

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**EVALUACIÓN DE EFECTOS INMUNOESTIMULANTES Y ANTIOXIDANTES
EN LA MICROALGA DE *Dunaliella salina* COMO ADITIVO DIETÉTICO EN
CORDEROS DE PELO**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA

PAOLA GUADALUPE ZAVALA QUIJADA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. SAWAKO OSHIMA

CO-DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARTHA CANDELARIA REYES BECERRIL

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

MAYO DEL 2023

Evaluación de efectos inmunoestimulantes y antioxidantes en la microalga de *Dunaliella salina* como aditivo dietético en corderos de pelo. Tesis presentada por MVZ. Paola Guadalupe Zavala Quijada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dra. Sawako Oshima
Director de tesis

Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril
Co-director de tesis

Dra. Yissel Sacnicte Valdés García.
Asesor

Dra. Rosalba Lazalde Cruz.
Asesor

Dr. Miguel Arturo Cabanillas Gámez.
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California, al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por brindarme la oportunidad de formar parte del cuerpo estudiantil de Maestría en Ciencias Veterinarias.

Al CONAHCYT por la beca (1175832), fundamental para la realización de este proyecto.

Quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Sawako por brindarme la oportunidad y formarme durante todo el proceso de mi investigación y aprendizaje. A mi coodirectora Dra. Martha Reyes, asesor Dr. Carlos Angulo, y compañero MC. Cristian Machuca por su apoyo y capacitación en las técnicas de actividad enzimática de este trabajo en CIBNOR La Paz BCS. A mis asesoras Dra. Rosalba Lazalde y Dra. Yissel Valdés por su importante contribución y guía en el proceso de adición y manejo de los animales, a mis asesores Dr. Miguel Cabanillas y Dr. Gerardo Medina por el apoyo y conocimiento brindados. Al Dr. José Luis Stephano y Allele Biotech.

Al Dr. Saul Hernández del Instituto de Investigaciones de Ciencias Agrícolas por brindar las instalaciones para realizar la etapa final del bioensayo.

A mis compañeras de maestría Jazmín, Keydi y Roció por el apoyo y unión para seguir adelante ante todos los retos, a mis compañeros de laboratorio Carlos y Estefanía por haberme apoyado en dudas y procedimientos, a los estudiantes de inmunología del IICV por su contribución en el periodo de adición y manejo de los animales durante el bioensayo.

DEDICATORIA

A mis padres Obdulia, Jorge, mi hermano Jorge A., mi prima Brianda, mi amiga Ana G. y mi pareja Oscar, por acompañarme en este camino darme su amor, ánimos y apoyo emocional durante todo este proceso, a mi padre Fermín, que desde el infinito me acompaña en mis pasos y triunfos y finalmente, a mi yo pequeña, la fuerza y capacidad para enfrentar los miedos ha estado presente desde siempre.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto inmunoestimulante y antioxidante de la adición dietética de *Dunaliella salina* en corderos de pelo en etapa de predestete en la posta de Ovinos del IICV-UABC. 18 corderos divididos en 3 grupos (0, 3 y 6 g día⁻¹) fueron tratados durante 30 días de marzo-abril de 2023 y se enviaron a sacrificio. Se determinó la concentración de proteína total y actividad de mieloperoxidasa en muestras de sangre periférica y tejidos. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA). En el grupo de 3 g se obtuvo un aumento significativo ($P < 0.05$) en la concentración de proteína en rumen (2.32 ± 0.27 mg/mL) en comparación con el grupo control (1.91 ± 0.51 mg/mL). La concentración de proteína total en rumen, yeyuno y colón así como la actividad de catalasa en hígado se incrementó en el grupo de 3 g al día 30. No se observó diferencias en la actividad de mieloperoxidasa en hígado, mucosa intestinal y bazo por la adición de *D. salina*. La producción de óxido nítrico tampoco fue afectada de manera significativa por la adición de *D. salina*. Es importante continuar a explorar el potencial inmunoestimulante y antioxidante de *D. salina* para promover una producción ovina sustentable en la región.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the immunostimulant and antioxidant effect of the dietary addition of *Dunaliella salina* in pre-weaning hair lambs at the IICV-UABC Sheep Station. 18 lambs divided into 3 groups (0, 3 and 6 g day⁻¹) were treated for 30 days from March-April 2023 and sent for slaughter. Total protein concentration and myeloperoxidase activity were determined in peripheral blood and tissue samples. The results were subjected to analysis of variance (ANOVA). In the 3 g group, a significant increase ($P < 0.05$) in rumen protein concentration was obtained (2.32 ± 0.27 mg/mL) compared to the control group (1.91 ± 0.51 mg/mL). The concentration of total protein in the rumen, jejunum and colon as well as the catalase activity in the liver increased in the 3 g group on day 30. No differences were observed in the myeloperoxidase activity in the liver, intestinal mucosa and spleen due to the addition of *D. salina*. Nitric oxide production was also not significantly affected by the addition of *D. salina*. It is important to continue exploring the immunostimulant and antioxidant potential of *D. salina* to promote sustainable sheep production in the region.

CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVO GENERAL	19
HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
CONCLUSIÓN	38
LITERATURA CITADA	39

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1.	Componentes obtenidos de las microalgas y sus actividades biológicas	11
2.	Tratamiento en el periodo de adaptación	23
3.	Cuantificación de proteínas totales (PT) en los 12 diferentes tejidos de corderos adicionados con <i>Dunaliella Salina</i>	30
4.	Actividad de la enzima antioxidante CAT en los 12 tejidos de los corderos adicionados con <i>Dunaliella Salina</i>	36

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.	Estructura química de carotenoides de las microalgas	13
2.	pH ruminal de los corderos al final del experimento	29
3.	Concentración de proteínas séricas en corderos experimentados	31
4.	Actividad de antiproteasas en mucosa intestinal	32
5.	Actividad de mieloperoxidasa en mucosa, hígado y bazo	33
6.	Actividad de mieloperoxidasa en suero	34
7.	Producción de óxido nítrico de los sueros sanguíneos	35

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos con un tamaño aproximado de 2-200 μm y son muy versátiles habitando toda clase de ambientes. Prestan importantes funciones para el ecosistema como la emisión de oxígeno (O_2) y la captura de dióxido de carbono (CO_2). Algunas de sus aplicaciones incluyen biorremediación, biofertilizantes, biocombustibles y en la suplementación alimenticia en humanos y animales. Los compuestos derivados de las microalgas han demostrado poseer propiedades para beneficiar la salud humana, como una actividad antiinflamatoria y antioxidante. Moléculas bioactivas incluidos pigmentos carotenoides, ácidos grasos y polisacáridos (Montero-Lobato et al., 2018; Mau et al., 2021).

En la industria agropecuaria las microalgas se han utilizado como un recurso sostenible para la producción de ganado, aves de corral y acuicultura debido a sus diversos perfiles nutricionales, como fuentes de proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales, vitaminas y otros productos de alto valor. (Saadaoui et al., 2021).

En Baja California actualmente se registran alrededor de 33,499 cabezas de ganado ovino, representando el 0.38% de cabezas registradas a nivel nacional (SIAP, 2021). En los sistemas de producción intensiva de pequeños rumiantes, los animales son expuestos a distintos factores y prácticas que causan estrés crónico promoviendo la producción de radicales libres impactando negativamente al sistema inmunológico, potenciando la susceptibilidad a diversas patologías. Se han utilizado los inmunomoduladores en la alimentación como una alternativa al

uso de antibióticos ya que podrían promover funciones del sistema inmunológico innato. El uso de suplementos naturales promueve la producción ambientalmente sostenible, fortaleciendo el sistema gastrointestinal, funcionando como profiláctico ante las condiciones de estrés e infecciones que reducen el rendimiento productivo mejorando la salud y bienestar de los ovinos en la producción intensiva. (Lordan et al., 2011; Byrne et al., 2020).

La Microalga *Dunaliella salina* se conoce por sus numerosos pigmentos carotenoides al igual que otros componentes bioactivos, que podrían funcionar como un aditivo dietético, sin embargo, no ha sido estudiado su potencial para mejorar el sistema inmunológico en animales de producción (de Morais et al., 2015).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es determinar si existe un efecto inmunoestimulante y antioxidante de la microalga *Dunaliella salina* como aditivo dietético en corderos de pelo en fase de predestete.

REVISIÓN DE LITERATURA

Bases generales del sistema inmunológico de mamíferos

El sistema inmune cuenta con una amplia gama de mecanismos de defensa contra organismos patógenos y sustancias tóxicas que comprometen la estabilidad del hospedero. Los cuales podemos clasificar en la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Como primera línea de defensa la respuesta innata cuenta con componentes celulares y humorales. Los componentes celulares abarcan múltiples tipos de células como los son, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos células dendríticas, macrófagos y células asesinas naturales (NK por sus siglas en ingles), que utilizan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por siglas en ingles) para interactuar con patógenos para su destrucción y eliminación. Dentro de los componentes humorales podemos encontrar la cascada de activación del sistema complemento, sistema de coagulación, mediadores de inflamación, péptidos antimicrobianos, quelantes de hierro, así como anticuerpos naturales (NAb), pentraxinas y proteínas C reactivos (Shishido et al., 2012; Tizard, 2018).

La respuesta inmune adaptativa implica un número reducido de células, de dos tipos, linfocitos T y B, respuesta que es mediada por los receptores de antígenos de estas células (Medzhitov, 2007). Las células implicadas en el sistema inmune, regulan su actividad a través de una gran cantidad de mediadores como citoquinas, interleucinas, factor de necrosis tumoral alfa α (TNF- α) e interferón gamma γ (INF- γ) predominantemente producidos por macrófagos y linfocitos (Chan y Schroder, 2020).

Otro integrante de los mensajeros de señalización celular de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, es el óxido nítrico (NO). La respuesta inmune descontrolada frente a patógenos o sustancias tóxicas, pueden causar daños inflamatorios en tejidos y enfermedades auto inmunes. Para vencer esta respuesta descontrolada y sus efectos la respuesta es regulada por medio de un equilibrio entre señales co-estimulantes e inhibitoras. Los linfocitos T actúan como mediadores primarios de las funciones efectoras inmunitarias, expresando una gran cantidad de receptores co-inhibidores, incluyendo el gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3), la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) y la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (Pardoll, 2012).

Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), radicales superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (-OH) y el peróxido de hidroxilo (H_2O_2), son producidos de forma endógena por el metabolismo normal o por factores y agentes exógenos. Su sobreproducción induce la interrupción en la señalización y control redox, conocido como estrés oxidativo el cual es un estado de desequilibrio entre el estado antioxidante y oxidante donde se favorece a este último. Bajo este estrés, estas especies de reactivas reaccionan con macromoléculas provocando daños celulares, comprometiendo la estructura de las membranas, funciones enzimáticas y de la expresión genética, conduciendo a la manifestación de la respuesta inflamatoria crónica. Estas acciones dañinas inducidas pueden ser restringidas por antioxidasas endógenas y antioxidantes exógenos (Zuluaga et al., 2017).

Uno de los mecanismos para la regulación oxidativa deriva de la producción de antioxidantes enzimáticos que se encargan de neutralizar y eliminar los radicales libres como lo es superóxido dismutasa (SOD) como principal defensa intracelular y extracelular. SOD actuando contra los prooxidantes al catalizar la dismutación de superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), esta es seguida por catalasa (CAT) y glutatión-peroxidasa (GSH-Px). CAT catabolizando los productos de SOD H_2O_2 en H_2O y O_2 molecular, teniendo actividad máxima en hígado y riñones (Castillo et al., 2001; Celi, 2010).

La inmunomodulación incluye todos los procesos que activan, modifican y regulan la respuesta inmune con un fin terapéutico, como reducir procesos inflamatorios y combatir enfermedades, este concepto está relacionado con el tema de cáncer, pero sirve como un concepto básico para ubicarlo en la definición de inmunomodulación, papel de las microalgas (Ben-Aharon et al., 2018).

Inmunomodulación de la inmunidad adaptativa por medio de la vacunación alterada o la exposición natural de un animal a patógenos u otros agentes extraños, induce la generación de células T y B efectoras y de memoria para proporcionar protección a largo plazo contra un patógeno (Byrne et al., 2020).

Inmunomodulación de la inmunidad innata incluye exposición de un animal o células a una sustancia o compuesto cebador, frecuentemente a un patrón molecular asociado a microbios (MAMP), de modo que la exposición a agonistas inmunes no relacionados da como resultado una respuesta aumentada o suprimida (tolerante). Se observa principalmente en linaje mieloide y células NK.

El mecanismo incluye la reprogramación epigenética y metabólica de las células inmunes innatas y las células progenitoras (Byrne et al., 2020).

Inmunoestimulantes comerciales utilizados en producción animal

Una forma de fortalecer la defensa del sistema inmune intestinal es el uso de algunos promotores de crecimiento como probióticos, prebióticos y fitobióticos como aditivos alimentarios. Estos tienen un efecto positivo en el estado de salud de los animales, principalmente a través de una mayor inmunidad de la mucosa del huésped y mayor resistencia a la colonización de bacterias patógenas (Cheng et al., 2014).

El interés por alternativas a los antibióticos ha llevado a un aumento en la utilización de compuestos inmunomoduladores en la alimentación. Muchos de estos compuestos se componen de una mezcla de levaduras o bacterias enteras o componentes de la pared celular como lipopolisacáridos (lps) o β -glucanos. Pueden promover funciones inmunes innatas, como el aumento de la actividad fagocítica, el aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno o la restauración de la secreción de citoquinas proinflamatorias a los leucocitos (Byrne et al., 2020).

Probióticos

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que proporcionan beneficios para la salud adicionados como suplementos en alimentos o agua. Mousa et al., (2019), evaluaron los efectos inmunoestimulantes

y antioxidantes de la suplementación con agua con *Bacillus subtilis* comercial (1g / L / día) en corderos obteniendo aumentos significativos en el conteo total de leucocitos y linfocitos ($p = 0.0018$ y 0.0002 , respectivamente), elevaciones la actividad de la lisozima sérica ($p = 0.004$), en el día 30 de tratamiento, así como elevaciones en CAT ($p = 0.01$) y NO ($p = 0.002$) en el día 15 de tratamiento, comparados con el grupo control sin suplementación. En cuanto a los hallazgos de expresión génica se obtuvieron respuestas elevadas sobre IL-5 e IL-6 entre los días 15 y 30 de tratamiento.

Microalgas

Las microalgas son un grupo de microorganismos fotosintéticos eucariotas, incluyendo el grupo de procariotas fotosintéticos (cianobacterias); se presentan de forma unicelular y organizadas en grupos o colonias, poseen características y formas variadas con un diámetro o longitud de aproximadamente 2-200 μm . Crecen principalmente en ambientes acuáticos, tanto marinos como aguas continentales. El contenido de clorofila y otros pigmentos son los que le otorgan la capacidad fotosintética. Las microalgas representan un diverso grupo polifilético, la cual no presenta una definida clasificación taxonomía. Se le puede clasificar a partir de fitoplancton el cual comprende a las diatomeas (bacillariophyta), dinoflagelados (dinophyta), flagelados verdes y amarillo-marrones (clorofita, prasinophyta, prymnesiophyta, cryptophyta, chrysophyta y raphidophyta) y algas verdeazuladas (cyanophyta). (Rasmussen y Morrissey, 2007; El Gamal, 2010; Lordan et al., 2011).

Aplicación industrial de las microalgas

Las microalgas son una fuente natural de compuestos bioactivos como lo son las vitaminas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos poliinsaturados, minerales, carotenoides, enzimas y fibra. Esto es debido a su alta eficiencia en la fijación de dióxido de carbono (CO₂), nitrógeno, fósforo, magnesio, potasio y varios metales. Por lo tanto, son consideradas como fuentes prometedoras e innovadoras de nuevos alimentos y productos funcionales, aumentando el valor nutricional de los alimentos y, así, favorecer la salud, mejorando el bienestar y la calidad de vida y reduciendo los riesgos de enfermedad (Matos et al., 2017).

Los géneros de microalgas más utilizados para la producción de alimentos funcionales son *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella*.

Chlorella

Es una microalga eucariota verde, perteneciente al grupo Chlorophyceae, la cual es considerada como un complemento nutricional saludable y nutracéutico ampliamente comercializado. Es rica en clorofila, proteínas, polisacáridos, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales. Es rica en vitaminas del complejo B, especialmente B12. Su metabolito bioactivo más importante es la antioxidante luteína y β -1,3 glucano, un inmunoestimulante que reduce los radicales libres y el colesterol en sangre (Spolaore et al., 2006; Bishop y Zubeck, 2012; de Morais et al., 2015).

Spirulina

Pertenece al grupo de las verde-azul, Cianobacterias procariotas de agua dulce. Es comercialmente producida como alimento para peces, suplementos vitamínicos, colorantes alimentarios, productos farmacéuticos y nutracéuticos. Posee un alto valor proteico (60 a 70%), alta digestibilidad, con cantidades significativas de ácidos grasos esenciales poliinsaturados y compuestos fenólicos. Es rica en vitaminas del complejo B, especialmente B12 y vitamina E, contiene alto contenido en pigmentos minerales y oligoelementos (Bishop y Zubeck, 2012; de Morais et al., 2015; Matos et al., 2007).

Dunaliella

Microalga verde, perteneciente al grupo Chlorophyceae, altamente halotolerante, de viable y fácil cultivo debido a su ambiente. Especialmente *D. salina* es considerado el nutracéutico más dominante en la producción. Esta produce numerosos pigmentos carotenoides, principalmente y en mayor cantidad β -caroteno (14% de su peso seco) y en menor cantidad α -caroteno, luteína y licopeno. Al igual que otros componentes bioactivos como glicerol, lípidos, proteínas, enzimas y vitaminas (Francavilla et al., 2010; Bishop y Zdcubeck, 2012; de Morais et al., 2015).

Actividad antiinflamatoria y antioxidante

Las microalgas son ampliamente reconocidas como una fuente valiosa de moléculas bioactivas naturales con valor comercial y con beneficios para la salud. Estas moléculas son sintetizadas por el metabolismo de las microalgas, con

actividad antiinflamatoria y antioxidante, como lo son pigmentos carotenoides β -caroteno, luteína y astaxantina, ácidos grasos EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico) y polisacáridos sulfatados, algunos ejemplos se muestran en el Cuadro 1 (Montero-Lobato et al., 2018).

Existen varias familias de diatomeas (algas unicelulares) con actividades antiinflamatorias reportadas como porosiraglacilis; *Attheya longicornis*, *Cylindrotheca closterium*, *Odontella mobiliensis*, *Pseudonitzschia*, *Pseudodelicatissima*, dinoflageladas; *Amphidinium carterae* y las algas verdes; *Dunaliella bardawil* y *Dunaliella tertiolecta* (Lavy et al., 2003; Caroprese et al., 2012; Samarakoon et al., 2013; Ingebrigtsen et al., 2016; Lauritano et al., 2016).

Los antioxidantes son aquellos que pueden restringir daños celulares inducidos por el estrés oxidativo al extinguir el oxígeno singlete y la consecuente eliminación de los radicales (McNulty et al., 2007, 2008).

Lauritano et al. (2016) y Ingebrigtsen et al. (2016), reportaron que las microalgas inhibieron la liberación de TNF- α en una línea celular monocítica (THP-1). Así mismo, Samarakoon et al. (2013), demostraron la inhibición de la producción de NO en la línea celular de macrófagos RAW. Por su parte, Rao et al. (2013), estudiaron las propiedades antioxidantes de los carotenoides presentes en biomasas de las microalgas *Spirulina platensis* (200 μ M de β -caroteno), *Haematococcus pluvialis* (200 μ M de astaxantina), *Botryococcus braunii* (200 μ M de luteína) en un modelo de rata.

Cuadro 1. Componentes obtenidos de las microalgas y sus actividades biológicas.

Componente	Fuente	Actividad
Carotenoides		
β -Caroteno	<i>Dunaliella salina</i> <i>Haematococcus</i> sp.	Antioxidante Pro-vitamina A Anti-inflamatorio
Astaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Chlorella zofigiensis</i> <i>Chlorococcum</i> sp.	Antioxidante Anti-inflamatorio
Luteína	<i>Dunaliella salina</i> <i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Chlorella prothecoides</i>	Antioxidante Anti-inflamatorio
Ácidos grasos		
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	<i>Tetraselmis</i> sp.	Anti-inflamatorio
Ácido docosahexaénico (DHA)	<i>Tetraselmis</i> sp.	Anti-inflamatorio
Polisacáridos		
Polisacárido extracelular sulfatado	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Porphydium</i> sp.	Anti-inflamatorio Inmunomodulador
Polisacárido sulfatado	<i>Tetraselmis suecica</i>	Anti-inflamatorio
Polisacárido sulfatado B-(1,3)-glucano	<i>Chlorella stigmatophora</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	Anti-inflamatorio Inmunomodulador

Utilizando como parámetro las enzimas antioxidantes CAT, SOD, peroxidasa y los niveles de peroxidación lipídica en plasma e hígado. Las ratas alimentadas con las microalgas tuvieron mayor actividad en comparación del grupo control destacando el grupo alimentado con *H. pluvialis*. Se puede concluir que la biomasa de las microalgas, rica fuente de carotenoides, es capaz de prevenir la peroxidación lipídica a través de la eliminación de radicales libres y restaurar la actividad enzimática. Mientras que Caroprese et al. (2012), utilizando un modelo de células mononucleares de sangre periférica de ovejas, demostraron la reducción de citoquinas como efecto antiinflamatorio de una mezcla de fitoesteroides de la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Caroprese et al. 2012).

Carotenoides

Los carotenoides forman parte de los pigmentos liposolubles más comunes en la naturaleza, sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y hongos, donde actúan como moléculas clave para la vida, debido a sus funciones biológicas como la participación de la fotosíntesis, disipación excesiva de la luz y la extinción del oxígeno singlete. Tiene una absorción de energía luminosa en el rango de 400-550 nm, lo que les confiere coloraciones amarilla, naranja y roja. Están presentes en todas las microalgas (Vílchez et al., 2011; Rodríguez-Amaya 2015).

Los carotenoides están formados estructuralmente por un terpeno de 40 átomos de carbono y dos anillos terminales. Tienen como unidad a los isoprenos y en su mayoría son tetraterpenoides (C40 ó 8 unidades de isoprenoides), estos se encuentran en una molécula lineal y simétrica como se muestra en la Figura 1.

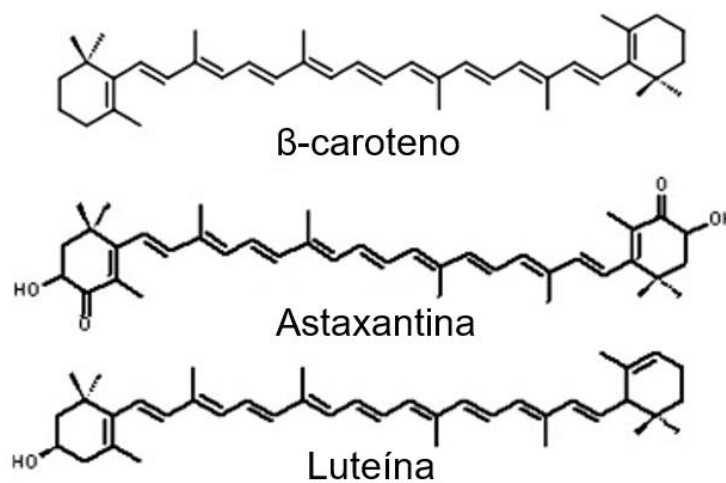


Figura 1. Estructura química de carotenoides de las microalgas.

(Rao et al. 2013)

El sistema de dobles enlaces conjugados les confiere una alta reactividad química, por lo cual se pueden isomerizar y oxidar fácilmente. Estos se clasifican en dos grupos, cuando átomos de carbono e hidrógeno están presentes en la molécula son denominados carotenoides, mientras que son denominados xantofilas cuando también cuentan con átomos de oxígeno (Mezzomo y Ferreira 2016; Zuluaga et al., 2017). Los carotenoides son considerados un antioxidante exógeno. Los más importantes son la astaxantina, la cual actúa como un antioxidante rompedor de cadenas y el β - caroteno, este es considerado el miembro más destacado del grupo de carotenoides que está presente en la dieta humana como una fuente importante de vitamina A (Mezzomo y Ferreira 2016; Zuluaga et al., 2017; Maroneze et al., 2019).

B-caroteno

Lavy et al. (2003), demostraron efectos protectores con la prealimentación de la microalga *Dunaliella bardawil* en seco, rica en β -caroteno, utilizando un modelo de inflamación en el intestino delgado de ratas, inducido con ácido acético. Estos efectos fueron evaluados mediante la enzima MOP, histología e histomorfometría de las vellosidades intestinales. Del mismo modo, Murthy et al. (2005), comprobaron efectos hepatoprotectores de la microalga *Dunaliella salina*, con el 2.87% (w/w) de carotenoides, principalmente β -caroteno. Suplementando a ratas con 250 μ /kg, 125 μ /kg con la microalga y 100 μ /kg de carotenoide sintético, retado con tetracloruro de carbono (CCl_4). Obteniendo resultados favorables comparados contra los grupos control y una mayor protección comparado con el carotenoide sintético.

Astaxantina

El estrés oxidativo promueve la producción de varias citoquinas, incluidas las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , Speranza et al. (2017), demostraron que el carotenoide marino astaxantina reduce significativamente la secreción de estas citoquinas proinflamatorias en un modelo celular (U-937) estimuladas con peróxido de hidrógeno H_2O_2 . Regnier et al. (2015), evaluaron la actividad antioxidante intracelular de astaxantina extraída de la microalga *Haematococcus pluvialis* y astaxantina sintética, fueron estudiadas y comparadas por dos ensayos presentando actividades antioxidantes más fuertes que la astaxantina sintética. De igual manera fue evaluada la viabilidad celular un modelo de células vasculares humanas (HUEVEC) expuesta a astaxantina de *H. pluvialis*, la cual no presentó toxicidad, así como cambios en la morfología y en la viabilidad de las células. Este estudio sugiere que la utilidad de este metabolito bioactivo natural en la prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares de una forma segura y eficaz.

Ácidos grasos poliinsaturados

Las microalgas son una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Se pueden clasificar en dos familias de, mega-6 (ω -6) y omega-3 (ω -3). Dentro de la familia de ω -6 se deriva del ácido linoleico (AL) que incluye al ácido araquidónico. La familia ω -3 se deriva del ácido α -linoléico (ALA), destacando el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico

(DHA), estos últimos forman parte de los metabolitos bioactivos más importantes implicados en la actividad antiinflamatoria de las microalgas (Cui y Schenk 2019; Balić et al., 2020).

Estructuralmente estos ácidos grasos contienen dos o más dobles enlaces en su cadena de carbono. La familia de ω -3 tienen en común un doble enlace carbono terminal en la posición ω -3, el tercer enlace desde el extremo metilo del ácido (Balić et al., 2020). La actividad antiinflamatoria que ejercen los ω -3 es explicada por el propio metabolismo de los AGPI. Los derivados de las familias de ω -6 y ω -3 compiten en la síntesis de eicosanoides (producto de la oxidación) al dirigirse a las mismas enzimas desaturasas y elongasas. Los eicosanoides actúan como moléculas de señalización bioactivas que regulan los procesos homeostáticos proinflamatorios y antiinflamatorios. A partir de los ω -6 se expresa la COX-2 por la cascada del ácido araquidónico y su posterior formación de prostaglandinas (PG) de la serie dos lipoxigenasa (5-LOX) formando leucotrienos (LT) de la serie cuatro (B4, C4, E4) con funciones proinflamatorias. Por otro lado, el EPA se metaboliza en PG de la serie tres (B3, D3, E3, I3) y LT de la serie cinco (B5, C5 y D6) con funciones antiinflamatorias, vasodilatadores y antiagregantes. (Dennis y Norris, 2015; Balić et al., 2020).

Polisacáridos sulfatados

Las microalgas producen polisacáridos, constituyentes estructurales, intracelulares y extracelulares. Estos son polímeros condensados formados por

largas cadenas de monosacáridos. Principalmente las microalgas marinas están constituidas por polisacáridos sulfatados (PS), estas son macromoléculas bioactivas en las que algunos grupos hidroxilos están sustituidos por grupos sulfato en los residuos de azúcar. (Raposo et al., 2013; Chen et al., 2019).

Sun et al. (2014), probaron la capacidad antioxidante de polisacáridos extraídos de la microalga *Isochrysis galbana* inducidos con pirogalol, comprobando que tienen la capacidad moderada de eliminar los radicales superóxido e hidroxilo dependiente de concentración (0-3,2 mg/mL). Por su parte, Chen et al. (2019), evaluaron la actividad inmunoestimulante con los heteropolisacáridos sulfatados de la microalga *Tribonema* spp. (12.5-200 μ g/mL) en un modelo celular de macrófagos RAW264.7 24 hr después de la administración, comprobando que los PS compuestos principalmente por galactosa, podrían aumentar la viabilidad celular y regular la expresión de algunas citoquinas como IL-6, IL-10 y TNF- α .

JUSTIFICACIÓN

En la industria agropecuaria las microalgas se han utilizado como un recurso natural para la producción de ganado, aves de corral y acuicultura debido a sus diversos perfiles nutricionales, como fuentes de proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales, vitaminas y otros productos de alto valor, (Saadaoui et al., 2021). Se han reportado las propiedades inmunoestimulantes de microalgas en modelos celulares, marinos, y algunos animales de producción, pero sus efectos no han sido estudiados en ovinos.

El uso de microalgas para la alimentación animal es de particular interés debido a que existe la necesidad de identificar fuentes alternativas de compuestos naturales en la producción pecuaria, ambientalmente sostenible, nutricionalmente beneficiosa y con potencial inmunoestimulante para aumentar el rendimiento productivo.

Una investigación científica controlada sobre efectos inmunoestimulantes y antioxidantes de la microalga *Dunaliella salina* en corderos de destete, proporcionará información de base para el uso de suplementos o aditivos dietéticos naturales de microalgas para mejorar la salud y bienestar de los ovinos, en la producción intensiva y así ayudar a disminuir los costos de producción y pérdidas económicas por enfermedades, además de promover una producción sustentable.

HIPÓTESIS

Hi: La actividad de las enzimas inmunoestimulantes y antioxidantes en corderos de pelo en fase de predestete presentaran cambios cuando se les administre la microalga *Dunaliella salina* como aditivo dietético.

H₀: La actividad de las enzimas inmunoestimulantes y antioxidantes en corderos de pelo en fase de predestete no presentará cambios cuando se les administre la microalga *Dunaliella salina* como aditivo dietético.

OBJETIVOS

General

Determinar si existe un efecto inmunoestimulante y antioxidante de la microalga *Dunaliella salina* como aditivo dietético en corderos de pelo.

Específico

Determinar el efecto en la actividad inmunoestimulante y antioxidante con dos niveles de adición dietética de *Dunaliella salina* en corderos de pelo, mediante la cuantificación de las actividades de proteínas totales, mieloperoxidasa (MPO) catalasa (CAT), producción de óxido nítrico (NO) y antiproteasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Tipo Experimental

Localización del estudio

El estudio se llevó a cabo en la Unidad Experimental de la posta de Ovinos del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en la ciudad de Mexicali, Baja California.

Duración del bioensayo

El periodo del bioensayo con *Dunaliella salina* estudio fue marzo-abril del año 2023 con una duración de 37 días en total.

Animales

Para el diseño experimental, se seleccionó al azar de un lote de ovinos en fase de predestete, de ambos sexos de cruce Katahdin × Dorper, de aproximadamente 2 meses de edad con un peso aproximado de 7.79 ± 0.98 kg, sanos, obtenidos de la Unidad Experimental de la posta de Ovinos y Caprinos del IICV-UABC. Se excluyeron aquellos animales que presentaron signos clínicos de enfermedad, así como retrasos en el crecimiento. Posterior a la selección, se

pesó a cada animal con una báscula de mano y se tomó el registro. Todos los procedimientos se realizaron según lo establecido por la Norma Oficial Mexicana en materia de salud animal; NOM-062-ZOO-1995, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; NOM-051-ZOO-1995, trato humanitario en la movilización de animales; NOM-024-ZOO-1995, Especificaciones y características zoonosanitarias para el transporte de animales, sus productos y subproductos, productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos; NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

Microalga *Dunaliella salina*

La pasta de microalgas de *Dunaliella salina* se adquirió de la empresa Allele Biotech de México, S. de R.L. de C.V. ubicado en el Ejido Zarahemla, Ensenada, Baja California. COEPRIS 19 NV 02 001 20, Registro Sanitario COFEPRIS 203301622X0009.

Bioensayo con la adición dietética de *Dunaliella salina*

El día -14 del bioensayo se registraron los pesos de 18 animales los cual se agruparon en 3 bloques según su peso vivo (PV) (bloque 1: 5.88 ± 0.53 , bloque 2: 7.38 ± 0.36 , bloque 3: 10.13 ± 1.48), para ser asignados a 3 grupos de tratamientos; Grupo control, grupo adicionado con 3 g y un grupo adicionado con

6 g. Los corderos estuvieron en un periodo de 7 días de adaptación con aumento gradual de adición de la microalga *D. salina* hasta la dosis final asignada, para lograr esto, se dividió equitativamente el total de gramos asignados entre los días de adaptación (Cuadro 2). Los corderos fueron alimentados con una dieta a libre acceso (*Creep-feeding* en inglés), con acceso libre a las madres, suplementos concentrados y posteriormente con solo heno de alfalfa.

Cuadro 2. Tratamiento en el periodo de adaptación.

Grupo	Adición (g) de harina de <i>Dunaliella salina</i> por animal						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Control	0	0	0	0	0	0	0
3 g	0.429	0.857	1.286	1.714	2.143	2.571	3.000
6 g	0.857	1.714	2.571	3.429	4.286	5.143	6.000

Procedimiento del muestreo

Se tomaron muestras de sangre a todos los animales desde el día 0 al 30 en intervalos de 15 días. Las muestras de sangre yugular se colectaron en tubos

Vacutainer Golden Vac TM, 3 mL sin anticoagulante y 2 mL con anticoagulante (EDTA) y se trasladaron inmediatamente al Laboratorio de Biología Molecular del IICV-UABC para su procesamiento y almacenamiento. El suero sanguíneo fue recuperado mediante centrifugación a 2500 g por 15 min. Las muestras de sangre entera y suero sanguíneo fueron alicotados en microtubos de 1.5 mL y almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis de laboratorio.

Una vez concluido el periodo del bioensayo se realizó el sacrificio de los animales en la sala de matanza del Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC, se realizó la inspección de la canal, se midió el pH del contenido ruminal, y se muestrearon diferentes tejidos (rumen, omaso, abomaso, duodeno, yeyuno, ciego, colón, hígado, bazo, riñón, músculo y mucosa intestinal) con pinzas, bisturí y tijeras de disección para ser colocadas en microtubos estériles de 2 ml. Todas las muestras fueron preservadas y almacenadas a - 20° C en el Laboratorio de Biología Molecular del IICV hasta su posterior preparación de homogeneizados (lisados) de las muestras.

Para preparar los lisados de las muestras, se pesaron 100 mg de cada una de las muestras de tejidos utilizando una balanza analítica. En el caso de la mucosa intestinal se recuperó suavemente de la superficie de la mucosa usando tijeras y bisturí. Las muestras fueron trituradas y colocadas en 500 µl de PBS (pH 7.4) en microtubos estériles de 2 ml. Se homogeneizaron mecánicamente mediante un sonicador digital modelo Q125 (Qsonica, E.U.A.) por 10 seg. Centrifugado 10,000 g a 4°C por 10 min obteniendo un sobrenadante transferido a nuevos tubos, para ser preservados a -20 °C.

Cuantificación de proteínas totales (PT)

Para determinar la concentración de proteína de los lisados los 12 tejidos (rumen, omaso, abomaso, duodeno, yeyuno, ciego, colon, hígado, bazo, riñón, músculo y mucosa intestinal) y sueros, se utilizó el método colorimétrico de Bradford utilizando el Coomassie azul brillante G-250 (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*, marca Bio-Rad, cat. #5000006). Se estableció una curva de referencia utilizando soluciones de albúmina de suero bovino, fracción V (Sigma, Chemical Co., M.O., E.U.A., Cat # A-3350).

Evaluación de los parámetros de la respuesta inmunoestimulante

Actividad Antiproteasa

La actividad de antiproteasa en muestras de la mucosa intestinal, se determinó mediante la capacidad de las muestras para inhibir la actividad de la tripsina, según 20 µl de muestra incubados con 20 µl de solución estándar de tripsina (Tripsina de páncreas de bovinos, tipo I, marca Sigma, Chemical Co., M.O., E.U.A., Cat # T8003), durante 10 min. a 22 °C. 200 µl de PBS 0.1 M (pH 7.0) y 250 µl de azocaseína (Sigma-Aldrich, M.O., E.U.A., Cat.# A2765) al 2 % (p/v) en PBS e incubado por 1 h a 22 °C. Se añadieron 500 µl de ácido tricloroacético 10 % (v/v) incubado por 30 min a 22 °C. Centrifugado a 6000 g por 5 min. El sobrenadante será transferido a una microplaca de 96 pozos (Falcon 3915, Becton Dickinson, E.U.A.) con 0.1 ml de hidróxido de sodio 1 N por pozo

para medir una Absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplaca digital modelo Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.).

Evaluación de los parámetros de la respuesta antioxidante

Actividad Catalasa

La determinación de la actividad de la catalasa en los 12 tejidos (rumen, omaso, abomaso, duodeno, yeyuno, ciego, colon, hígado, bazo, riñón, músculo y mucosa intestinal) se basó en el protocolo de Angulo et al. (2020). En breve, se utilizó el cromógeno Purpald® (Sigma-Aldrich, M.O., E.U.A. cat.# 192892), método basado en la reacción de la catalasa con metanol en presencia de H₂O₂. Actividad enzimática (U) determinada por la producción de formaldehído (metanol oxidado) medido colorimétricamente con el cromógeno Pulpald®. Se realizó una curva estándar con hígado bovino. En cada pozo de reacción en una microplaca de 96 pozos se colocaron 25 µl de buffer, 25 µl de metanol, 5 µl de H₂O₂ y 50 µl del lisado de la muestra. Se incubó a temperatura ambiente en agitación suave por 20 min. Posteriormente se agregó 25 µl de hidróxido de potasio al 10 M y 50 µl de Purpald®, se incubó a temperatura ambiente en agitación suave por 10 min. en condiciones de oscuridad. Se agregó 25 µl de periodato de potasio 192 mM en hidróxido de potasio 0.5 M y se agitó por 5 min a temperatura ambiente para parar la reacción. Se midió la absorbancia a 655 nm con un lector de microplaca

digital modelo Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.). Todos los ensayos se realizaron en triplicados.

Actividad Mieloperoxidasa

La actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en las muestras de suero, mucosa intestinal, hígado y bazo se realizaron de acuerdo con el método de Quade & Roth (1997) con algunas modificaciones. 20 μ l de muestra por triplicado en una microplaca de 96 pozos (Falcon 3915, Becton Dickinson, E.U.A.), se agregan 100 μ l de la solución revelador TMB (40 ml H₂O destilada, 10 μ l de peróxido de hidrógeno (30%), 1 pastilla de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich, E.U.A., Cat. #5525), en oscuridad y se dejó reposar 2 min. Después se añadió 50 μ l de ácido sulfúrico al 4 M y se leyó la absorbancia 450 nm con un lector de microplaca digital modelo Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.).

Producción de Óxido nítrico

La producción de óxido nítrico (NO) en las muestras de suero, se determinó midiendo la concentración de nitritos de acuerdo con el método de (Neumann et al., 1995) con algunas modificaciones. Se añadieron 50 μ l de muestra por triplicado en una microplaca de 96 pozos, se adicionaron 50 μ l de reactivo de Griess (Sigma-Aldrich, E.U.A., Cat.#03553) 4 mg/ml en agua y se incubó durante 15 min en oscuridad y temperatura ambiente. Se leyó la Absorbancia a 490 nm con un lector de microplaca digital modelo Varioskan LUX

Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.). Se calculó la concentración de nitrito (mM) comparando con una curva estándar elaborada a partir de las soluciones de nitrito de sodio.

Análisis estadístico

Para probar los efectos de los diferentes niveles de adición de *Dunaliella salina* en la dieta sobre el estatus inmune y antioxidante, se utilizó un diseño completamente al azar. Para las variables del efecto inmunoestimulante (antiproteasas) y para el efecto antioxidante (MPO, NO, y CAT), los datos de respuesta se sometieron en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y para la varianza homogénea la prueba de Levene. Los efectos de los tratamientos se probaron mediante Análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de las distintas dietas sobre los parámetros de la respuesta inmune y antioxidante. El modelo aplicado: $Y_{ij} = \mu + \tau Y_o + \epsilon_{ij}$, donde Y es la respuesta inmune o antioxidante; μ es la media general; τ es el nivel de adición de *Dunaliella salina* con 3 y 6 g; y ϵ para el error experimental. Se utilizó la prueba de Tukey para determinar si existen diferencias significativas entre medias con una significancia de $P < 0.05$. Se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 25.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de pH ruminal de los corderos al final del experimento

Los resultados que se presentan en la Figura 2, no mostraron diferencias significativas en el nivel de pH ruminal entre grupos tratados con *D. salina* y el grupo control.

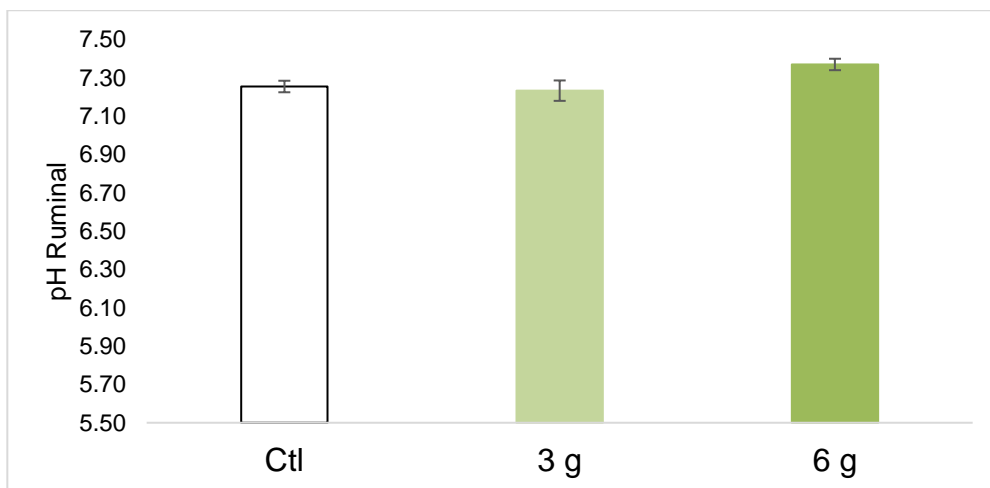


Figura 2. pH ruminal de los corderos al final del experimento.

Cuantificación de proteínas totales (PT)

Los resultados obtenidos de la cuantificación de proteínas totales en los 12 diferentes tejidos de los corderos adicionados con *D. salina* se muestran en el Cuadro 3. Se observaron diferencias significativas en la concentración proteica entre grupos en 3 diferentes tejidos, donde en rumen en el grupo de 3 g se obtuvo

un incremento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de PT (2.32 ± 0.27 mg/mL).

En comparación con el grupo control (1.91 ± 0.51 mg/mL). Por el contrario, en yeyuno y colon se obtuvo un efecto negativo con respecto al control. En el grupo de 6 g también se observó el mayor efecto negativo sobre la concentración de PT en tres tejidos, rumen, yeyuno y colon. En el resto de los tejidos no se observaron diferencias significativas entre tres grupos.

Cuadro 3. Cuantificación de proteínas totales (PT) en los 12 diferentes tejidos de corderos adicionados con *D. salina*.

Tejido	Tratamientos ¹		
	Ctrl	3 g	6 g
Rumen	1.91 ± 0.51^{ab}	2.32 ± 0.27^b	1.34 ± 0.42^a
Omaso	2.91 ± 0.78	3.36 ± 0.29	3.06 ± 0.05
Abomaso	2.47 ± 0.58	2.79 ± 0.41	2.85 ± 0.75
Duodeno	8.19 ± 1.10	7.57 ± 0.85	7.98 ± 1.25
Yeyuno	8.53 ± 0.86^b	8.46 ± 0.59^{ab}	6.93 ± 1.09^a
Colon	6.71 ± 0.66^b	6.08 ± 0.63^{ab}	5.46 ± 0.67^a
Ciego	5.24 ± 0.51	5.34 ± 0.32	5.25 ± 0.35
Mucosa	3.05 ± 0.73	3.75 ± 0.38	3.84 ± 0.50
Hígado	11.03 ± 0.84	11.70 ± 2.06	11.56 ± 1.48
Bazo	9.36 ± 0.80	9.97 ± 1.43	9.42 ± 1.03
Riñón	7.61 ± 0.82	8.91 ± 0.63	8.04 ± 1.04
Músculo	5.70 ± 0.85	4.26 ± 0.83	4.17 ± 1.48

¹ Ctrl: Grupo control sin *D. salina*; 3 g grupo adicionado con 3 gramos de *D. salina*; 6 g grupo adicionado con 6 gramos de *D. salina*. Concentración expresada en mg/ml de proteína.

^{abc} Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias estadísticas entre los grupos.

En la Figura 3 se muestran los resultados de la PT en suero sanguíneo de los corderos durante el periodo del experimento.

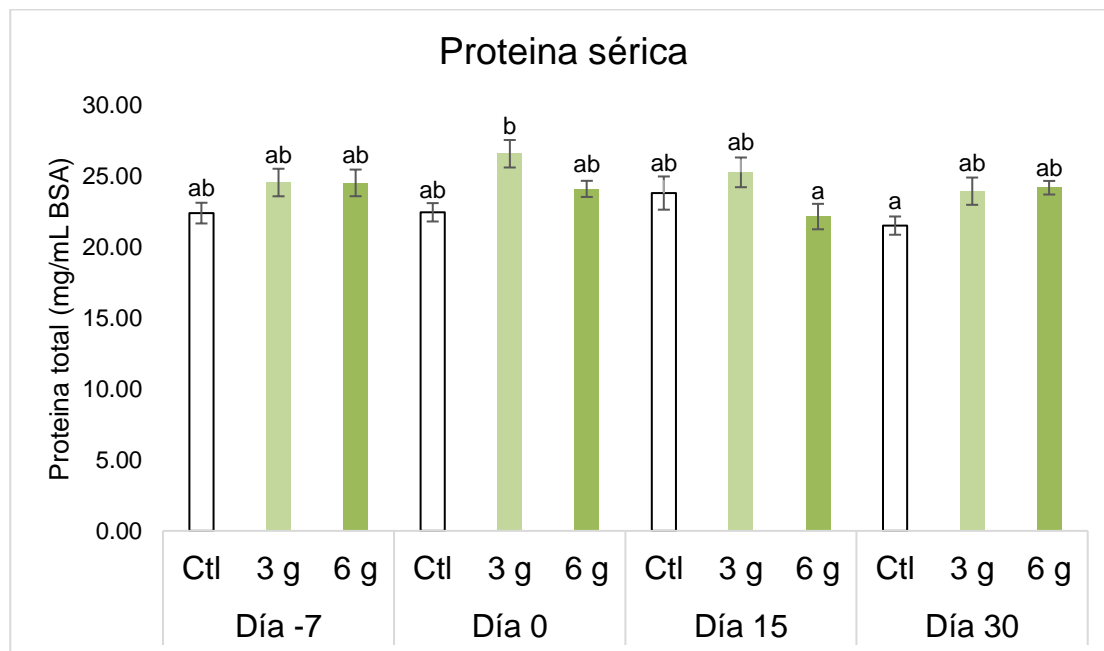


Figura 3. Concentración de proteínas séricas en corderos experimentados.

Es importante indicar que la concentración de proteína sérica del grupo control se observó ligeramente disminuida al final del periodo (día 30), comparado al día -7, día 0 y día 15. Este cambio negativo pudiera ser el reflejo de los diversos factores de estrés fisiológico a los que los corderos son sometidos durante esta etapa de destete. Sin embargo, la concentración de la proteína

sérica en los grupos de 3 g y 6 g fue superior a la del grupo control en el Día 30, mostrando el efecto positivo de la adición de *D. salina*.

Actividad de antiproteasas

Se realizó el ensayo de la actividad de antiproteasa solo para las muestras de mucosa, y se expresaron los resultados como el porcentaje de inhibición de tripsina (Figura. 4).

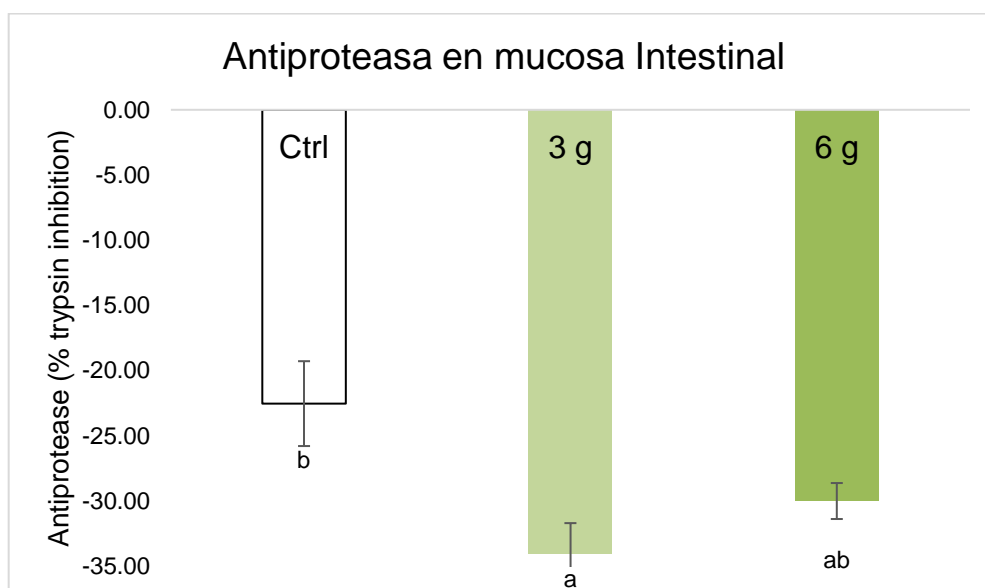


Figura 4. Actividad de antiproteasas en mucosa intestinal.

Los valores negativos de actividades de antiproteasas, incluyendo el valor negativo del grupo control, indican posibles problemas técnicos en la realización del ensayo. Una de las posibilidades sería que el protocolo utilizado en el presente trabajo fue previamente estandarizado para muestras de cultivo celular

de peces y mamíferos, mientras las muestras preparadas en el presente trabajo son lisados de mucosa intestinal de ovinos, con alta viscosidad, lo que pudiera haber afectado los resultados de ensayo.

Actividad de mieloperoxidasa (MPO)

Resultados de la cuantificación de la actividad de la enzima MPO se muestran en la Figura 5. No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los tratados, en todos los tres tejidos analizados (mucosa intestinal, hígado y bazo). Existe una tendencia a incrementar la actividad en el grupo de tratamiento de 3 g (mucosa intestinal e hígado). Sería interesante analizar el cambio longitudinal de la actividad de MPO de estos tejidos durante el tratamiento.

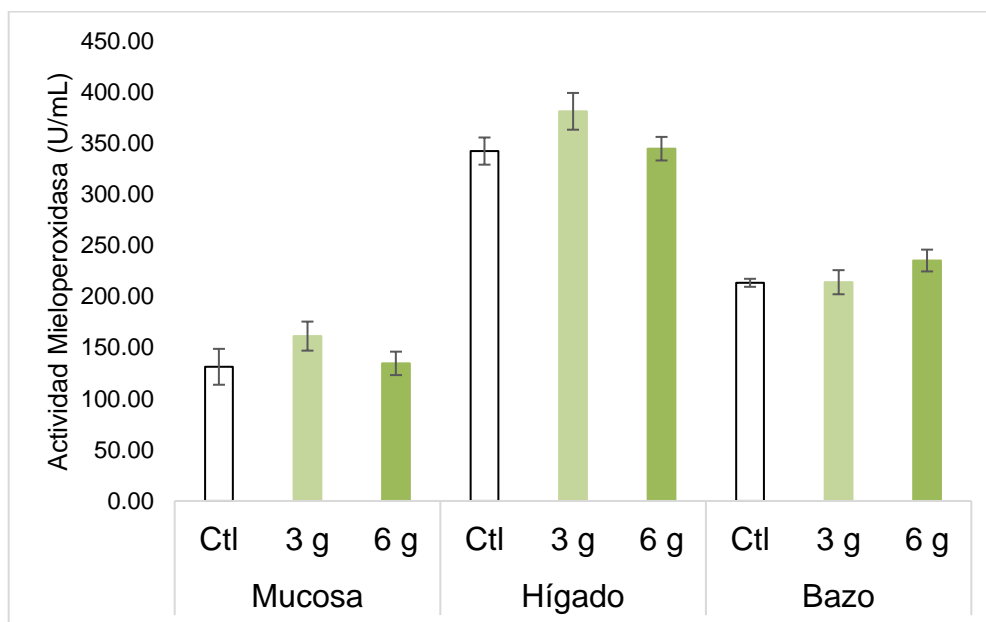


Figura 5. Actividad de mieloperoxidasa en mucosa, hígado y bazo.

La enzima MPO es almacenada en neutrófilos y macrófagos y se liberan durante actividad fagocítica, para combatir con patógenos mediante la conversión de cloruro y peróxido de hidrógeno a hipoclorito (Loria et al. 2008).

La actividad de MPO en mucosa intestinal ha sido utilizado como indicador de daños tisulares e inflamación en modelo murino. Lavy et al. (2003) reportaron que la adición dietética de *Dunaliella bardawil* tuvo un efecto protector de la mucosa intestinal, con actividad antiinflamatoria, disminuyendo la actividad de MPO en modelo murino.

La Figura 6. muestra resultados de la medición de actividades de MPO en sueros durante el periodo del bioensayo.

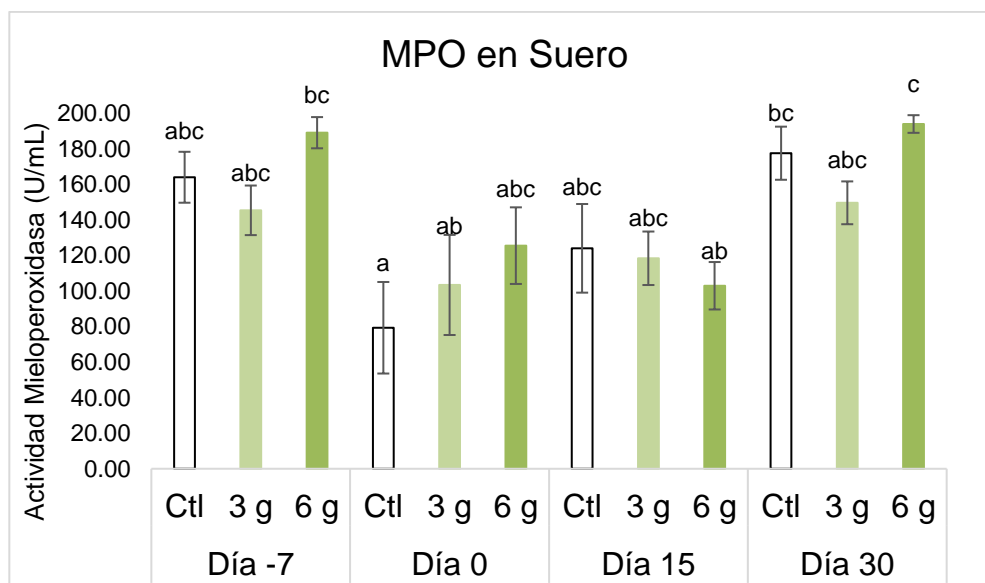


Figura 6. Actividad de mieloperoxidasa en suero

Se observaron oscilaciones en actividad de MPO tanto en el grupo control y grupos tratados durante el periodo de experimento. Una vez terminado el periodo de ajuste (primeros 7 días), la actividad de MPO fue mayor en el grupo de 6 g comparado al grupo control en el día 0 y el día 30. El grupo de 3 g solo se observó mayor actividad de MPO comparado al grupo control en el día 0, posteriormente las diferencias con el grupo control se disminuyeron por tiempo, terminando con menor actividad de MPO comparado al grupo control en el día 30.

Producción de Óxido nítrico (NO)

No hubo diferencias significativas en la producción de NO en sueros entre grupos de animales tratados (Figura 7).

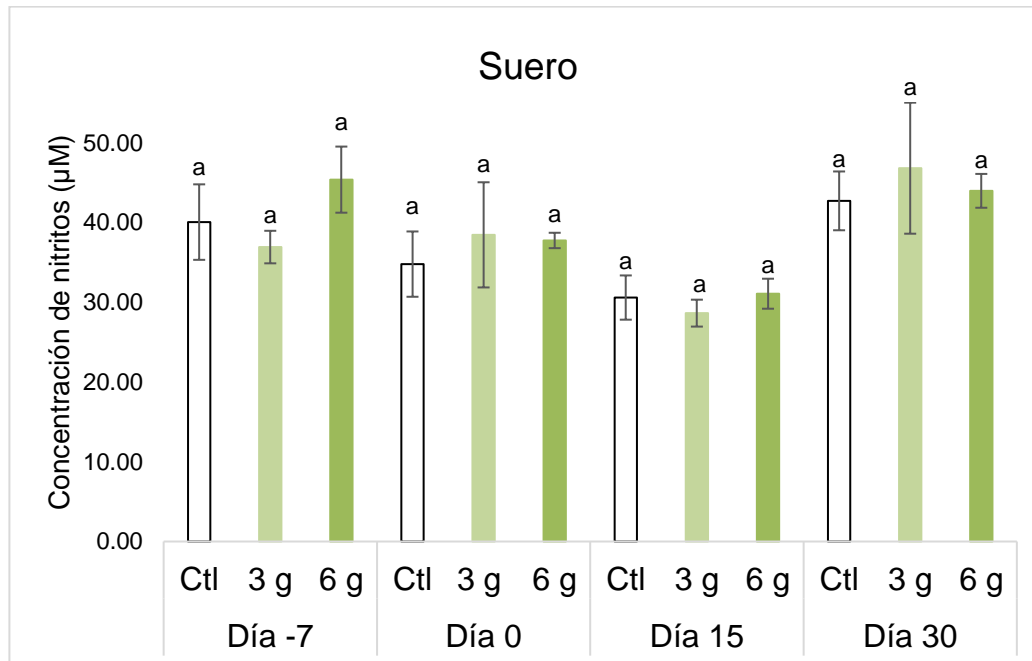


Figura 7. Producción de óxido nítrico de los sueros sanguíneos.

Actividad de Catalasa (CAT)

La actividad de la enzima antioxidante CAT en hígado y omaso fue significativamente mayor en los grupos de 3 g y 6 g comparado al control ($p < 0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Actividad de la enzima antioxidante CAT en los 12 tejidos de los corderos adicionados con *D. salina*.

Tejido	Tratamientos ¹		
	Ctrl	3 gr	6 gr
Rumen	3.88±0.38	3.75±0.27	3.90±0.11
Omaso	4.14±0.24 ^a	4.75±0.12 ^b	4.85±0.43 ^b
Abomaso	05.07±0.31	4.50±0.32	4.72±0.28
Duodeno	5.36±1.53	5.17±0.12	5.60±1.81
Yeyuno	5.69±0.65	5.51±0.63	5.00±1.19
Colon	4.55±0.38	4.31±0.17	4.61±0.46
Ciego	4.09±0.23	4.12±0.44	4.18±0.47
Mucosa	5.05±0.74	5.73±0.50	5.93±0.62
Hígado	27.03±5.70 ^a	38.13±6.29 ^b	36.47±3.45 ^{ab}
Bazo	9.92±0.71	9.89±1.62	9.53±0.93
Riñón	8.80±0.73	11.33±2.35	9.75±0.80
Músculo	4.54±0.43	4.69±0.39	4.48±0.39

¹ Ctrl: Grupo control sin *D. salina*; 3 g grupo adicionado con 3 gramos de *D. salina*; 6 g grupo adicionado con 6 gramos de *D. salina*. Actividad expresada en nmol/min/mL.

^{abc} Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias estadísticas entre los grupos.

En el grupo de 6 g, la actividad de CAT en hígado (36.47 ± 3.45) fue superior a la del control (27.03 ± 5.70) pero fue inferior a la del grupo de 3 g (38.13 ± 6.29). En los tejidos como mucosa intestinal y riñón se observó una tendencia de incremento en grupos tratados, sin significancias estadísticas, probablemente por mayor variación entre réplicas biológicas y analíticas.

CONCLUSIONES

El presente estudio proporcionará el primer reporte sobre efectos inmunoestimulantes y antioxidantes de una cepa de *Dunaliella salina*, originaria de Baja California, en el sistema de producción ovina.

La adición de 3g de *D. salina* durante 30 días en la etapa de destete mejoró algunos parámetros proteicos y enzimáticos como la concentración de proteína sérica, proteína total en rumen, yeyuno, colón, y la actividad de catalasa en hígado.

Los parámetros antioxidantes como la actividad de mieloperoxidasa y la producción de óxido nítrico no resultaron concluyentes o no fueron afectados de manera significativa por la adición de *D. salina*.

El uso de microalgas naturales originaria de la región promueve una producción sustentable, mejorando la salud y bienestar de ovinos en la producción intensiva, por lo que es importante continuar este tipo de estudios para explorar el potencial inmunoestimulante y antioxidante de *D. salina*.

LITERATURA CITADA

- Angulo C, Chavez-Infante L, Reyes-Becerril M, Angulo M, Romero-Geraldo R, Llinas-Cervantes X, Cepeda-Palacios R. 2020. Immunostimulatory and antioxidant effects of supplemental feeding with macroalga *Sargassum* spp. on goat kids. *Trop Anim Health Prod.* 52(4):2023-2033
- Balić, A., D. Vlastic, K. Zuzul, B. Marinovic, and Z. B. Mokos. 2020. Omega-3 versus Omega-6 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of inflammatory skin diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 21(3):741-767.
- Ben-Aharon, O., R. Magnezi, M. Leshno and D.A. Goldstein. 2018. Association of immunotherapy with durable survival as defined by value frameworks for cancer care. *JAMA. Oncol.* 4(3):326-332.
- Bishop, W.M. and H. M. Zubeck. 2012. Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *J. Nutr. Food Sci.* 2:1-6.
- Byrne, K. A., C. L. Loving, and J. L. McGill. 2020. Innate immunomodulation in food animals: Evidence for trained immunity? *Front. Immunol.* 11:1099-1114.
- Caroprese, M., M. Albenzio, M.G. Ciliberti, M. Francavilla and A. Sevi. 2012. A mixture of phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* affects proliferation of

peripheral blood mononuclear cells and cytokine production in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 150(1-2):27-35.

Castillo, C., J. L. Benedito, M. López-Alonso, M. Miranda, and J. Hernández. 2001. Importance of oxidative stress in cattle:: its relationship with the physiological condition (pregnancy and parturition) and nutrition. *Arch Med Vet* 33(1):5-20.

Chan, A.H. and K. Schroder. 2020. Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. *J. Exp. Med.* 217(1):1-10.

Chen, X. L., L. Song, H. Wang, S. Liu, H. H. Yu, X. Q. Wang, R. F. Li, T. Z. Liu, and P. C. Li. 2019. Partial characterization, the immune modulation and anticancer activities of sulfated polysaccharides from filamentous microalgae *Tribonema* sp. *Molecules* 24(2):1-11.

Cheng, G., H. Hao, S. Xie, X. Wang, M. Dai, L. Huang and Z. Yuan. 2014. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?. *Front. Microbiol.* 5:217-232.

Costa, J.A.V., B.F. Lucas, A.G.P. Alvarenga, J.B. Moreira, and M.G. de Moraes. 2021. Microalgae polysaccharides: an overview of production, characterization, and potential applications. *Polysaccharides.* 2:759–772.

- Cui, Y., S. R. Thomas-Hall, and P. M. Schenk. 2019. *Phaeodactylum tricornutum* microalgae as a rich source of omega-3 oil: Progress in lipid induction techniques towards industry adoption. *Food Chem.* 297:1-9.
- Dennis, E. A., and P. C. Norris. 2015. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 15(8): 511-523.
- De Morais, M.G., B.D.S. Vaz, E.G. de Morais and J.A.V. Costa. 2015. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed. Res.* 2015:1-15.
- El Gamal, A.A. 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi. Pharm. J.* 18:1-25.
- Francavilla, M., P. Trotta, and R. Luque. 2010. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella sauna*: A potentially novel industrial application. *Bioresour. Technol.* 101(11):4144-4150.
- Ingebrigtsen, R.A., E. Hansen, J.H. Andersen and H.C. Eilertsen. 2016. Light and temperature effects on bioactivity in diatoms. *J. Appl. Phycol.* 28(2):939-950.
- Lauritano, C., J.H. Andersen, E. Hansen, M. Albrigtsen, L. Escalera, F. Esposito, K. Helland, K.Ø. Hanssen, G. Romano and A. Ianora. 2016. Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities. *Front. Mar. Sci.* 3:68-80.

- Lavy, A., Y. Naveh, R. Coleman, S. Mokady and M.J. Werman. 2003. Dietary *Dunaliella bardawil*, a β -carotene-rich alga, protects against acetic acid-induced small bowel inflammation in rats. *Inflamm. Bowel. Dis.* 9:372-379.
- Lordan, S., R.P. Ross and C. Stanton. 2011. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar. Drugs.* 9:1056-1100.
- Maroneze, M. M., E. Jacob-Lopes, L. Q. Zepka, M. Roca, and A. Perez-Galvez. 2019. Esterified carotenoids as new food components in cyanobacteria. *Food Chem.* 287:295-302.
- Matos, J., C. Cardoso, N.M. Bandarra and C. Afonso. 2017. Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. *Food Funct.* 8:2672-2685.
- Mau, L., J. Kant, R. Walker, C. M. Kuchendorf, S. D. Schrey, U. Roessner, and M. Watt. 2021. Wheat can access phosphorus from algal biomass as quickly and continuously as from mineral fertilizer. *Front. Plant Sci.* 12:1-14.
- McNulty, H. P., J. Byun, S. F. Lockwood, R. F. Jacob, and R. P. Mason. 2007. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* 1768(1):167-174.

- McNulty, H., R. F. Jacob, and R. P. Mason. 2008. Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *Am. J. Cardiol.* 101(10A):20-29.
- Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449:819-826.
- Mezzomo, N., and S. R. S. Ferreira. 2016. Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. *J. Chem.*
- Montero-Lobato, Z., M. Vázquez, F. Navarro, J.L. Fuentes, E. Bermejo, I. Garbayo, C. Vílchez and M. Cuaresma. 2018. Chemically-induced production of anti-inflammatory molecules in microalgae. *Mar. Drugs.* 16(12):478.
- Mousa, S., A. Elsayed, B. Marghani, and A. Ateya. 2019. Effects of supplementation of *Bacillus* spp. on blood metabolites, antioxidant status, and gene expression pattern of selective cytokines in growing Barki lambs. *J. adv. Vet.* 6(3):333-340.
- Murthy, K. N. C., A. Vanitha, J. Rajesha, M. M. Swamy, P. R. Sowmya, and G. A. Ravishankar. 2005. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* - a green microalga. *Life Sci.* 76(12):1381-1390.

- Quade, M. J., and J. A. Roth. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58(3-4):239-248.
- Pardoll, D.M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* 12(4):252-264.
- Rasmussen, R. S. and M. T. Morrissey. 2007. Marine biotechnology for production of food ingredients. *Adv. Food Nutr. Res.* 52:237-292.
- Rao, A. R., V. Baskaran, R. Sarada, and G. A. Ravishankar. 2013. In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from microalgal biomass - A repeated dose study. *Int. Food Res. J.* 54(1):711-717.
- Raposo, M. F. D., R. de Moraes, and A. de Moraes. 2013. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Mar. Drugs.* 11(1):233-252.
- Regnier, P., J. Bastias, V. Rodriguez-Ruiz, N. Caballero-Casero, C. Caballo, D. Sicilia, A. Fuentes, M. Maire, M. Crepin, D. Letourneur, V. Gueguen, S. Rubio, and G. Pavon-Djavid. 2015. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* prevents oxidative stress on human endothelial cells without toxicity. *Mar. Drugs.* 13(5):2857-2874.

- Rodriguez-Amaya, D. B. 2015. Status of carotenoid analytical methods and in vitro assays for the assessment of food quality and health effects. *Curr. Opin. Food Sci.* 1:56-63.
- Saadaoui, I., R. Rasheed, A. Aguilar, M. Cherif, H. Al Jabri, S. Sayadi, and S. R. Manning. 2021. Microalgal-based feed: promising alternative feedstocks for livestock and poultry production. *Anim. Sci. Biotechnol.* 12(1):1-15.
- Samarakoon, K.W., J.Y. Ko, S.M. Rahman, J.H. Lee, M.C. Kang, O.N. Kwon, J.B. Lee and Y.J. Jeon. 2013. In vitro studies of anti-inflammatory and anticancer activities of organic solvent extracts from cultured marine microalgae. *Algae.* 28(1):111-119.
- Shishido, S.N., S. Varahan, K. Yuan, X. Li and S.D. Fleming. 2012. Humoral innate immune response and disease. *Clin. Immunol.* 144(2):142-158.
- SIAP. 2021. Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera. México. Ovino población ganadera 2013-2022 cabezas. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>
- Speranza, L., M. Pesce, A. Patruno, S. Franceschelli, M. A. de Lutiis, A. Grilli, and M. Felaco. 2012. Astaxanthin treatment reduced oxidative induced pro-inflammatory cytokines secretion in U937: SHP-1 as a novel biological target. *Mar. Drugs.* 10(4):890-899.

- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101(2):87-96.
- Sun, Y. Y., H. Wang, G. L. Guo, Y. F. Pu, and B. L. Yan. 2014. The isolation and antioxidant activity of polysaccharides from the marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Carbohydr. Polym.* 113:22-31.
- Talero, E., S. Garcia-Maurino, J. Avila-Roman, A. Rodriguez-Luna, A. Alcaide, and V. Motilva. 2015. Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. *Mar. Drugs.* 13(10):6152-6209.
- Tizard, I.R. 2018. *Inmunología veterinaria*. 10th ed. Elsevier Inc. EUA.
- Vílchez, C., E. Forjan, M. Cuaresma, F. Bedmar, I. Garbayo, and J. M. Vega. 2011. Marine carotenoids: Biological functions and commercial applications. *Ma. Drugs.* 9(3):319-333.
- Zuluaga, M., V. Gueguen, G. Pavon-Djavid, and D. Letourneur. 2017. Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. *Bl.* 7(1):1-3.