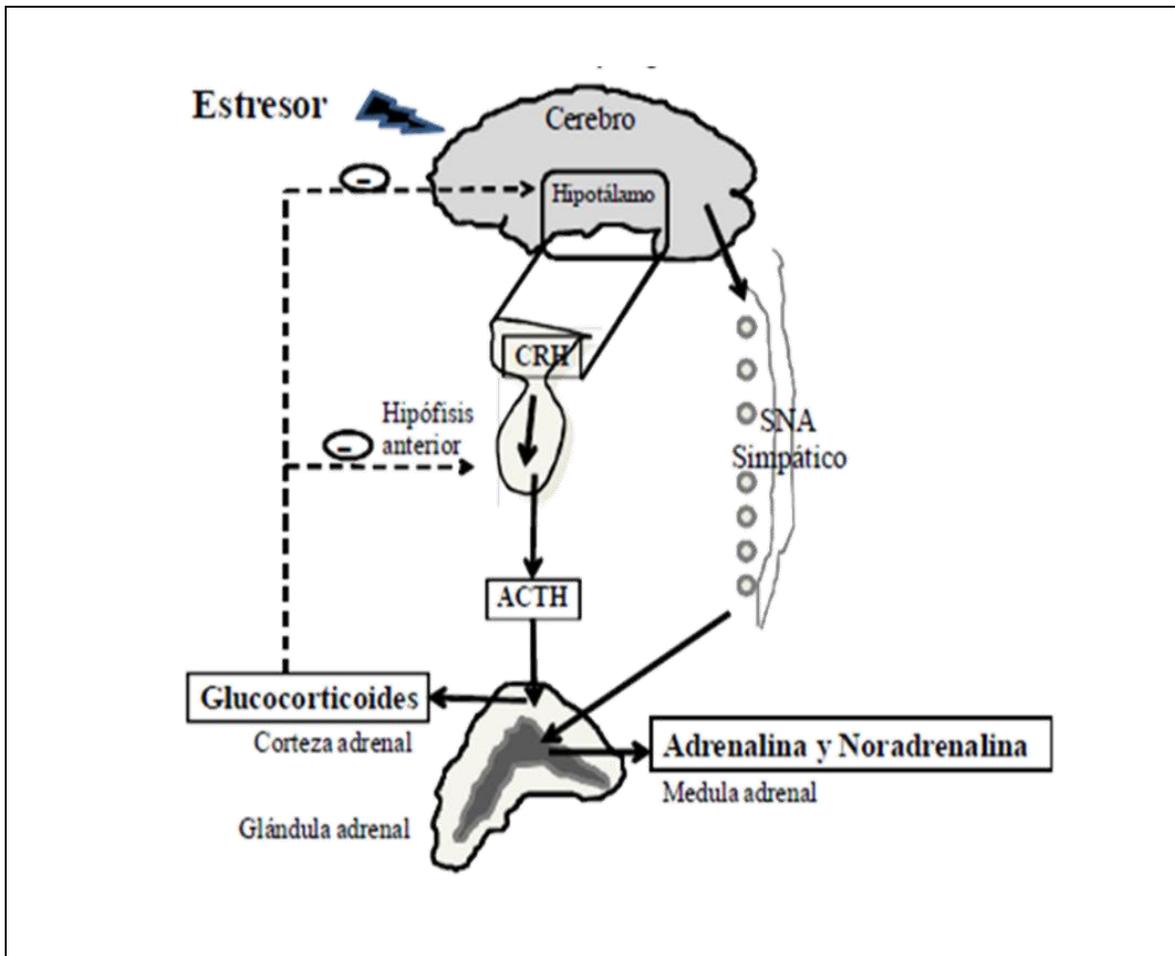


Figura 3. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, liberación de glucocorticoides desde la corteza adrenal, y Eje simpático-adrenomedular liberación de adrenalina desde la médula adrenal

ACTH: hormona Adrenocorticotropa; CRH: hormona liberadora de corticotropina; SNA: sistema nervioso autónomo (Damián y Ungerfeld, 2013).

Un estudio realizado en codornices estresadas y no estresadas, dio como resultados en ambos casos que el ácido ascórbico redujo la inmovilidad tónica frente a reacciones de amenaza, por lo que se ha sugerido un efecto en la experiencia de estrés del animal, así como en el sistema endocrino relacionado con la liberación de cortisol (Minka *et al.*, 2009), esto último también demostrado en cabras (Sunil *et al.*, 2010). Por lo tanto, no está claro si el ácido ascórbico tiene su efecto en un nivel

psicológico de la valoración de estrés o en algún momento en el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (Minka *et al.*, 2009).

Otro estudio en aves ha reportado que la adición de AA en la dieta antes de llevar al sacrificio, reduce la respuesta al estrés inhibiendo la liberación de ACTH y enzimas de las glándulas suprarrenales, por ende, disminuyendo la secreción de glucocorticoides y mineralocorticoides (Rubio *et al.*, 2015).

Se ha demostrado la importancia del AA en la aclimatación en frío de los rumiantes. Black y Hidiroglou (1996) mencionan que en corderos por tener una fase monogástrica son capaces de utilizar el AA vía oral exógeno.

4.11.1.1 Efectos de los glucocorticoides en el sistema inmune

Cuando un organismo se encuentra en condiciones de estrés prolongado, las acciones excesivas de los productos del eje HHA y del Sistema Nervioso Simpático pueden provocar alteraciones patofisiológicas en diversos sitios del individuo, incluyendo al sistema inmune.

La ACTH causa la liberación de glucocorticoides por parte de la corteza adrenal, los cuales son considerados inmunosupresores. La ACTH actúa directamente sobre linfocitos, siendo posible que éstos también sinteticen ACTH. Así, la liberación de ACTH de la hipófisis, así como la posible liberación en linfocitos activados, tiene un efecto inhibitorio sobre el sistema inmune. Los corticoesteroides afectan negativamente varios aspectos de la inmunidad mediada por células, cambiando el tipo de respuesta dada por Th1 a Th2 de acuerdo a lo descrito por Sánchez *et al.* (2007).

4.12 Métodos para la cuantificación de ácido ascórbico

La *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC) recomienda determinar las diversas vitaminas mediante varios métodos, tales como espectrofotometría, fluorometría, incluso por métodos microbiológicos. Uno de los principales métodos de medición ha sido la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), ya que a este método se le ha acoplado los detectores fluorométricos y espectrofotométricos, lo que nos permite analizar las vitaminas contenidas tanto en compuestos farmacéuticos como en una fuente natural. Un método rutinario también es la volumetría, el cual puede ser aplicado en un laboratorio de control de calidad de diversos alimentos; éste es la mejor opción cuando no se tiene el equipo de alta tecnología necesario (Zago *et al.*, 2010).

4.12.1 Cuantificación en alimentos

El método volumétrico es uno de los más utilizados en la industria alimenticia por ser accesible y de fácil aplicación, además de estar recomendado por la AOAC.

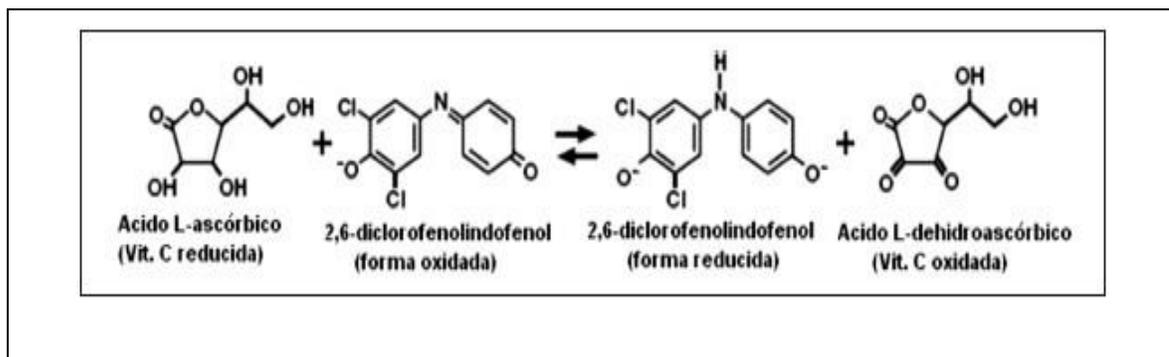


Figura 4. Reacción de oxidación del ácido ascórbico

(Zago *et al.*, 2010)

Este se aplica mediante la titulación con el indicador redox 2,6-diclorofenolindofenol. El análisis consiste en la oxidación del ácido ascórbico por medio del colorante redox 2,6-diclorofenolindofenol, el cual es de color azul en medio básico y de color rojo en medio ácido, reduciéndose este compuesto cuando se encuentra ante la presencia del AA (Figura 4). El resultado se interpreta como que el ácido ascórbico es directamente proporcional a la capacidad de un extracto de la muestra para reducir una solución que es estándar determinada por titulación (Zago *et al.*, 2010).

4.12.2 Cuantificación en organismo

Se han utilizado métodos colorimétricos para determinar la concentración plasmática de ácido ascórbico en rumiantes, aplicando variadas reacciones basadas en la oxidación de AA. Estos métodos han presentado baja especificidad y son afectados por algunas otras sustancias reductoras contenidas en el plasma sanguíneo. Por ello también se determina el contenido de AA por medio de HPLC en plasma. Se han realizado comparaciones en estudios con plasma bovino usando HPLC con un detector espectrofotométrico después de un tratamiento con ditioeritritol y del método α, α' -dipiridilo, el cual es un método colorimétrico. En esta comparación se demostró que el método colorimétrico proyectó concentraciones más elevadas de AA respecto al HPLC, por lo cual se ha determinado que la mejor forma de determinación de AA en el organismo es mediante una cromatografía líquida dada su confiabilidad (Matsui, 2012).

4.13 Diversos estudios con ácido ascórbico

El cuadro 1 se presentan los diversos resultados que se han obtenido en estudios similares a lo largo de los últimos años con un enfoque en nuestro tema de interés.

Cuadro 1. Estudios relacionados con la administración de AA en diferentes especies animales

Sistema Inmune	Bienestar Animal	Especie	Año	Autor
Aumento de la resistencia a la infección de <i>E. ictaluri</i> , la producción de ac's y la respuesta del complemento. Mejora la fagocitosis.	Administración de 30, 60, 150, 300 y 3000 mg/kg de AA. Mejora peso corporal con niveles altos de AA.	Peces	1985	Li y Lovell
NA	Con la administración de 10g/d de AA, hubo una disminución de cortisol, con estrés por transporte.	Bovinos	2003	Tyler y Cummins
Incremento de glóbulos blancos, monocitos, linfocitos.	Adición de AA a 800 mg/kg en la dieta podría mejorar la inmunidad humoral bajo estrés por calor.	Aves	2003	Worapol <i>et al.</i>
NA	Aumento de ganancia de peso final y diaria, adicionando 500, 750, y 1000 mg/kg de AA en la dieta, bajo estrés por calor.	Ovinos	2008	Abd-El-Monem <i>et al.</i>
Incrementa la concentración lisosomal.	La administración de AA a razón de 10 mg/kg inyectado, tiene un efecto inmunoestimulante, cuando se realiza una privación de calostro.	Camellos	2008	Al-Sultan
Disminución en conteo de neutrófilos.	Reducción del efecto adverso, de la tensión en las cabras impuestas por la manipulación, carga y transporte, al administrar 100mg/kg de AA antes del transporte.	Caprinos	2009	Minka <i>et al.</i>
Aumento de la respuesta linfoproliferativa y la inmunidad mediada por células.	Alivia los efectos del estrés oxidativo, una administración de 15 g/animal/día de AA más 12.5 g/a/d de carbonato de potasio, más 10 g/a/d de AA polifosfato.	Búfalos	2010	Sunil <i>et al.</i>
Aumento de N/L, proteína total, globulina, albumina.	El administrar AA a razón de 250 mg/kg, mejora los parámetros hematológicos, por lo tanto, reduce los efectos adversos del estrés, cuando son transportados durante 8 horas en temporada harmattan.	Porcinos	2011	Adenkola <i>et al.</i>
Incremento de glóbulos rojos, hematocrito, hemoglobina, linfocitos, monocitos, proteínas totales, glucosa y colesterol. Disminución en conteo de neutrófilos y eosinófilos.	Efecto beneficioso del AA en dosis de 25, 50 y 75 mg/kg, aumentando parámetros sanguíneos, en animales afectados por estrés calórico.	Ovinos	2011	Babe
Mejora de la relación de neutrófilos/linfocitos y eosinopenia.	Mejora de los efectos de la carga y transporte con la administración de 100 mg/kg de AA.	Caprinos	2011	Minka y Olusegun
Menor sensibilidad de los leucocitos contra el efecto citotóxico de <i>M. haemolytica</i> . Ejerce un efecto protector en los leucocitos.	El administrar vitamina C y E (2.5 g/animal y 750 UI, respectivamente), como apoyo para el tratamiento y profilaxis de CRB, en animales después de transporte.	Bovinos	2011	Urban <i>et al.</i>
Células blancas disminuyeron, conforme el nivel de administración de AA. Linfocitos aumentaron. Títulos de ac's contra Newcastle aumentaron.	Al administrar 150, 350, 550 mg/kg de AA, se encuentra una mejoría en el peso corporal. Beneficia el estado del animal por efecto de estrés térmico.	Aves	2012	Elagib y Omer
NA	La suplementación de AA (5 g, 2 veces al día) tras el estrés prolongado, aumenta sus concentraciones plasmáticas.	Equinos	2012	Ralston y Stives
Valores de Alanina aminotransferasa, Aspartato aminotransferasa y Fosfato creatinin quinasa se incrementaron.	La administración de AA a 100 mg/kg, mejora el efecto del estrés debido al transporte por carretera y el post-pastoreo facilitado la recuperación de las cabras en tensión.	Caprinos	2013	Minka y Olusegun

Sistema Inmune	Bienestar Animal	Especie	Año	Autor
Incremento en proteína total, albúmina, globulina, glucosa, colesterol y calcio en sangre.	La suplementación con AA a razón 2.5 g/d mejora los efectos adversos del estrés por calor durante la temporada de verano.	Ovinos	2014	Abd-Allah y Zouny
Incremento de células rojas y blancas, y disminución en Neutrófilos/Linfocitos, además de cortisol.	La administración de AA a razón 125 mg/kg alivia los efectos del estrés por transporte, modulando la respuesta fisiológica.	Ovinos	2014	Kassab y Mohammed
NA	No permitió el aumento de corticosterona, la administración de 500 mg/1 litro de agua.	Ratas	2014	Lodhi <i>et al.</i>
Disminución de la mortalidad.	Efecto en la conversión alimenticia, administrando 300 ppm de AA.	Aves	2015	Majekodunmi <i>et al.</i>
Aumento del conteo eosinófilo.	Modula la neutrofilia e induce alteración de marcadores eritroides, con la administración de AA a 200 mg/kg oral al someterlos a aglomeración durante la temporada harmattan.	Asnos	2015	Olaiya <i>et al.</i>
Elevado título de anticuerpos frente varias vacunas.	El suministro de extracto de cáscara de naranja a 1000 ppm y 1250 ppm en las raciones puede ayudar a mejorar respuesta inmune relativa.	Aves	2015	Pourhossein <i>et al.</i>

*NA: no aplica, ac's: anticuerpos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

El presente trabajo se realizó en el Rancho Santa Úrsula, el cual se dedica a la Cría y engorda de ovinos de las razas Katahdin y Dorper, así como de sus cruzas. Su Ubica en el municipio de Ciénega de Flores en la Carretera Monterrey-Nuevo Laredo en el km 21.5.

Este municipio cuenta con una superficie de 156.2 kilómetros cuadrados, colindando al norte y al oeste con Salinas Victoria, al sur con Apodaca y General Zuazua y al este con General Zuazua, en el Estado de Nuevo León. Tiene un clima seco estepario cálido, con temperatura media anual de 23º C. Tiene una precipitación promedio anual de 624 mm. Los vientos dominantes son los del noreste al este y del norte al sur (SEGOB, 1998).

5.2. Colecta en campo

Se utilizaron 60 ovinos de aproximadamente de 2 meses de edad, de 1 día de destetados y de un peso de entre 16 y 27 kg, los cuales se distribuyeron por medio de un diseño de bloques al azar por parte del peso del animal. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamientos, siendo: Tratamiento 1: con 15 animales que se les denominó Grupo Control (GC); Tratamiento 2: también con 15 animales en el Grupo con Dosis de Referencia de Ácido Ascórbico (AA) (GDR), a los que se les administraron 75 mg/kg de peso (Babe, 2011) vía oral; Tratamiento 3: con 15 animales en el Grupo con Cáscara de Naranja a los que se les ofrecieron 100 g/día por cada animal de cáscara de naranja molida (GCN) y el Tratamiento 4:

con 15 animales en un Grupo con Cáscara de Naranja (100 g) y con Dosis de Referencia de AA (75 mg/kg) (GCNDR).

Los animales fueron alojados en 3 corrales a razón de 20 borregos por corral de 6.2 m por 4.2 m dando un espacio de 1.3 m²/animal, Se colocaron 5 animales del grupo control bien identificados en cada corral para dar un total de 20 animales por corral.

Todos los animales se expusieron al mismo manejo zootécnico (vacunación, desparasitación, dieta, pesaje, cambio de ubicación) y a las condiciones climáticas durante el período experimental que inició el 4 de julio del 2015 y finalizó el día 2 de agosto del mismo año.

5.3 Método para la obtención de sangre

Se obtuvieron muestras sanguíneas por punción de la vena yugular, utilizando tubos Vacutainer® sin EDTA y con EDTA. Las muestras se tomaron al comienzo, a los 15 días y al final del experimento, y se mantuvieron en refrigeración en hieleras para su traslado al Laboratorio de Fisiología, Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en donde se realizó el procesamiento de las muestra. Las muestras contenidas en los tubos sin EDTA se sometieron a centrifugación refrigerada a 4° C a 2500 rpm por 10 minutos, en una centrifugadora de la marca Hermle-Labortechnik® de modelo Z300 K, para obtener el suero. El suero obtenido se almacenó en tubos Eppendorf y se mantuvo en congelación a -20° C para su posterior análisis de cortisol, así como análisis

diferencial de albuminas y globulinas. Las muestras con EDTA se mantuvieron en refrigeración para su análisis.

5.4 Temperaturas. Humedad relativa

5.4.1 Temperatura rectal

En cada grupo de animales (Grupo 1 control; Grupo 2 Tratamiento AA; Grupo 3 tratamiento CN; Grupo 4 tratamiento de administración de AA más CN), se obtuvo la temperatura rectal semanalmente de todos los animales de estudio con un termómetro digital de la marca Omron® modelo MC-102 con una precisión de 0.1°C, con la finalidad de conocer si tenían algún trastorno que pudiera alterar su estado. Algunos autores (Hernández *et al.*, 2007; Montoya *et al.*, 2013) mencionan que este indicador que comparándolo con la temperatura ambiental podría revelar algún estado de estrés calórico.

5.4.2 Temperatura ambiental y humedad relativa

Diariamente se registró la temperatura ambiental en el Rancho Santa Úrsula, con un termohigrómetro modelo HTC-1 (marca Lonn, China) el cual registra un rango de temperatura de -50° C a 70° C con una resolución de 0. 1° C. La humedad relativa (HR) es registrada con un rango que va desde el 10% a 99% con una resolución de 1% de HR. Con estas mediciones se pudo determinar bajo qué condiciones climáticas se encontraban los animales y en qué condiciones se desarrolló el experimento.

5.5 Pesaje

Los 60 ovinos de los 3 tratamientos (Tratamiento 1: con 15 animales Control, Tratamiento 2: también con 15 animales en el Grupo con dosis de Referencia, de AA (GDR), Tratamiento 3: con 15 animales en el Grupo con Cáscara de Naranja) fueron pesados un día antes del día 0 y el día 0, para calcular un promedio del peso corporal de ambos días al inicio de la investigación. Posteriormente se pesaron los animales a intervalos quincenales, es decir, al día 15 y el día final del experimento. Esto se realizó con una báscula de la marca Gallagher® modelo W810 v2, con una capacidad de 2,000 kg y con una resolución de 0.1 kg. Ésta variable fue registrada para determinar si hubo un aumento o disminución de los pesos de los animales sometidos a los diversos tratamientos. Estos resultados se muestran reunidos por tratamientos en la sección de resultados (Figura 16), este parámetro fue analizado por medio de un bloques al azar y análisis de varianza por Tukey.

5.6 Procesamiento de muestras en el laboratorio

5.6.1 Sangre completa

Con la muestra de sangre colectada en tubos con EDTA, se realizó un Hemograma completo para verificar los parámetros de hematocrito, proteínas totales, conteo de glóbulos blancos, y un diferencial de los glóbulos blancos para saber qué tipo de células se encontraban en la sangre de los animales en esos momentos. Una muestra de sangre se tomó con un capilar heparinizado de capacidad de 60 µl, de la marca Kimbel Chase®, el cual se colocó en una centrifugadora de capilares de la marca Gemmy Industrial Corp.® modelo KHT-400

por espacio de 5 minutos a 12,000 rpm, obteniendo así la separación de paquete celular de eritrocitos, plasma y capa leucocitaria en el tubo. Posteriormente el tubo capilar del microhematocrito se colocó en la tabla de lectura para conocer el valor del paquete celular.

5.6.1.1 Conteo de glóbulos blancos

Para el conteo de Leucocitos utilizamos un líquido de dilución llamado líquido diluyente de Türk, que se compone de las siguientes sustancias:

Por cada 100 ml de agua destilada:

Ácido acético glacial 2 ml

Solución acuosa de violeta de genciana o azul de metileno al 1 %.....1 ml

La función de este diluyente es que el ácido acético produce lisis de los eritrocitos sin alterar a los leucocitos y el violeta de genciana o azul de metileno tiñe el núcleo de los leucocitos para que estos puedan observarse mejor. Entonces se tomó una muestra de sangre con la pipeta de Thoma hasta la marca 0.5, después se rellenó con solución de Turk hasta la marca 11. La pipeta se colocó en un agitador de la marca Clay Adams® modelo 1171 por unos segundos, se tomó la pipeta y se retiraron las primeras 3 gotas, posteriormente la cuarta gota se colocó sobre una ranura de la cámara de Neubauer o hemocitómetro, en el cual se le colocó un cubre objetos previamente, y por capilaridad la gota de la muestra se distribuye por un lado de las cámaras, para así proceder a la lectura de los 16 cuadritos de la cámara a un aumento de 10x en un microscopio de la marca Zeiss®. El conteo de cada

muestra se realizó con la ayuda de un contador de células de la marca Unico®. La cuantificación de células blancas, Neutrófilos y Linfocitos fue realizada mediante este procedimiento en sangre completa que se obtuvo con los tubos Vacutainer® con EDTA (tapón violeta); utilizando el método tradicional con una cámara de Neubauer. Posteriormente se realizó la diferenciación de células blancas mediante un frotis sanguíneo con el mismo tubo de muestra, obteniendo Neutrófilos y Linfocitos, además de Monocitos, Basófilos y Eosinófilos al conteo de 100 células. Los resultados obtenidos se muestran en la sección de resultados y fueron analizados por un diseño completamente al azar y análisis de varianza por Tukey, (ver gráfica 3).

5.6.1.2 Frotis sanguíneo

De la sangre con EDTA se realizó un frotis sanguíneo para conocer datos importantes como la cantidad, morfología, y dimensión de las células componentes de la sangre, pudiendo esclarecer diversas patologías sanguíneas. Para ello se tomó una gota con una pipeta desechable y se colocó sobre un portaobjeto en la parte central y con otro portaobjetos se extendió la muestra a lo largo con un ángulo de 45° para que la extensión quedara como una capa fina de sangre, y con ello obtener un frotis sanguíneo. Después esta extensión se fijó en alcohol por unos segundos, luego se tiñó con los hemocolorantes Hematoxilina y Eosina para así diferenciar las diferentes células blancas contenidas en la muestra. Se dejaron secar y se etiquetaron para su identificación y posterior análisis al microscopio.

5.6.1.3. Proteínas totales por refractometría

Se obtuvieron las proteínas plasmáticas por medio de un refractómetro de la marca Sper Scientific® modelo 300005, solo para comparar el resultado con el del método de espectrofotometría. En el refractómetro se colocó una gota del suero previamente centrifugado del tubo de microhematocrito, el cual se rompe por encima de la placa leucoplaquetaria (Buffy coat) para depositar la gota en el lector del refractómetro. Éste es cerrado y en la escala del centro se visualiza un horizonte marcando la cantidad de proteína plasmática total que contiene, y obteniendo así el índice de refracción de cada muestra. Este paso fue efectuado, para la realizar como es indicado el hemograma completo.

5.6.2 Cortisol

Para determinar la concentración del cortisol en sangre se utilizaron 25 µl de suero, siguiendo las recomendaciones e indicaciones del fabricante del kit Bio-Cortisol del Grupo Mexlab®. Éste es un inmunoensayo de ELISA, que contiene estándares, enzima conjugada, solución de frenado, buffer de lavado y sustrato, para determinar los ng/ml de cortisol en cada muestra. El procedimiento fue realizado en una serie de pasos: 1) Pipetear 25 µl de estándares de cortisol, controles y suero problema, 2) Agregar 200 µl de enzima conjugada cortisol a los pocillos, 3) mezclar por 10 segundos, 4) Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente (18-26°C), 5) Remover el líquido de los micropozos por medio de 3 lavados con 300 µl de 1X buffer de lavado y secar con papel, 6) Agregar 100 µl de sustrato TMB a los micropozos, 7) Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos,

8) Agregar 50 µl de solución de frenado a todos los micropozos y agitar para mezclar, 9) Proceder a la lectura de absorbancia con un lector de micro ELISA a 450 nm después de 20 minutos transcurridos del último paso. Posteriormente se tomaron las absorbancias de cada muestra y se dio lectura según la curva de calibración para obtener la concentración de cortisol en ng/ml. Los resultados obtenidos se analizaron mediante una X^2 .

5.6.3 Proteínas totales, Albuminas y Globulinas

Una cantidad del suero congelado se utilizó para determinar cuantitativamente proteínas totales por un método colorimétrico mediante de la técnica Total Protein Biuret de Spinreact[®], con la ayuda de un espectrofotómetro de la marca Shimadzu[®] modelo UV-1800. Otra cantidad del suero congelado se utilizó para determinar cuantitativamente las albúminas por colorimetría por medio de la técnica Albumin Verde bromocresol de Spinreact[®], con la ayuda del mismo espectrofotómetro de la marca Shimadzu[®] modelo UV-1800. Al obtener los dos parámetros anteriores, se determinaron globulinas por la diferencia de ambas concentraciones en el suero (proteínas totales y albúminas). Los resultados fueron analizados por un diseño completamente al azar y análisis de varianza por Tukey.

6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron: Peso, Cortisol en suero, Relación de células blancas (N/L) en sangre, Temperatura rectal, Temperatura ambiente, Humedad relativa, Proteínas Totales, Albúminas y Globulinas. En el caso de Peso, N/L, Proteínas Totales, Relación Albúminas y Globulinas se obtuvieron resultados de los 60 animales en los tres muestreos y en el parámetro Cortisol solo analizaron y obtuvieron resultados de 40 animales en los tres muestreos.

6.1 Temperaturas y humedad relativa

6.1.1 Temperatura ambiental y humedad relativa

Como se mencionó anteriormente, se tomaron diariamente durante el periodo experimental la temperatura ambiente (TEM) y humedad relativa (HR), esto para tomar en cuenta el clima que estuvo predominando durante el estudio.

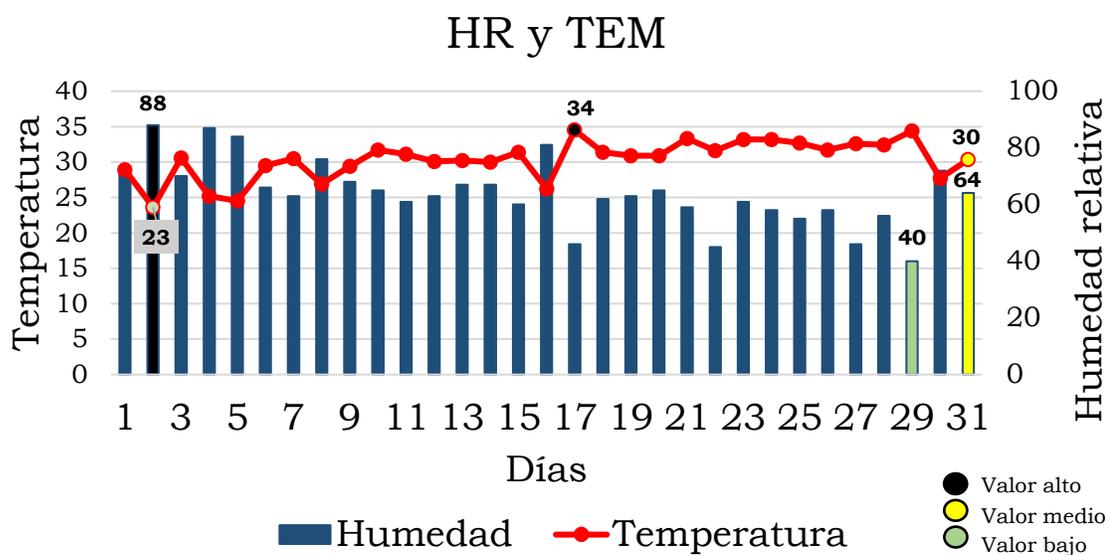


Figura 5. Humedad relativa y temperatura ambiental que se estuvo registrando durante los 30 días del estudio

En la Figura 5, se observó el valor de las temperaturas durante los 30 días de experimento. En el día 2 se registró la menor TEM con 23°C y la menor HR al día 29 con 40%, el valor medio de TEM se obtuvo al día 31 con 30°C y el de HR también al día 31 con 64%, y en cuanto a los valores más altos de TEM y HR, fueron de 34°C y 88%, respectivamente.

6.1.2 Temperatura rectal

Esta variable fue medida en 5 tiempos, es decir, semanalmente, contando el primer día del comienzo del estudio. Ver Figura 6.

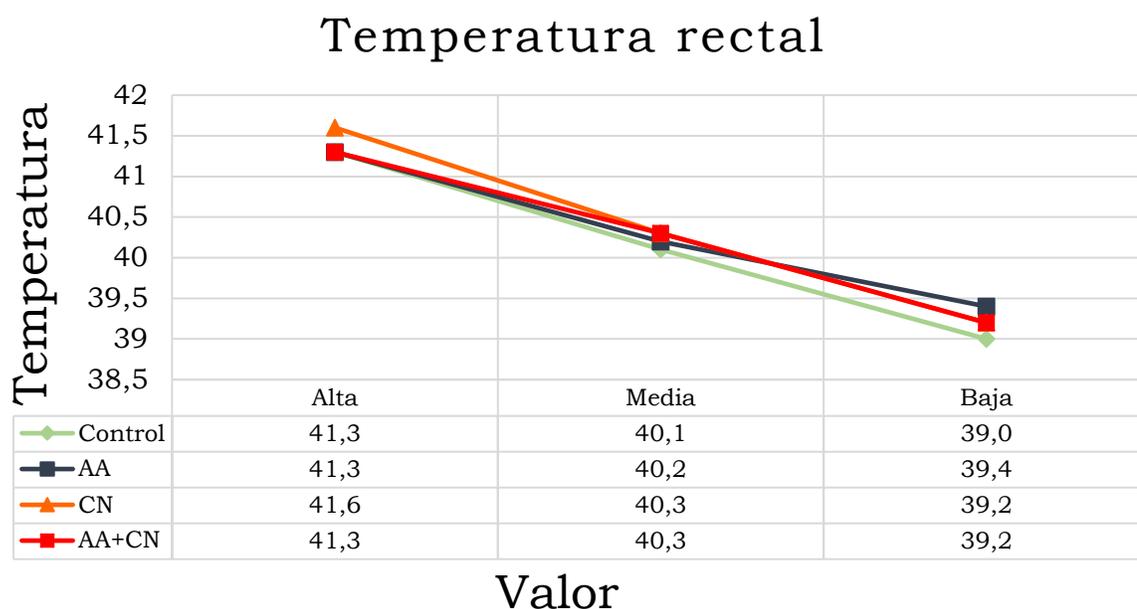


Figura 6. Temperatura rectal registrada de los animales en los cuatro tratamientos respectivamente

Se obtuvo en el tratamiento control una temperatura rectal (TR) alta a la muestra número 4 con 41.3°C y una baja a la muestra 3 con 39°C, obteniendo una temperatura rectal promedio de 40.18°C. En el tratamiento AA una TR alta a la

muestra 2 con 41.3°C y una baja a la muestra 3 con 39.4°C, con promedio de TR de 40.26°C. En el tratamiento CN se encontró una TR alta a la toma de muestra 2 con 41.6°C y una baja a la muestra 1 con 39.2°C, lo que nos dio un promedio de TR de 40.3°C. Y por último en el tratamiento AA+CN, se obtuvo una TR alta a la muestra 3 con 41.3°C y una baja TR a la muestra 1 con 39.2°C, con un promedio de TR de 40.34°C.

6.2 Hemograma

6.2.1 Relación Neutrófilos/Linfocitos en diferencial de sangre

La cuantificación de células blancas, Neutrófilos y Linfocitos fue realizada mediante un conteo de glóbulos blancos, el cual determinó una diferencia significativa entre tratamientos ($P > 0.05$), siendo el AA+CN con el mejor resultado obteniendo una media de 42.2 neutrófilos/100 células, seguido por el tratamiento de CN con 40.2 neutrófilos/100 células, los cuales son iguales estadísticamente ($P < 0.05$), después le sigue el tratamiento GC con 33.9 neutrófilos/100 células, y después el tratamiento AA con 33.8 neutrófilos/100 células, siendo estadísticamente iguales ($P < 0.05$) al tratamiento CN pero diferentes de CN+AA.

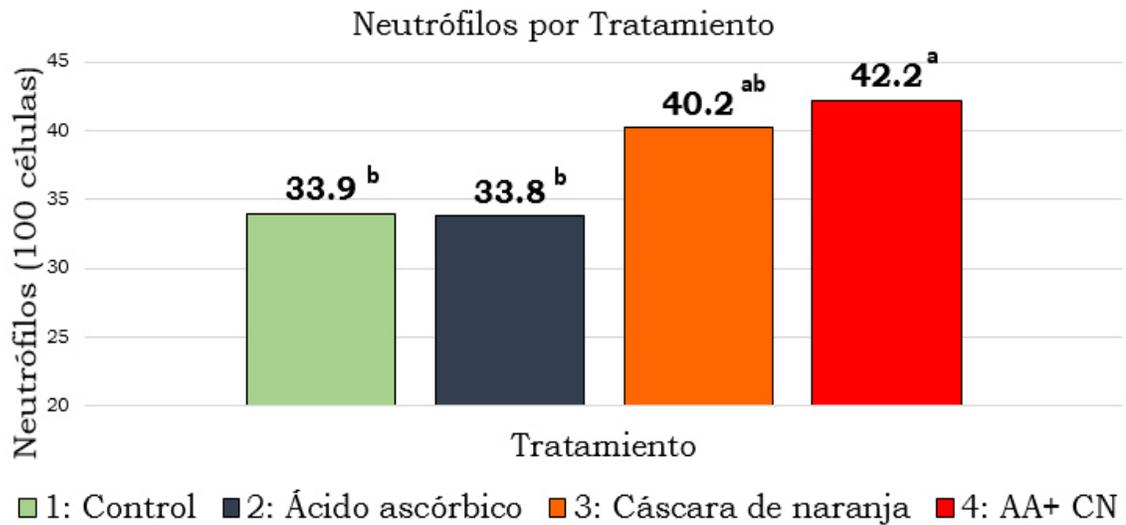


Figura 7. Resultados de la relación de la cantidad de neutrófilos por tratamiento

Control: sin nada, Ácido ascórbico: 75 mg/kg, Cáscara de naranja: 100 g, AA+CN: 75mg/kg de AA + 100 g de CN. ^{a, b} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$)

En la Figura 8, se obtuvo que el mejor resultado obtenido fue a los 0 días del tratamiento con 51.7 neutrófilos/100 células, seguido del día 30 con 35.3 neutrófilos/100 células y al día 15 con 25.6 neutrófilos/100 células, con una diferencia significativa ($P < 0.05$), entre los días de toma de muestra.

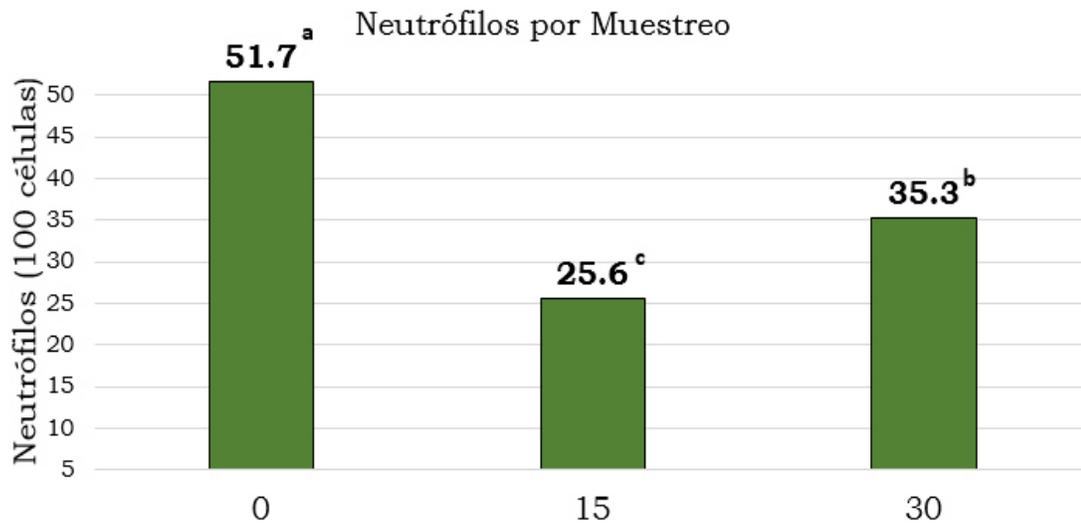


Figura 8. Relación de cantidad de neutrófilos por día de muestreo

Muestra las medias que se obtuvieron en los tres días de muestreo, con la totalidad de animales. ^{a, b, c} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$)

En la Figura 9, se muestra una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos al día 0, donde también encontramos una interacción entre los días de muestreo y el tratamiento, teniendo como la mejor media al tratamiento con AA con 55.6 linfocitos/100 células siendo estadísticamente igual ($P < 0.05$) al tratamiento GC con 46.1 linfocitos/100 células, pero diferente ($P < 0.05$) a CN con 40.3 linfocitos/100 células y CN+AA con 34.0 linfocitos/100 células. El tratamiento GC fue similar ($P < 0.05$) a CN, pero diferente ($P < 0.05$) a CN+AA. En este caso CN fue similar ($P < 0.05$) a CN+AA.

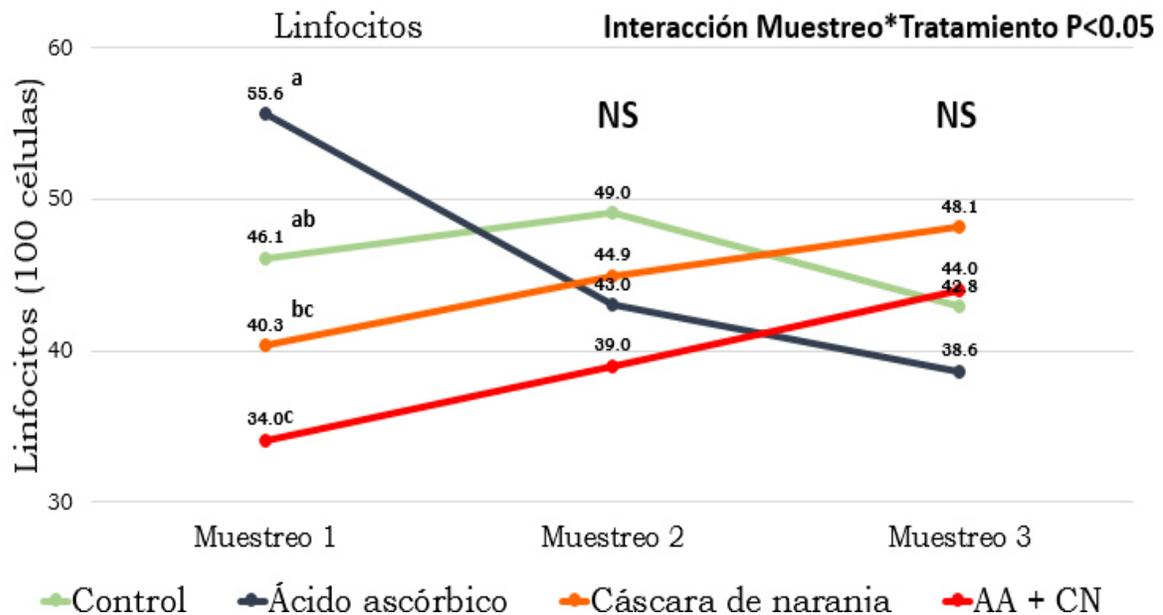


Figura 9. Interacción de la cantidad de linfocitos con el día de muestreo

Control: sin nada, Ácido ascórbico: 75 mg/kg, Cáscara de naranja: 100 g, AA+CN: 75mg/kg de AA + 100 g de CN. ^{a, b, c} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey P<0.05), NS: no significativo.

6.3 Proteínas totales: Relación albúminas/globulinas

La Figura 10 muestra, una diferencia significativa (P<0.05), al día 15 de toma de muestra con 6.1 g/dL de proteínas totales obteniendo la mejor media a comparación de los días 0 con 5.8 g/dL y día 30 con 5.6 g/dL, pero esta a su vez siendo estadísticamente igual (P<0.05) al día 0 de toma de muestra, siendo la media del día 0 similar (P<0.05) al día 30 de toma de muestra.

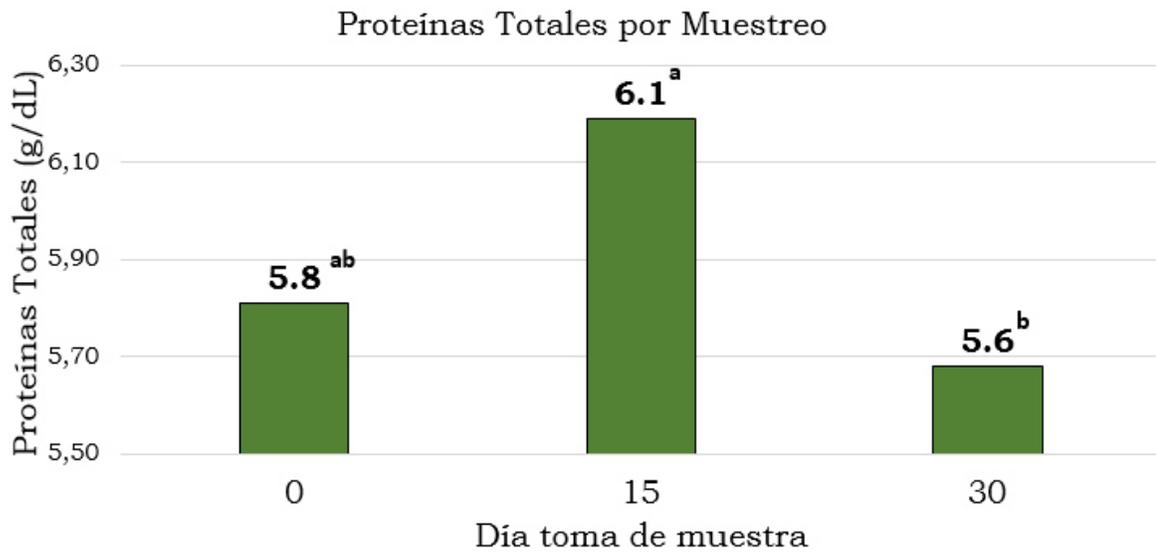


Figura 10. Relación de los resultados de proteínas totales por día de muestra

Muestra las medias que se obtuvieron en los tres días de muestreo, con la totalidad de animales. ^a

^b Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$)

En la Figura 11 se observó, una diferencia significativa ($P < 0.05$), obteniendo que al día 0 los animales del CN tenían una mejor media de 3.2 g/dL de albúmina, seguido por AA+CN y GC con 3.1 g/dL siendo estos iguales estadísticamente ($P < 0.05$), pero diferentes ($P < 0.05$) de AA con 2.9 g/dL, a excepción de GC que también fue igual ($P < 0.05$) estadísticamente a AA.

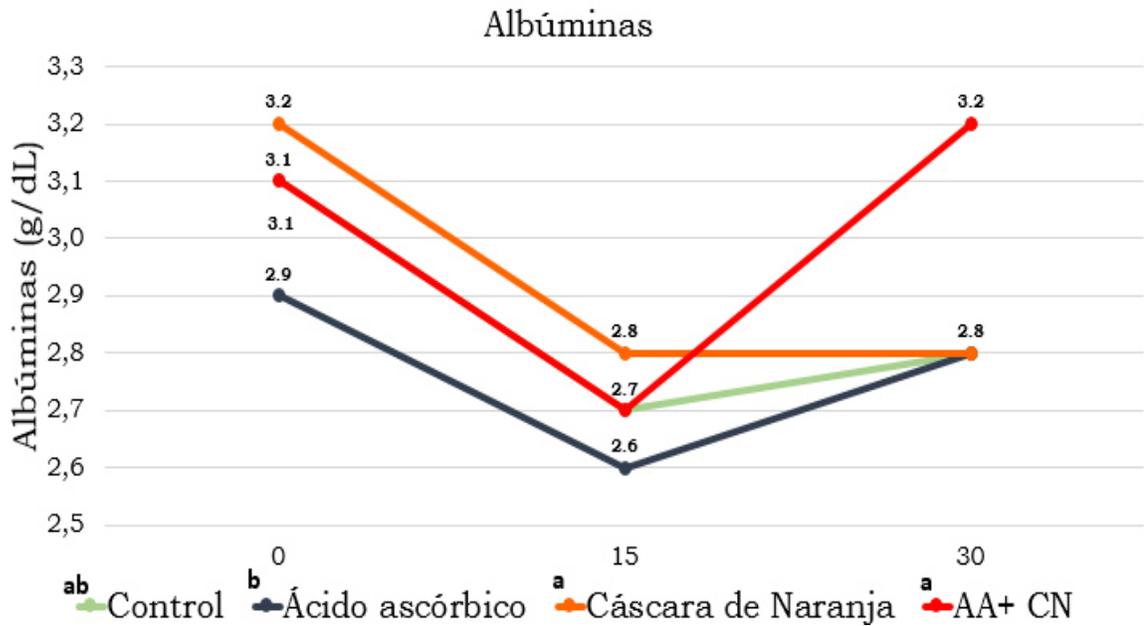


Figura 11. Resultados de la cantidad de albúminas en suero en los diferentes días de muestreo
Control: sin nada, Ácido ascórbico: 75 mg/kg, Cáscara de naranja: 100 g, AA+CN: 75mg/kg de AA + 100 g de CN. ^{a, b} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$)

En la Figura 12, se muestra las globulinas por muestreo en donde se obtuvo una diferencia significativa ($P < 0.05$), siendo la mejor media al día 15 del muestreo con 3.4 g/dL, siendo diferente al día 0 con 2.6 g/dL y al día 30 con 2.7 g/dL, donde estados dos últimas resultaron estadísticamente iguales ($P < 0.05$).

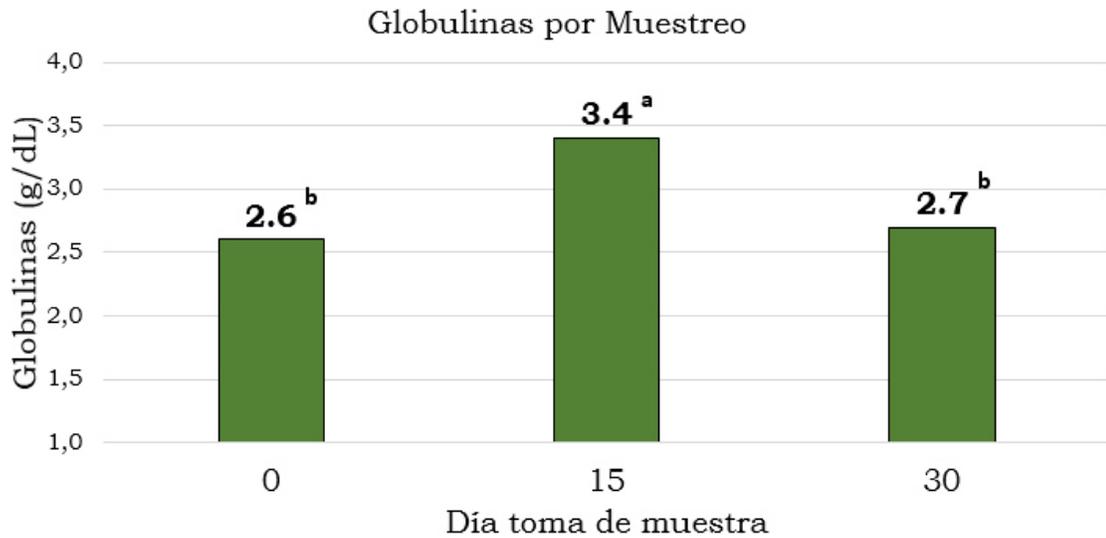


Figura 12. Resultado de la cantidad de globulinas en suero registradas durante los días de muestreo

Muestra las medias que se obtuvieron en los tres días de muestreo, con la totalidad de animales. ^a,

^b Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$)

6.4 Cortisol

En la Figura 13 se obtuvo que, al comienzo del estudio, día 0 con 87.9 ng/ml, los animales se encontraban con el cortisol elevado, obteniendo una diferencia significativa ($P < 0.05$), a diferencia de los otros días de muestreo, día 15 con 45.9 ng/ml y día 30 con 46.9 ng/ml, estos dos últimos resultados a su vez siendo iguales ($P < 0.05$) estadísticamente.

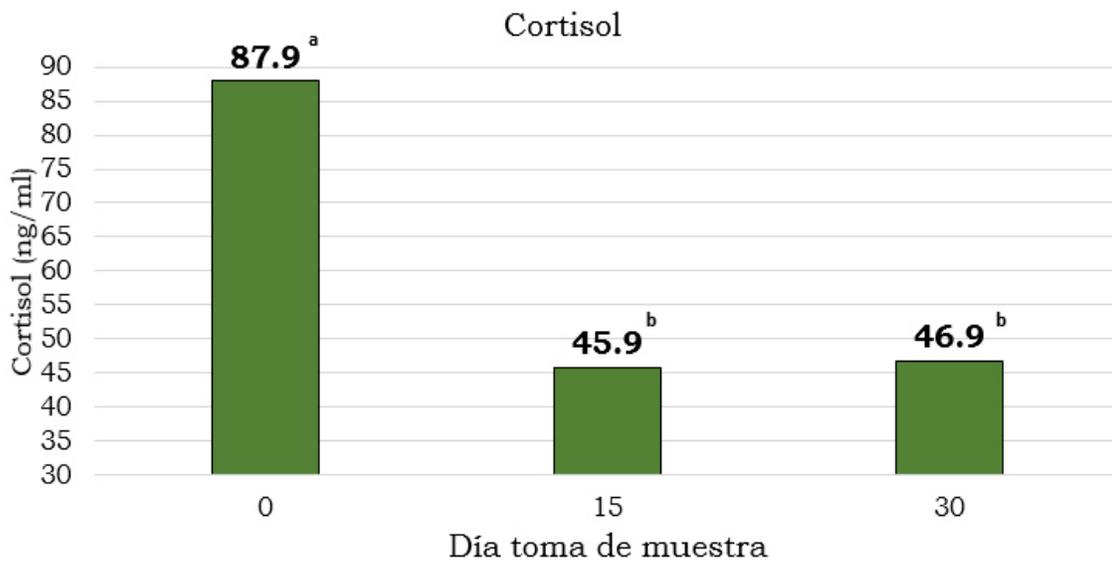


Figura 13. Resultados de cortisol sérico en las diferentes tomas de muestra

Muestra las medias que se obtuvieron en los tres días de muestreo, con la totalidad de animales. ^a
^b Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$)

En la Figura 14, hubo una diferencia significativa ($P < 0.05$) por medio del tratamiento de AA, siendo el mejor tratamiento ya que obtuvo la menor cantidad de animales con cortisol elevado del día 0 al día 15, es decir de 10 animales, 7 tenían una reducción del cortisol y 3 no la tuvieron. El tratamiento GC obtuvo 6 animales sin reducción y 4 animales con reducción, el tratamiento CN obtuvo 6 animales con reducción y 4 animales sin reducción, y el tratamiento CN+AA obtuvo 5 animales con reducción y 5 animales sin reducción.

La Figura 15, se observa una diferencia significativa ($P < 0.05$) también en el tratamiento AA, siendo el mejor tratamiento del día 0 al día 30 al obtener, de 10 animales, 9 animales con reducción y 1 animal sin reducción. El tratamiento GC obtuvo 5 animales con reducción y 5 animales sin reducción, el tratamiento CN 7

animales sin reducción y 3 con reducción, y el tratamiento CN+AA 6 animales sin reducción y 4 con reducción.

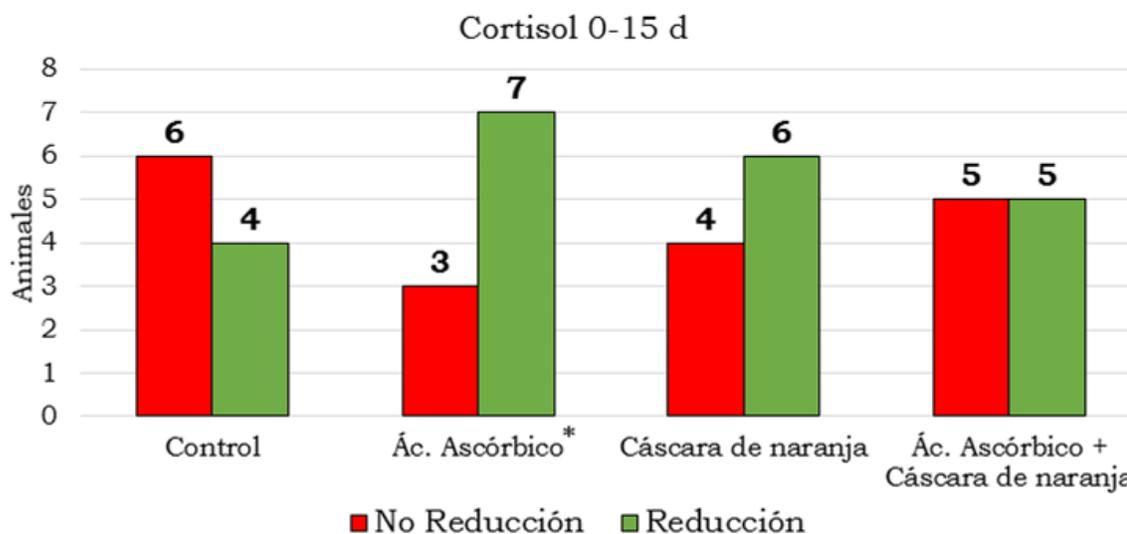


Figura 14. Cantidad de animales que presentan una reducción y una no reducción de cortisol sérico del día 0 al día 15 del periodo experimental

Control: sin nada, Ácido ascórbico: 75 mg/kg, Cáscara de naranja: 100 g, AA+CN: 75mg/kg de AA + 100 g de CN. *Ácido ascórbico: marca una diferencia significativa en comparación de los demás tratamientos (Tukey $P < 0.05$)

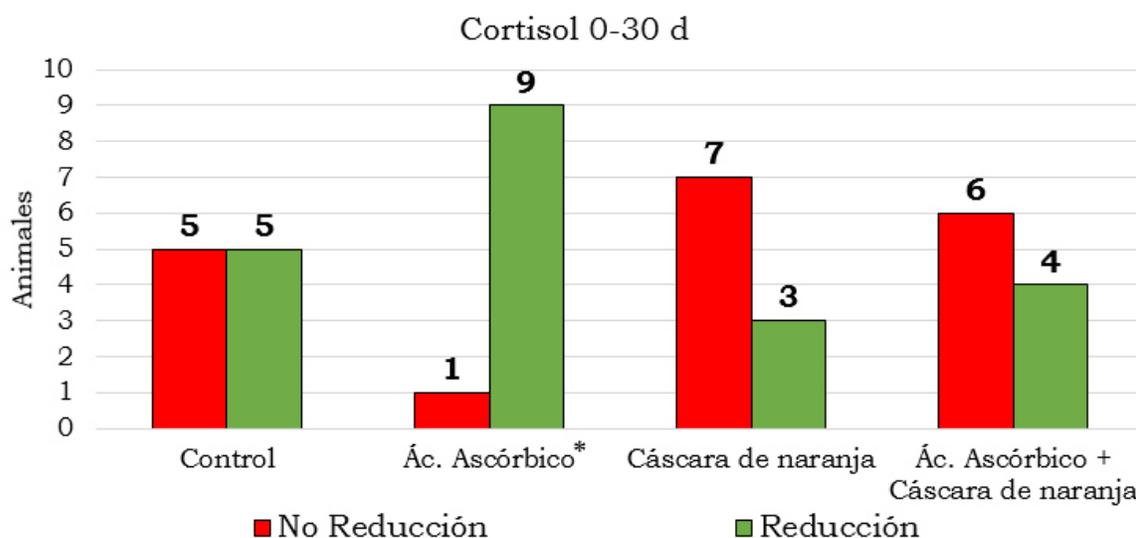


Figura 15. Cantidad de animales que presentan una reducción y una no reducción de cortisol sérico en el periodo comprendido por el estudio, día 0 a día 30

Control: sin nada, Ácido ascórbico: 75 mg/kg, Cáscara de naranja: 100 g, AA+CN: 75mg/kg de AA + 100 g de CN. *Ácido ascórbico: marca una diferencia significativa en comparación de los demás tratamientos (Tukey $P < 0.05$)

6.5 Peso final de los animales

La Figura 16 nos indica, una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos al final del estudio, siendo el mejor tratamiento el CN con 28.4 kg de peso, seguido por AA con 27.4 kg, después GC con 27.0 kg y al final CN+AA con 26.3 kg. El tratamiento CN fue estadísticamente igual ($P < 0.05$) a GC y AA, pero diferente ($P < 0.05$) de CN+AA, este a su vez siendo igual ($P < 0.05$) estadísticamente que GC y AA.

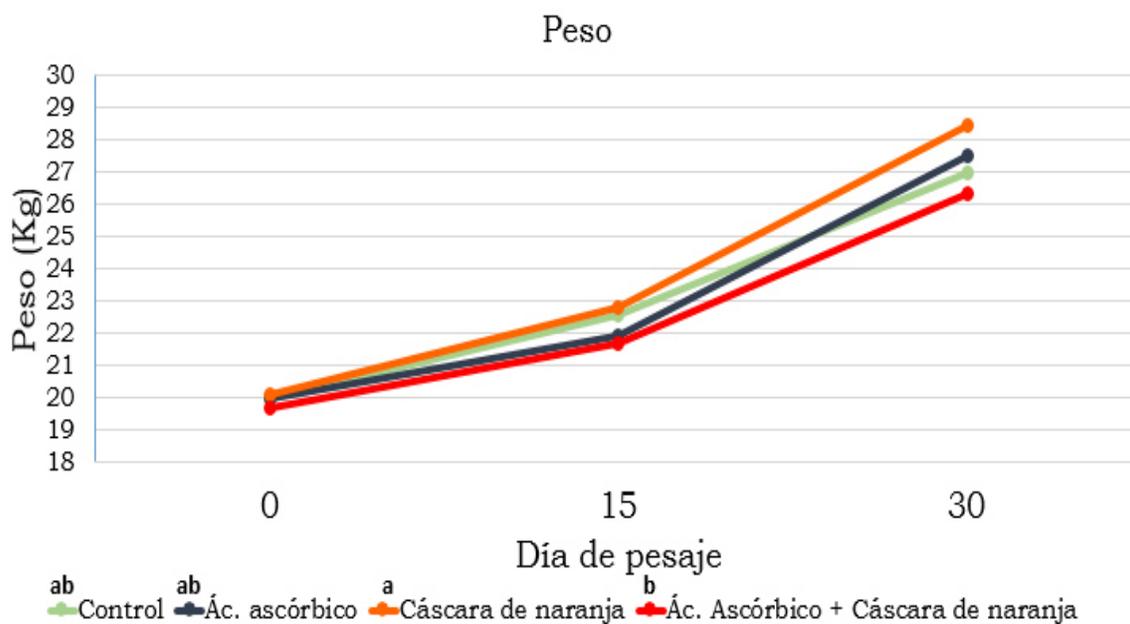


Figura 16. Resultados de los pesos registrados durante las tres tomas de peso durante el periodo experimental

Control: sin nada, Ácido ascórbico: 75 mg/kg, Cáscara de naranja: 100 g, AA+CN: 75mg/kg de AA + 100 g de CN. ^{a, b} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$)

7. DISCUSIÓN

Los animales del tratamiento con cáscara de naranja obtuvieron un peso al final de los 30 días del periodo experimental, superior (28.45 kg) en comparación con los demás grupos de tratamientos. Esta ganancia de peso concuerda con lo obtenido por Villanueva *et al.* (2013), utilizando un porcentaje similar (15%) de residuo fresco de naranja junto a su concentrado donde el consumo fue mayor que en otros porcentajes ofrecidos, esto debido a las características que posee este alimento que tiene una palatabilidad y digestibilidad elevada en ensilaje, pudiendo ser la razón del incremento en el consumo y la ganancia de peso en este estudio, Calsamiglia *et al.*, (2004).

Al comienzo del trabajo, los animales se encontraban con cortisol elevado, posteriormente a los 15 días de realizar el experimento, los animales a los que se les ofreció sólo ácido ascórbico, 7 de 10 animales presentaron menor concentración de cortisol sérico a comparación con los demás grupos y al final del experimento (día 30), 9 de 10 animales presentaron una reducción de cortisol sérico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con Tyler y Cummins (2003), quienes en novillas expuestas a estrés por transporte observaron una reducción de la cantidad de cortisol conforme pasaron los días. Kassab y Mohammed (2014) en corderos expuestos a estrés por transporte obtuvieron una disminución de la cantidad de cortisol en los animales a los cuales se les ofreció AA, aunque esta disminución no fue significativa.

En el presente trabajo se obtuvo una diferencia significativa en el caso de los neutrófilos, por día de muestra, con la mayor cantidad de neutrófilos al día 0 del

período experimental (51.7 células/100 células), en comparación con los otros tratamientos. Esto demuestra que tenía altas cantidades de neutrófilos al inicio del experimento. El resultado obtenido por tratamiento de estos mismos fue una reducción durante los días (15 y 30 d) y se obtuvo un promedio más bajo en tratamiento con ácido ascórbico (33.8 células/100 células), aunque no hubo diferencia significativa con respecto al grupo control. Babe (2011) en ovejas sometidas a estrés por calor obtuvo un menor porcentaje de neutrófilos en el tratamiento con ácido ascórbico, con un resultado significativo.

Sin embargo, en el número de linfocitos, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, sólo diferencia significativa el primer día de muestreo entre tratamientos, donde el grupo tratado con ácido ascórbico tuvo la mayor cantidad de linfocitos al inicio del experimento (55.6 células/100 células), y aunque este número fue disminuyendo con el paso del tiempo no fue significativo. Esto en conjunto puede ser debido al cortisol que se liberó durante el destete y el manejo que estaba dando durante esta etapa, y con el paso de los días se adaptaba, por lo que el cortisol dejó de ser la causa de este comportamiento. Algo similar ocurrió en el trabajo de Minka y Olusegun (2011) en cabras bajo notorio estrés fisiológico y psicológico por el transporte, las cuales presentaron este comportamiento en los dichos parámetros.

En el presente trabajo, en el caso de proteínas totales, albúminas y globulinas, se obtuvo el parámetro proteína total superior a los 15 días de experimento con un promedio de 6.1 g/dL, a diferencia de otros días, pero no hay diferencia significativa entre los tratamientos. En el caso de la albúmina las diferencias significativas entre tratamientos, en que el tratamiento con ácido

ascórbico y cáscara de naranja obtuvo 3,2 g/dL siendo el mejor número promedio en comparación con los otros tratamientos. Y en cuanto a la cantidad de globulinas obtenida por la diferencia de los parámetros anteriores, el día 15 el mejor promedio con 3.4 g/dL en comparación con los otros días de muestreo, pero no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Algo similar paso en el trabajo realizado por Abd-Allah y Zanouny (2014) en corderos expuestos a estrés por calor en temporada de verano, donde obtuvieron mayor cantidad de proteínas plasmáticas con diferencia significativa en el tratamiento en el que se administraba ácido ascórbico a diferencia de los demás grupos, lo cual atribuyeron la disminución de las proteínas plasmáticas en el grupo control a la dilución de éstas por el aumento corporal del agua, al estar expuestos al calor, así como al aumento de hormonas catabólicas como los glucocorticoides, como lo es cortisol, Álvarez y Johnson (1973).

8. CONCLUSIÓN

1.- La administración diaria como suplemento del AA redujo la concentración de cortisol en suero, en comparación con los demás grupos.

2.- La administración del AA mejora el bienestar de los animales que están sometidos a estrés de manejo rutinario en las explotaciones intensivas ovinas mostrando menor cantidad de cortisol sérico en sangre.

3.- La administración de una cantidad de CN en conjunto con el alimento diario de los ovinos de engorda, aumenta el consumo diario de alimento habitual, por lo que su peso se ve aumentado.

9. LITERATURA CITADA

- Abd-Allah M. y Zounouy A.I. (2014). Amelorative effect of ascorbic acid administration and chilled drinking water on ram lambs exposed to heat stress during summer season. *Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences*. 9:17-28.
- Abd-El-Monem U.M., Abel-Ghany B. y Abd-El-Hamid A.A. (2008). Effect of ascorbic acid supplementation on growth performance, carcass traits, some physiological parameters and some blood constituents of growing lambs under the summer egyptian conditions. *Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences*. 3:41-52.
- Adenkola A.Y., Ayo J.O., Sackey A.K.B. y Adelaiye A.B. (2011). Eight hours road transportation and ascorbic acid administration effects on haematological parameters of pigs during the harmattan season. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 2:1143-1150.
- Al-Sultan S.I. (2008). Immuno-stimulant effects of Ascorbic Acid in Colostrum-deprived neonatal camels. Department of public health and animal husbandry. College of veterinary medicine and animal resources, King Faisal University. 1:24.
- Álvarez L. (2008). Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. *Archivos de Zootecnia*. 57:39-59.
- Alvarez M.B. y Johnson H.D. (1973). Effects of environment heat exposure on cattle plasma catecholamine and glucocorticoids. *Journal of Dairy Science*. 56:189-194.
- Babe A.A. (2011). Effect of vitamin C on haematology and serum biochemistry in heat-stressed sheep. *Research opinions in animal & veterinary sciences*. 11:731-733.
- Barbany-Cairó J.R. y Javierre-Garcés C. (2006). Suplementación en vitamina C y rendimiento deportivo (I). *Archivos de Medicina del Deporte*. 23:49-59.

- Berger A. (2000). Th1 and Th2 responses: what are they?. *British Medical Journal*. 321:7258.
- Black W.D. y Hidiroglou M. (1996). Pharmacokinetic study of ascorbic acid in sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 60:216-221.
- Bolet-Astoviza M. (2004). Aspectos de la historia del descubrimiento de algunas vitaminas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 20(4).
- Brody S., Preut R., Schommer K. y Schürmeyer T.H. (2002). A randomized controlled trial of high dose ascorbic acid for reduction of blood pressure, cortisol, and subjective responses to psychological stress. *Psychopharmacology*. 159:319-324.
- Calsamiglia S., Ferret A. y Bach A. (2004). Tablas FEDNA de valor nutritivo de forrajes y subproductos fibrosos húmedos. Fundación para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid. pp. 70.
http://www.fundacionfedna.org/subproductos_fibrosos_humedos/pulpa-de-c%C3%ADtricos (consultado septiembre de 2016).
- Carmen-Gallo N.T. (2005). Transporte terrestre de bovinos: efectos sobre el bienestar animal y la calidad de la carne. *Agro-Ciencia*. 21:37-49.
- Carro M.D., Ranilla M.J. y Tejido M.L. (2006). Utilización de aditivos en la alimentación del ganado ovino y caprino. *Pequeños Rumiantes*. 7:26-37.
- Castro-Campos E. (1994). Documento preparado por el proyecto GCP/RLA/102/ITA "Apoyo a las actividades regionales de acuicultura en América Latina y el Caribe"- Aquila II. México, D.F. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentrtación – FAO.

Ceddia R.P., Wick M.P. y Ottobre J.S. (2005). Sodium dependent vitamin C transporters in the sheep corpus luteum: sequence analysis. *Biology of Reproduction*. 1-28.

Damián J.P. y Ungerfeld R. (2013). Indicadores de bienestar animal en especies productivas: una revisión crítica. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 21:103-113.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). (2013). Scientific opinion on the safety and efficacy of vitamin C (ascorbic acid and sodium calcium ascorbyl phosphate) as a feed additive for all animal species based on a dossier submitted by VITAC EEI. *EFSA Journal*. 11:1-25.

Elagib H.A.A. y Omer H.M. (2012). Effect of Dietary Ascorbic Acid on Performance and Immune Response of Heat Stressed Broiler Chicks. *Pakistan Journal of Nutrition*. 11:216-220.

González C., Civit D., Díaz M., Faverio I. y Lamboglia M. (2013). Bienestar animal en ovinos, en establecimientos agropecuarios, durante el transporte y en frigoríficos. *Veterinaria Argentina*. 30:1-45.

Hernández A., Cervantes P., Salinas V.M., García R., Tejeda A., Gallardo F., y Álvarez J.L. (2007). Resuesta al estrés por calor en la vaca criollo lechero tropical bajo un sistema de doble propósito en México. *Revista de Salud Animal*. 29:85-90.

Hernández-Rodríguez M. y Sastre-Gallego A. (1999). *Tratado de Nutrición*. España, Madrid. Díaz de Santos.

Hidiroglou M., Batra T.R. y Zhao X. (1997). Comparison of vitamin C bioavailability after multiple or single oral dosing of different formulations in sheep. *Reproduction Nutrition Development*. 37:443-448.

http://www.fundacionfedna.org/subproductos_fibrosos_humedos/pulpa-de-c%C3%ADtricos (consultado septiembre de 2016).

Johnston C.S. y Luo B. (1994). Comparison of the absorption and excretion of three commercially available sources of vitamin C. *Journal of the American Dietetic Association*. 94(7):779–781.

Kassab A.Y. y Mohammed A.A. (2014). Ascorbic acid administration as anti-stress before transportation of sheep. *Egyptian Journal of Animal Production*. 51:19-25.

Ki J.H., Mamua L.L., Yang C.J., Kim S.H., Ha J.K., Lee W.S., Cho K.K. y Lee S.S. (2012). Hemato-biochemical and Cortisol Profile of Holstein Growing-calves Supplemented with Vitamin C during Summer Season. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 25:361-368.

Kim J.H., Mamuad L.L., Yang C.J., Kim S.H., Ha J.K., Lee W.S., Cho K.K. y Lee S.S. (2012). Hemato-biochemical and Cortisol Profile of Holstein Growing-calves Supplemented with Vitamin C during Summer Season. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 25:361-368.

Kobayashi S., Kumagai M., Kikuchi Y., Hagino A. y Oda S. (2009). Circadian variation in plasma total antioxidative capacity and levels of ascorbic acid in sheep. In *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Effects of Nutrition on Reproduction and Welfare: Proceedings of the XIth International Symposium on Ruminant Physiology*. Wageningen Academic Pub.

- Latham M.C. (2002). Nutrición humana en el mundo en desarrollo. Italia, Roma. FAO. Alimentación y nutrición N° 29 Capítulo 11: Vitaminas. www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s00.htm
- Li Y. y Lovell R.T. (1985). Elevated Levels of Dietary Ascorbic Acid Increase Immune Responses in Channel Catfish. *Journal of Nutrition*. 115:123-131.
- Lodhi G.M., Latif R., Hussain M.M., Naveed A.K. y Aslam M. (2014). Effect of ascorbic acid and alpha tocopherol supplementation on acute restraint stress induced changes in testosterone, corticosterone and norepinephrine levels in male Sprague dawley rats. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*. 26:7-11.
- Majekodunmi B.C., Ogunwole O.A. y Sokunbi O.A. (2015). Synergistic Effect of Electrolytes and Ascorbic Acid on Performance and Physiological Response of Broiler Birds in Hot Humid Tropics. *International Journal of Agriculture and Forestry*. 5:23-29.
- Matsui T. (2012). Vitamin C Nutrition in Cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 25:597-605.
- Mendoza-Martínez G.D., Plata-Pérez F.X. y Mella R. (2007). Evaluación de alimentos integrales para el engorde intensivo de ovinos. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 17:66-72.
- Minka N.S., Olusegun-Ayo J., Sackey A.K.B. y Adelaiye A.B. (2009). Assessment and scoring of stresses imposed on goats during handling, loading, road transportation and unloading, and the effect of pretreatment with ascorbic acid. *Livestock Science*. 125:275–282.

- Minka N.S. y Olusegun-Ayo J. (2011). Modulating effect of ascorbic acid on transport induced immunosuppression in goats. *International Scholarly Research Network ISRN Veterinary Science*. 2011:1-7.
- Minka N.S y Olusegun-Ayo J. (2013). Physiological and behavioral responses of goats to 12-hour road transportation, lairage and grazing periods, and the modulatory role of ascorbic acid. *Journal of Veterinary Behavior*. 8:349-356.
- Moberg G.P. y Mench J.A. (2000). *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare Research of Animal Stress*. USA, New York. CABI Publishing.
- Mollinedo-Patzi M.A. y Carrillo-Larico K.J. (2014). Absorción, excreción y metabolismo de las vitaminas hidrosolubles. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 41:2146.
- Montoya-Botero S., Ramírez-Gómez J.S. y Saldarriaga-Saldarriaga A. (2013). Efecto de la temperatura ambiental y la humedad relativa sobre la temperatura corporal en caprinos. Colombia, Medellín. Universidad Nacional de Colombia, Facultad Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal.
- Olaifa F., Ayo J.O., Ambali, S.F. y Rekwot P.I. (2015). Hematbiochemical responses to packing in donkeys administered ascorbic acid during the harmattan season. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2:133-138.
- Ordóñez J.G. (2007). *Región citrícola de Nuevo León*. México, Nuevo León. Fondo Editorial de Nuevo León.
- Palacios-Sánchez L. (2013). Breve historia de las vitaminas. *Revista Médica Sanitas*. 16:142-145.

- Partida de la Peña J.A., Braña-Varela D., Jiménez-Severiano H., Ríos-Rincón F.G. y Buendía-Rodríguez G. (2013). *Producción de Carne Ovina*. México, Querétaro, Ajuchitlán. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, Libro Técnico No. 5.
- Pohanka M., Pejchal J., Snopkova S., Havlickova K., Karasova J.Z., Bostik P. y Pikula J. (2012). Ascorbic Acid: An Old Player with a Broad Impact on Body Physiology Including Oxidative Stress Suppression and Immunomodulation: A Review. *Medicinal Chemistry*. 12:35-43.
- Pourhossein Z., Alaw-Qotbi A.A., Seidavi A., Laudadio V., Centoducati G. y Tufarelli V. (2015). Effect of different levels of dietary sweet orange (*Citrus sinensis*) peel extract on humoral immune system responses in broiler chickens. *Animal Science Journal*. 86:105-110.
- PROGAN. (2010). Programa Nacional Ganadero. *Producción de Carne Ovina*. SAGARPA.
- Ralston S. y Stives M. (2012). Supplementation of Ascorbic Acid in Weanling Horses Following Prolonged Transportation. *Animals*. 2:184-194.
- Rincón A.M., Vásquez A.M. y Padilla F.C. (2005). Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 55:305-310.
- Roca-Cedeño A.J. (2011). Efecto del estrés calórico en el bienestar animal, una revisión en tiempo de cambio climático. *Espamciencia*. 2:15-25.
- Rodríguez-Castañón A.A. y Barrio I. (2005). Las vitaminas en la nutrición del ganado vacuno. *Ganaderos de Austrias*. Núm. 26.

- Rubio-Lozano M.S., Méndez-Medina R.D., Reyes-Mayorga K., Rubio-García M.E., Ovando M.A., Ngapo T.M. y Galindo-Maldonado F.A. (2015). Effect of an allostatic modulator on stress blood indicators and meat quality of commercial young bulls in Mexico. *Meat Science*. 105:63-67.
- Sánchez-Segura M., González-García R.M., Cos-Padrón Y. y Macías-Abraham C. (2007). Estrés y sistema inmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 23:1-10.
- Santamaría C., Martín-González A. y Astorga F. (2015). Extractos vegetales: aplicación para la reducción del estrés. *Nutrínnews*. 75-80.
- SEGOB. (1998). Centro Nacional de Estudios Municipales, Gobierno del Estado de Nuevo León. Los Municipios de Nuevo León. *Enciclopedia de los Municipios de México*. México, Monterrey, N.L.
- Serra H.M. y Cafaro T.A. (2007). Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 41:525-532.
- Sunil-Kumar B.V., Singh G. y Meur S.K. (2010). Effects of addition of electrolyte and ascorbic acid in feed during heat stress in buffaloes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 23:880-888.
- Tyler P.J. y Cummins K.A. (2003). Effect of dietary ascorbyl-2-phosphate on immune function after transport to a feeding facility. *Journal of Dairy Science*. 86:622-629.
- Urban-Chmiel R., Hola P., Lisiecka U., Wernicki A., Puchalski A., Dec M. y Wysocka M. (2011). An evaluation of the effects of α -tocopherol and ascorbic acid in bovine respiratory disease complex occurring in feedlot calves after transport. *Livestock Science*. 141:53-58.

- Valdés F. (2006). Vitamina C. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 9:557-68.
- Vélez-Marín M. y Uribe-Velásquez L.F. (2010). ¿Cómo afecta el estrés calórico la reproducción? *Biosalud*. 9:83-95.
- Ventura-García J. (2011). Alimentar a los rumiantes con corteza y pulpa de cítricos reduce la presencia intestinal de *E. coli* y *Salmonella*. Albéitar, Portal Veterinaria.
- Villanueva Z., Ibarra M.A., Zárate P., Briones F., Escamilla O.S., González A. y Gutiérrez E. (2013). Comportamiento productivo de corderos de pelo alimentados con residuo fresco de naranja (*Citrus sinensis*) en sustitución de granos de sorgo (*Sorghum vulgare*). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 47:27-31.
- Worapol A., Sridama P., Phasuk Y., Vongpralab T., Pakdee P., Katawatin S. y Simaraks S. (2003). Effects of ascorbic acid on cell mediated, humoral immune response and pathophysiology of white blood cell in broilers under heat stress. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 25:297-305.
- Zago K.I., García M.Y., Di-Bernardo M.L., Vit P., Luna J.R. y Gualtieri M. (2010). Determinación del contenido de vitamina C en miel de abejas venezolanas por volumetría de óxido-reducción. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*. 41:25-30.

10. ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cartel presentado en el Simposio “Una Salud”	80
Anexo 2. Cartel presentado en la Reunión Anual de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria	81
PAGEREF _Toc473293597 \h 81	



Efecto del ácido ascórbico y cáscara de naranja como inmunoestimulante y reductor de cortisol en ovinos de engorda en condiciones de estrés por espacio

García-Montero S¹, Cantú-Martínez M², Zamora-Ávila D², Fimbres-Durazo H², Bernal-Barragán H³

¹Posgrado conjunto Agronomía Veterinaria, UANL, ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UANL, ³Facultad de Agronomía, UANL



INTRODUCCION

En México se tienen registradas cerca de 53,000 unidades de producción ovina¹. Los sistemas de producción de engorda intensiva requieren mínima mortalidad, el mayor peso de cordero al finalizar la engorda con la mejor eficiencia alimenticia posible. En condiciones de una alta densidad animal (recomendado 2.5m² x animal)² se tienen agentes estresantes agudos y de corto plazo que elevan los niveles de adrenalina y agentes estresantes a largo plazo que aumentan los niveles de cortisol, deprimiendo su sistema inmune, llegando a provocar patologías y hasta la muerte^{3,4}. El estrés generado provoca una afección al bienestar del animal^{5,6}, provocando el esfuerzo para mantener el equilibrio entre el animal y su ambiente, volviéndose esta situación negativa cuando se presenta en exceso^{5,7}. Es por eso que en ocasiones se agregan a la dieta suplementos que mejoren esta condición^{8,9}.

Uno de los suplementos que se han utilizado, es el ácido ascórbico (AA) por ser barato, no tóxico, sin tiempo de retiro y de fácil administración, por lo que representa un gran valor en el campo. El AA es considerado un importante antioxidante, el cual ha sido utilizado para gestionar condiciones de estrés¹⁰. Estudios han demostrado que la suplementación con este nutriente antioxidante puede atenuar los efectos negativos del estrés ambiental en rumiantes, además de aves y ratas¹¹, demostrando que es una de las primeras defensas en la sangre total en contra de radicales libres, incluso que tiene influencia en la movilidad fagocítica y quimiotaxis¹². Se ha reportado que a pesar de que los ovinos, son una de las especies que posee la enzima L-gulonolactona oxidasa necesaria para la síntesis de su propio AA¹³, en un entorno específico y condiciones fisiológicas, la cantidad de ácido ascórbico producido por el animal puede ser insuficiente para cumplir con su requisito¹⁴. Se ha demostrado la importancia del AA en la aclimatación en frío de los rumiantes; en corderos se ha descrito que por tener una fase monogástrica son capaces de utilizar el AA exógeno vía oral¹⁵.

Otro recurso para este fin es la cáscara de naranja que podría ser utilizado como un sustituto del AA por el contenido que posee en su composición química, siendo de 16.25 ± 1.43 mg / 100 g de muestra seca de harina de cáscara de naranja, además de otros micronutrientes como calcio, magnesio y zinc (Tabla 1)¹⁶.

Tabla 1. Contenido de micronutrientes en harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*). (mg/100g de muestra seca)¹⁶

Harinas de cáscaras	Calcio	Magnesio	Zinc	Ácido ascórbico	Carotenoides β totales
Naranja	27.34 \pm 0.31	8.64 \pm 0.40	0.38 \pm 0.11	16.25 \pm 1.43	2.25 \pm 0.17
Mandarina	50.25 \pm 0.24	15.61 \pm 0.33	0.44 \pm 0.08	12.32 \pm 1.83	11.03 \pm 0.53
Toronja	49.54 \pm 0.39	10.35 \pm 0.46	0.97 \pm 0.02	28.17 \pm 1.28	2.31 \pm 0.29

El analizar los parámetros hematológicos, nos lleva a demostrar índices importantes de salud, producción y capacidad de adaptación del animal a las condiciones ambientales que prevalecen en su entorno; el obtener la relación de neutrófilos/linfocitos (N/L), sirve como un índice de confianza en la evaluación de la respuesta inmune y la capacidad del animal para adaptarse a diversas condiciones de estrés¹⁰, al igual que la medición de la temperatura rectal, siendo un indicador de la capacidad para superar el efecto perjudicial del medio ambiente durante la temporada de calor^{10,14}. La evaluación de cortisol formaría parte de un indicador de estrés¹⁴. Es por eso que el conocer la presencia de situaciones de estrés en sistemas de producción, ha sugerido la implementación de compuestos y/o aditivos que ayuden a la mejora continua de la producción. Por lo cual se ha planteado la hipótesis de que la administración de ácido ascórbico y de cáscara de naranja reduce los niveles de cortisol y estimula el sistema inmunitario del ganado ovino de engorda.

OBJETIVOS

El objetivo de la presente investigación es determinar el efecto de la administración de ácido ascórbico y cáscara de naranja para reducir el cortisol en sangre (indicador de estrés), y estimular el sistema inmunitario en ganado ovino de engorda.

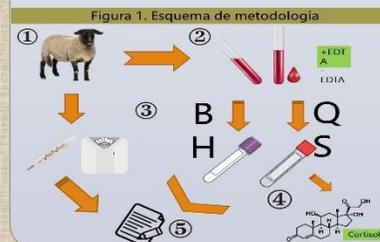
Al cual llegaremos, por medio de los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la relación de células blancas (N/L) y proteínas (proteínas totales, globulinas, albúminas, etc.) presentes antes (día 0) y después (día 30) de la aplicación del tratamiento con ácido ascórbico y cáscara de naranja, mediante biometría hemática y química sanguínea, respectivamente.
2. Determinar las concentraciones de cortisol en sangre antes (día 0), durante (día 15) y después (día 30) de la administración de ácido ascórbico y cáscara de naranja, mediante inmunoensayo.
3. Determinar si el ácido ascórbico y la cáscara de naranja tienen influencia sobre los aumentos de peso y peso final del animal.



MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizará en el Rancho Santa Úrsula, ubicado en la Carretera Monterrey-Nuevo Laredo km 21.5, dedicado a la engorda de ovinos de 18-40 kg de peso. Se utilizarán como unidades experimentales 60 ovinos de similares edades y pesos. Los animales se distribuirán en cuatro grupos de tratamientos, siendo: T1: 15 animales en un Grupo Control (GC), T2: 15 animales en un Grupo con Dosis de Referencia 2.5 g/d, aproximadamente 45 mg/kg de peso corporal^{17,18} (GDR), T3: 15 animales en un Grupo con Cáscara de Naranja 20% en la dieta (GCN) y T4: 15 animales en un Grupo con Cáscara de Naranja y con Dosis de Referencia (GCNDR). Los animales serán alojados a razón de 15 animales en corrales de 3 x 5 m (1m²/animal). Todos los animales se expandirán al mismo manejo zootécnico (vacunación, desparasitación, alimentación, etc.) y condición climática durante el periodo experimental. El peso corporal se registrará un día antes del día 0 y el día 0, sacando un promedio de ambos días, luego a intervalos quincenales, es decir, día 14 y día 15 sacando promedio de ambos días, hasta el final del experimento. Semanalmente se medirán temperaturas rectales. Al principio, a los 15 días y al final del experimento se obtendrán muestras de sangre con EDTA y sin EDTA por venopunción de la vena yugular, se mantendrán en refrigeración para su traslado, su posterior procesamiento de obtención de suero y análisis de química sanguínea, en el aparato VetTest® Analyzer (Idexx Laboratories) para proteínas totales, albúmina, globulinas, etc., además de una biometría hemática analizadas por QBC® VetAutoread™. También una parte del suero se almacenará a -20°C de temperatura para el análisis de cortisol, con una muestra adicional durante el tratamiento, esto se analizará mediante inmunoensayo ELISA (Figura 1). Los resultados obtenidos se analizarán por el diseño experimental de bloques al azar, en un factorial 2 x 2, con dos niveles de ácido ascórbico (0 y 2.5 g/d) y dos niveles de cáscara de naranja (0 y 20% en la dieta). Será probado mediante análisis de varianza y Tukey, utilizando el paquete de software SPSS (v17).



REFERENCIAS

1. PROGAN. 2010. Programa Nacional Ganadero. In Producción de Carne Ovina (1 Ed.) SAGARPA.
2. Sánchez, Carlos. 2014. Aspectos prácticos en la engorda intensiva de ovinos. Departamento Técnico-Nutrición de Rumiantes. Trouw Nutrition México.
3. González C, Chiv D, Díaz M, et al. 2013. Bienestar animal en ovinos, en establecimientos agropecuarios, durante el transporte y en frigoríficos. Veterinaria Argentina. 30:1-45.
4. Álvarez, I. 2008. Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. Archivos de Zootecnia. 57:39-59.
5. Santamaría, C., Marín-González, A., Astorga, F. 2015. Extractos vegetales: aplicación para la reducción del estrés. Nutripress. 7:8-80.
6. Moberg, G.P., Mench, J.A. 2000. The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare (1 Ed.). USA. New York: CAB International.
7. Roca-Cerdas, A.J. 2011. Efecto del estrés calórico en el bienestar animal, una revisión en tiempo de cambio climático. Espanciencia. 2:15-25.
8. Carro, M.D., Ranilla, M.J., Tejido, M.L. 2006. Utilización de aditivos en la alimentación del ganado ovino y caprino. Pequeños Rumiantes. 7:26-37.
9. Partida-de-la-Peña, J.A., Braña-Varela, D., Jiménez-Severiano, H. et al. 2013. Producción de Carne Ovina (1 Ed.). México, Querétaro, Ajuichitlán Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal.
10. Kassab, A.Y., Mohammed, A.A. 2014. Ascorbic acid administration as anti-stress before transportation of sheep. Egyptian Journal of Animal Production. 51:19-25.
11. Sunil-Kumar, B.V., Singh, G., Meur, S.K. 2010. Effects of addition of electrolyte and ascorbic acid in feed during heat stress in buffaloes. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 23:880-888.
12. Black, W.D., Hidirgiou, M. 1996. Pharmacokinetic study of ascorbic acid in sheep. Canadian Journal of Veterinary Research. 60:219-221.
13. Rincón, Alicia M., Viquez-A., Marina, Padilla, Fanny C. 2005. Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*), cultivadas en Venezuela. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 55:305-310.
14. Abd-Allah, M., Zanouny, A. 2014. Ameliorative effect of ascorbic acid administration and chilled drinking water on lam lambs exposed to heat stress during summer season. Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences. 9:17-24.
15. Gharem, A.M., Jaber, L.S., Abi-Said, M. et al. 2008. Physiological and chemical responses in water deprived Awassi ewes treated with vitamin C. Journal of Arid Environments. 72:141-149.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, por el apoyo económico activo que se me ha brindado. A mis asesores M.C. Marco Cantú, Dr. Hugo Bernal, Dr. Héctor Fimbres y Dra. Diana Zamora, FA-FMVZ, UANL por su apoyo. Al MVZ Víctor Ortiz y el Rancho Santa Úrsula por el apoyo con las instalaciones donde se realizó el estudio.





Efecto del ácido ascórbico y cáscara de naranja como reductor de cortisol en corderos de engorda en condiciones de estrés

García-Montero, Selene G., Bernal-Barragán, Hugo, Sánchez-Dávila, Fernando, Cantú-Martínez, Marco A.

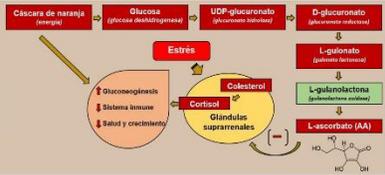


Universidad Autónoma de Nuevo León, Posgrado Conjunto Agronomía Veterinaria en Ciencia Animal. Facultad de Agronomía y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campus de Ciencias Agropecuarias, Gral. Escobedo, Nuevo León, México. C.P. 66050
Correo: mvz_selenemontero@hotmail.com



INTRODUCCIÓN

La engorda intensiva de ovinos requiere de mínima mortalidad y la mayor ganancia de peso de cordero al finalizar la engorda con la mejor eficiencia alimenticia posible, donde se tiene una alta densidad animal por lo cual encontramos estresores agudos y de corto plazo que elevan los niveles de adrenalina, así como estresores a largo plazo que aumentan los niveles de cortisol, deprimiendo su sistema inmune llegando a provocar patologías y muerte (Álvarez, 2008; González *et al.* 2013). Por lo cual se han buscado alternativas que puedan ayudar a modular estas situaciones (Carro *et al.* 2006; Suni *et al.* 2010; Peña *et al.* 2013). La medición y evaluación de la actividad del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), en el cual se desencadena el estrés, se puede realizar a través de la cuantificación del cortisol (Babe, 2011).



OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la administración tanto de AA como de Cáscara de Naranja (CN) en la reducción de cortisol en sangre y ganancia de peso en el ganado ovino de engorda.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la administración de los tratamientos sobre el peso del animal.
2. Determinar las concentraciones de cortisol en suero antes (día 0), durante (día 15) y después (día 30) de la administración de los tratamientos.

METODOLOGÍA

El trabajo se realizó en el Rancho Santa Úrsula, ubicado en la Carretera Monterrey-Nuevo Laredo km 21.5. Se utilizaron 60 ovinos de 2 meses de edad recién destetados, con un peso entre 16 y 27 kg. Los animales se dividieron en cuatro tratamientos: 15 animales por grupo, un grupo control, un segundo grupo al que se le administró AA en agua purificada (75 mg/kg), un tercer grupo, al que se le dio CN (100 g por animal) y el último grupo al cual se le ofreció ambos tratamientos (AA y CN). Los corderos fueron alojados a razón de 20 animales por corral con medidas de 6.2 m x 4.2 m (1.3 m²/animal), en cada corral se encontraban 5 animales del grupo control y 15 animales del tratamiento correspondiente. Todos los animales se expusieron al mismo manejo zootécnico (vacunación, desparasitación, dieta, destete, vitaminación) y condición climática desde el día 4 de julio al 2 de agosto del 2015, periodo en el cual diariamente se registraron la humedad relativa (HR) y temperatura ambiental (TEM) con un termohigrómetro (Gráfica 1). Semanalmente se midieron temperaturas rectales de todos los animales.



Se obtuvieron muestras de sangre con EDTA y sin EDTA por venopunción yugular. Con la sangre obtenida en tubo con EDTA se realizó una Biometría hemática, obteniendo los parámetros de: 1) Microhematocrito, 2) Proteínas Plasmáticas, 3) Cuento de Glóbulos Blancos y 4) Diferencial de Glóbulos Blancos por medio de un frotis sanguíneo (relación Neutrófilos/Linfocitos). Con el suero obtenido se realizó un 1) Inmunoensayo para Cortisol (Bio-Cortisol Grupo MEXLAB®), 2) Cuantificación de Albúminas (Albumin, verde bromocresol, SPINREACT®), 3) Cuantificación de Proteínas Totales (Total protein, biuret, SPINREACT®) y 4) Determinación de Globulinas por diferencia de PT y ALB.



Los resultados se analizaron por diseño de bloques al azar, factorial 2 x 2, con dos niveles de AA (0 y 75 mg/kg) y dos niveles de cáscara de naranja (0 y 100 g) para peso. Para analizar niveles de cortisol, se utilizó X² (reducción, no reducción). Fueron probados mediante análisis de varianza y Tukey, utilizando el software SPSS (v22). Todos los parámetros se evaluaron con el valor de P < 0.05 y se aceptó como el mínimo nivel significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso del peso vivo, se obtuvieron resultados de los 60 animales en los tres muestreos y para el cortisol solo se obtuvieron resultados de 40 animales de los tres muestreos. El peso promedio de los corderos se presentan en la Gráfica 2. Los animales del tratamiento con CN obtuvieron una media superior (28.45 kg), lo que concuerda con Villanueva *et al.* (2013), donde utiliza un porcentaje similar (15%) en corderos alimentados con residuo fresco de naranja junto a su concentrado, donde el consumo fue mayor que en otros porcentajes ofrecidos, esto debido a las características que posee la CN, palatabilidad y digestibilidad elevada en ensilaje, pudiendo ser la razón del incremento del consumo y la ganancia de peso en este estudio (Calsamiglia, Ferret & Bach, 2004). Al comienzo del trabajo, los animales se encontraban con cortisol elevado (Gráfica 3), a los 15 días los animales a los que se les ofreció sólo AA, 7 de 10 animales presentaron menor concentración de cortisol sérico en comparación con los demás grupos (Gráficas 4, inciso A) y al final del experimento (día 30), 9 de 10 animales (Gráficas 4, inciso B). Estos resultados concuerdan con los obtenidos con Tyler & Cummins (2003) en donde novillas expuestas a estrés por transporte se observaron con una reducción de la cantidad de cortisol conforme pasaron los días. Al igual que Kassab & Mohammed (2014) en corderos que se expusieron también a estrés por transporte obtuvieron una disminución de la cantidad de cortisol en los animales a los cuales se les ofreció AA, aunque esta disminución no fue significativa.

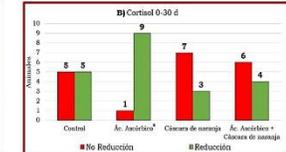


Gráfica 1. Humedad relativa y Temperatura ambiental durante los 30 días del periodo experimental.
HR: Alta = 68.1 %
Media = 64.1 %
Baja = 49.1 %
TEM: Alta = 34.3 °C
Media = 30.3 °C
Baja = 23.6 °C



Gráfica 2. Peso: se muestra diferencia significativa del tratamiento 3 (cáscara de naranja 100 g). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey P<0.05).

Gráfica 3. Cortisol: se muestra diferencia significativa por el día de toma de muestra (87.90). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey P<0.05, sign = nanogramos por mililitro).



Gráficas 4. A) Cortisol 0-15 d, se muestra diferencia significativa del tratamiento 2 (Ácido ascórbico). B) Cortisol 0-30 d, se muestra diferencia significativa del tratamiento 2 (Ácido ascórbico) con el parecer un efecto acumulativo de animales con reducción de cortisol. * Diferencias significativas (Tukey P<0.05), o = días.

CONCLUSIÓN

La administración diaria como suplemento del AA mostró una reducción de cortisol en suero, en comparación con los demás grupos. Esto nos demuestra que la administración del AA mejora el bienestar de los animales que están sometidos a estrés de manejo rutinario en las explotaciones intensivas ovinas. La administración de una cantidad de CN en conjunto al alimento diario de en los corderos de engorda, aumenta el consumo de alimento y repercute en el peso vivo en forma positiva.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Agronomía, a MC. Marco A. Cantú, Dr. Hugo Bernal, Dr. Fernando Sánchez, CONACYT y a el Sr. Jaime Quintanilla.