

EFFECTO DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON ANTIOXIDANTES (ACEITE DE LINO Y α -TOCOPHEROL) SOBRE LA FASCIOLISIS EXPERIMENTAL OVINA

Martínez-Pérez, J.M.¹, Robles-Pérez, D.¹, Benavides-Silván, J.², Morán-Lobato, L.², Rojo-Vázquez, F.A.^{1,2}, Andrés-Llorente, S.², Martínez-Valladares, M.²

¹Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León, 24071-León.

²Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE). Finca Marzanas, 24346-Grulleros (León). mmarva@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una parasitosis muy común en los rumiantes domésticos, principalmente en los ovinos. El control se basa en la administración de fasciolicidas, pero su uso irracional ha favorecido el desarrollo de resistencias. Por ello, deben plantearse medidas alternativas, como la aplicación de estrategias profilácticas de carácter nutricional e inmunológico (Rehim *et al.*, 2003). Durante la infección por *Fasciola hepatica*, el hospedador activa mecanismos de defensa asociados a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) o prooxidantes (Maffei Facino *et al.*, 1993; Abo-Shousha *et al.*, 1999) que, en la fase crónica, causan daño hepático a nivel celular, reducen los niveles disponibles de antioxidantes no enzimáticos (glutación y vitaminas A, C y E) (Kolodziejczyk *et al.*, 2005) y mantienen un efecto inflamatorio. El uso de antioxidantes no enzimáticos como la vitamina E (α -tocopherol) o de inmunomoduladores que regulen la respuesta inflamatoria, como los ácidos grasos omega-3 proporcionados por el aceite de lino (Mory *et al.*, 2004), pueden paliar los daños hepáticos. La suplementación de la dieta con estos compuestos podría ayudar a contrarrestar el efecto de las EROs, mejorar la calidad de la carne y aumentar su vida útil (Morrissey *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1997). El objetivo de este estudio ha sido analizar el efecto de la inclusión en la dieta de aceite de lino y de la vitamina E sobre la infección experimental con *F. hepatica* en ovejas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

El estudio se llevó a cabo con 30 ovinos de raza Merina de cinco meses de edad, procedentes de un rebaño libre de fasciolosis. Antes de comenzar el estudio, los animales se desparasitaron con triclabendazol + levamisol (Endex®), por vía oral. Los animales se distribuyeron en tres lotes con 10 animales cada uno, homogéneos según el peso corporal. Desde seis semanas antes del inicio del estudio hasta su finalización, los ovinos se alimentaron con una ración mixta idéntica, si bien al primer grupo se le suplementó la dieta con aceite de lino (3%); al segundo, con vitamina E (0,06 g/kg pienso); y al tercero no se le dio ningún aditivo (grupo testigo). Al inicio del ensayo, todos los ovinos se infectaron con 200 metacercarias de *F. hepatica* incluidas en cápsulas de gelatina. Todos los animales se sacrificaron el día 96 post-infección (p.i.) mediante la administración intravenosa de pentobarbital sódico (Dolethal). El experimento se llevó a cabo en el Instituto de Ganadería de Montaña de León.

Ensayos *in vivo* y parámetros bioquímicos

El peso vivo de todos los animales se midió al inicio y al final del ensayo.

Se recogieron muestras individuales de heces a partir del día 44 p.i. hasta el final del estudio, cada tres días. El recuento fecal de huevos se realizó mediante sedimentación, y el recuento acumulado se calculó según las especificaciones de Vercruyse *et al.* (1993).

Durante las semanas 0, 4, 8 y 12 p.i., se recogió individualmente sangre en tubos Vacutainer sin anticoagulante. El suero obtenido se congeló a -20°C y remitió al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León para valorar la actividad de las enzimas hepáticas gamma-glutamil transferasa (GGT) y alanino-amino transferasa (ALT).

Necropsia y análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Tras el sacrificio de los animales, se examinaron macroscópicamente el hígado y la vesícula biliar de cada animal y se tomaron muestras del lóbulo izquierdo para el estudio histopatológico. Posteriormente, se contaron las fasciolas presentes, clasificándolas según su tamaño. También se pesaron los hígados y los ganglios hepáticos linfáticos.

Los TBARS se realizaron a partir de tejido hepático, siguiendo las indicaciones de Maraschiello *et al.* (1999).

Análisis estadístico

Se analizaron las diferencias significativas entre los tres grupos mediante la prueba ANOVA. Para determinar las diferencias entre pares de grupos se utilizó el análisis mediante la *t* de Student. Las diferencias menores al 5% ($P < 0,05$) fueron consideradas significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos *in vivo* y parámetros bioquímicos

Al final del ensayo, el grupo testigo presentó valores de peso vivo significativamente superiores ($P < 0,05$) frente a los otros dos grupos (Figura 1). En concreto, se observaron diferencias significativas entre el grupo testigo y el grupo suplementado con lino ($P < 0,01$) y entre este último y el grupo al que se administró vitamina E ($P < 0,01$).

La patencia comenzó el día 66 p.i. en el grupo suplementado con lino y en el testigo, y el día 70 p.i. en el grupo de la vitamina E (Figura 2). Tras analizar el recuento fecal acumulado de huevos al final del estudio, se pudo observar que el grupo del lino era superior ($841,3 \pm 663,4$ hgh) frente al testigo ($782,9 \pm 362,6$ hgh) y el de la vitamina E ($612,9 \pm 241,8$ hgh), aunque las diferencias no fueron significativas. Estos resultados indican un posible efecto de la vitamina E en la menor excreción fecal de huevos al comparar las eliminaciones entre grupos. Por otra parte, el efecto inmunomodulador del aceite de lino, debido a su alta concentración en ácidos grasos omega-3 (Mory y Beilin, 2004), se hace patente puesto que la eliminación fecal de huevos en este grupo fue menor que en el testigo hasta el día 90 p.i., en que la tendencia se invirtió; este hecho podría estar motivado por la inactivación del efecto inmunomodulador por los altos niveles de oxidación durante la Infección, puesto que los ácidos grasos poliinsaturados son atacados por la presencia de EROs.

Se evaluaron las enzimas hepáticas ALT y GGT, indicadoras de lesiones parenquimatosas y ductulares, respectivamente. La ALT estuvo dentro de los límites normales (7-24 UI/l) a lo largo del estudio, con valores máximos en 4ª semana p.i., coincidiendo con la migración del parásito, en los grupos del lino y de la vitamina E, aunque más elevados en el primero siendo las diferencias significativas ($P < 0,01$). Tras ello, tuvo lugar un descenso de los valores hasta finalizar el ensayo, siendo más importante en el grupo de la vitamina E (37,1%), frente al del lino (21,9%) y el testigo (12,1%). La GGT registró valores medios superiores a los normales (21-44 UI/l), con un incremento generalizado a medida que proseguía la infección. El mayor nivel de actividad enzimática se observó en el grupo del lino. También en la semana 4 p.i. se apreciaron diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,01$). Kolodziejczyk *et al.* (2005) relacionaron el aumento de enzimas indicadoras de daño hepático (en especial la ALT) en la fasciolosis con el descenso de los niveles de antioxidantes, con lo que el mayor descenso de esta enzima en el grupo de la vitamina E sugiere la protección frente a la infección.

Necropsia y análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los hígados de los animales se pesaron, comprobándose que el peso medio del grupo que recibió vitamina E era un 2,8% superior al del grupo testigo, y el suplementado con lino, un 13,3% inferior. En cuanto al peso de los ganglios linfáticos, el valor medio en el grupo de la vitamina E fue un 7,7% superior al testigo y en el grupo del lino un 7,7% inferior. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en ninguno de los análisis.

Tras el estudio de las lesiones macroscópicas del hígado tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre grupos. Histológicamente, la mayoría de las muestras mostraron hepatitis grave con componente inflamatorio mixto (linfocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos), sin diferencias entre los grupos.

El número medio de fasciolas recuperadas fue mayor en el grupo testigo ($123,0 \pm 35,2$) que en el de la vitamina E ($97,7 \pm 39,9$) y el lino ($71,2 \pm 26,5$), con diferencias significativas ($P < 0,01$). En el grupo testigo, las fasciolas tenían un tamaño mayor, con diferencias significativas entre este grupo y el del lino ($P < 0,01$).

Los resultados obtenidos en los TBARS mostraron que la suplementación de la dieta con vitamina E reducía de manera significativa ($P < 0,001$) los niveles de oxidación en hígado en comparación con la dieta testigo y la enriquecida con lino. La vitamina E, antioxidante lipofílico, es capaz de proteger las membranas frente a la acción de EROs y su

concentración se ve reducida como consecuencia de la infección por *F. hepatica* (Kolodziejczyk *et al.*, 2005). La suplementación con vitamina E limitó el nivel de peroxidación lipídica en el hígado tras la infección por *F. hepatica*, cuyo resultado fue una menor cantidad de fasciolas adultas. Los ácidos grasos presentes en el aceite de lino indujeron protección frente a la infección al reducir la carga parasitaria, actuar contra formas inmaduras y provocar una reacción inflamatoria menor (Casanueva *et al.*, 2001).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo-Shousha, S., Khalil, S.S. & Rashwan, E.A. 1999. J. Egypt. Soc. Parasitol. 29: 149-156.
- Casanueva, R., Hillyer, G.V., Ramajo, V., Oleaga, A., Espinoza, E. & Muro, A. 2001. J. Parasitol. 87: 697-700.
- Kolodziejczyk, L., Siemieniuk, E. & Skrzydlewska, E. 2005. Parasitol. Res. 96: 367-372.
- Maffei-Facino, R., Carini, M., Aldini, G., Ceserani, R., Ceserani, I., Cavaletti, E. & Vederio, L. 1993. Arzneimittelforschung. 43: 455-460.
- Maraschiello, C., Sárraga, C. & García-Regueiro, J.A. 1999. J. Agric. Food Chem. 47: 867-872.
- Rehim, W.M., Sharaf, I.A., Hishmat, M., el-Toukhy, M.A., Rawash, N.A. & Fouad, H.N. 2003. Arzneimittelforschung. 53: 214-220.
- Vercruyssen, J., Dorny, P., Hong, C., Harris, T.J., Hammet, N.C., Smith, D.G. & Weatherley, A.J. 1993. Vet. Parasitol. 49: 51-59.
- Wood, J.D. & Enser, M. 1997. Br. J. Nutr. 78, Suppl. 1: S49-S60.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Proyecto CSI185B11-2). M. Martínez-Valladares y J. Benavides disfrutaron de un contrato post-doctoral JAE-Doc del CSIC co-financiado por el Fondo Social Europeo y L. Morán-Lobato tiene concedida una beca JAE-Predoc del CSIC.

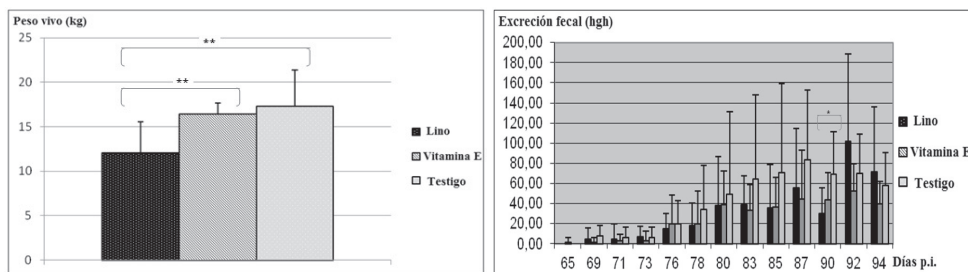


Figura 1. Peso vivo a lo largo del estudio. Las diferencias significativas están marcadas con ** ($P<0,01$). **Figura 2.** Cinética de excreción fecal de huevos (días 66-94 p.i.). Las diferencias significativas están marcadas con * ($P<0,05$).

EFFECT OF A DIET SUPPLEMENTED WITH ANTIOXIDANTS (FLAX OIL AND α -TOCOPHEROL) ON OVINE EXPERIMENTAL FASCIOSIS

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the effect of two different diets based on flax and vitamin E additives in comparison with a control group supplemented with a diet free of polyunsaturated fatty acids and phenolic compounds. Thirty sheep were divided in these three groups. Body weight (BW) and biochemical values (ALT and GGT hepatic enzymes) were studied. Faecal eggs excretion was also analysed and parasitic forms were collected and counted after measuring other hepatic ganglionar aspects. After analysing the analysis of variance (ANOVA) test, significant differences were found in relation to the BW ($P<0.05$) and the arithmethical mean of flukes recovered ($P<0.01$) with higher values in the control group, and in biochemical values during the week 4 postinfection ($P<0.01$) with upper enzymatic activities in groups supplemented with flax oil and vitamin E (α -tocopherol).

Keywords: flax oil, vitamin E (α -tocopherol), *Fasciola hepatica*, sheep.