

**UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO
SÁNCHEZ CARRIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA, INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS Y AMBIENTAL
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA**



**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
ZOOTECNISTA**

**ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN
HIGADO DE ANIMALES ALIMENTADOS CON
ANTIMICROBIANOS**

IVAN EDUARDO MAMANI FLORES

ASESOR

DR. FELIX ESTEBAN AIRAHUACHO BAUTISTA

HUACHO – PERÚ

2023

ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN HIGADO DE ANIMALES ALIMENTADOS CON ANTIMICROBIANOS

INFORME DE ORIGINALIDAD

20%

INDICE DE SIMILITUD

20%

FUENTES DE INTERNET

7%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	ciencia.lasalle.edu.co Fuente de Internet	2%
2	repository.lasalle.edu.co Fuente de Internet	1%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
4	research.vu.nl Fuente de Internet	1%
5	es.wikipedia.org Fuente de Internet	1%
6	www.buenastareas.com Fuente de Internet	1%
7	idoc.pub Fuente de Internet	<1%
8	Xianyun Ren, Baoquan Gao, Xianliang Meng, Ping Liu, Jian Li. " Comparison of the florfenicol metabolic rate in individuals with	<1%

**UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO
SÁNCHEZ CARRIÓN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA, INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS Y AMBIENTAL**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

**ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN
HIGADO DE ANIMALES ALIMENTADOS CON
ANTIMICROBIANOS**

Sustentado y aprobado ante el jurado evaluador

Dr. Carlomagno Velasquez

Vergara

PRESIDENTE

Ing. Hilario Noberto Pujada

Abad

SECRETARIO

Mg.Sc. Emmanuel Alexander

Sessarego Davila

VOCAL

Dr. Felix Esteban airahuacho

Bautista

ASESOR

HUACHO – PERÚ

2023

DEDICATORIA.

Papá, por siempre estar presente y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, este logro es tuyo.

AGRADECIMIENTO

Creo absolutamente necesario que se refleje mi agradecimiento a las personas que han sido decisivas en mi vida y que de uno u otro modo han contribuido a que haya culminado esta tesis.

A mis padres, María Jesús y Oscar Lázaro junto a mi hermana Noelia, por el amor, soporte y confianza.

A mi asesor de tesis el Dr. Félix Esteban Airahuacho Bautista, gracias por su compromiso, responsabilidad y dedicación a través del tiempo. Gracias por preferir a esta tesis para que se logre potencializar y así compita por nuevos avances en la investigación.

Al Ing. Edwin Macavilca Ticallauri quien aceptó dando el permiso para el desarrollo de esta tesis en el Laboratorio de Procesos e Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Agraria Industrias Alimentarias y Ambiental.

Asimismo, a la Dr. Zoila Honorio Durand por brindar sus aportes e intervenciones, así como también permitirnos el uso de la SALA DE INVESTIGACIÓN FOCAM-TESIS.

A Javier Luyo Flores, académico y buen profesional de campo quien siendo mi profesor de escuela universitaria me insto por la investigación dando

A Jaime Peña Chinchay por brindar su apoyo y motivación en circunstancias enrevesadas de mi vida.

Finalmente, a mi familia nuclear, mi esposa quien es mi compañera de vida, que me dio como hija a Mariel Elajak y decirte Mariel que eres la razón de todas mis mañanas, y quiero que te des cuenta lo mucho que significas para mí.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO.....	4
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. Descripción de la realidad problemática	3
1.2. Formulación del problema.....	4
1.2.1. Problema general	4
1.2.2. Problemas específicos	4
1.3. Objetivos de la investigación.....	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Justificación de la investigación.....	5
1.5. Delimitación del estudio.....	5
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	6
2.1. Antecedentes de la investigación.....	6
2.2. Bases Teóricas.....	7
2.2.1. Glutación S-Transferasa (GST)	7
2.2.2. Metabolismo de xenobióticos por GST.....	8
2.2.3. Antibióticos o antimicrobianos	12

2.2.4. Resistencia bacteriana	13
2.3. Definición de términos básicos.....	15
2.4. Hipótesis de la investigación	18
2.4.1. Hipótesis general	18
2.4.2. Hipótesis específicas.....	18
CAPITULO III: METODOLOGIA.....	19
3.1. Diseño metodológico.....	19
3.1.1. Ubicación.....	19
3.1.2. Materiales e insumos.....	19
3.1.3. Diseño de investigación	20
3.1.4. Variables analizadas	20
3.1.5. Muestra	20
3.2. Técnicas de recolección de datos.....	20
3.3. Técnicas para el procesamiento de la información.....	22
CAPITULO IV: RESULTADOS	23
CAPITULO V: DISCUSIÓN	26
CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	28
6.1. Conclusiones	28
6.2. Recomendaciones.....	28
CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	29
ANEXOS	37

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i>	Participación del glutatión en la desintoxicación de xenobióticos y especies reactivas de oxígeno, su relación con el desarrollo patológico y el papel potencial de diferentes fotoquímicos (Lushchak et al 2012).....	8
<i>Figura 2.</i>	Detoxificación de xenobióticos vía ácidos mercaptúricos (Huber y Almeida, 2008).....	10
<i>Figura 3.</i>	Ejemplos de la actuación de GST en detoxificación celular de xenobióticos (Huber et al., 2008).	11
<i>Figura 4.</i>	Formación del conjugado GS-DNB. Detoxificación del CDNB a través de la GST formando 2,4-dinitrofenil-S-glutatión (GS-DNB). Adaptado de Hayes & Pulford, 1995...	12
<i>Figura 5.</i>	Actividad de la GST en hígado proveniente de aves de sistemas de producción que incluye o no antimicrobianos en el alimento. Letras iguales sobre las barras indica que no hubo diferencias estadísticas significativas (prueba t de Student; $p > 0,05$). Los valores están expresados como medias \pm desviación estándar ($n = 3$).	23
<i>Figura 6.</i>	Actividad de la GST en hígado de cerdos proveniente de sistemas de producción que incluye o no antimicrobianos en el alimento. Letras diferentes sobre las barras indica que hubo diferencias estadísticas significativas (prueba t de Student; $p < 0,05$). Los valores están expresados como medias \pm desviación estándar ($n = 3$).....	24
<i>Figura 7.</i>	Actividad de la GST en hígado de cuyes proveniente de sistemas de producción que incluye o no antimicrobianos en el alimento. Letras diferentes sobre las barras indica que hubo diferencias estadísticas significativas (prueba t de Student; $p < 0,05$). Los valores están expresados como medias \pm desviación estándar ($n = 3$).....	25

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Contenido de proteína total en muestras de hígado de aves, cerdos y cuyes	38
Anexo 2: Actividad de la GST en muestras de hígado de aves, cerdos y cuyes.....	39
Anexo 3: Estadísticos de normalidad de los datos	40
Anexo 4: Resultados de la prueba t-Student.....	41

RESUMEN

Objetivo: Determinar la actividad de la enzima glutatión *S*-transferasa (GST) en hígado de animales provenientes de sistemas de alimentación que incluyen o no antimicrobianos.

Metodología: Se utilizó muestras de hígado provenientes de aves, cerdos y cuyes, tres de cada especie, beneficiados al peso recomendado para consumo humano. Las muestras de hígado fueron homogenizadas y centrifugadas, obteniendo la fracción citosólica para determinar el contenido de proteínas totales y la actividad de la GST. Los ensayos cinéticos consistieron en la lectura del conjugado 2,4-dinitrofenil-*S*-glutatión en espectrofotómetro producto de la reacción del 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, glutatión reducido y extracto citosólico de hígado en un tampón de reacción. **Resultados:** La actividad de la GST fue mayor en cerdos que consumieron alimento con antimicrobianos ($p = 0.04$), mientras que no hubo diferencias significativas para la actividad de la GST en el hígado de aves ($p = 0.17$). Sin embargo, la actividad de la GST fue mayor en cuyes que consumieron alimento sin antimicrobianos ($p = 0.02$). **Conclusiones:** La actividad incrementada de la GST en cerdos sugieren potencial de esta enzima como biomarcador para animales que consumen alimentos con antimicrobianos. La alimentación en cuyes, además del concentrado, incluye forraje verde, un factor que podría influir en la actividad de la GST.

Palabras clave: Biomarcador, GS-DNB, Actividad enzimática.

ABSTRACT

Objective: To determine the activity of the enzyme glutathione *S*-transferase (GST) in the liver of animals from feeding systems that include or not antimicrobials. **Methodology:** The liver samples from poultry, pigs and guinea pigs were used, three of each species, benefited to the recommended weight for human consumption. The liver samples were homogenized and centrifuged, obtaining the cytosolic fraction to determine the total protein content and GST activity. The kinetic assays consisted of reading the conjugate 2,4-dinitrophenyl-*S*-glutathione in a spectrophotometer, product of the reaction of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, reduced glutathione and cytosolic extract of liver in a buffer of reaction. **Results:** The GST activity was higher in pigs fed antimicrobials feed the probability ($p = 0.04$), while there was no significant difference for GST activity in bird liver ($p = 0.17$). However, GST activity was higher in guinea pigs consuming feed without antimicrobials ($p = 0.02$). **Conclusions:** The increased activity of GST in pigs suggests the potential of this enzyme as a biomarker for animals consuming feed containing antimicrobials. The feed in guinea pigs, in addition to the concentrate, includes green forage, a factor that could influence the activity of the GST.

Keywords: Biomarker, GS-DNB, enzyme activity.

INTRODUCCIÓN

La producción de alimentos de origen animal en un inicio considero que era necesario incluir productos veterinarios para enfrentar los desafíos venideros en sistemas de alta producción intensiva. Dosis bajas y subterapeúticos de antimicrobianos mejora el crecimiento y la eficiencia de conversión alimenticia, previniendo y controlando enfermedades (Niewold, 2007), previene la transmisión de patógenos zoonóticos (Doyle & Erickson, 2006) y mejora el medio ambiente (Kobayashi, 2010). Sin embargo, después que las investigaciones mostraron que el uso de antibióticos conlleva hacia el desarrollo de resistencia microbial, se comenzó a cuestionar, limitar, y prohibir su uso en algunos países como Suecia, con el fin de evitar los efectos adversos del desarrollo de resistencia y la eliminación de residuos de drogas de la carne (Hamid et al., 2019).

La mayoría de los animales, incluidos los humanos, están expuestos diariamente a una gran cantidad de compuestos químicos en el aire, el agua o los alimentos. Algunos de estos compuestos químicos son moléculas de señalización que transportan información valiosa sobre el entorno del animal (p. ej., la presencia de alimentos, depredadores o miembros del sexo opuesto), mientras que otros son tóxicos y deben evitarse o eliminarse (Hahn, 2002). Para esto último, los animales han desarrollado enzimas inducibles y transportadores para facilitar la biotransformación y eliminación de xenobióticos que se encuentran en el ambiente (Uno et al., 2012 & Burkina et al., 2015).

Los componentes enzimáticos inducibles para la eliminación de sustancias tóxicas incluyen las enzimas glutatión *S*- transferasas (GST) por lo que en los últimos años se le ha prestado mucha atención. Los resultados del estudio de Pugazhendhi et al. (2017) indican claramente que GST juega un papel vital en la protección contra xenobióticos incluyendo varios tipos de antibióticos, pero también la enzima parece estar involucrada en la desintoxicación de agentes antimicrobianos. La sensibilidad e inducibilidad de las GST bajo exposición a muchos xenobióticos demuestran el papel vital de las Fases I y II en la biotransformación (Ku et al., 2014), por lo que es utilizada biomarcadores para evaluar la contaminación del medio ambiente (Uno et al., 2012).

La actividad de la GST podría ser utilizado como un biomarcador para productos de origen animal provenientes de sistemas de producción intensiva. Los sistemas de producción

intensiva se caracteriza por utilizar antimicrobianos en la dieta para maximizar la producción animal mientras que un sistema extensivo los animales son criados con una alimentación básica de bajo costo con fines de apoyar la economía familiar. En ambos sistemas, la actividad de la GST podría mostrarse diferente. El objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad hepática de la GST en animales de importancia zootécnica provenientes de producciones que incluyen o no antimicrobianos en el alimento.

CAPITULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

Los antibióticos son compuestos sintéticos orgánicos, químicos o elementos inorgánicos simples, administrados en pequeñas cantidades con la finalidad de mejorar la tasa de crecimiento y conversión alimenticia de los animales, por los que se les denomina promotores de crecimiento. Los antibióticos, como la oxitetraciclina, son ampliamente utilizados en medicina veterinaria y humana (Al-Mohaimed et al., 2021), y su utilización sin las mínimas restricciones haría que su metabolismo en el organismo objetivo sea ineficiente conllevando a la eliminación de mayores cantidades de residuos del producto activo y sus metabolitos al medio ambiente.

Se ha informado que el consumo de antibióticos de la industria agrícola (pecuaria) es aproximadamente el triple que el de los humanos (Van Boeckel et al., 2019), y los altos niveles de antibióticos en el entorno agrícola podrían crear presiones de selección que contribuyen a la aparición y persistencia de genes de resistencia a los antibióticos en bacterias y parásitos (Wellington et al., 2013). Las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos al llevar genes de resistencia a los antibióticos, y estas bacterias pueden transferirse del medio ambiente y los animales a los humanos de varias maneras, lo que representa un riesgo para la salud de los humanos (Martínez, 2008).

En los últimos años, se ha prestado mucha atención al glutatión S- transferasas (GST) debido a su capacidad de biotransformación de los antibióticos. Los resultados del estudio de Pugazhendhi et al. (2017) indican claramente que GST juega un papel vital en la protección contra varios tipos de antibióticos, pero también la enzima parece estar involucrada en la desintoxicación de agentes antimicrobianos. Por lo tanto, la reacción mediada por GST está involucrada en la biotransformación de xenobióticos (Pugazhendhi et al., 2017).

La actividad de la GST podría ser utilizado como un indicador del uso de antimicrobianos. Los sistemas de producción intensiva utilizan antimicrobianos para alcanzar el óptimo productivo, mientras que en un sistema de crianza familiar o traspatio la prioridad no es expresar el máximo potencial del organismo animal. En ambos sistemas, la actividad de la GST podría mostrarse diferente.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿La actividad de la enzima hepática GST es diferente entre los animales de diferentes sistemas de producción?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿La actividad hepática de la enzima GST difiere entre los pollos de engorde de los diferentes sistemas de producción?
- ¿La actividad hepática de la enzima GST difiere entre los cerdos de diferentes sistemas de producción?
- ¿La actividad hepática de la enzima GST difiere entre los cuyes de diferentes sistemas de producción?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Determinar la actividad hepática de la GST en animales de importancia zootécnica de diferentes sistemas de producción.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la actividad hepática de la GST en pollos de engorde de diferentes sistemas de producción.
- Determinar la actividad hepática de la GST en cerdos de diferentes sistemas de producción.
- Determinar la actividad hepática de la GST en cuyes de diferentes sistemas de producción.

1.4. Justificación de la investigación

El excesivo uso de antimicrobianos en la producción animal con la finalidad de disminuir los factores estresantes de la producción intensiva genera presión de selección que contribuye a la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos (Wellington et al., 2013). Según Martínez (2008) estas resistencias pueden generar fallos terapéuticos en tratamientos veterinarios, y al riesgo de transferencia de genes de resistencia a los antibióticos por microorganismos y bacterias resistentes a los antibióticos.

Ding et al. (2022) menciona que la exposición en la granja puede haber afectado la composición microbiana y aumentado la abundancia de genes resistentes a antibióticos en los trabajadores agrícolas. Asimismo, es posible que se haya producido la transmisión de algunos genes resistentes a antibióticos entre el medio ambiente, los animales y los seres humanos a través de la bacteria huésped, lo que podría representar una amenaza potencial para la salud humana.

La actividad de la GST podría ser utilizado como un indicador del uso de antimicrobianos. La determinación de variabilidad de la actividad hepática de la GST según el tipo de sistema de explotación pecuaria, sugeriría su relación con una mayor presencia de xenobióticos, como los antimicrobianos utilizados en la producción animal.

1.5. Delimitación del estudio

La investigación fue realizada utilizando hígado de pollos de engorde, cerdos y cuyes provenientes de sistemas de producción con y sin antimicrobianos en la dieta. Los animales de sistema productivo con antimicrobiano en la dieta provenían de la empresa “Redondos” (Pollos), Redondos Cerdos, mientras que los cuyes provenían de la empresa R & D S.A.C. Los animales de sistema productivo sin antimicrobiano fueron recolectados directamente de criadores de campo para consumo propio, mientras los cerdos fueron obtenidos del “taller de cerdos criollos”, que no utiliza antimicrobianos en la dieta. El estudio tuvo una duración de 90 días, entre la colecta de muestras y realización de los ensayos in vitro.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Zhao et al. (2019) mencionan que el abuso y el uso indebido de los antibióticos en el tratamiento y la prevención de infecciones bacterianas a nivel mundial ha dado lugar a la existencia ubicua de estos medicamentos en ambientes acuáticos, lo que causa una frecuente resistencia a los antimicrobianos y la contaminación en los ecosistemas. Por ello, administrar vía oral tres antibióticos comunes (tetraciclina, eritromicina y norfloxacin) a pepinos de mar *Apostichopus japonicus* durante 45 días, para imitar el uso a largo plazo de antibióticos. Entre sus resultados encontró que la expresión de GST fue rápidamente sobre regulada a los 15 días de la exposición a los antibióticos, disminuyendo bruscamente a los 30 días.

Arivalagan et al. (2017) evaluaron el papel de GST en la resistencia a los antibióticos entre las bacterias aisladas de la cama de aves de corral e identificó el efecto de la GST en la reducción de la actividad antimicrobiana de los antibióticos. La actividad de la GST fue tres a cuatro veces más comparado con el control en presencia de diversos antibióticos para *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Micrococcus* sp. aislados de la cama de aves de corral. El análisis del patrón de isoenzima de GST reveló que la variación en la expresión puede deberse a la resistencia a los antibióticos. Los resultados concluyeron que el GST podría desempeñar un papel importante en la protección contra el efecto tóxico de los agentes antimicrobianos, lo que hace que las bacterias se vuelvan resistentes a los antibióticos.

Los antibióticos del alimento animal que contaminan las aguas residuales usualmente inhiben el crecimiento de microorganismos de tratamientos de aguas residuales. Park (2012) encontró que los efectos inhibitorios de antibióticos sobre las bacterias eran reducidos por microorganismos que contienen enzimas desintoxicantes GST. Las concentraciones iniciales de tetraciclina, sulfatiazol y ampicilina fueron de 100 mg/L, 100 mg/L y 50 mg/L respectivamente, que son típicas del rango detectado en la alimentación de cerdos en Corea. Los resultados muestran que la eficacia de eliminación de la tetraciclina es casi del 70% con *Staphylococcus epidermidis* en el biorreactor, sugiriendo que este método de eliminación de antibióticos es digno de estudio adicional.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Glutación S-Transferasa (GST)

Las GST son una familia de enzimas principalmente solubles, multifuncionales y dimericos (Van der Oost et al., 2003). Además de sus funciones esenciales en el transporte intracelular (heme, bilirrubina y ácidos biliares) y la biosíntesis de leucotrienos y prostaglandinas, un papel crítico de las GST es la detoxificación celular (Glisic et al., 2015).

La presencia de dos sitios activos por dímero, con actividades independientes una de la otra, ayudan en el cumplimiento de la función detoxificante de la GST. Cada sitio activo consiste en un mínimo de dos regiones de unión, uno muy específico para la GSH, y otro sitio de conexión con menor especificidad para los electrófilos (Danielson & Mannervik, 1985). La reacción antioxidante dominante conjuga el tripéptido GSH (γ -glutamil-cisteinil-glicina) con un co-sustrato hidrofóbico que posee un centro electrofílico (Oakley, 2011). Para ello, la activación del átomo de azufre de la GSH al anión tiolato (GS⁻, un nucleófilo fuerte que ataca sustratos electrofílicos como carbono, nitrógeno o azufre) es necesaria, aunque los detalles del mecanismo de activación varían entre enzimas de diferentes subfamilias (Wu & Dong, 2012). Este tipo de reacción normalmente resulta en la reducción de la reactividad del compuesto y en el aumento de su solubilidad en agua como un prerrequisito principal para la subsiguiente eliminación a través de los transportadores de eflujo (Malik et al., 2016).

La evidencia que la actividad de la GST es críticamente importante en sistemas biológicos está en que evolucionaron a través de vías convergentes en al menos cuatro familias de enzimas estructuralmente distintas (las GST citosólicas, las GST mitocondriales de la clase Kappa, las enzimas MAPEG, las proteínas de resistencia a la fosfomicina) (Atkinson y Babbitt, 2009, Robinson et al., 2004, Ladner et al., 2004). Las GST citosólicas son la familia más extensamente estudiada y ocurre en todas las formas de vida celular. Las GST citosólicas de mamíferos se caracterizaron en la investigación biomédica, debido al papel desempeñado por muchos miembros de la familia en metabolismo de drogas y xenobióticos (contaminantes) (Board & Menon, 2013).

2.2.2. Metabolismo de xenobióticos por GST

Los seres vivos están continuamente expuestos a compuestos químicos naturales y/o no naturales extraños para ellos (Huber & Almeida, 2008). Estos compuestos se denominan xenobióticos y pueden actuar de manera perjudicial al organismo.

La detoxificación enzimática de xenobióticos puede clasificarse en tres fases distintas, pero estrictamente relacionadas: fase I, II y III (Figura 1). En las fases I y II, generalmente se observa la transformación del xenobiótico en una especie que presenta mayor solubilidad en agua, además de una menor toxicidad. En la fase III, estos metabolitos se transportan al exterior de la célula y luego excretada. De hecho, la fase II del metabolismo de xenobióticos comprende un importante paso para la eliminación de estas especies del medio celular, pudiendo en algunos casos involucrar la participación de transportadores.

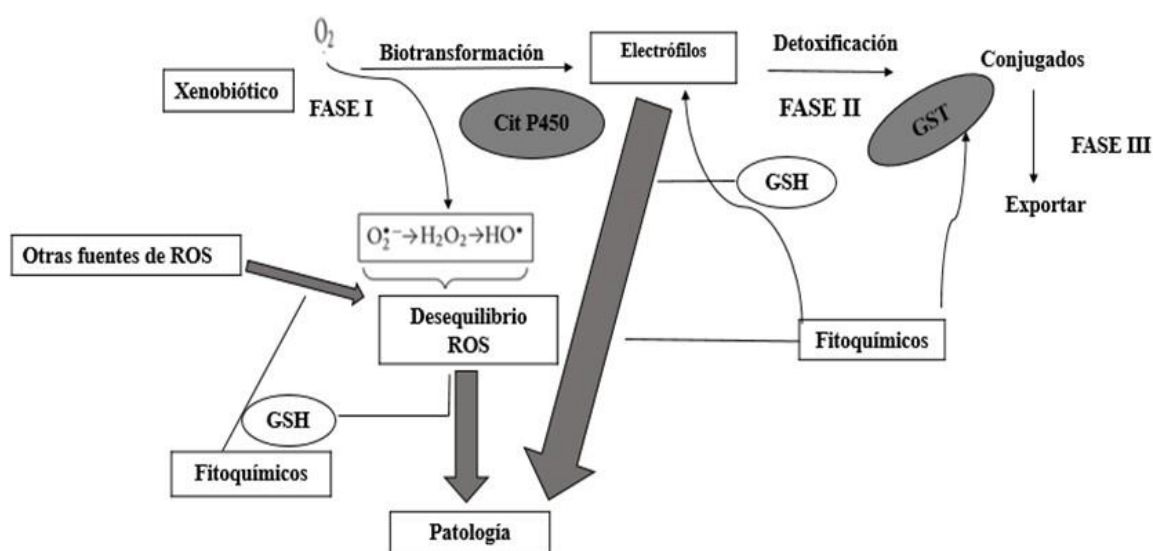


Figura 1. Participación del glutatión en la desintoxicación de xenobióticos y especies reactivas de oxígeno, su relación con el desarrollo patológico y el papel potencial de diferentes fotoquímicos (Lushchak et al 2012).

La mayoría de los procesos de la fase I son mediados por enzimas citocromo P450 que son responsables, principalmente por reacciones de oxidación de los xenobióticos (Guengerich et al., 1990). Las enzimas de la fase II catalizan la conjugación de los xenobióticos (o de sus metabolitos de la fase I) con sustratos endógenos (generalmente

glutación, ácido glucurónico y glicina) haciéndolos más solubles en agua. Cuantitativamente la formación de conjugados con el glutatión es la principal reacción observada para muchos xenobióticos durante la fase II (Sheehan et al., 2001).

De hecho, los niveles celulares (en condiciones normales) de glutatión reducida (GSH) son altamente elevados (~ 10mM), indicando que el mecanismo de detoxificación a través del glutatión puede representar una adaptación biológica fundamental para la supervivencia y la garantía de la perpetuación de muchas especies (Dringen et al., 2000). Las enzimas de biotransformación de xenobióticos de la fase I y II se distribuyen principalmente en el hígado, aunque también incluyen órganos como el intestino, los riñones (Matsuo et al., 2008). Por ello, el hígado es un órgano altamente recomendado en el estudio de indicadores medioambientales (Gül et al., 2004, Cárcamo et al., 2017).

El conjugado de glutatión/xenobióticos formados por acción de la GST son reconocidos por transportadores específicos y conducidos hacia el medio intercelular (Fig. 2). En el medio intercelular, los conjugados del glutatión / xenobióticos se dividen por acción de enzimas γ -glutamil transpeptidasa y di peptidasas presentes en la porción externa de la membrana celular (Suzuki et al., 2001). La primera etapa de eliminación de los conjugados del glutatión implica la remoción de un residuo de ácido glutámico por la γ -glutamil transpeptidasa (γ GT). En una etapa posterior ocurre la clivación de un residuo de glicina por di peptidasas, restando sólo el residuo de la cisteína ligada al xenobiótico. El glutamato y la glicina libres pueden ser reabsorbidos por la célula y utilizados en la síntesis de glutatión (GSH). El grupo amino del residuo de cisteína presente en la conjugada cisteína / xenobiótico es acetilado por la acción de N-acetiltransferasa intracelular para formar el correspondiente ácido mercaptúrico, que se conduce a la circulación de la bilis (Hinchman et al., 1991). Dependiendo de las características de la porción derivada del xenobiótico (X), el correspondiente ácido mercaptúrico podrá ser directamente excretado en la orina, o pasar por metabolización para ser eliminado (Boyland et al., 1969).

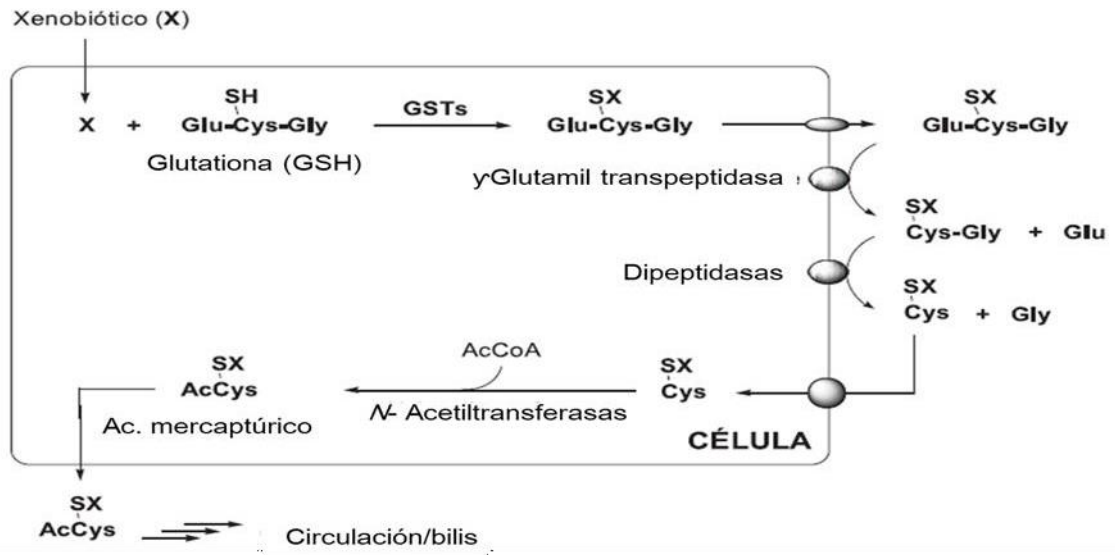


Figura 2. Detoxificación de xenobióticos vía ácidos mercaptúricos (Huber & Almeida, 2008).

En la figura 3 se muestra algunos ejemplos de conjugación por acción de la GST, donde se observa como: el antineoplásico bulsufan se conjuga con el glutatión (GSH) y forma el catión sulfonio, el principal mecanismo de detoxificación celular (Fig. 2A). Compuestos aromáticos derivados del naftaleno (Fig. 2B), altamente tóxicos, carcinogénicos y se encuentran en el ambiente producto de la combustión de la gasolina, son metabolizados a óxidos de árenos que al ser interceptados por las GST forman los alcoholes isoméricos (Buckpitt et al., 1987). La morfina, alcaloide utilizado como anestésico y analgésico, tiene dos posibles caminos de oxidación durante el inicio de su metabolización, ambos llevando a la formación de especies altamente susceptibles a la adición conjugada del glutatión (GSH) (Fig. 2C). Uno de los caminos implica la participación de la morfina 6-deshidrogenasa (M6D) en la etapa de oxidación, llevando a la formación de la morfinona (Todaka et al., 2005). La conjugación con GSH por acción de la GST forma conjugados que son excretados del medio celular (Ishida et al., 1989).

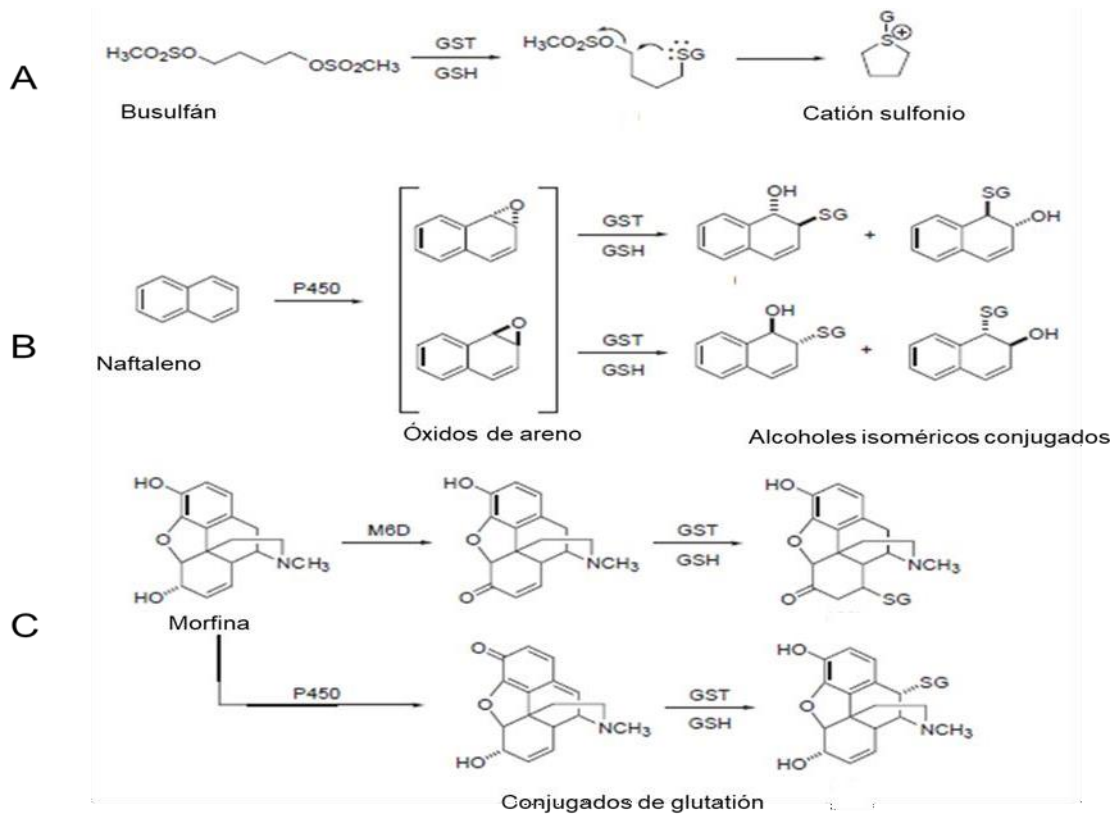


Figura 3. Ejemplos de la actuación de GST en detoxificación celular de xenobióticos (Huberet al., 2008).

Después del descubrimiento del ácido mercaptúrico, GSH y enzimas necesarias para formar este conjugado, se desarrollieron modelos para estudiar la actividad enzimática de GST (Hodgson, 2004). El más conocido de estos modelos de estudio es el ensayo enzimático utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB), un sustrato relativamente bueno para interactuar con varias isoformas de GST (Habig & Jakoby, 1981) y estimar actividades basales de GST (Ensibi et al., 2013). Bajo este enfoque, la interacción de antibióticos, quimioterápicos y/o sus metabolitos con las GST, pueden ser evaluadas a través de ensayos in vitro utilizando CDNB como sustrato. En base a este enfoque, las GST conjugarían GSH con CDNB produciendo conjugados GS-DNB (Fig. 4).

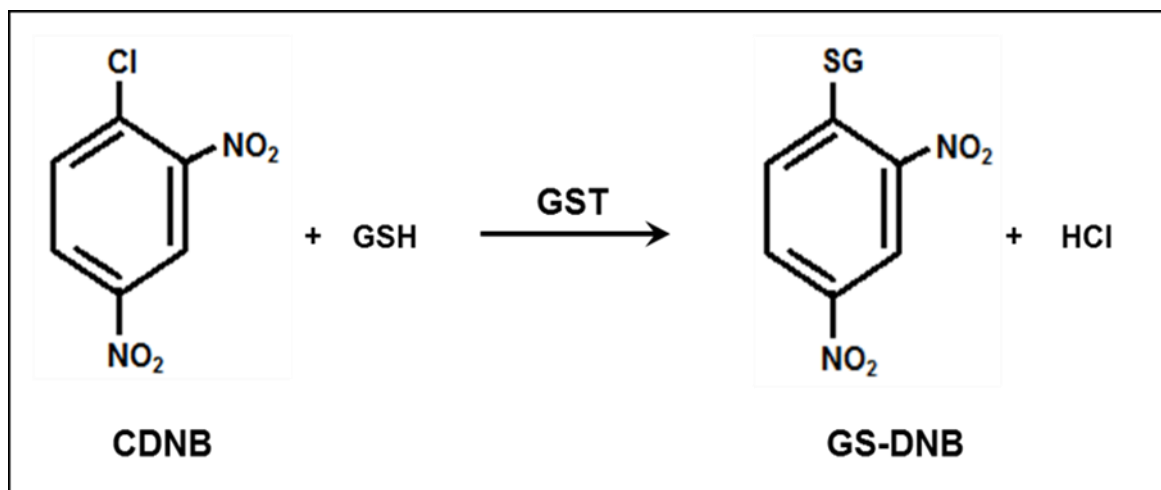


Figura 4. Formación del conjugado GS-DNB. Detoxificación del CDNB a través de la GST formando 2,4-dinitrofenil-S-glutati6n (GS-DNB). Adaptado de Hayes & Pulford, 1995.

2.2.3. Antibióticos o antimicrobianos

Los antibióticos son extraídos de estructuras orgánicas vivientes o seres vivos, como bacterias, hongos o alga; mientras que en termino antimicrobiano se refiere a derivados de sustancias químicas sintetizadas en condiciones de laboratorio (Bacanli & Basaran, 2019). Los antibióticos son sustancias que pueden matar o inhibir el crecimiento de varios microorganismos (Bacanli & Basaran, 2019). El efecto promotor de crecimiento de los antibióticos se descubrió en la década de 1940, cuando se observó que los animales alimentados con micelios secos de *Streptomyces aureofaciens* que contenían residuos de clortetraciclina mejoraron su crecimiento (Castanon, 2007).

A principios de 1900, el químico alemán Paul Ehrlich desarrollo medicamentos para tratar enfermedades infecciosas, y acuñó el término quimioterapia para el uso de químicos en el tratamiento contra enfermedades (DeVita & Chu, 2008), y fue la primera persona en documentar la efectividad de los modelos animales para analizar una serie de productos químicos para su actividad potencial contra las enfermedades (DeVita y Chu, 2008).

Los antibióticos y quimioterapéuticos (antimicrobianos) representan un grupo de compuestos con estructuras químicas heterogéneas y propiedades físico-químicas diferentes que tienen como único punto en común la capacidad antibacteriana, resultando en una alteración selectiva de la población microbiana del intestino y en el estímulo del crecimiento de las bacterias benéficas. Además de esto, puede haber dos tipos de acción directa de los

antimicrobianos sobre las bacterias y hongos sensibles: la muerte del agente (efecto bactericida) y un detenimiento en el crecimiento y reproducción (efecto bacteriostático).

Esos efectos pueden ser por interferencia en la síntesis de la pared celular, alteraciones en la permeabilidad de membrana citoplasmática, interferencias en la replicación cromosómica y en la síntesis proteica celular. De manera general, los efectos de estos aditivos pueden ser agrupados en 3 categorías (Lima,1999):

- Efecto metabólico: mejora en el desempeño a través del efecto directo sobre el metabolismo del animal.
- Efecto Nutricional: altera la población microbiana y reduce el espesor de la pared intestinal promoviendo una mayor disponibilidad de nutrientes, traducido en una economía de energía y nutrientes para el mantenimiento de los tejidos corporales.
- Control de enfermedades: inhibición de bacterias intestinales responsables de enfermedades subclínicas, permitiendo expresar el máximo potencial genético del animal.

2.2.4. Resistencia bacteriana

En los últimos años, la resistencia a los antibióticos y quimioterápicos se ha convertido en una de las áreas prioritarias de las autoridades de legislación (Bacanli y Basaran, 2019). La utilización de antibióticos para la profilaxis, la meta-profilaxis, el tratamiento de infecciones y como promotor del crecimiento para mejorar la eficiencia de la alimentación en animales sanos transformó la industria ganadera (Sarmah et al., 2006).

El uso excesivo y el mal uso de los antibióticos estimuló la aparición más rápida de bacterias resistentes a los antibióticos y genes resistentes a los antibióticos, reduciendo su potencial terapéutico contra los patógenos humanos y animales (Ding et al., 2022). Los antibióticos y genes de resistencia a antibióticos están ampliamente distribuidos en agua

superficiales, efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, suelos y desechos animales (Qiao et al., 2018).

Los efectos positivos alcanzados por el uso de antimicrobianos en la alimentación animal fueron defendidos durante muchos años, pero microbiólogos y expertos en enfermedades infecciosas, cuestionaban esta práctica, descubriendo bacterias y flora intestinal de personas y animales de granja más resistentes a antimicrobianos que al de aquellos que no lo utilizaban (Gorbach, 2001).

Levy et al. (1976) al realizar un estudio in vivo / in situ para evaluar el efecto de la introducción de oxitetraciclina a bajas dosis como agente antimicrobiano en el alimento reportan colonización de la flora intestinal de pollos y personas de la granja con cepas de *Escherichia coli* resistentes a la tetraciclina y otros medicamentos. Hershberger et al. (2005) al evaluar la epidemiología de la resistencia antimicrobiana en enterococos de granjas de animales y su posible relación de resistencia al uso de antimicrobianos, reportaron tasas de resistencia a quinupristina/dalfopristina, gentamicina y ciprofloxacina para *E. faecium* de 2, 0 y 55 % en ganado de carne, 8, 7 y 47% en bovinos lecheros, 21, 1 y 47 en cerdos, 85, 12 y 23 en pollo, y 52, 13 y 24% en pavos, respectivamente. Asimismo, encontraron tasas de resistencia a gentamicina para *E. faecalis* de del 0% en ganado de carne, 24% en ganado lechero, 37% en cerdos, 32% en pollos y 29% en pavos.

Actualmente, los antimicrobianos se agregan al alimento en concentraciones entre 2.5 y 125 mg / kg de alimento para mejorar el crecimiento durante un período indefinido (semanas a meses), dependiendo del tipo y tamaño del animal y el tipo de antibiótico (Marshall and Levy, 2011). Por lo tanto, el uso no terapéutico de los antibióticos podría desempeñar un papel primordial en la evolución y diseminación de la resistencia múltiple a los antibióticos que el uso terapéutico, ya que generalmente involucra la exposición continua largo plazo en un gran número de animales (McEwen & Fedorka-Cray, 2002).

Según Habboush & Guzman (2021), el mecanismo de resistencia a los antibióticos se clasifica comúnmente en los siguientes cuatro grupos:

Resistencia intrínseca: las bacterias pueden sobrevivir a un antibiótico debido a la resistencia intrínseca a través de la evolución al cambiar su estructura o componentes. Por ejemplo, un antibiótico que afecta el mecanismo de construcción de la pared de las bacterias,

como la penicilina, no puede afectar a las bacterias que no tienen pared celular.

Resistencia adquirida: Capacidad de los microorganismos para resistir la actividad de un agente antimicrobiano en particular al que previamente eran susceptibles las bacterias pueden adquirir resistencia a través de una nueva mutación genética que ayuda a la bacteria a sobrevivir o al obtener ADN de una bacteria que ya es resistente. Un ejemplo es la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a la rifampicina.

Cambio genético: el ADN bacteriano puede cambiar y alterar la producción de proteínas, lo que lleva a diferentes componentes y receptores bacterianos que hacen que las bacterias no sean reconocidas por el antibiótico. Un ejemplo es la resistencia de *Escherichia coli* y *Haemophilus influenza* a la trimetoprima.

Transferencia de ADN: Las bacterias pueden compartir componentes genéticos con otras bacterias y transferir el ADN resistente a través de una transferencia horizontal de genes. Por lo general, las bacterias adquieren material genético externo a través de tres etapas principales: 1) transformación (a través de la incorporación de ADN desnudo), 2) transducción (a través del proceso de fagocitosis) y 3) conjugación (por contacto directo).

2.3. Definición de términos básicos

Actividad catalítica: Velocidad de la reacción química producida por la presencia de una sustancia que es consumida en la reacción química

Alícuotas: La alícuota parte proporcional que se toma de un volumen o de una masa inicial, para ser usada en una prueba de laboratorio, sus propiedades físicas y químicas, así como su composición, representan la sustancia original.

Biomarcador: Sustancia con propiedades biofísicas que pueden medirse en muestras biológicas así como también si está expuesto a un producto médico o a un agente ambiental dando indicadores de su estado biológico.

Biotransformación: Proceso por el cual las sustancias que ingresan al cuerpo cambian de moléculas hidrofóbicas a hidrofílicas para facilitar la eliminación del cuerpo.

Detoxificación celular: Es un proceso que se lleva a cabo principalmente en las células del hígado y que consiste en la inactivación de productos tóxicos como drogas, medicamentos o los propios productos del metabolismo celular, por ser liposolubles (hepatocitos).

Dímero: Se refiere a la molécula que tiene la misma composición química y peso doble que otra, sin ninguna relación entre sí.

Electrófilos: Un reactivo químico que es atraído por un área específica con grandes cantidades o electrodos abundantes.

Ensayos in vitro: Se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

Factores de transcripción: Es cualquier proteína necesaria para iniciar el proceso de transcripción.

Inhibidor: Sustancia capaz de disminuir la actividad catalítica de una enzima. Compuesto que tiene por efecto frenar o impedir algunas reacciones químicas, como la oxidación, la corrosión, la polimerización, etc.

Leucotrienos: Los leucotrienos (LT) son ácidos grasos derivados del metabolismo oxidativo del ácido araquidónico por la vía de la 5-lipooxigenasa. Deben su nombre al hecho de que originalmente fueron aisladas a finales de los 70 a partir de los leucocitos, conteniendo 3 enlace dobles en su estructura hidrocarbonada.

Mutágenos: Son las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea, pueden producir alteraciones genéticas hereditarias o aumentar su frecuencia.

Neurotoxinas: Son los compuestos que interfieren en el normal funcionamiento del sistema nervioso. Muchas de estas sustancias se encuentran en la naturaleza, siendo sintetizadas por los diferentes organismos como defensa ante posibles ataques.

Nucleófilo: Los nucleófilos son bases de Lewis que atacan a un carbono desplazando al grupo saliente.

Patógenos: Todo agente biológico externo que se aloja en un ente biológico determinado, dañando de alguna manera su anatomía, a partir de enfermedades o daños visibles o no.

Prostaglandinas: Las prostaglandinas o PG son compuestos lipídicos derivados de ácidos grasos y similares a las hormonas.

Síntesis proteica: Es el proceso por el cual se componen nuevas proteínas a partir de los veinte aminoácidos esenciales. En este proceso, se transcribe el ADN en ARN.

Tampón químico: Las soluciones tampón, denominadas también soluciones buffer, son aquellas que ante la adición de un ácido o base son capaces de reaccionar oponiendo la parte de componente básica o acida para mantener fijo el pH.

Transcripción: Consiste en hacer una copia complementaria de un trozo de ADN.

Aducto: La palabra aducto se origina por la contracción de las palabras adición y producto, y se refiere a una entidad química que se produce por la unión de dos moléculas mediante un enlace covalente.

Antibiótico: Término que originalmente solo describía aquellas formulaciones derivadas de microorganismos vivos, pero ahora también se aplica a los antimicrobianos sintéticos, como las sulfonamidas o fluoroquinolonas agente antimicrobiano: Agente que mata microorganismos o detiene su crecimiento.

2.4. Hipótesis de la investigación

2.4.1. Hipótesis general

Ho: La actividad de la enzima GST no es diferente entre los animales de diferentes sistemas de producción.

Ha: La actividad de la enzima GST si es diferente entre los animales de diferentes sistemas de producción.

2.4.2. Hipótesis específicas

Ho1: La actividad de la enzima GST no difiere entre los pollos de engorde de diferentes sistemas de producción.

Ha1: La actividad de la enzima GST si difiere entre los pollos de engorde de diferentes sistemas de producción.

Ho2: La actividad de la enzima GST no difiere entre los cerdos de diferentes sistemas de producción.

Ha2: La actividad de la enzima GST si difiere entre los cerdos de diferentes sistemas de producción.

Ho3: La actividad de la enzima GST no difiere entre los cuyes de diferentes sistemas de producción.

Ha3: La actividad de la enzima GST si difiere entre los cuyes de diferentes sistemas de producción.

CAPITULO III: METODOLOGIA

3.1. Diseño metodológico

3.1.1. Ubicación

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Procesos e Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Agraria, Industrias Alimentarias y Ambiental, ubicado en el distrito de Huacho, Provincia de Huaura, Región Lima – Provincias.

3.1.2. Materiales e insumos

Los materiales utilizados fueron:

- Ultrafreezer de capacidad de congelamiento de -80°C
- Espectrofotómetro Lambda 1050 + UV/VIS/NIR (PerkinELmer)
- Centrifuga (HERMLE)
- Vortex
- Kit de Pipetas
- Beaker Glass
- Balanza Analítica de Precisión (Pioner-OHAUS)
- Fiola
- Cubetas de cuarzo (ISOLAB - CUVETTES)
- Tubo de microcentrífuga
- Medidor de pH portátil (HANNA).
- Horno Esterilizador Secado (KerLab)
- Los reactivos utilizados fueron:
- Agua destilada
- Tampón de homogeneización del hígado que contenía Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6.
- Tampón de reacción: fosfato de potasio 0.1 M pH 7.0
- 1-cloro-2,4-di-nitrobenceno (CDNB) 100 mM en etanol
- Glutaciona reducida (GSH) 100 mM en tampón fosfato de potasio 0.1 M pH7.0
- Kit comercial de proteínas totales (QCA- Química Clínica Aplicada S.A)

3.1.3. Diseño de investigación

El diseño de investigación fue no experimental cuantitativo debido a que no se manipuló variables y solo se cuantificó la actividad enzimática tal como ocurre en la especie de estudio en su medio productivo. Además, fue un diseño de investigación transeccional descriptivo debido a que se recolectó datos en un solo momento con la finalidad de analizar su incidencia e interrelación (Hernández et al., 2014).

3.1.4. Variables analizadas

La variable independiente estuvo representada por el sistema de alimentación que utiliza o no antimicrobianos. La variable dependiente analizada fue la actividad de la enzima GST en el hígado.

3.1.5. Muestra

Se utilizó muestras de hígado provenientes de pollos de engorde, cerdos y cuyes de pesocomercial provenientes de sistemas de alimentación que incluyen o no antimicrobianos en la dieta. Las muestras de hígado provenían de animales de 36 días de edad para las aves ($n = 3$), 20 semanas de edad aproximada para la de los cerdos ($n = 3$) y 10 semanas de edad aproximada para los cuyes ($n = 3$).

3.2. Técnicas de recolección de datos

Las aves y cuyes fueron sacrificados por dislocamiento cervical a excepción del cerdo, que sus muestras de hígado provenientes de sistemas de alimentación que incluyen antimicrobianos fueron adquiridas del camal de cerdos de Redondos. El hígado de cerdos provenientes de sistemas de alimentación que no utilizan antimicrobianos fue adquirido del “Taller de Cerdos Criollos” perteneciente a la escuela Ing. Zootécnica de la UNJFSC durante las faenas de sacrificio programados por la mencionada Escuela. Los productos cárnicos fueron comercializados. La técnica de recolección de datos tuvo los siguientes pasos:

Procedimientos de la técnica de recolección de datos.

Primer paso: Luego del sacrificio de los animales, se recolectó las muestras de hígado que fueron almacenados en Ultrafreezer a -80°C para los análisis posteriores.

Segundo paso: El hígado de aves, cerdos y cuyes fueron homogenizados (1:4 p/v) en solución tampón conteniendo TRIS HCl 50 mM, EDTA 1 mM, con pH ajustado en 7.6, que fue preparado previamente.

Tercer paso: En seguida, las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 20000xg por 20 min a 4°C. El sobrenadante resultante o fracción citosólica fue separado en alícuotas y almacenado a -80°C para el posterior cálculo de proteínas y actividad GST.

Cuarto paso: Para determinar la proteína total se utilizó el método Bradford con las muestras de hígado, se procedió de la siguiente manera. En una cubeta para espectrofotómetro se realizó el ensayo que contenía agua destilada (0.02 ml) y reactivo biuret (1 ml), que sirvió para ajustar el instrumento para leer cero de absorbancia. Luego se realizó el ensayo estándar, donde se colocó 0.02 ml de reactivo estándar y 1 ml de reactivo biuret. El contenido de la cubeta fue mezclado al invertir la cubeta 5 veces e incubado 37°C durante 10 minutos. Seguidamente, se procedió a la lectura de absorbancias en 545 nm, marcando el cero con el ensayo blanco. La absorbancia del estándar fue utilizada para estimar el factor de calibración, con la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de calibración} = 4 \text{ g/dl} / \text{absorbancia del estándar}$$

La proteína total fue determinada con la fórmula siguiente:

$$\text{Proteínas totales} = \text{Absorbancia de la muestra} \times \text{factor de calibración} \times \text{cantidad de muestra}$$

Quinto: Los ensayos de cinéticos (absorbancia) fueron realizados basados en lo descrito por Habig & Jakoby, (1981). El ensayo enzimático consistió en la adición de 975 µL de tampón de reacción 0.1M (30°C), 10 µL de CDNB 0.12M, 10 µL de GSH 0.1M y 5 µL de muestra citosólica en una cubeta de cuarzo de 1mL. Cada ensayo fue realizado en triplicado. Inmediatamente, el contenido de la cubeta fue homogenizado por inversión 5 veces y la lectura de absorbancia realizada en espectrofotómetro a una longitud de onda de 340nm durante 3 minutos. El conjugado GS-DNB presenta una fuerte absorción a 340nm con un coeficiente de extinción molar (ϵ) = 9600 M⁻¹ cm⁻¹; y su absorción en el espectrofotómetro fue directamente proporcional a la actividad de la muestra (Habig & Jakoby, 1981).

Sexto paso: La actividad enzimática fue calculada con la siguiente ecuación (Monserrat et al.,2006). La actividad enzimática: $(\Delta \text{ABS (media)} * \text{dilución de la muestra}) / (9.6 * \text{volumen de la muestra (mL)} * \text{concentración proteica de la muestra (mg/mL)})$.

3.3. Técnicas para el procesamiento de la información

Los datos recolectados fueron procesados utilizando la hoja de cálculo de Microsoft Excel. Los datos se ajustaban a la distribución normal por lo que se aplicó la prueba t de Student. Se utilizó el programa estadístico R para evaluar la distribución normal y revisar la prueba t de student elaborandose asi los gráficos y el análisis estadístico.

CAPITULO IV: RESULTADOS

La figura 5 muestra la actividad de la enzima GST en el hígado de pollos de engorde provenientes de sistema de producción que utilizan o no antimicrobianos en el alimento. En el presente estudio, la actividad de la enzima GST no mostró diferencias estadísticas significativas ($p = 0.1746$) en el hígado de pollos de engorde provenientes de diferentes sistemas de producción.

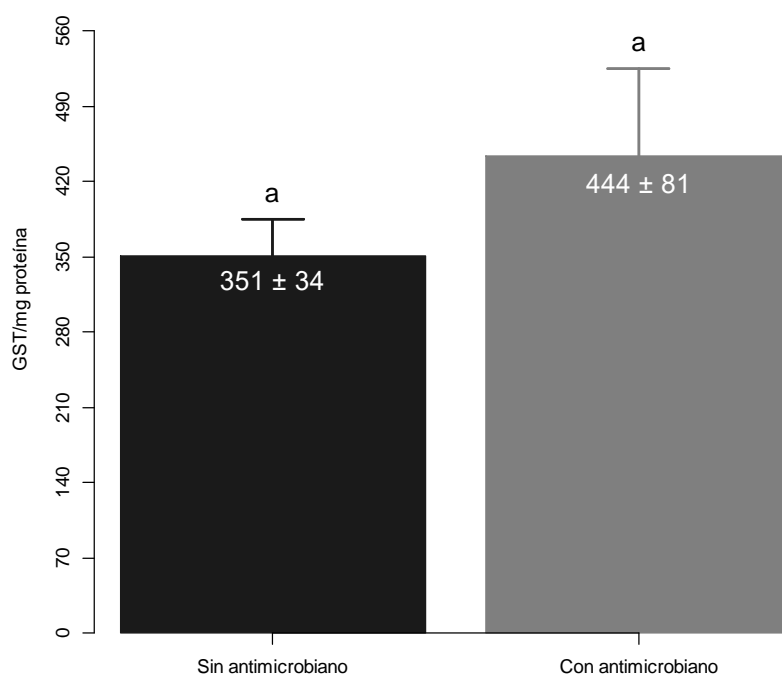


Figura 5. Actividad de la GST en hígado proveniente de pollos de engorde de sistemas de producción que incluye o no antimicrobianos en el alimento. Letras iguales sobre las barras indica que no hubo diferencias estadísticas significativas (prueba t de Student; $p > 0,05$). Los valores están expresados como medias \pm desviación estándar ($n = 3$).

La figura 6 muestra la actividad de la enzima GST en el hígado de cerdos provenientes de sistemas de producción que utilizan o no antimicrobianos en el alimento. La actividad de la GST se mostró estadísticamente superior ($p = 0.044$) en el hígado de cerdos que provenían de sistemas de producción que utilizan antimicrobianos en el alimento.

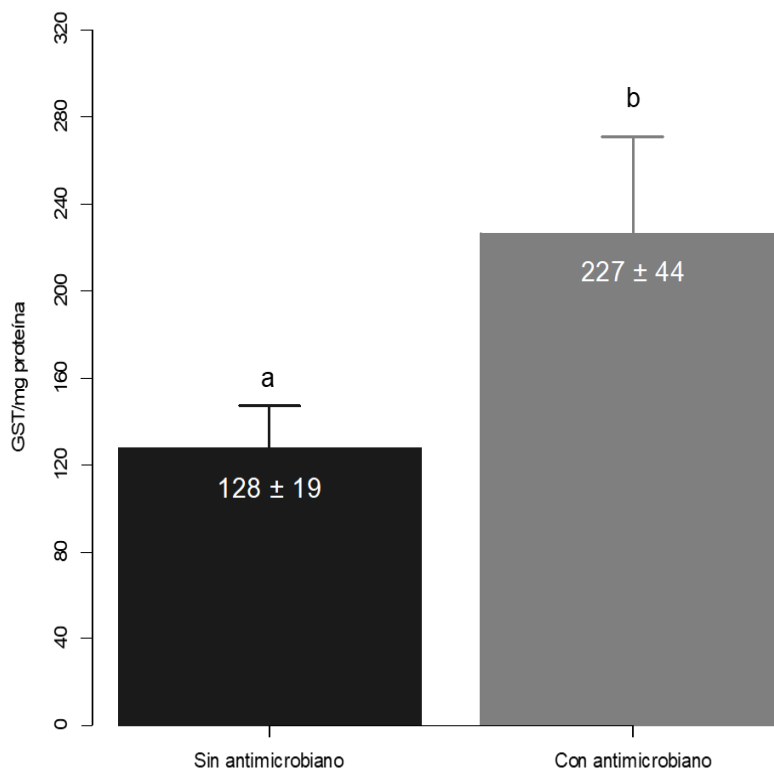


Figura 6. Actividad de la GST en hígado de cerdos proveniente de sistemas de producción que incluye o no antimicrobianos en el alimento. Letras diferentes sobre las barras indica que hubo diferencias estadísticas significativas (prueba t de Student; $p < 0,05$). Los valores están expresados como medias \pm desviación estándar ($n = 3$).

La figura 7 muestra la actividad de la enzima GST en el hígado de cuyes provenientes de sistemas de de producción que utilizan o no antimicrobianos en el alimento. La actividad de la enzima GST de cuyes provenientes de sistemas de crianza que no utilizan antimicrobianos en el alimento fue estadísticamente superior ($p = 0.016$) comparado con la de cuyes proveniente de un sistema que incluye antimicrobiano en el alimento.

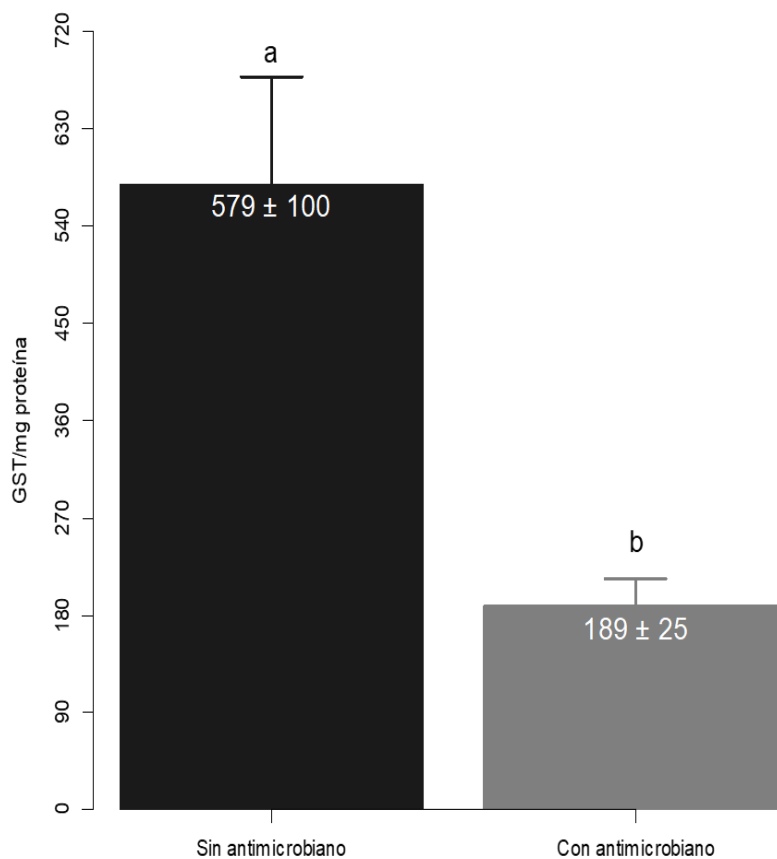


Figura 7. Actividad de la GST en hígado de cuyes proveniente de sistemas de producción que incluye o no antimicrobianos en el alimento. Letras diferentes sobre las barras indica que hubo diferencias estadísticas significativas (prueba t de Student; $p < 0,05$). Los valores están expresados como medias \pm desviación estándar ($n = 3$).

CAPITULO V: DISCUSIÓN

En el presente estudio, los resultados observados en las aves y cerdos provenientes de sistemas de producción que utilizan antimicrobianos en la dieta sugieren que la síntesis de la GST y su actividad estaría siendo inducida. Los sistemas de producción intensiva basan su productividad en el uso de promotores de crecimiento como los antimicrobianos. Los antimicrobianos de la dieta estarían activando receptores nucleares que aumentan la síntesis de la GST, aumentando la conjugación del antimicrobiano con GSH con la finalidad de eliminarla del organismo vía urinaria. La mosca blanca *Bemisia tabaci* desarrolló un alto nivel de resistencia al tiametoxam (un insecticida neonicotinoide de segunda generación) utilizado ampliamente para controlar esta plaga. Los resultados mostraron que la expresión de un conjunto de enzimas de desintoxicación, como glutatión *S*-transferasas (GST), citocromo P450, UDP- glucuronosiltransferasa y varios transportadores ABC se elevaron sustancialmente en los estratos resistentes a tiametoxam (Yang et al., 2019). Falkner et al. (1993) al estudiar los efectos de la exposición aguda al arsenito (compuesto químico utilizado como pesticida, conservante del cuero, antiséptico, tinturas, jabones y fungicida) sobre las enzimas monooxigenasa P-450 (CYP) de cuyes observaron aumento en la actividad de la GST solo en el riñón, pero no en el hígado o pulmón. Estos autores mencionan que es improbable que los aumentos en las actividades enzimáticas impliquen una interacción directa con el receptor nuclear Ah, pero podrían estar relacionados con cambios en la expresión de HSP 90 u otro HSP que podrían afectar la expresión o actividad de CYP o GST a nivel transcripcional, nivel tradicional y/o postraducciona.

La presencia continua de xenobióticos dentro del organismo animal, induce a una mayor expresión génica (Ku et al., 2014) y síntesis de enzimas biotransformadoras como la GST para eliminarlas del organismo (Arivalagan et al., 2017). El hígado es el principal órgano desintoxicante (Zaefarian et al., 2019), y a nivel del núcleo celular, existen receptores que señalizan o dirigen la transcripción genética de proteínas necesarias (Whitlock, 1999). La interacción de xenobióticos, como los antimicrobianos, y enzimas GST puede evaluarse mediante pruebas in vitro utilizando CDNB. Basado en este enfoque, GST combinaría GSH con CDNB produciendo conjugados GS-DNB. La variación en estas detecciones sería indicativa de las variaciones la actividad de la enzima GST. Los componentes enzimáticos inducibles para la eliminación de xenobióticos del organismo animal incluyen CYP, GST y glucuronosil transferasas. El componente sensorial de este sistema consiste en receptores que regulan la expresión de genes de biotransformación en respuesta a la presencia frecuente

de xenobióticos.

En los cuyes, sin embargo, los resultados fueron contradictorios. Se esperaba encontrar mayor actividad de la GST en el hígado de cuyes provenientes de sistemas de producción intensivos que utilizan antimicrobianos en la dieta del concentrado, sin embargo, la actividad fue mayor en cuyes de sistema de producción que no utilizan antimicrobianos. Podrían ser muchos los factores que explicarían estas diferencias, pudiéndose sugerir al forraje verde como uno de los mayores factores de variabilidad (por ejemplo, residuos de pesticidas y sus metabolitos en el forraje). Mihaljević et al. (2020) al estudiar la interacción de GST de pez cebra con compuestos organoestánicos en concentraciones relevantes en el medio ambiente, encontraron que este contaminante actuaba como un inhibidor competitivo. Es decir, conforme se incrementa los niveles de compuestos organoestánicos en el medio ambiente, la actividad de desintoxicación de la GST disminuye.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Bajo las condiciones en las que se realizó el presente estudio se concluye:

- La actividad de la GST en el hígado de pollos de engorde no fue influenciada por la procedencia del sistema productivo.
- La actividad de la GST fue mayor en el hígado de cerdos provenientes del sistema productivo que utilizan antimicrobianos en el alimento.
- La actividad de la GST fue menor en el hígado de cuyes proveniente del sistema productivo que no utilizan antimicrobianos en el concentrado.

6.2. Recomendaciones

De acuerdo a las conclusiones del presente estudio se recomienda:

- Los resultados observados en cerdos provenientes de sistema productivos que utilizan o no antimicrobianos en el alimento, muestran potencial de la GST como un buen indicador biológico para cerdos provenientes de sistemas productivos intensivos.
- Realizar estudios con órganos provenientes de animales criados bajo condiciones de laboratorio, con exposición o no de antimicrobianos en la dieta.

CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Al-Mohaimed, A. M., Abbasi, A. M., Ali, M. A., & Dhas, D. (2021). Reduction of multiple antibiotics from the waste water using coated glutathione S-transferase producing biocatalyst. *Environmental research*, 112262. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.11226>
- Arivalagan, P., Sridevi, D., Congeevaram, S., Piruthiviraj, P., Kuppusamy, R., Rijuta Ganesh, S., & Kaliannan T. (2017). Electrophoretic pattern of glutathione S-transferase (GST) in antibiotic resistance Gram-positive bacteria from poultry litter. *Microbial Pathogenesis*, 108, 285-290. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.003>
- Atkinson, H. J., & Babbitt, P. C. (2009). Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry*, 48(46), 11108–11116. <https://doi.org/10.1021/bi901180v>
- Bacanlı, M., & Başaran, N. (2019). Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 125, 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>
- Board, P. G., & Menon, D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(5), 3267–3288. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.019>
- Boylard, E., & Chasseaud, L. F. (1969). The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 32, 173–219. <https://doi.org/10.1002/9780470122778.ch5>
- Buckpitt, A. R., Castagnoli, N., Jr, Nelson, S. D., Jones, A. D., & Bahnson, L. S. (1987). Stereoselectivity of naphthalene epoxidation by mouse, rat, and hamster pulmonary, hepatic, and renal microsomal enzymes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 15(4), 491-498. <https://dmd.aspetjournals.org/content/dmd/15/4/491.full-text.pdf>
- Burkina, V., Zlabek, V., & Zamaratskaia, G. (2015). Effects of pharmaceuticals present in aquatic environment on Phase I metabolism in fish. *Environmental toxicology and pharmacology*, 40(2), 430–444. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.07.016>

- Cárcamo, J. G., Aguilar, M. N., Carreño, C. F., Vera, T., Arias-Darraz, L., Figueroa, J. E., Romero, A. P., Alvarez, M., & Yañez, A. J. (2017). Consecutive emamectin benzoate and deltamethrin treatments affect the expressions and activities of detoxification enzymes in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, *191*, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.10.004>
- Castanon, J. I. (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry science*, *86*(11), 2466–2471. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00249>
- Danielson, U. H., & Mannervik, B. (1985). Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *The Biochemical journal*, *231*(2), 263–267. <https://doi.org/10.1042/bj2310263>
- DeVita, V. T., Jr, & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer research*, *68*(21), 8643–8653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>
- Di Ilio, C., Polidoro, G., Arduini, A., & Federici, G. (1982). Glutathione S-transferase activity from guinea-pig brain: A comparison with hepatic multiple forms. *General Pharmacology: The Vascular System*, *13*(6), 485-490. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(82\)90022-2](https://doi.org/10.1016/0306-3623(82)90022-2).
- Ding, D., Zhu, J., Gao, Y., Yang, F., Ma, Y., Cheng, X., Li, J., Dong, P., Yang, H., & Chen, S. (2022). Effect of cattle farm exposure on oropharyngeal and gut microbial communities and antibiotic resistance genes in workers. *Science of The Total Environment* *806*(3), 150685. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150685>.
- Doyle, M. P., & Erickson, M. C. (2006). Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poultry science*, *85*(6), 960–973. <https://doi.org/10.1093/ps/85.6.960>
- Dringen R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology*, *62*(6), 649–671. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(99\)00060-x](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00060-x)
- Ensibi, C., Pérez-López, M., Soler Rodríguez, F., Míguez-Santiyán, M. P., Yahya, M., & Hernández-Moreno, D. (2013). Effects of deltamethrin on biometric parameters and liver biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental toxicology and pharmacology*, *36*(2), 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.04.019>

- Falkner, K. C., McCallum, G. P., Cherian, M. G., & Bend, J. R. (1993). Effects of acute sodium arsenite administration on the pulmonary chemical metabolizing enzymes, cytochrome P-450 monooxygenase, NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase and glutathione S-transferase in guinea pig: comparison with effects in liver and kidney. *Chemico-biological interactions*, 86(1), 51–68.
[https://doi.org/10.1016/0009-2797\(93\)90111-b](https://doi.org/10.1016/0009-2797(93)90111-b)
- Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic, R., & Smital, T. (2015). Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 158, 50–62.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.013>
- Gorbach S. L. (2001). Antimicrobial use in animal feed--time to stop. *The New England journal of medicine*, 345(16), 1202–1203.
<https://doi.org/10.1056/NEJM200110183451610>
- Guengerich F. P. (1990). Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 25(2), 97–153.
<https://doi.org/10.3109/10409239009090607>
- Gül, S., Belge-Kurutaş, E., Yildiz, E., Sahan, A., & Doran, F. (2004). Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environment international*, 30(5), 605–609.
[https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00059-X)
- Habboush, Y., & Guzman, N. (2021). Antibiotic Resistance. [Updated 2021 May 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>
- Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1981). Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in enzymology*, 77, 398–405. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77053-8)
- Hahn M. E. (2002). Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-biological interactions*, 141(1-2), 131–160. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(02\)00070-4](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(02)00070-4)
- Hamid, H., Zhao, L. H., Ma, G. Y., Li, W. X., Shi, H. Q., Zhang, J. Y., Ji, C., & Ma, Q. G. (2019). Evaluation of the overall impact of antibiotics growth promoters on broiler health and productivity during the medication and withdrawal period. *Poultry science*, 98(9), 3685–3694. <https://doi.org/10.3382/ps/pey598>

- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(6), 445–600. <https://doi.org/10.3109/10409239509083491>
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2014). *Metodología de la investigación* (6a. ed. --.). México D.F.: McGraw-Hill.
- Hershberger, E., Oprea, S. F., Donabedian, S. M., Perri, M., Bozigar, P., Bartlett, P., & Zervos, M. J. (2005). Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 55(1), 127–130. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh508>
- Hinchman, C. A., Matsumoto, H., Simmons, T. W., & Ballatori, N. (1991). Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *The Journal of biological chemistry*, 266(33), 22179–22185.
- Hodgson, E., (2010). Introduction to biotransformation (metabolism). In: Krieger, R. (Ed.), Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, vol. 1. *Elsevier Inc*, pp. 865–875. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00036-7>
- Huber, P.C., Almeida, W.P., & Fátima, Â. (2008). Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31(5), 1170-1179. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>
- Ishida, T., Kumagai, Y., Ikeda, Y., Ito, K., Yano, M., Toki, S., Mihashi, K., Fujioka, T., Iwase, Y., & Hachiyama, S. (1989). (8S)-(glutathion-S-yl)dihydromorphine, a novel metabolite of morphine from guinea pig bile. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 17(1), 77–81. <https://dmd.aspetjournals.org/content/dmd/17/1/77.full.pdf>
- Kobayashi, Y. (2010). Abatement of methane production from ruminants: trends in the manipulation of rumen fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23, 410-416. <https://www.animbiosci.org/upload/pdf/23-55.pdf>
- Ku, P., Wu, X., Nie, X., Ou, R., Wang, L., Su, T., & Li, Y. (2014). Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and antioxidant system. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 166, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.07.006>

- Ladner, J. E., Parsons, J. F., Rife, C. L., Gilliland, G. L., & Armstrong, R. N. (2004). Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry*, 43(2), 352–361. <https://doi.org/10.1021/bi035832z>
- Levy, S. B., FitzGerald, G. B., & Macone, A. B. (1976). Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *The New England journal of medicine*, 295(11), 583–588. <https://doi.org/10.1056/NEJM197609092951103>
- Lima, G.J.M.M. (1999). Uso de aditivos na produção de suínos. Simpósio sobre as implicações sócioeconômicas do uso de aditivos na produção animal,. Anais. Piracicaba: CBNA, p. 51-68.
- Lushchak V. I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of amino acids*, 2012, 736837. <https://doi.org/10.1155/2012/736837>
- Malik, A., Fouad, D., Labrou, N. E., Al-Senaïdy, A. M., Ismael, M. A., Saeed, H. M., & Ataya, F. S. (2016). Structural and thermodynamic properties of kappa class glutathione transferase from *Camelus dromedarius*. *International journal of biological macromolecules*, 88, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.065>
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 718–733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
- Martínez, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5887), 365–367. <https://doi.org/10.1126/science.1159483>
- Matsuo, A. Y., Gallagher, E. P., Trute, M., Stapleton, P. L., Levado, R., & Schlenk, D. (2008). Characterization of Phase I biotransformation enzymes in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* : CBP, 147(1), 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.08.001>
- McEwen, S. A., & Fedorka-Cray, P. J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34 Suppl 3, S93–S106

<https://doi.org/10.1086/340246>

- Mihaljević, I., Bašica, B., Maraković, N., Kovačević, R., & Smital, T. (2020). Interaction of organotin compounds with three major glutathione S-transferases in zebrafish. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 62, 104713. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104713>
- Monserat, J.M.; Geracitano, L.A., Da Silva, H.C. Colares. E.P. Bianchini, A. In: Lana, P.C. (2006). *Avaliação ambiental de estuários brasileiros: diretrizes metodológicas*. Riode Janeiro: Museu Nacional.
- Niewold T. A. (2007). The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry science*, 86(4), 605–609. <https://doi.org/10.1093/ps/86.4.605>
- Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug metabolism reviews*, 43(2), 138–151. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558093>
- Park H. (2012). Reduction of antibiotics using microorganisms containing glutathione S-transferases under immobilized conditions. *Environmental toxicology and pharmacology*, 34(2), 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.011>
- Park, H., & Choung, Y.K. (2007). Degradation of Antibiotics (Tetracycline, Sulfathiazole, Ampicillin) Using Enzymes of Glutathion S-Transferase. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 13 , 1147–1155. <https://doi.org/10.1080/10807030701506223>
- Pugazhendhi, A., Dhanarani, S., Shankar, C., Prakash, P., Ranganathan, K., Saratale, R. G., & Thamaraiselvi, K. (2017). Electrophoretic pattern of glutathione S-transferase (GST) in antibiotic resistance Gram-positive bacteria from poultry litter. *Microbial pathogenesis*, 110, 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.003>
- Qiao, M., Ying, G. G., Singer, A. C., & Zhu, Y. G. (2018). Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment international*, 110, 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.016>
- Robinson, A., Huttley, G. A., Booth, H. S., & Board, P. G. (2004). Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *The Biochemical journal*, 379(Pt 3), 541–552. <https://doi.org/10.1042/BJ20031656>

- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., & Boxall, A.B.A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–759. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *The Biochemical journal*, 360(Pt 1), 1–16. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600001>
- Suzuki T., Nishio K., Tanabe S. (2001). The MRP Family and Anticancer Drug Metabolism. *Curr. Drug Metab*, 2, 367-377. <https://doi.org/10.2174/1389200013338289>
- Todaka, T., Ishida, T., Kita, H., Narimatsu, S., & Yamano, S. (2005). Bioactivation of morphine in human liver: isolation and identification of morphinone, a toxic metabolite. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 28(7), 1275–1280. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1275>
- Uno, T., Ishizuka, M., & Itakura, T. (2012). Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental toxicology and pharmacology*, 34(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.02.004>
- Van Boeckel, T. P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N. G., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., & Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6459), eaaw1944. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1944>
- van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6)
- Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., Johnson-Rollings, A. S., Jones, D. L., Lee, N. M., Otten, W., Thomas, C. M., & Williams, A. P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *The Lancet. Infectious diseases*, 13(2), 155–165. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1)
- Whitlock J. P., Jr (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39, 103–125. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.103>
- Wu, B., & Dong, D. (2012). Human cytosolic glutathione transferases: structure, function,

- and drug discovery. *Trends in pharmacological sciences*, 33(12), 656–668.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.007>
- Yan, W., Xiao, Y., Yan, W., Ding, R., Wang, S., & Zhao, F., (2019). The effect of bioelectrochemical systems on antibiotics removal and antibiotic resistance genes: A review. *Chemical Engineering Journal*, Volume 358, Pages 1421-1437.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.128>
- Zaefarian, F., Abdollahi, M. R., Cowieson, A., & Ravindran, V. (2019). Avian Liver: The Forgotten Organ. *Animals: an open access journal from MDPI*, 9(2), 63.
<https://doi.org/10.3390/ani9020063>
- Zhang, W., Yin, K., Li, B., & Chen, L. (2013). A glutathione S-transferase from *Proteus mirabilis* involved in heavy metal resistance and its potential application in removal of Hg^{2+} . *Journal of hazardous materials*, 261, 646–652.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.023>
- Zhao, Y., Liu H., Wang, Q., & Li, B. (2019). The influence of three antibiotics on the growth, intestinal enzyme activities, and immune response of the juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus selenka*. *Fish & Shellfish Immunology*, Volume 84, páginas 434-440. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.022>

ANEXOS

Anexo 1: Contenido de proteína total en muestras de hígado de aves, cerdos y cuyes

Especie	Sistema de alimentación	Absorbancia, 545 nm	Proteína, mg/ml	
Aves	Sin Antimicrobiano	0.049	20.13	
		0.046	18.90	
		0.060	24.65	
			0.052	21.22
	Con Antimicrobiano	0.090	36.97	
		0.081	33.27	
0.077		31.63		
		0.083	33.96	
Cerdos	Sin Antimicrobiano	0.066	27.11	
		0.058	23.83	
		0.056	23.00	
			0.060	24.65
	Con Antimicrobiano	0.075	30.81	
		0.069	28.34	
0.076		31.22		
		0.073	30.12	
Cuyes	Sin Antimicrobiano	0.090	36.97	
		0.081	33.27	
		0.077	31.63	
			0.083	33.96
	Con Antimicrobiano	0.049	20.13	
		0.046	18.90	
0.060		24.65		
		0.052	21.22	

Factor de calibración = 5.13

Cantidad de muestra = 80 µl

Anexo 2: Actividad de la GST en muestras de hígado de aves, cerdos y cuyes.

Especie	Sistema de alimentación	Absorbancia, 340 nm	Proteína, mg/ml	Actividad GST, unidades GST/mg de proteína	
Aves	Sin Antimicrobiano	0.1792	21.22	379	
		0.1710	21.22	362	
		0.1479	21.22	313	
					351
	Con Antimicrobiano	0.1925	33.96	370	
		0.2243	33.96	432	
0.2755		33.96	530		
				444	
Cerdos	Sin Antimicrobiano	0.1973	24.65	131	
		0.1614	24.65	107	
		0.2194	24.65	145	
					128
	Con Antimicrobiano	0.4704	30.12	255	
		0.4606	30.12	250	
0.3244		30.12	176		
				227	
Cuyes	Sin Antimicrobiano	0.3678	33.96	663	
		0.3355	33.96	605	
		0.2599	33.96	469	
					579
	Con Antimicrobiano	0.1848	21.22	213	
		0.1422	21.22	164	
0.1643		21.22	190		
				189	

Actividad enzimática = (absorbancia (media) * dilución de la muestra) / (9.6 *volumen de la muestra (ml)*concentración proteica de la muestra (mg/ml))

Dilución de la muestra = 11

Volumen de la muestra = 5 ml

Anexo 3: Estadísticos de normalidad de los datos

Aves

Shapiro-Wilk normality test

W = 0.90599, p-value = 0.4106

Cerdos

Shapiro-Wilk normality test

W = 0.88621, p-value = 0.2988

Cuyes

Shapiro-Wilk normality test

W = 0.84892, p-value = 0.1543

Anexo 4: Resultados de la prueba t-Student

Aves

Welch Two Sample t-test

$t = -1.8312$, $df = 2.699$, $p\text{-value} = 0.1746$

mean of x mean

of y 351.3333

444.0000

Cerdos

Welch Two Sample t-test

$t = -3.5671$, $df = 2.7289$, $p\text{-value} = 0.04378$

mean of x mean

of y 127.6667

227.0000

Cuyes

Welch Two Sample t-test

$t = 6.5869$, $df = 2.2415$, $p\text{-value} = 0.01654$

mean of x mean

of y

579 189

