

Inulina de Agave (*Agave tequilana*, Weber) Como Suplemento Alimenticio en Gallinas Ponedoras y su Efecto en los Niveles de Poliaminas en las Excretas

REYNOSO-OROZCO, Ramón†, SÁNCHEZ-CHIPRÉS, David Román*, CHÁVEZ-MORA, Ivonne Yanine y NOA – PÉREZ, Mario

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, 44600 Zapopan, Jalisco

Recibido 23 Enero, 2017; Aceptado 20 Marzo, 2017

Resumen

La inulina es un fructano formado por unidades monoméricas que pueden estar de dos hasta 60 veces en la molécula y cuya característica es presentar enlaces fructosil-fructosa en la mayoría de los enlaces glicosídicos. La inulina puede ser incorporada a productos alimenticios dado que ofrece beneficios tecnológicos y nutricionales, Las Poliaminas Putrescina, Espermidina y Espermina son moléculas ubicuas, de bajo peso molecular y básicas dados sus grupos aminos. Se consideran necesarias para la homeostasis celular. La retroconversión de las Poliaminas bioactivas Espermina y Espermidina, respectivamente las convierte en Putrescina que a su vez es excretada. Se utilizaron 30 pollitas de un día de nacidas, fueron distribuidas en tres tratamientos con cuatro repeticiones de 10 pollitas cada uno. Los tratamientos fueron; Testigo (sin Inulina de agave), OLG 0.1% (con 0.1% de Inulina de agave en el alimento) OLG 0.2% (0.2% de Inulina de agave en el alimento). Se determinaron niveles de Poliaminas en excremento, mediante HPLC en fase reversa. Se encontraron disminuidos los valores de Putrescina, respecto al grupo testigo, $p < 0.05$. Espermidina y Espermina no mostraron diferencias estadísticamente significativas. El uso de Inulina de agave en gallinas disminuye la presencia de Putrescina en heces de gallinas ponedoras.

Poliaminas, Agave tequilana, gallinas ponedoras, HPLC

Abstract

Inulin is a fructan or carbohydrate formed by monomeric units that can be repeated two to 60 times in the molecule and whose distinctive feature is to present fructosyl fructose bonds in most of the glycosidic bonds. Inulin can be incorporated into a wide variety of food products because it offers technological and nutritional benefits. The polyamines Putrescine, Spermidine and Spermine are ubiquitous, low molecular weight and basic molecules given their amine groups. They are considered necessary for cellular homeostasis. The retroconversion of the bioactive polyamines Espermina and Spermidine, respectively, turns them into Putrescine, which in turn is excreted. We used 30 day-old chickens born, were randomly distributed in three treatments with four replicates of 10 pullets each. Treatments were categorized as Control (control without agave inulin), OLG 0.1% (adding 0.1% of agave inulin in feed) OLG 0.2% (adding 0.2% of agave inulin in feed). The polyamine levels in feces were determined by reverse phase HPLC. The values of Putrescine were decreased with respect to the control group, $p < 0.05$. Spermidine and Spermine did not show statistically significant differences. The use of agave inulin in hens reduces the presence of Putrescine in feces of laying hens

Polyamines, Agave tequilana, laying hen, HPL

Citación: REYNOSO-OROZCO, Ramón, SÁNCHEZ-CHIPRÉS, David Román*, CHÁVEZ-MORA, Ivonne Yanine y NOA – PÉREZ, Mario. Inulina de Agave (*Agave tequilana*, Weber) Como Suplemento Alimenticio en Gallinas Ponedoras y su Efecto en los Niveles de Poliaminas en las Excretas. Revista de Simulación y Laboratorio 2017, 4-10: 1-7

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: dsanchez@cucba.udg.mx)

†Investigador contribuyendo como primer autor

1. Introducción

La producción de huevo en México es una actividad comparable con la de países desarrollados, participando con 4.7% de la producción mundial, después de Japón, Rusia, La India, Estados Unidos y China. En México la avicultura es una actividad económica de gran importancia y representó el 1.0% del Producto Interno Bruto (PIB) total en el 2016 (1). Dicha actividad económica aportó 1 millón 236,000 empleos directos e indirectos generados el mismo año. En nuestro país el huevo representa toda una cultura alimentaria, dado su alto valor nutricional, su accesibilidad a la mayor parte de la población, y versatilidad de preparación. Es importante mencionar que México es el principal consumidor de huevo a nivel mundial; en el mismo 2016 se reporta un valor de 22.8 kg de huevo por año, por persona (2).

Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que afectan de manera benéfica al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon (3). Los oligofruktanos (o varios azúcares simples unidos entre sí) son producidos por muchos tipos de plantas. Se concentra o almacena en el tejido fino de la planta; generalmente raíces y rizomas contienen las concentraciones más grandes (4). Los prebióticos son digeridos por bifidobacterias y estimulan su crecimiento, dichas bacterias a su vez contribuyen a la homeostasis de las células intestinales, además de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (5).

Las Poliaminas (PAs) Putrescina (Pu), Espermidina (Spd) y Espermina (Spm) son moléculas ubicuas, de bajo peso molecular y básicas dados sus grupos aminos, se obtienen de fuentes intrínsecas por biosíntesis intracelular, así como extrínsecas en el caso de la dieta, la flora intestinal, las secreciones relacionadas con la digestión, además de células desprendidas (6).

Se consideran necesarias para la homeostasis, división (7), así como la diferenciación celular ya que participan en múltiples vías metabólicas y procesos moleculares como la replicación, transcripción y traducción, así como moléculas indispensables para la sobrevivencia y el desarrollo (8). La retroconversión de las Poliaminas bioactivas Spd y Spm, respectivamente, las convierte en Pu que puede ser excretada.

El efecto de la dieta respecto a los niveles de PAs en las excreciones permite el uso de la determinación de dichas moléculas extensamente (9, 10, 11), entre muchas otras aplicaciones y en distintos modelos de estudio (12). Debemos mencionar que existe controversia respecto al uso de las PAs como marcadores moleculares en distintos modelos y/o estados fisiológicos; por un lado, se argumenta que los niveles de PAs son resultado de una respuesta total del cuerpo, cuando se determinan en fluidos o excreciones en casos de cáncer (13) y otros padecimientos (14, 15) y sin embargo en el estudio de las plantas son bien reconocidas como indicadores de estrés desde hace 40 años (12).

En el presente estudio se determinaron los niveles de Pu, Spd y Spm en heces de gallinas ponedoras que fueron alimentadas con una dieta adicionada con Fructanos obtenidos de *Agave tequilana*, dado que no existen reportes de los niveles de PAs a partir de dicha fuente.

2.- Objetivo general:

En el presente estudio el objetivo fue el de determinar los niveles de Pu, Spd y Spm en heces de gallinas ponedoras alimentadas con una dieta adicionada con Fructanos obtenidos de *Agave tequilana*.

3.- Materiales y Métodos:

3.1.- Diseño Experimental

Se utilizaron 100 pollitas de un día de nacidas de la línea hy-line w-36, divididas aleatoriamente en 3 tratamientos y se analizó las excretas de 10 pollitas por tratamiento, en la última semana de postura. Los tratamientos fueron categorizados como Testigo (control sin Fructanos de agave), Fructanos 0.1% (1 Kg de Fructanos de agave/tonelada de alimento) y Fructanos 0.2% (2 Kg de Fructanos de agave/tonelada de alimento). La cantidad de adición de Fructanos de agave fue determinada por experimentos preliminares (16). La prueba duró desde el desarrollo hasta las 30 semanas de postura.

3.2.- Alimentación y manejo

El alojamiento de las aves fue en piso con cama de olote de maíz y espacio acondicionado para la etapa de postura con nidos de lámina galvanizada. Durante el experimento se proporcionó a las aves alimento en dos ocasiones, por la mañana y por la tarde de manera controlada, de acuerdo a un programa de alimentación conforme a su requerimiento y un consumo apropiado y garantizado de nutrientes según las tablas del NRC (17), de manera controlada.

El alimento fue servido en comederos tipo tolva. El agua fue suministrada en bebederos de campana a saciedad. Los Fructanos de agave fueron adicionados en la dieta en forma de harina. Se llevó a cabo un calendario de vacunación de acuerdo la zona de estudio y la referencia técnica de la estirpe aviar. El periodo de luz se ajustó a 17 horas. Las aves se mantuvieron en estas condiciones por tres semanas y posteriormente hasta alcanzar un peso promedio de 1.119 Kgs y 21 semanas de edad para iniciar la postura.

3.3.- La Determinación de PAs

Las concentraciones de Pu, Spd y Spm (Sigma) se determinaron en excretas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC) con detección de fluorescencia (Agilent 1200 series, Germany) según Marcé et al., (18) con pequeñas modificaciones y al término de la prueba. Se tomaron 200 mg de muestra y se mezclaron con 1 ml de TCA-HCl, se adicionaron 40 μ L de diaminoheptano (DAH) (Sigma) como estándar interno a 1 ngr/ μ L y se centrifugaron en tubo Eppendorf a 14,000 rpm/20 min.

Se tomaron 100 μ L del sobrenadante y se mezclaron en un vial ámbar con 40 μ L de carbonato de sodio saturado y se adicionaron 100 μ L de cloruro de dansilo (Sigma) (5 mg/ml de acetona). Los viales se taparon y se dejaron reposar toda la noche en oscuridad, se desecaron a temperatura ambiente por 72 hrs y con nitrógeno gas a 60 °C, respectivamente. Se re-suspendieron en 1 ml de agua y se filtraron en cartuchos Octadecil C18 (J.T.Baker, Holanda), y que previamente se activaron con 1 ml de Metanol (Sigma-Aldrich). Se equilibraron con 1 ml de bicarbonato de sodio 20 mM a pH de 12.

Se pasó la muestra dansilada y se lavó la columna con 5 mL de agua. Las PAs se eluyeron con 1 ml de AcN (Caledon, Canadá), y se inyectaron 20 μ L al cromatógrafo de líquidos. Para analizar los niveles de PAs se utilizó el método de dansilación con cloruro de dansilo propuesto por Marcé. Las PAs dansiladas fueron separadas por RP-HPLC, con columna Lichrosorb 10-RP-18 (4.6x250 mm). Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de acetonitrilo:agua (90:10) a 1 mL/min., detección con fluorescencia, a 340 nm de excitación y 435nm de emisión (Agilent G1321A FLD).

La concentración de PAs se determinó por el método del estándar interno (DHA como referencia), y se expresó en ng/g de Pu en heces. La recuperación mostro un valor mayor al 85% cuando se usaron 80 ngs de estándares.

3.4.- Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para diferencia de medias y el método de Dunn para la comparación de medias, respectivamente. Los valores se expresan como promedios \pm error estándar. Los análisis se desarrollaron con el paquete estadístico SigmaPlot para Windows, versión 11. Las diferencias se consideraron significativas con el valor de $p < 0.05$.

4.- Resultados y Discusión

Dado que no existen reportes sobre los niveles de PAs en heces de gallinas de postura, ésta es la principal aportación del presente trabajo. Aunque se consideran más apropiadas como indicadores de cambios fisiológicos, como el efecto de la dieta, a las formas acetiladas de la PAs Pu, Spd y Spm, en excreciones (19). Sin embargo, en el caso de heces de gallina la Pu en su forma no acetilada es el mejor indicador para dietas adicionadas con Fructanos procedentes de *Agave tequilana* (Fig. 1). Spd y Spm no parecen ser buenos indicadores, dado que los niveles registrados se encontraron muy cercanos al límite inferior de detección (datos no presentados).

Dado que aquí se tomaron 200 mg de muestra, probablemente aumentar la cantidad de heces permite que Spd y Spm sean también buenos candidatos como biomarcadores del efecto de la dieta, aunque esto requiere de más estudios. Los resultados están de acuerdo con múltiples trabajos previos que muestran a Pu como la PA que más se excreta en distintos modelos (19, 20, 21), respecto a Spd y Spm.

La técnica de separación utilizada en el presente estudio permite la determinación de las tres PAs (Fig., 2) Pu, Spd y Spm, consideradas clásicas en sus distintas aplicaciones (21), con las correspondientes ventajas, dado que la obtención de muestra es no invasiva, entre otras, y para el modelo presentado aquí.

En la Grafico 1, se observa que los Niveles de Pu en heces de gallinas de postura alimentadas con una dieta adicionada con Fructanos de *Agave tequilana*, según los Materiales y Métodos, los valores corresponden al promedio \pm el error estándar, obtenidos mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn para comparación de medias.

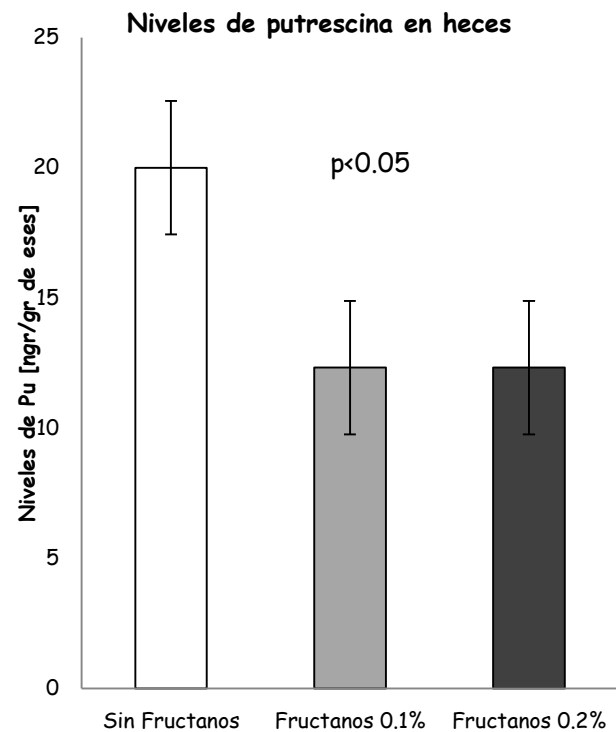


Grafico 1 Niveles de Pu en heces de gallinas de postura alimentadas con una dieta adicionada con Fructanos de *Agave tequilana*

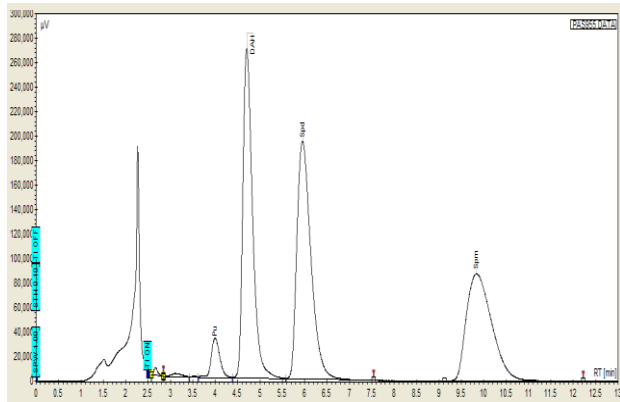


Grafico 2 Cromatograma correspondiente a los estándares de PAs: Pu, Spd y Spm, así como DAH como estándar interno y donde se incluye los tiempos de retención de cada molécula

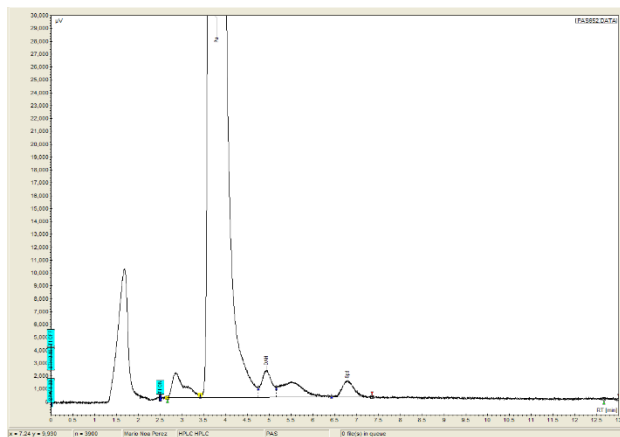


Grafico 3 Cromatograma típico de una muestra de heces de gallinas de postura alimentadas con una dieta adicionada con Fructanos de *Agave tequilana* y sus respectivos tiempos de retención

En el Grafico 2 observamos el Cromatograma correspondiente a los estándares de PAs: Pu, Spd y Spm, así como DAH como estándar interno, en donde se incluye los tiempos de retención de cada molécula, y en el grafico 3 se observa el Cromatograma típico de una muestra de heces de gallinas de postura alimentadas con una dieta adicionada con Fructanos de *Agave tequilana* y sus respectivos tiempos de retención.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una asociación entre el efecto de la dieta con el contenido de Pu (grafico 3), con la ventaja de usar un tipo de muestra no invasiva, con respecto a otros trabajos con propósitos similares (22). Por otro lado, aunque en el reino vegetal está bien establecido el uso de las PAs como indicadores de estrés (12), éste no es un criterio plenamente aceptado en animales, excepto cuando se trata una patología como el cáncer (21, 23).

En el presente modelo se observaron diferencias físicas significativas en el estado general de las gallinas que fueron alimentadas con una dieta adicionada con Fructanos de *Agave tequilana*, respecto a dietas sin adición; entre otras, el plumaje se desarrolló mejor, más uniforme; con un comportamiento menos inquieto o menos estresadas y con mejor calidad de huevo. Quizás estos parámetros requieran de más estudios para corroborar dichas observaciones superficiales.

7 Referencias

- [1]SAGARPA, 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.gob.mx/sagarpa
- [2]UNA, 2014. Unión Nacional de Avicultores. www.una.org.mx
- [3]Gibson, G.R.; Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 1995, 125, 1401–1412.
- [4]Corzo, N.; Alonso, J.L.; Azpiroz F.; Calvo, M.A.; Cirici, M.; Leis, R.; Lombo, F.; Mateos-Aparicio, I.; Plou, F.J.; Ruas-Madiedo, P.; Rúperez, P.; Redondo-Cuenca, A.; Sanz, M.L.; Clemente, A. Prebiotics: concept, properties and beneficial effects. 2015, *Nutrición Hospitalaria*, 31(s01):99-118.

- [5]Yoo, J.Y.; Kim S.S. Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. *Nutrients* 2016, 8, 173; doi:10.3390/nu8030173
- [6]Vargas, A.J.; Wertheim, B.C.; Gerner, E.W.; Thomson, C.A.; Rock, C.L.; Thompson, P.A. Dietary polyamine intake and risk of colorectal adenomatous polyps. *Am J Clin Nutr.* 2012, 96(1):133-41.
- [7]Ruseva, S.; Lozanov, V.; Markova, P.; Girchev, R.; Mitev, V. In vivo investigation of homocysteine metabolism to polyamines by high-resolution accurate mass spectrometry and stable isotope labeling. *Anal Biochem.* 2014, 457:38-47.
- [8]Majumdar, R.; Barchi, B.; Turlapati, S.A.; Gagne, M.; Minocha, R.; Long, S.; Minocha, S.C. Glutamate, Ornithine, Arginine, Proline, and Polyamine Metabolic Interactions: The Pathway Is Regulated at the Post-Transcriptional Level. *Front Plant Sci.* 2016, 16;7:78.
- [9]Cremades, A.; Sanchez-Capelo, A.; Monserrat, A.; Monserrat, F.; Peñafiel, R. Effects of potassium deficiency on potassium, polyamines and amino acids in mouse tissues. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2003, 134(3):647-54.
- [10]Yanaiida, Y.; Kohno, H.; Yoshida, K.; Hirose, Y.; Yamada, Y.; Mori, H.; Tanaka, T. Dietary silymarin suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinogenesis.* 2002, 23(5):787-94.
- [11]Gonzalez-Esquerria, R.; Leeson, S. Concentrations of putrescine, spermidine, and spermine in duodenum and pancreas as affected by the ratio of arginine to lysine and source of methionine in broilers under heat stress. *Poult Sci.* 2006, 85(8):1398-408.
- [12]Minocha, R.; Majumdar, R.; Minocha, S.C. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Front Plant Sci.* 2014, 5;5:175.
- [13]Häkkinen, M.R.; Roine, A.; Auriola, S.; Tuokko, A.; Veskimäe, E.; Keinänen, TA.; Lehtimäki, T.; Oksala, N.; Vepsäläinen, J. Analysis of free, mono- and diacetylated polyamines from human urine by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013, 15;941:81-9.
- [14]Teti D.; Visalli, M.; McNair, H.J. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002, 5;781(1-2):107-49.
- [15]Paik, M.J.; Lee, S.; Cho, K.H.; Kim, K.R. Urinary polyamines and N-acetylated polyamines in four patients with Alzheimer's disease as their N-ethoxycarbonyl-N-pentafluoropropionyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring mode. *Anal Chim Acta.* 2006, 18;576(1):55-60.
- [16]Park, S.O.; Park, B.S. 2012. Effect of feeding inulin oligosaccharides on cecum bacteria, egg quality and egg production in laying hens. *African J of Biotech.* 2012, 11(39):9516-9521.
- [17]NRC National Research Council, 1992.
- [18]Marcé, M.; Brown, D.S.; Capell, T.; Figueras, X.; Tiburcio, A.F. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *J of Chromatography B,* 1995, 666: 329-335.

[19]Muskiel, F.A.J.; Dorhout, B.; van den Berg, G.A.; Hessels, J. Investigation of polyamine metabolism by high-performance liquid chromatographic and gas chromatographic profiling methods. *J of Chromat B*, 1995, 667:189-198.

[20]Reynoso-Orozco, R.; Santerre, A.; Delgado-Saucedo, J.I.; Casas-Solís, J.; Velázquez-Magaña, S.; Puebla-Pérez, A.M. *Interciencia*, 2008, 33, (5):384-388.

[21]Khuhawara, M.Y.; Qureshib, G.A. Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *J of Chromat B*, 2001, 764:385–407.

[22]Gostner, A.; Blaut, M.; Schäffer, V.; Kozianowski, G.; Theis, S.; Klingenberg, M.; Dombrowski, Y.; Martin D.; Ehrhardt, S.; Taras, D.; Schwiertz, A.; Kleessen, B.; Lührs, H.; Schauber, J.; D. Dorbath, D.; Menzel, T.; Scheppach, W. Effect of isomalt consumption on faecal microflora and colonic metabolism in healthy volunteers. *British J of Nut*, 2006, 95:40–50.

[23]Gugliucci, A. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clinica Chimica Acta*. 2004, 344: 23–35.