

Comparación del método de Friedewald y el directo para la determinación del colesterol LDL en gallinas ponedoras*

José Henry Osorio**, Jancy Darly Flórez Ochoa***

Resumen

Introducción. Los métodos de evaluación de los lípidos sanguíneos muestran variabilidad en el perfil lipídico en las aves. En este artículo se compararon dos métodos para la cuantificación del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad en gallinas ponedoras. **Materiales y métodos.** El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad se cuantificó con la fórmula de Friedewald y con el método directo a base de detergentes y N,Nbis (4-sulfobutil)-m-toluidina a 40 gallinas en producción de la línea Hy-Line W-36 de 26 semanas de edad. **Resultados.** Se encontraron diferencias de los resultados entre los métodos de evaluación del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad. El P valor del test F es inferior a 0,05, lo cual evidenció diferencia estadísticamente significativa, con una confianza del 95 % entre métodos. **Conclusiones.** Es factible la utilización del método directo a base de detergentes y N,Nbis (4-sulfobutil)-m-toluidina para la determinación del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad en gallinas ponedoras.

Palabras clave: gallinas ponedoras, lípidos, metabolismo.

Comparing Friedewald's and the direct methods to determine LDL cholesterol in laying hens

Abstract

Introduction. The methods to evaluate blood lipids are varied in the lipid profiles of poultry. In this paper

two methods to quantify the cholesterol of low density lipoproteins in laying hens are compared. **Materials and methods.** The low density lipoproteins' cholesterol was quantified by the use of the Friedewald's method and of the direct method based on detergents and N, N Bis (4-sulfobutyl) -m-toluidine in 40 laying hens from the Hy-Line W-36 line, with 26 weeks of age. **Results.** There are differences between methods in the results. The P value of test F is below 0,05, showing a statistically significant difference, with a 95 % confidence between methods. **Conclusions.** The use of the direct method based on detergents and N, N Bis (4-sulfobutyl) -m-toluidine to determine the low density lipoproteins' cholesterol in laying hens is feasible.

Key words: laying hens, lipids, metabolism.

Comparação do método de Friedewald e o direto para a determinação do colesterol LDL em galinhas poedeiras

Resumo

Introdução. Os métodos de avaliação dos lípidos sanguíneos mostram variabilidade no perfil lipídico nas aves. Neste artigo se compararam dois métodos para a quantificação do colesterol das lipoproteínas de baixa densidade em galinhas poedeiras. **Materiais e métodos.** O colesterol das lipoproteínas de baixa densidade se quantificou com a fórmula de Friedewald y com o método direto a base de detergentes e N,Nbis(4-sulfobutil)-m-toluidina a

* Artículo original derivado del proyecto de investigación de Laboratorio de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas, Calle 65 No. 26-10, Manizales, Colombia.

** Médico universidad de Manizales, Médico veterinario zootecnista, Licenciado en biología y química de la Universidad de Caldas, especialista y magister en patología molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona (España), magister en bioquímica de la Universidad del valle, magister of Philosophy (Metabolism) de la Universidad de Newcastle Upon Tyne (Reino Unido). Doctor en ciencias biomédicas, (bioquímica y biología molecular) de la Universidad del Valle.

*** Médica Veterinaria y Zootecnista, Magister en Ciencias Veterinarias.

40 galinhas em produção da linha Hy-Line W-36 de 26 semanas de idade. **Resultados.** Encontraram se diferenças dos resultados entre os métodos de avaliação do colesterol das lipoproteínas de baixa densidade. O P valor do teste F é inferior a 0,05, o qual evidenciou diferença estatisticamente significativa, com uma confiança do 95 % entre métodos.

Conclusões. É viável a utilização do método direto a base de detergentes e N,Nbis(4-sulfobutil)-m-toluidina para a determinação do colesterol das lipoproteínas de baixa densidade em galinhas poedeiras.

Palavras Chaves: galinhas poedeiras, lipídios, metabolismo.

Introducción

Las gallinas ponedoras han sido investigadas, y se han encontrado diferencias no solo con los mamíferos sino con los machos y las hembras inmaduras de su misma especie, debido a la producción de huevo que afecta los niveles de triglicéridos (TAG) y, por tanto, los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés: very low density lipoprotein) de la sangre (Bacon, Leclercq y Blum, 1978, 1684); Griffin, Grant y Perry, 1982, 650; Hermier, Catheline y Legrand, 1996, 261; Hermier et al, 1989, 113; Walzem et al, 1999, 469s). Varios de los trabajos en nutrición que se han realizado hasta el día de hoy lograron disminuir, con aditivos en la dieta, los lípidos de la yema de huevo, y han investigado la relación que tienen con los lípidos circulantes (Ahmad et al, 2014, 217; Ayerza y Coates, 2000, 727; Chowdhury, Chowdhury y Smith, 2002, 1859). No obstante, entre estudios se han encontrado diferencias en los valores arrojados de los niveles de lípidos sanguíneos, ya sea por la genética, por la dieta o, posiblemente, por el método de análisis de las muestras (Yin et al, 2008, 289; Yue et al, 2011, 1732).

El método de referencia para la cuantificación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés: Low density lipoprotein) es el método de ultracentrifugación (Bachorik, 2000, 1416). Sin embargo, es conveniente tener en cuenta que el proceso de ultracentrifugación no es totalmente preciso, por la difícil recuperación de las lipoproteínas y por la falta de homogeneidad de las fracciones obtenidas (Palacios et al, 1999, 36), y requiere de personal capacitado, lo cual acarrea costos extras en los análisis.

En los estudios del metabolismo de los lípidos en gallinas en producción, se ha realizado la cuantificación de las lipoproteínas por los méto-

dos de ultracentrifugación y electroforesis (Hermier et al, 1989, 110), y como dicho método es tan complicado de seguir, se han considerado otros métodos más fáciles y asequibles para la cuantificación de las lipoproteínas en dicha especie, pero dichos métodos se basan en la medición del colesterol que transportan las lipoproteínas medidas por ultracentrifugación.

Entre los métodos que se utilizan para la cuantificación del colesterol de las LDL (C-LDL) en gallinas ponedoras, está la fórmula de Friedewald (Salma et al, 2007, 717) y/o métodos enzimáticos-colorimétricos (Liu et al, 2010, 272). Estos últimos métodos actualmente son apetecidos porque disminuyen los costos operacionales, y entre estos están los métodos directos o igualmente conocidos como homogéneos, los cuales son específicos para la medición del C-LDL, y están libres de interferencias endógenas tales como altas concentraciones de TAG en sangre (Nauck, Russell y Rifai, 2002, 239). Pese a esto, no todos los métodos homogéneos tienen las mismas garantías, y algunos pueden llegar a ser afectados por los niveles de TAG de la muestra (Miller et al, 2002, 494).

Debido a todo lo anterior, en el presente trabajo se evalúan 2 métodos (la fórmula de Friedewald y otro directo a base detergente y N,Nbis (4-sulfobutil)-m-toluidina), para cuantificar el colesterol LDL en las gallinas ponedoras, con el fin de determinar si la fórmula de Friedewald es factible en la cuantificación del C-LDL en gallinas ponedoras en producción.

Materiales y métodos

Animales y dieta

Gallinas de las líneas Hy-Line W-36 fueron criadas en la Granja Montelido propiedad de

la Universidad de Caldas, a una temperatura promedio de 25°C, y 13 horas de luz aproximadamente; fueron alimentadas hasta la semana veinticuatro de edad con una dieta comercial para gallinas ponedoras, junto con todo el lote de aves. Se eligieron completamente al azar las aves a estudiar, manteniéndose en el mismo galpón, y durante las semanas 25 y 26 de edad se alimentaron con una dieta a base de maíz y torta de soya (tabla 1). La producción para la semana 26 de las aves escogidas fue del 96 %, con un peso promedio de 1444g. Se realizó un ayuno previo de 16h ± 1h para la toma de muestras. El número de aves fue de 40; en la semana 26 de edad, se tomaron 20

cm de sangre directamente de la yugular. La sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos y el suero se congeló a -30°C.

Métodos de análisis

Todos los reactivos pertenecían a los laboratorios BioSystems S. A, Barcelona, España; los valores de CT, C-HDL, TAG y C-LDL fueron determinados por métodos enzimáticos-colorimétricos, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los análisis se efectuaron en un equipo RAYTO RT-1904C, analizador semiautomático de química.

Tabla 1. Composición de la dieta para gallinas ponedoras kg / 100kg

Ingredientes	Kg
Maíz	59,12
Salvado de trigo	2,65
Torta de soya (48)	25,72
DL- metionina	0,22
L- treonina	0,06
Carbonato de calcio	8,63
Dicalfos (fosfato bical)	1,82
Aceite de soya	1,25
Colina	0,20
Premezcla de vitaminas y minerales	0,10
Sal	0,25
Composición calculada:	
Proteína cruda %	17,61
Energía metabolizable kcal/kg	2748,97

Método de Friedewald

Se determinaron en suero los niveles de CT, el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL: del inglés High density lipoprotein) y los TAG.

La determinación del CT en suero se realizó mezclando 10µL de la muestra y 1mL de reactivo (Pipes 35mmol/L, colato sódico 0,5mmol/L, fenol 28mmol/L, colesterol esterasa >0,2U/mL, colesterol oxidasa >0,1U/mL, peroxidasa >0,8U/mL, 4-AA 0,5mmol/L, pH 7,0). Se agitó bien la mezcla y se dejaron incubar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los éste-

res de colesterol se hidrolizaron por la colesterol-esterasa, y dieron lugar a colesterol libre, el cual por acción de la colesterol-oxidasa formó colesteno + peróxido de hidrógeno; este último en presencia de la 4-AA y fenol dieron lugar a la quinonaimina por acción de la peroxidasa. La quinonaimina es proporcional al colesterol total de la muestra y se cuantificó espectrofotométricamente.

La determinación del colesterol HDL mediante el método de precipitado se llevó a cabo usando 1mL de reactivo (Fosfotungstato 0,4 mmol/L y cloruro de magnesio 20 mmol/L), que se mezcló con 0,2mL de la muestra de suero, se agitó

bien y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente; luego, se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm. En el precipitado quedaron las VLDL, las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, del inglés: intermediate density lipoprotein) y LDL; en el sobrenadante quedaron las HDL. Finalmente, se recogieron con cuidado 100µL del sobrenadante, y se depositaron en otro tubo de ensayo, se mezclaron con 1mL del reactivo para CT y se incubaron por 10 minutos al baño maría a 37°C. El C-HDL fue hidrolizado por la colesterol-esterasa y la colesterol-oxidasa; esto dio lugar a peróxido de hidrógeno que fue consumido por una peroxidasa en presencia de la 4-aminoantipirina (4-AA) y fenol, quedando como producto final la quinonaimina, producto que es proporcional al C-HDL de la muestra, y este se cuantificó espectrofotométricamente.

Se determinaron los TAG en suero, utilizando 10µL de la muestra y 1mL de reactivo (Pipes 45mmol/L, 4-clorofenol 6mmol/L, cloruro magnésico 5mmol/L, lipasa >100U/mL, glicerol-quinasa >1,5U/mL, glicerol-3P-oxidasa >4U/mL, peroxidasa >0,8U/mL, 4-AA 0,75mmol/L, ATP 0,9mmol/L, pH 7,0). Se agitó bien la mezcla y se dejaron incubar los tubos durante 15 minutos a temperatura ambiente. En el anterior proceso, los triglicéridos fueron hidrolizados por la lipasa a glicerol y ácidos grasos; el glicerol, en presencia de ATP, fue fosforilado por la glicerol-quinasa y dio lugar al glicerol 3P + ADP; el glicerol 3P en presencia de oxígeno formó peróxido de hidrógeno por acción de la glicerol-3P-oxidasa; finalmente, se cuantificó espectrofotométricamente la quinonaimina producto de la acción de la peroxidasa sobre el peróxido de hidrógeno en presencia de 4-AA y clorofenol; la quinonaimina es proporcional a la concentración de los TAG.

Los valores de colesterol LDL fueron calculados mediante la siguiente fórmula: colesterol LDL = colesterol total - colesterol HDL - colesterol VLDL. El C-VLDL fue calculado por la división de los triglicéridos entre 5 (TAG/5) (Friedewald, Levy y Fredrickson, 1972).

Determinación del colesterol LDL mediante el método directo (detergente)

Este método consta de un reactivo A: Buffer MES >30mmol/L, colesterol esterasa <1,5U/mL,

colesterol oxidasa <1,5U/mL, 4-AA 0,5mmol/L, ascorbato oxidasa <3,0 U/L, peroxidasa >1U/mL, detergente, pH 6,3, y un reactivo B: Buffer MES >30mmol/L, DSBmT 1mmol/L, detergente, pH 6,3.

Se pipetearon 750 µL del reactivo A, y 7µL de la muestra de suero. El detergente del reactivo A solubilizó el colesterol de las HDL, VLDL y los PM. Los ésteres de colesterol fueron hidrolizados simultáneamente por la colesterol-esterasa y la colesterol-oxidasa, y dieron lugar a colesteno y peróxido de hidrógeno; este último fue consumido por una peroxidasa en presencia de 4-AA. Esta reacción no fue formadora de color. Se añadieron al producto del paso anterior 250µL del reactivo B, y se dejaron incubar por 5' a 37°C. El detergente presente en dicho reactivo solubilizó el colesterol LDL; al igual que en el paso anterior, la colesterol-esterasa y la colesterol-oxidasa hidrolizaron el colesterol LDL, y dieron como productos finales colesteno y peróxido de hidrógeno; el peróxido de hidrógeno y el DSBmT se condensaron en presencia de una peroxidasa para formar quinonaimina. La quinonaimina es proporcional a la concentración de colesterol-LDL presente en la muestra, la cual se cuantificó espectrofotométricamente.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando ANOVA simple. Para el análisis estadístico se utilizó Statgraphics Plus 5.1. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron con el $P < 0,05$ del test F.

Resultados y discusión

Los niveles séricos del C-LDL, de gallinas ponedoras, por la fórmula de Friedewald y el método directo, se muestran en la tabla 2. El P valor del test F es inferior a 0,05 lo que evidencia diferencia estadísticamente significativa, con una confianza del 95 % entre métodos.

En las gallinas ponedoras, se han realizado diferentes estudios del metabolismo lipídico, con la metodología disponible comercialmente. En el caso de las LDL, se ha evaluado su colesterol y su alteración con el tipo de dieta utilizada, usando

la fórmula de Friedewald (Salma et al, 2007, 717); como los valores que se muestran en dicho estudio son superiores a 80mg/dL, fue inesperado que la media de los valores arrojados en la presente investigación, usando la fórmula de Friedewald fuera negativa (tabla 2).

Para hallar el C-LDL usando la fórmula de Friedewald, se tuvieron en cuenta las concentraciones CT, C-HDL y TAG en suero, y se calculó el C-VLDL con la fórmula TAG/5. En diversos trabajos se demostró que esta fórmula funcionó en humanos sanos, con niveles de TAG inferiores a 400mg/dL, que tenían una relación de 5:1 entre TAG y CT las VLDL (Friedewald, Levy y Fredrickson, 1972, 499). En el caso de las gallinas, se encontró que esta relación cambia, pues es menor la proporción de CT, y mayor, la de TAG en las VLDL (Hermier et al, 1989, 111).

Pese a lo anterior y a que en el presente trabajo los niveles de TAG en suero fueron mayores a 400 mg/dL (tabla 2), se calcularon los datos de C-VLDL dando como resultado una media de 155,5mg/dL, datos muy diferentes a los arrojados por el método de ultracentrifugación, que utilizaron Hermiener y colaboradores (Hermiener, 1989. 111), los cuales tenían valores más elevados que los encontrados en el presente trabajo.

Lo anterior determinó que la fórmula de Friedewald no era factible en gallinas ponedoras ni para el cálculo del C-VLDL y mucho menos para el cálculo del C-LDL, debido a los errores sumados en las ecuaciones que se necesitan para dar los resultados requeridos, y que en el presente estudio arrojó valores negativos (tabla 2).

Tabla 2. Concentración en mg/dL de CT, TAG, C-VLDL, C-HDL, C-LDL Friedewald, C-LDL directo en gallina ponedora

	CT	TAG	C-VLDL	C-HDL	C-LDL Friedewald	C-LDL Directo
Media	142,3	777,4	155,5	13,4	-26,54 ^a	49,3 ^p
Desviación estándar	33,3	284,2	56,8	3,5	36,8	11,1
Mínimo	92,1	129,7	25,9	6,8	-121,7	30,5
Máximo	255,5	1398,2	279,6	21,3	52,8	71,9
Rango	163,4	1268,4	253,7	14,4	174,5	41,5
P-valor					0,000	

CT: Colesterol total, TAG: Triglicéridos, C-VLDL: colesterol de la lipoproteína de muy baja densidad (calculado: dividiendo los TAG entre 5) C-HDL: colesterol de la lipoproteína de alta densidad, C-LDL colesterol de la lipoproteína de baja densidad.

Las técnicas de ensayos con líquidos homogéneos, también conocidas como métodos directos para la medición del C-LDL, han sido promocionadas como métodos que no presentaron problemas en pacientes con ausencia de ayuno, y con la capacidad de medir el C-LDL en muestras donde los TAG eran mayores a 400mg/dL (Fei et al, 2000, 1352); sin embargo, el método que ha sido utilizado en el presente trabajo (detergente + DSBmT) se ha afectado negativamente en sus resultados, cuando las altas concentraciones de TAG en suero superan el rango máximo permitido (Miller et al, 2002, 497); en el caso de los reactivos utilizados para este trabajo, pertenecientes a los laboratorios BioSystems, aceptan una lipemia con un máximo de 1290mg/dL de TAG.

En el presente trabajo se encontró un rango de TAG entre 129-1398mg/dL (solo un dato fue superior a 1290 mg/dL); no obstante, se hizo el análisis del suero por el método directo y se comparó con los resultados obtenidos en trabajos anteriores. Se encontró que los resultados analizados con el método directo son similares a los datos en el estudio donde analizaron en la dieta los subproductos del cártamo (An et al, 1997, 691-692), los cuales utilizaron el método de ultracentrifugación junto con un Kit enzimático para colesterol; pero, difirieron con los datos del trabajo donde analizaron otros aditivos como el ácido linoleico conjugado (Yin et al, 2008, 285 y 289). El método utilizado en este trabajo fue con un precipitado a base de polivinil sulfato (comunicación interna); además, este método también puede verse afectado

negativamente por las altas concentraciones de TAG en suero (Rifai et al, 1992, 154).

Como conclusión se encontró que la cuantificación del C-LDL con la fórmula Friedewald no es factible usarla en gallinas ponedoras en producción, debido a los altos niveles de TAG en suero que a van afectar negativamente los valores de dicha lipoproteína. Se encontró viable el uso del método directo a base de detergente + DSBmT para las gallinas ponedoras; sin embargo, hay que tener en cuenta que los niveles de TAG no superen el máximo permitido por el laboratorio(s) fabricantes.

Agradecimientos

A la Universidad de Caldas por prestar la granja donde se alojaron las gallinas, al doctor William Narváez Solarte por su colaboración con la elaboración de la dieta para las aves, a Luis Fernando Reyes González y Alex Narváez Solís por su colaboración en el trabajo de campo.

Referencias bibliográficas

- Ahmad, S.; Haq, A.; Yousaf, M.; Kamran, Z.; Rehman A. y Sohail M. (2014). Production of n-3PUFA Enriched Eggs By Feeding Various Dietary Ratios of n-6 to n-3 Fatty Acids and Vitamin A Levels to the Laying Hens in Hot Climate. *J PoultSci*, 51:213-219. Recuperado de: http://www.researchgate.net/publication/260064812_Production_of_n-3PUFA_Enriched_Eggs_By_Feeding_Various_Dietary_Ratios_of_n-6_to_n-3_Fatty_Acids_and_Vitamin_A_Levels_to_the_Laying_Hens_in_Hot_Climate
- An, B. K.; Nishiyama, H.; Tanaka, K.; Ohtani, S.; Iwata, T.; Tsutsumi, k.; et al. (1997). Dietary safflower phospholipid reduces liver lipids in laying hens. *Poult Sci*, 76(5), 689-95.
- Ayerza, R. y Coates, W. (2000), Dietary levels of chia: influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. *Poult Sci*, 79(5), 724-39.
- Bachorik, P. S. (2000). Measurement of low-density-lipoprotein cholesterol. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, editors. Handbook of lipoprotein testing. 2 nd ed. Washington, DC: AACC Press; p. 245-64.
- Bacon, W. L.; Leclercq, B. y Blum, J. C. (1978) Difference in metabolism of very low density lipoprotein from laying chicken hens in comparison to immature chicken hens. *Poult Sci*, 57(6), 1675-86.
- Chowdhury, S. R, Chowdhury, S. D. y Smith, T. K. (2002). Effects of dietary garlic on cholesterol metabolism in laying hens. *Poult Sci*, 81(12), 1856-62.
- Fei, H.; Maeda, S.; Kirii, H.; Fujigaki, S.; Maekawa, N.; Fujii, H.; et al. (2000). Evaluation of two different homogeneous assays for LDL-cholesterol in lipoprotein-X-positive serum. *Clinical Chemistry*, 46(9),1351-6.
- Friedewald, W.; Levy, R. y Fredrickson, D. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6), 499-502.
- Griffin, H. D.; Grant, G. y Perry, M. (1982) Hydrolysis of plasma triacylglycerol rich lipoproteins from immature and laying hens (*Gallus domesticus*) by lipoprotein lipase in vitro. *Biochem J*, 206, 647-54.
- Hermier, D.; Catheline, D. y Legrand, P. (1996). Relationship between hepatic fatty acid desaturation and lipid secretion in the estrogenized chicken. *Comp Biochem Physiol*, 115A(3), 259-64.
- Hermier, D.; Forgez, P.; Williams, J. y Chapman, M. J. (1989). Alterations in plasma lipoproteins and apolipoproteins associated with estrogen-induced hyperlipidemia in the laying hen. *Eur J Biochem*, 184(1), 109-18.
- Liu, X.; Zhao, H. L.; Thiessen, S.; House, J. D. y Jones, P. J. H. (2010). Effect of plant sterol-enriched diets on plasma and egg yolk cholesterol concentrations and cholesterol metabolism in laying hens. *Poult Sci*, 89(2), 270-5.
- Miller, W. G.; Waymack, P. P.; Anderson, F. P.; Ethridge, S. F. y Jayne, E. C. (2002). Performance of four homogeneous direct methods for LDL-cholesterol. *Clinical Chemistry*, 48(3), 489-98.
- Nauck, M.; Russell.; Warnick, G. y Rifai, N. (2002). Methods for Measurement of LDL-Cholesterol: A Critical Assessment of Direct Measurement by Homogeneous Assays versus Calculation. *Clinical Chemistry*, 48(2), 236-54.
- Palacios, M.; Esteban, M.; Águila, J. Á. y Ortolá, J. (1999). Recomendaciones para la determinación de la concentración en suero de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad. *Quim Clin*, 18(1), 33-40.

- Rifai, N.; Warnick, G. R.; McNamara, J. R.; Belcher, J. D.; Grinstead, G. F. y Frantz, I. D. (1992). Measurement of low-density-lipoprotein cholesterol in serum: a status report. *Clinical Chemistry*, 38(1), 150-60.
- Salma, U.; Miah, A. G.; Tareq, K. M. A.; Maki, T. y Tsujii, H. (2007). Effect of dietary *Rhodobacter capsulatus* on egg-Yolk cholesterol and laying hen performance. *Poult Sci*, 86(4), 714-9.
- Walzem, R. L.; Hansen, R. J.; Williams, D. L y Hamilton, R. L. (1999). Estrogen induction of VLDLy Assembly in Egg-Laying hens. *J Nutri* 129(2), 467S-72S.
- Yin, J. D.; Shang, X. G.; Li, D. F.; Wang, F. L.; Guan, Y. F. y Wang, Z. Y. (2008). Effects of dietary conjugated linoleic acid on the fatty acid profile and cholesterol content of egg yolks from different breeds of layers. *Poult Sci*, 87(2), 284–90.
- Yue, H. Y.; Wang, J.; Qi, X. L.; Ji, F.; Liu, M. F.; Wu, S. G. et al. (2011). Effects of dietary oxidized oil on laying performance, lipid metabolism, and apolipoprotein gene expression in laying hens. *Poult Sci*, 90(8), 1728-36.