

ESTADO OXIDATIVO EN GATAS SUPLEMENTADAS CON ACEITE DE PESCADO Y DESAFIADAS CON ACETAMINOFÉN

Oxidative Status in Cats Supplemented with Fish Oil and Challenged with Acetaminophen

Iris Constanza González¹, Mirela Noro^{1,2*}, Juan Sebastián Galecio¹, Ricardo Chihuailaf³ y Fernando Wittwer¹

¹Inst Cs Clín Vet, Universidad Austral de Chile (UACh), Casilla 567, Valdivia, Chile;

²Curso de Medicina Veterinaria, Universidad Federal do Pampa, UNIPAMPA, Uruguaina, Brasil;

³Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile. *mirelanoro@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el balance energético y oxidativo en gatas suplementadas con aceite de pescado y determinar la presencia de daño oxidativo posterior a un desafío con acetaminofén. Se utilizaron ocho gatas adultas, esterilizadas, alimentadas con concentrado comercial y divididas en dos grupos (n=4), C (control) y AP (8% de aceite de pescado), durante 60 días (d). Cada 10 d, hasta el d 60, se determinó el peso vivo, condición corporal, índice de masa corporal y los valores sanguíneos de indicadores energéticos (triacilglicerol, colesterol, ácidos grasos no esterificados), de daño oxidativo (malondialdehído [MDA], fragilidad osmótica eritrocitaria [FOE] y cuerpos de Heinz) y del estado antioxidante (glutatión peroxidasa, cobre, zinc). Al d 60 se desafiaron con acetaminofén (100 mg/kg *po*), obteniéndose muestras de sangre a las 0; 4; 24; 72 y 120 horas para determinar daño oxidativo y hepático (ALT y ALP). La suplementación con aceite de pescado no modificó los indicadores de daño oxidativo, a su vez incrementó el peso corporal (16%). Posterior al desafío con acetaminofén se incrementó la actividad plasmática de ALP y el MDA eritrocitario; con valores superiores de FOE en el grupo AP, sin cambios en los otros indicadores de daño oxidativo. Se concluye que gatas suplementadas en la dieta con 8% de aceite de pescado incrementan su peso sin modificar el estado antioxidante o la susceptibilidad al estrés oxidativo. Sin embargo, presentan una mayor fragilidad osmótica eritrocitaria posterior a un desafío con acetaminofén comparado con las controles, motivo por lo cual no se recomienda el uso de aceite de pescado como suplemento de la dieta.

Palabras clave: Gatos, acetaminofén, estrés oxidativo, aceite de pescado.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the energy and oxidative balance in cats supplemented with fish oil and the presence of oxidative and liver damage after a challenge with acetaminophen. Eight sterilized female cats were fed with commercial concentrate and allotted into groups (n = 4), C (control) and AP (8% fish oil in the diet) for 60 days (d). Body weight, body condition, body mass index, blood markers for energy (triacylglycerol, cholesterol, free fatty acids), oxidative damage (malondialdehyde [MDA], erythrocyte osmotic fragility [FOE] and Heinz bodies [HB]) and antioxidant status (glutathione peroxidase, copper, zinc) were determined on d 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60. At d 60, cats were challenged with acetaminophen (100mg/kg *po*) and blood samples were obtained at 0, 4, 24, 72 and 120 hours to determine oxidative (MDA, HB) and liver damage (ALT and ALP). Supplementation with fish oil increased body weight (16%) without inducing oxidative damage. Meanwhile acetaminophen challenge increased plasma ALP activity and erythrocyte MDA, with higher values of FOE in AP group compared to C. It was concluded that cats supplemented in the diet with 8% fish oil increased their weight without changes in their antioxidant status or susceptibility to oxidative stress. However, an increased erythrocyte osmotic fragility was determined after a challenge with acetaminophen, which is why it is not recommended the use of fish oil as a dietary supplement.

Key words: Cats, acetaminophen, oxidative stress, fish oil.

INTRODUCCIÓN

El gato (*Felis catus*) se caracteriza por tener una alta tolerancia a dietas ricas en grasas [19]. A su vez, incorporar en su alimentación ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), como los que constituyen al aceite de pescado, puede generar sobrepeso [14], el cual se ha asociado con la presentación de estrés oxidati-

vo en humanos y ratones (*Mus musculus*) [13, 25]. De igual manera, la incorporación de aceite de pescado en la dieta de gatos se asocia con la presentación de daño oxidativo [15].

Tradicionalmente se ha entendido al estrés oxidativo como el desequilibrio entre antioxidantes y oxidantes, por un exceso relativo de radicales libres producidos en el organismo [4]. Dentro de los radicales libres, los más frecuentemente producidos son los derivados del oxígeno, denominándose especies reactivas de oxígeno (ERO) [31]. Por otro lado, existe un sistema antioxidante conformado por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que protegen el organismo de la acción deletérea de los radicales libres [4]. Los antioxidantes enzimáticos catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Dentro de estas enzimas se encuentran la superóxido dismutasa (SOD) -dependiente de Cu y Zn-, catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) [4].

El estrés oxidativo produce daño oxidativo en el ADN, proteínas y lípidos [4, 22]. La peroxidación lipídica (LPO) se produce por la interacción de una ERO con un PUFA, formando un radical libre acil ácido graso, el cual se transforma en un radical libre peróxido ácido al adicionar oxígeno. Cuando la LPO se produce en membranas celulares o subcelulares, se altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica [23]. Es así que estimaciones indirectas del estatus de la LPO han sido determinadas a través de la prueba de la fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE), visto que los eritrocitos están sujetos a daño oxidativo cuando se reduce intracelularmente la producción de antioxidantes como NADPH y glutatión reducido (GSH) [8]. Por otro lado, una baja concentración de GSH, aumenta la concentración de metahemoglobina con formación de cuerpos de Heinz (CH) [10]. La formación de CH ha sido reportada en gatos luego de la administración de acetaminofén [20]. En conejos (*Oryctolagus cuniculus*), la administración intraperitoneal de acetaminofén incrementa la concentración de malondialdehído (MDA) y, la actividad plasmática de aspartato aminotransferasa (AST, EC:2.5.1.1) y de alanina aminotransferasa (ALT, EC: 2.6.1.2), indicando su efecto en la LPO e inducción de daño hepatocelular [9].

Se postula que, la suplementación con aceite de pescado en gatos modifica su balance oxidante-antioxidante, incrementando el balance nutricional de energía y el daño oxidativo, el cual se vería exacerbado al desafiar las células con un estímulo oxidante como el acetaminofén. Basado en los antecedentes planteados, el objetivo del estudio fue evaluar el balance energético y el estatus oxidativo en gatos suplementadas con aceite de pescado y determinar presencia de daño oxidativo y hepático al ser desafiadas mediante la administración oral de acetaminofén.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y manejo. Se utilizaron ocho gatas, adultas, esterilizadas, clínicamente sanas, vacunadas y desparasitadas. Las gatas fueron mantenidas en las dependencias de la Clínica de

Pequeños Animales del Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, en jaulas individuales de 50 x 50 x 75 cm, con un receptáculo con viruta de madera para la recolección de deposiciones y orina, además de un recipiente con agua *ad libitum* y otro para el alimento. Los animales recibieron una dieta base constituida de alimento comercial para gato adulto (Cat Chow®, Purina, 88% MS; 9% EE; 31% PB; 3,5% fibra cruda; 1% Ca; 0,8% P) entregada una vez al día en la mañana según el requerimiento energético diario (RED) para gata esterilizada calculado en Kcal multiplicando el requerimiento energético en reposo (RER) por 1,2. El RER es obtenido multiplicando el peso metabólico ($PV^{0,75}$) por 70.

Diseño experimental. Las gatas se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos homogéneos de cuatro gatas cada uno: grupo C, no tratado, alimentado con la dieta base y grupo AP, alimentadas con la dieta base más aceite de pescado industrial (Serenor S.A), con 32% de PUFA (TABLA I), administrado con una jeringa, en cantidad de 8% de la dieta (TCO), dando un aporte energético de 9 kcal/g. El experimento tuvo una duración de 65 d, con un modelo de muestreos repetidos.

Muestreos y determinaciones. A los días 0; 30 y 60 del experimento se determinó el peso corporal y el índice de masa corporal felina (IMCF) mediante dos mediciones morfométricas. Manteniendo el animal en estación con las extremidades perpendiculares al suelo y la cabeza en posición vertical se determinó: ¹la circunferencia torácica en cm a nivel craneal de la novena costilla y, ²el índice de medida de la pierna (IMP), calculada mediante la distancia entre la rótula y la tuberosidad del calcáneo en cm. Así, $IMCF = \{[(Caja\ torácica/0,7067) - IMP] / 0,9156\} - IMP$ [6].

Muestras de sangre se obtuvieron en ayuno al día 0; 10; 20; 30; 40 y 60 del período experimental, mediante venopunción yugular utilizando tubos con heparina, con ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) y sin anticoagulante; previa sedación del animal con xilacina al 2% en dosis de 1 mg/kg vía sc (Rompun, Bayer®).

De las muestras de sangre con heparina se separó una alícuota para determinar la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9), luego se centrifugaron (Centra CL3E, Thermo IEC, EUA) por 10 minutos (min) a 600 x g, al igual que las muestras sin aditivo, para la obtención de plasma y suero, respectivamente, los cuales fueron almacenados en microtubos de 1,5 mL y congelados (Freezer 420, Consul®, CFC Free, Brasil) a -20°C hasta el momento de su análisis.

Análisis de las muestras. Las alícuotas de las muestras de sangre con heparina obtenidas a los días 0; 30 y 60 del período experimental fueron hemolizadas y congeladas a -20°C para posteriormente determinar la actividad sanguínea de GPx (Ransel, Randox®) en un autoanalizador COBAS MIRA plus® (Roche, Alemania). La hemoglobinemia se determinó mediante el método de cianometahemoglobina [32] usando un espectrofotómetro Hitachi 4020® (Japón) a 546 nm.

TABLA I
PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE PESCADO
USADO EN EL EXPERIMENTO

	Grupos	Porcentaje %
	Omega 3	30,3
	Saturados	35,8
	Mono insaturados (MUFA)	24,7
	Poli insaturados (PUFA)	32,3
Láurico	C 12:0	0,2
Mirístico	C 14:0	8,0
Miristoleico	C 14:1	0,3
Pentadecanoico	C 15:0	0,7
Palmítico	C 16:0	19,9
Palmitoleico	C 16:1	6,1
Heptadecanoico	C 17:0	0,8
Heptadecanoico	C 17:1	0,3
Estearico	C 18:0	4,3
Oleico	C 18:1	13
Linoleico n-6	C 18:2	1,6
Linolénico n-3	C 18:3	1,5
Ecosanoico	C 20:0	0,3
Ecosaenoico	C 20:1	4,4
Eicosadienoico	C 20:2	0,2
Eicosatrienoico	C 20:3	0,3
Araquidónico n-6	C 20:4	0,2
Eicosapentaenoico n-3	C 20:5	12,5
Dicosanoico	C 22:0	1,1
Tetracosanoico	C 22:5	1,4
Docosahexaenoico n-3	C 22:6	14,6
Dicosapentaenoico n-3	C 24:1	0,6

Las concentraciones séricas de zinc (Zn) y cobre (Cu) se determinaron en las muestras de suero obtenidas los días 0; 30 y 60, previa dilución a 1:5 y 1:2 con LaCl_3 al 0,1%, respectivamente. La medición de Zn y Cu se efectuó en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 2380® (EUA) a 213,9 nm y 324,8 nm, respectivamente.

La concentración plasmática y eritrocitaria de malondialdehído (MDA) se determinó mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS). En un microtubo de 1,5 mL se adicionó 150 μL de ácido acético al 20%, 20 μL de dodecilsulfato (SDS) al 8,1%, 30 μL de agua destilada, 70 μL de plasma o eritrocitos y 150 μL de ácido tiobarbitúrico al 0,8%. Se mezcló e incubó a 95°C en el termorregulador Cole- Palmer V320 (EUA) durante 15 min. Se dejó enfriar por 30 min, se le adicio-

no 100 μL de agua destilada y 500 μL de solución de butanol-piridina en proporción 15:1, se mezcló y centrifugó a 4°C por 3 min a 25.000 x g. Se depositó 350 μL del sobrenadante en una microplaca para ELISA. La concentración de MDA fue medida en un lector de microplaca, Bio-tek, ELX800 (EUA) a 540 nm.

El porcentaje de eritrocitos con CH se determinó microscópicamente en frotis de sangre teñidos con azul cresil brillante. Para ello se depositaron en un microtubo dos gotas de sangre en contacto con dos gotas de colorante azul de cresil brillante, luego de incubada en un termorregulador Cole- Palmer V320 (EUA) a 37°C por 15 min, se realizó un frotis en el cual se observó al microscopio (Olympus CX31®, Japón, 1.000x) la presencia de eritrocitos con CH estableciendo su porcentaje en 1.000 eritrocitos.

La fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE) se determinó dentro de 24 horas (h) de recolectadas las muestras de sangre con EDTA. Para ello 20 μL de sangre se diluyeron en 5 mL de solución de NaCl al 0,55% y posterior a un reposo de 30 min y centrifugación a 600 x g por 10 min se leyó la absorbancia a 546 nm utilizando como blanco agua en el fotocolorímetro Hitachi 4020® (Japón). Como control de 100% de hemólisis se empleó una dilución de 20 μL de sangre diluida en 5 mL de agua. La FOE se expresó en porcentaje de hemólisis = (densidad óptica [DO] de la muestra / DO del control) x 100.

La concentración sérica de colesterol (CHOD-PAP, Human®, 10019), triacilglicerol (GPO – PAP, Human®, 10724) y ácidos grasos no esterificados (AGNE, NEFA-C, ACS- ACOD, Wako®, 994-75409), se determinaron a 546 nm, utilizando un autoanalizador COBAS MIRA plus® (Roche, Alemania).

Desafío oxidante. En el día 60, las ocho gatas se sometieron a un estímulo oxidante mediante la administración de acetaminofén (paracetamol, Kitadol®, solución, Laboratorio Chile) en una dosis única de 100 mg/kg vía oral mediante el uso de un gotario. Se obtuvieron muestras de sangre mediante venopunción yugular a las 0; 4; 24; 72 y 120 h posterior.

Las concentraciones plasmáticas y eritrocitarias de MDA, el porcentaje de eritrocitos con CH y la FOE se determinaron conforme a lo indicado anteriormente. Las actividades plasmáticas de alanina amino transferasa (ALT, EC 2.6.1.2, Human®, 12021) y fosfatasa alcalina (ALP, EC 3.1.3.1, Human®, 12027), y las concentraciones plasmáticas de urea (GLDH, Human®, 10521) y creatinina (Jaffé, Human®, 10051) fueron determinadas en las muestras de plasma heparinizado utilizando un autoanalizador COBAS MIRA plus®, (Roche, Alemania).

Análisis estadístico. Se analizó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad mediante la prueba de Bartlett [28]. Los datos con distribución paramétrica y homocedástica fueron analizados mediante la prueba t de Student no pareado, y los datos con distribución no paramétrica o heterocedásticos mediante la prueba de Mann-Whitney U [27]. Las diferencias entre los muestreos dentro de un mismo tratamiento fueron determinadas mediante un

modelo de ANDEVA de muestras con el siguiente modelo: $Y_{ij} = \mu + T_i + D_j + TD_{ij} + \varepsilon_{ij}$, donde: Y_{ij} = el efecto calculado, μ = media general, T_i = efecto del i-ésimo tratamiento, D_j = efecto del j-ésimo d/min; TD_{ij} = interacción tratamiento y d/min y ε_{ij} = error. Las diferencias fueron contrastadas por la prueba de Tukey [26], con un nivel de significación del 5%, utilizando el programa estadístico Statistix 8.0 [29].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Indicadores de balance energético. Las medias de los pesos corporales iniciales de las gatas de ambos grupos fueron similares ($P > 0,05$; TABLA II, FIG.1). A su vez, las gatas suplementadas con aceite de pescado incrementaron su peso vivo (PV) desde los 40 d llegando a los $3,7 \pm 0,1$ kg a los 60 d (aumento de 0,6 kg, equivalente al 16%) comparado con el grupo control ($P < 0,05$), el cual mantuvo constante su peso durante el ensayo ($P > 0,05$; FIG.1). La condición corporal y el IMCF se mantuvieron constantes y sin diferencias entre grupos ($P > 0,05$), solo este último presentó una tendencia a ser superior en el grupo aceite de pescado ($P < 0,1$) comparado con el grupo control (TABLA II). Estos resultados coinciden con el mayor aporte energético entregado por la suplementación con aceite de pescado, no obstante el tiempo de suplementación y dosis utilizada no fue suficiente para producir sobrepeso en las gatas suplementadas. El sobrepeso es el resultado de un balance energético positivo en el tiempo en el cual el ingreso de energía excede su gasto. Se considera como sobrepeso un peso corporal de 10 a 19% superior al óptimo, representando entre 3,2 a 4,4 kilos de PV y un IMCF superior al

30% [5]. A su vez otro autor considera sobrepeso entre 26 a 35% de IMCF y obesidad sobre el 35% [6].

Los indicadores sanguíneos de balance energético permanecieron constantes durante el período experimental, sin diferencias entre grupos ($P > 0,05$, TABLA II). Un efecto hipotriacilgliceromante se describe con el uso del aceite de pescado asociado a la presencia del ácido dicosahexanoico en su estructura, que inhibe la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y su secreción en el hígado [30]. Sin embargo, a altas concentraciones de PUFA, omega-3 y omega-6 de cadena larga en los lípidos de subproductos del mar se les atribuye la capacidad para reducir el colesterol y los triacilgliceroles en suero, reduciendo la presentación de enfermedades cardiovasculares [18].

Estado oxidativo. Los valores iniciales de los indicadores de balance antioxidante del organismo, concentraciones séricas de Cu y Zn y actividad sanguínea de la GPx, fueron similares entre los grupos ($P > 0,05$) y dentro de los intervalos de referencia propuestos para la especie (Cu= 5,6 a 22,1 $\mu\text{mol/L}$; Zn= 8,6 a 13,5 $\mu\text{mol/L}$; GPx >130 U/ g Hb) [32]. Las concentraciones de Cu y Zn permanecieron constantes y similares entre los grupos ($P > 0,05$, TABLA II) durante todo el período experimental, mientras que la actividad sanguínea de GPx del grupo control se incrementó al d 60 del ensayo (FIG. 2). Este incremento permitiría deducir que la dieta base aportó una cantidad adecuada de selenio (Se), superior a la que, tenían los animales previo al experimento, induciendo el aumento en la actividad de esta enzima antioxidante. Cabe señalar que el incremento en la actividad sanguínea de GPx se presenta posterior al mes de una suplementación con Se, tiempo asociado a la

TABLA II
VALORES ($X \pm EE$) DE INDICADORES ENERGÉTICOS Y DE BALANCE OXIDATIVO EN GATAS CONTROLES Y SUPLEMENTADAS CON ACEITE DE PESCADO EN LA DIETA

	Control	Aceite Pescado	P-Valor
Condición corporal (1-5)	2,7 \pm 0,11	2,6 \pm 0,11	0,5233
Peso (kg)	3,00 \pm 0,04	3,33 \pm 0,08	0,0049
IMCF ¹	17,3 \pm 0,49	18,5 \pm 0,51	0,0938
Colesterol (mmol/L)	2,17 \pm 0,14	2,17 \pm 0,18	0,9737
Triacilgliceroles (mmol/L)	0,55 \pm 0,10	0,56 \pm 0,07	0,6858
AGNE ($\mu\text{mol/L}$) ²	0,25 \pm 0,03	0,26 \pm 0,02	0,8229
Cu ($\mu\text{mol/L}$)	19,0 \pm 0,91	19,2 \pm 0,97	0,9027
Zn ($\mu\text{mol/L}$)	15,7 \pm 1,0	15,8 \pm 2,2	0,9127
GPx (U/ g Hb) ³	206 \pm 16	181 \pm 6,7	0,1656
Cuerpos de Heinz (%)	2,51 \pm 0,43	2,46 \pm 1,32	0,4754
FOE (%)	70,0 \pm 3,92	74,0 \pm 3,13	0,6227
MDA eritrocitario (nmol/mL)	1.913 \pm 319	1.791 \pm 288	0,9412
MDA plasmático (nmol/mL)	566 \pm 109	512 \pm 68,5	0,6641

¹IMCF= índice masa corporal felina; ²AGNE= ácidos grasos no esterificados; ³GPx= glutatión peroxidasa; ³FOE= fragilidad osmótica eritrocitaria; ⁴MDA= malondialdehído.

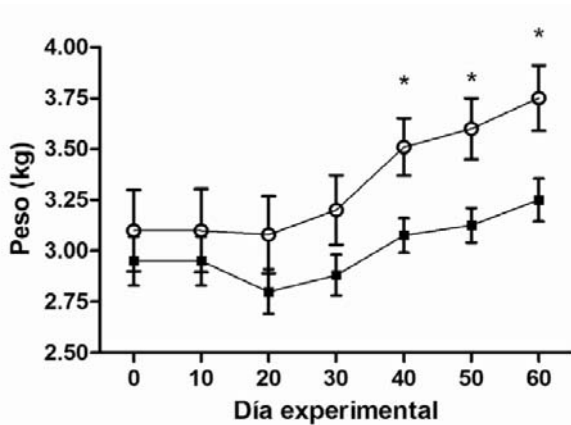


FIGURA 1. VARIACIÓN DEL PESO CORPORAL (\pm EE) EN GATAS SUPLEMENTADAS CON ACEITE DE PESCADO DURANTE 60 DÍAS (○, N=4) Y CONTROLES (■, N=4). *señala diferencias entre grupos.

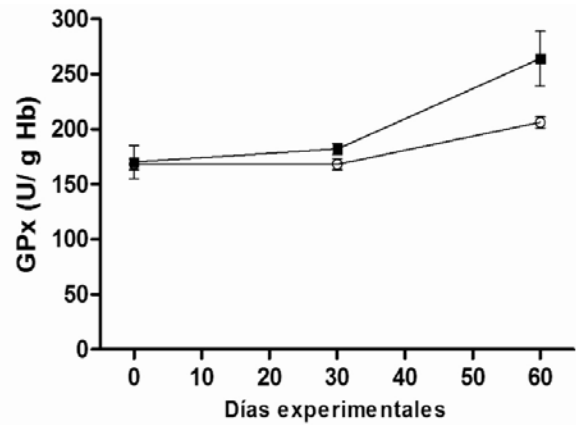


FIGURA 2. ACTIVIDAD SANGÜÍNEA DE GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX) EN GATAS SUPLEMENTADAS CON ACEITE DE PESCADO DURANTE 60 DÍAS (○, N=4) Y CONTROLES (■, N=4).

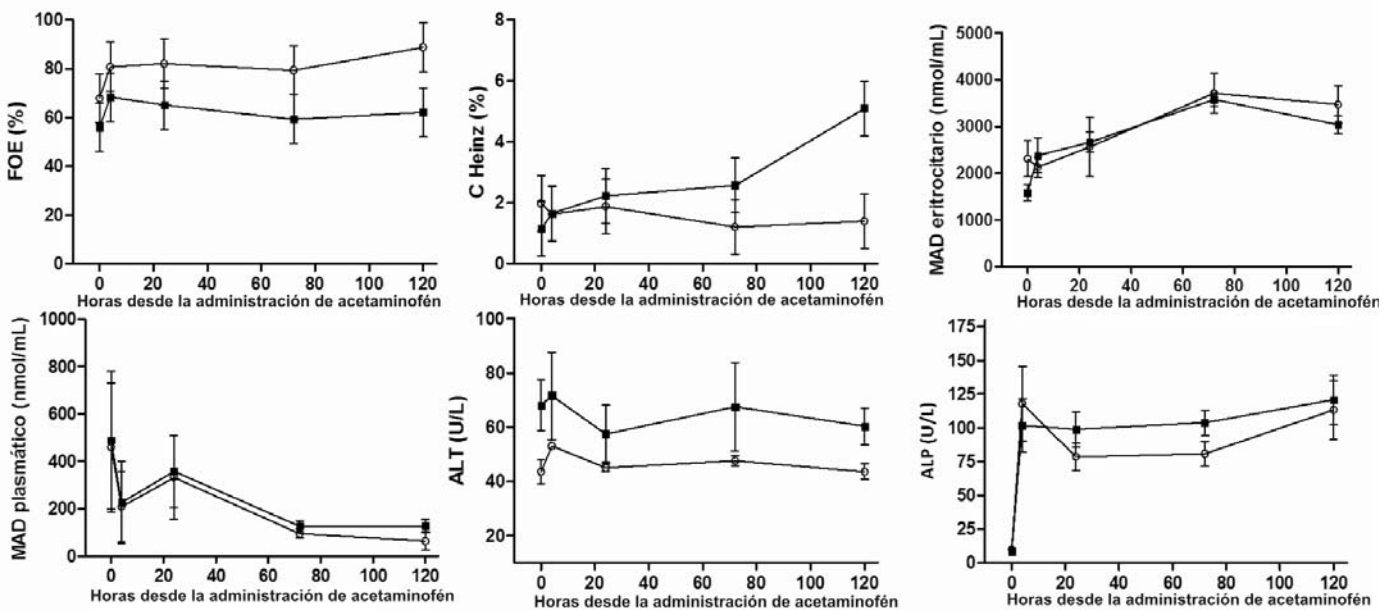


FIGURA 3. VARIACIONES EN LA FRAGILIDAD OSMÓTICA ERITROCITARIA (A), CORPÚSCULOS DE HEINZ (B), CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA (C) Y ERITROCITARIA (D) DE MALONDIALDEHIDO (MAD) Y ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE ALT (E) Y ALP (F) HASTA 120 HORAS POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS DE ACETAMINOFÉN (100 MG/KG P.O.) EN GATAS PREVIAMENTE SUPLEMENTADAS CON ACEITE DE PESCADO DURANTE 60 DÍAS (○, N=4) Y CONTROLES (■, N=4).

velocidad de reposición de los eritrocitos que en felinos es de 73 d [7]. Este aumento no se manifestó en las gatas suplementadas lo que podría indicar que, el aceite de pescado produjo una disminución relativa de la actividad de GPx. Otros estudios muestran que, alimentos ricos en lípidos modifican el estado antioxidante debido a que alteran la actividad enzimática de GPx y catalasa [21]. Al respecto, la suplementación con 20% de aceite de pescado a ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar, generó una disminución de diversas enzimas antioxidantes, entre las que se destaca la GPx [16, 30]. Una explicación tentativa sobre la cual no hay antecedentes disponibles hace refe-

erencia a una interferencia en la absorción del Se de la dieta por el aceite de pescado.

Los valores de los indicadores de daño oxidativo, concentración plasmática y eritrocitaria de MDA, porcentaje de CH y FOE, fueron similares ($P > 0,05$; TABLA II) para los dos grupos y se mantuvieron constantes ($P > 0,05$) durante el período experimental. Estos resultados señalan que la suplementación con aceite de pescado no produjo un incremento de la LPO en las células sanguíneas de las gatas. Resultados similares han sido descritos en ratas suplementadas por 30 d con aceite de pescado en dosis de 0,4 g/kg/d [24]. Por otro lado, existen an-

TABLA III
VALORES DE INDICADORES DE DAÑO OXIDATIVO EN GATAS CONTROLES Y SUPLEMENTADAS CON ACEITE DE PESCADO Y DESAFIADAS CON ACETAMINOFÉN

	Aceite	Control	EE	P-Valor		
				Grupo	Horas	Grupo*Horas
Cuerpos de Heinz (%)	1,53	2,89	0,59	0,192	0,547	0,307
FOE (%)	82,8	63,7	5,90	0,028	0,780	0,971
MDA eritrocitario (nmol/mL)	2.970	2.910	181	0,405	0,001	0,642
MDA plasmático (nmol/mL)	170	210	60	0,741	0,130	0,999
ALT (U/L)	47,3	64,2	4,67	0,003	0,735	0,974
ALP (U/L)	97,6	108,1	9,17	0,436	0,001	0,734
Urea (mmol/L)	9,34	8,60	0,29	0,086	0,042	0,419
Creatinina (µmol/L)	82,1	79,4	2,54	0,468	0,031	0,987

EE: error estándar; FOE: fragilidad osmótica eritrocitaria; MDA: malondialdehído; ALT: alanina amino transferasa; ALP: fosfatasa alcalina.

tecedentes que en células hepáticas y del corazón de ratas Wistar alimentadas con 20% de aceite de pescado se produce estrés oxidativo con una reducción de enzimas antioxidantes y un incremento de productos de LPO [16]. Adicionalmente, dietas hipercalóricas son susceptibles a daño oxidativo, especialmente en humanos, debido a la susceptibilidad de los PUFA al daño oxidativo con la posterior generación de productos tóxicos, siendo su sensibilidad a la LPO proporcional a su número de dobles enlaces [11].

Desafío oxidante. El uso de acetaminofén en dosis única de 100 mg/kg PV como desafío oxidante, no generó signos clínicos de intoxicación en ninguna de las ocho gatas. Se reporta que dosis de 50-100 mg/kg de acetaminofén pueden provocar signos de toxicidad y muerte [1]. En un estudio realizado con gatos a los que se administró una dosis de 90 mg/kg, se observó una intoxicación a las cuatro h de ingerido el medicamento con edema facial a las dos horas y metahemoglobina a las 24 h [2].

Si bien no se observaron signos clínicos compatibles con intoxicación con acetaminofén hubo un marcado incremento en la actividad plasmática de ALP en ambos grupos desde las cuatro h posterior al desafío, manteniéndose sobre el límite de referencia en el tiempo ($P < 0,05$; TABLA II, FIG. 3). De igual forma, se incrementó el MDA eritrocitario ($P < 0,05$, FIG. 3) posterior a la administración del fármaco. El aumento posterior al desafío oxidante en ambos indicadores, señaló que el acetaminofén generó daño hepático y LPO de eritrocitos. Por otro lado, la suplementación con aceite de pescado incrementó la FOE ($P < 0,05$; TABLA III), no observándose diferencias para las otras variables evaluadas. Sin embargo, la actividad plasmática de ALT previa al desafío oxidante con acetaminofén fue mayor en el grupo control, situación que se mantiene a lo largo del periodo experimental (FIG.3), y que podría asociarse a mayor integridad de las membranas de los hepatocitos producto de la suplementación con aceite de pescado, por lo tanto habría generado un efecto hepatoprotector.

En un estudio realizado en ratas se observó que dietas con un 5% de suplementación con aceite de pescado presentaron un efecto beneficioso en el tejido hepático protegiéndolo de agentes oxidantes [3]. No obstante se describe que dietas compuestas por PUFA influyen para que el acetaminofén produzca daño oxidativo en el hígado, debido a que el aceite de pescado modifica la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos del hígado y del eritrocito [11].

El porcentaje de eritrocitos con CH no se incrementó dentro de las 120 h de administrado el acetaminofén, quizás porque el efecto del acetoaminofén es más tardío, si bien se ha reportado que los efectos aparecen a los dos d, para luego desaparecer a los 12 d post intoxicación [12]. Los eritrocitos de los gatos presentan dos sitios lábiles a sufrir daño oxidativo, que son el fierro y los grupos sulfidrílos de las cadenas de globulinas, incrementando considerablemente la susceptibilidad a la desnaturalización oxidativa de la hemoglobina con formación de CH. Esto se atribuye a los 8-10 grupos sulfidrílos presentes por molécula comparado con los 2 ó 4 presentes en otras especies mamíferas [2], y a que el bazo de los felinos es ineficaz para remover los corpúsculos de Heinz de la sangre, siendo así un marcador persistente del daño oxidativo [20].

La FOE superior en las gatas suplementadas con aceite de pescado indica mayor susceptibilidad a hemólisis frente a variaciones en la presión osmótica del medio. Los eritrocitos son habitualmente expuestos a altas concentraciones de oxígeno y ERO. Los hidroperóxidos, inducen hemólisis, degradan la hemoglobina y sus fuertes uniones a las membranas, desintegran ácidos grasos y fosfolípidos además de cambiar la distribución de los lípidos de membrana [17]. Ello concuerda con lo demostrado mediante el consumo de dietas que contienen ácidos grasos que afectan la susceptibilidad al daño oxidativo celular. Además, pueden afectar la composición de la membrana celular y consecuentemente aumentar la sensibilidad de esas células a agentes prooxidantes como el acetaminofén [11].

Las concentraciones plasmáticas de urea y creatinina fueron similares entre los grupos; a su vez las concentraciones de urea se incrementaron en ambos grupos a las 72 h posteriores al desafío para luego disminuir a valores similares a las 24 h. La concentración de creatinina se incrementó a las 120 h comparada con las 24 h posteriores al desafío. Ambos metabolitos se encontraron dentro del intervalo de referencia para la especie indicando una adecuada funcionalidad renal en las gatas.

CONCLUSIÓN

Gatas suplementadas con 8% de aceite de pescado en la dieta incrementan su peso sin modificar el estado antioxidante o la susceptibilidad al estrés oxidativo. Sin embargo cuando son desafiadas con acetaminofén presentan mayor fragilidad osmótica eritrocitaria, motivo por lo cual no se recomienda el uso de aceite de pescado como suplemento de la dieta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALLEN, A.L. The diagnosis of acetaminophen toxicosis in a cat. **Can. Vet. J.** 44: 509-510. 2003.
- [2] ALLISON, R.W.; LASSEN, E.D.; BURKHARD, M.J.; LAPPIN, M.R. Effect of a bioflavonoid dietary supplement on acetaminophen-induced oxidative injury to feline erythrocytes. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 217: 1157-1161. 2000.
- [3] BHATTACHARYA, A.; LAWRENCE, R.A.; KRISHNAN, A.; ZAMAN, K.; SUN, D.; FERNANDES, G. Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide treated autoimmune-prone NZB/W female mice. **J. Am. Coll. Nutr.** 22: 388-399. 2003.
- [4] BLOCK, G.; DIETRICH, M.; NORKUS, E.P.; MORROW, J.D.; HUDES, M.; CAAN, B.; PACKER, L. Factors associated with oxidative stress in human populations. **Am. J. Epidemiol.** 156: 274-285. 2002.
- [5] BURKHOLDER, W.J.; TOLL, P.W. Obesidad. En: Hand, M.S.; Thatcher, C.D.; Remillard, R.L., Roudebush, P., (Eds). **Nutrición Clínica en Pequeños Animales**, Pan-american: Santa Fé de Bogotá, Colombia. Pp 475-508. 2000.
- [6] BUTTERWICK, R. How fat is that cat? **J. Feline Med. Surg.** 2: 91-94. 2000.
- [7] CHRISTIAN, J.A. Erythrokinetics and erythrocyte destruction. In: Weiss, D.J., Wardrop, K.J., (Eds). **Schalm's Veterinary Hematology**, Wiley-Blackwell: Ames, Iowa, USA. Pp 136-143. 2010.
- [8] CHRISTOPHER, M.M.; WHITE, J.G.; EATON, J.W. Erythrocyte pathology and mechanisms of Heinz body-mediated hemolysis in cats. **Vet. Pathol.** 27: 299-310. 1990.
- [9] CIGREMIS, Y.; TUREL, H.; ADIGUZEL, K.; AKGOZ, M.; KART, A.; KARAMAN, M.; OZEN, H. The effects of acute acetaminophen toxicity on hepatic mRNA expression of SOD, CAT, GSH-Px, and levels of peroxynitrite, nitric oxide, reduced glutathione, and malondialdehyde in rabbit. **Mol. Cell. Biochem.** 323: 31-38. 2009.
- [10] DESNOYERS, M. Anemias associated with oxidative injury. In: Weiss, D.J., Wardrop, K.J., (Eds). **Schalm's Veterinary Hematology**, Wiley-Blackwell: Ames, Iowa, USA. Pp 239-245. 2010.
- [11] FARINA, M.; SOARES, F.A.; FEOLI, A.; ROEHRING, C.; BRUSQUE, A.M.; ROTTA, L.; PERRY, M.L.; SOUZA, D.O.; ROCHA, J.B. In vitro effects of selenite and mercuric chloride on liver thiobarbituric acid-reactive substances and non-protein thiols from rats: influences of dietary cholesterol and polyunsaturated and saturated fatty acids. **Nutr.** 19: 531-535. 2003.
- [12] FETTMAN, M.J.; VALERIUS, K.D.; OGILVIE, G.K.; BEDWELL, C.L.; RICHARDSON, K.L.; WALTON, J.A.; HAMMAR, D.W. Effects of dietary cysteine on blood sulfur amino acid, glutathione, and malondialdehyde concentrations in cats. **Am. J. Vet. Res.** 60: 328-333. 1999.
- [13] FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J. Clin. Invest.** 114: 1752-1761. 2004.
- [14] HARPER, E.J.; STACK, D.M.; WATSON, T.D.; MOXHAM, G. Effects of feeding regimens on bodyweight, composition and condition score in cats following ovariohysterectomy. **J. Small Anim. Pract.** 42: 433-438. 2001.
- [15] HENDRIKS, W.H.; WU, Y.B.; SHIELDS, R.G.; NEWCOMB, M.; RUTHERFURD, K.J.; BELAY, T.; WILSON, J. Vitamin E requirement of adult cats increases slightly with high dietary intake of polyunsaturated fatty acids. **J. Nutr.** 132: 1613S-1615S. 2002.
- [16] IBRAHIM, W.; LEE, U.S.; YEH, C.C.; SZABO, J.; BRUCKNER, G.; CHOW, C.K. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron. **J. Nutr.** 127: 1401-1406. 1997.
- [17] IGLESIAS, B.; CATALÁ, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 38: 1482-1485. 2006.
- [18] KINSELLA, J. Food components with potential therapeutic benefits: the n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. **Food Technol.** 40: 89-97. 1986.
- [19] KIRK, C.A.; DEBRAEKELEER, J.; ARMSTRONG, J.O. Gatos normales. In: Hand, M.S.; Thatcher, C.D.; Remillard, R.L., Roudebush, P., (Eds). **Nutrición Clínica en**

- Pequeños Animales**, Panamerican: Santa Fé de Bogotá, Colombia. Pp 347- 413. 2000.
- [20] MACHADO, L.M.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M.E.; DA SILVEIRA, V.F.; YONEZAWA, L.A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na medicina veterinária. **Rev. Ciên. Agrovet.** 8: 84-94. 2009.
- [21] MAHFOUZ, M.M.; KUMMEROW, F.A. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. **J. Nutr. Biochem.** 11: 293-302. 2000.
- [22] MOMOI, Y.; GOTO, Y.; TANIDE, K.; TAKAHASHI, N.; WATARI, T.; YAMAZO, K.; TSUJIMOTO, H.; KUDO, T. Increase in plasma lipid peroxide in cats fed a fish diet. **J. Vet. Med. Sci.** 63: 1293-1296. 2001.
- [23] MORRIS, J.G.; CRIPE, W.S.; CHAPMAN, H.L., JR.; WALKER, D.F.; ARMSTRONG, J.B.; ALEXANDER, J.D., JR.; MIRANDA, R.; SANCHEZ, A., JR.; SANCHEZ, B.; BLAIR-WEST, J.R.; DENTON, D.A. Selenium deficiency in cattle associated with Heinz bodies and anemia. **Sci.** 223: 491-493. 1984.
- [24] MUSTAFA, I.; ERDOGAN, H.; OZYURT, B.; OZUGURLU, F.; OZGOCMEN, S.; FADILIOGLU, E. Omega-3 Essential Fatty Acid Supplementation and Erythrocyte Oxidant/Antioxidant Status in Rats. **Ann. Clin. Lab. Sci.** 35: 169-173. 2005.
- [25] OZATA, M.; MERGEN, M.; OKTENLI, C.; AYDIN, A.; SANISOGLU, S.Y.; BOLU, E.; YILMAZ, M.I.; SAYAL, A.; ISIMER, A.; OZDEMIR, I.C. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clin. Biochem.** 35: 627-631. 2002.
- [26] PETRIE, A.; WATSON, P. Hypothesis test 2- The F-test: Comparing two variance or more than two means. In: Petrie, A., Watson, P., (Eds). **Statistics for Veterinary and Animal Science**. Wiley-Blackwell: Oxford. Pp 93-106. 2006.
- [27] PETRIE, A.; WATSON, P. Non-parametric statistic methods. In: Petrie, A., Watson, P., (Eds). **Statistics for Veterinary and Animal Science**. Wiley-Blackwell: Oxford. Pp 158-173. 2006.
- [28] PETRIE, A.; WATSON, P. Probability and probability distributions. In: Petrie, A., Watson, P., (Eds). **Statistics for Veterinary and Animal Science**, Wiley-Blackwell: Oxford. Pp 28-44. 2006.
- [29] STATISTIX. Statistix 8.0: User's manual. Tallahassee, FL, USA: Analytical software. 396 pp. 2003.
- [30] VENKATRAMAN, J.T.; ANGKEOW, P.; SATSANGI, N.; FERNANDES, G. Effects of dietary n-6 and n-3 lipids on antioxidant defense system in livers of exercised rats. **J. Am. Coll. Nutr.** 17: 586-594. 1998.
- [31] WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem. J.** 313(1): 17-29. 1996.
- [32] WITTEWER, F. Hematología Clínica. En: Wittwer, F. (Ed.). **Patología Clínica Veterinaria**. Imprenta América: Valdivia. Pp 29-70. 2012.