

Comparison between the polyvinyl sulphate precipitate method and the Detergents + DSBmT direct method to determine LDL cholesterol in laying hens^a

Comparación del método precipitado con polivinil sulfato y directo con Detergentes + DSBmT para la determinación del colesterol LDL en gallinas ponedoras

Comparaçãõ do método precipitado com polivinil sulfato e direto com detergentes + DSBmT para a determinaçãõ do colesterol LDL em galinhas poedeiras.

José Henry Osorio^{1,3*}, DVM, MSc, PhD; Jancy Darly Flórez Ochoa², DVM, MSc.

**Autor para correspondencia: José Henry Osorio. Calle 65 No. 26-10, Manizales, Colombia.
E-mail: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co*

¹Docente Investigador. Laboratorio de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas, Calle 65 No. 26-10, Manizales, Colombia. E-mail: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co.

²Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas, Calle 65 No. 26-10, Manizales, Colombia. E-mail: jancydarly@yahoo.com.ar

³Investigador Universidad de Manizales. Carrera 9 No 19-03, Manizales (Colombia).

(Recibido: 3 de mayo, 2013; aceptado: 21 de junio, 2013)

Summary

The objective of this study was to compare two methods (precipitate vs. direct) to quantify low-density lipoprotein cholesterol in laying hens. Materials and methods: Cholesterol in low density lipoproteins was quantified using the precipitate (polyvinyl sulfate) method and the direct method based on detergent and N,Nbis (4-sulfobutyl)-m-toluidine. A total of 40 laying hens (Hy-Line W-36) aged 26 weeks were used. Results: Cholesterol levels (mg/dL) assessed by the precipitate and direct methods were 117.3 ± 38.6 and 49.3 ± 11.1 , respectively. The P value for the F test was less than 0.05, showing statistically significant difference between methods, with a 95% confidence. Conclusions: The direct method based on detergents and N,Nbis(4-sulfobutyl)-m-toluidine can be used to determine cholesterol in low density lipoproteins of laying hens since it is not affected by serum triglyceride levels.

^aPara citar este artículo: Osorio JH, Flórez JD. Comparación del método precipitado con polivinil sulfato y directo con Detergentes + DSBmT para la determinación del colesterol LDL en gallinas ponedoras. Rev CES Med Zootec. 2013; Vol 8 (1): 61-69.

Key words

Detergent, DSBmT, LDL- cholesterol, polyvinyl sulfato.

Resumen

El objetivo del estudio fue comparar dos métodos de análisis (precipitado vs. directo) para cuantificar el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad en gallinas ponedoras. Materiales y métodos: El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad se cuantificó por los métodos de precipitado (polivinil sulfato) y directo a base de detergentes y N,Nbis(4-sulfobutil)-m-toluidina en 40 gallinas ponedoras de la línea Hy-Line W-36 de 26 semanas de edad. Resultados: Los niveles de colesterol (mg/dL) de las lipoproteínas de baja densidad por los métodos del precipitado y directo fueron: 117.3 ± 38.6 y 49.3 ± 11.1 , respectivamente. El valor P de la prueba F fue inferior a 0.05, evidenciando diferencia estadísticamente significativa entre métodos, con una confianza del 95%. Conclusiones: Se puede utilizar el método directo a base de detergentes y N,Nbis(4-sulfobutil)-m-toluidina para determinar el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad en gallinas ponedoras, puesto que no lo afectan los niveles de triglicéridos séricos.

Palabras clave

Colesterol LDL, detergente, DSBmT, polivinil sulfato.

Resumo

O objetivo foi comparar dois métodos de análise (precipitado e direto) para a quantificação do colesterol das lipoproteínas de baixa densidade em galinhas poedeiras. Materiais e métodos. O colesterol das lipoproteínas de baixa densidade quantificou-se com os métodos do precipitado (polivinil sulfato) e direto a base de detergentes e N,Nbis (4-sulfobutil)-m-toluidina, em 40 galinhas poedeiras da linha Hy-Lyne W-36 de 26 semanas de idade. Resultados. Os níveis do colesterol das lipoproteínas de baixa densidade, pelos métodos precipitado e direto, em mg/dL foram de: $117,3 \pm 38,6$; $49,3 \pm 11,1$; respectivamente. O valor P do teste F é menor de 0,05, evidenciando diferença estatisticamente significativa, com uma confiança de 95% entre os métodos. Conclusões. É factível 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 devido a que é um método que não se afeta pelos níveis séricos dos triglicerídeos destas.

Palavras chave

Colesterol LDL, detergente, DSBmT, polivinil sulfato.

Introducción

Los diversos trabajos donde estudian la metodología encargada de medir el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés; Low Density Lipoprotein) en el hombre, han encontrado que algunos de los métodos disponibles comercialmente tienen fallas en la cuantificación de las lipoproteínas, cuando las personas presentan enfermedades metabólicas, tales como hiperlipemias¹⁵, hiperlipoproteinemias³, colestasis (los cuales presentan una lipoproteína-X)⁴. En el caso de las gallinas ponedoras, por pertenecer a una especie diferente a la del hombre, cuando empieza la producción de huevo, le ocurren cambios metabólicos (normales en esta especie) que pueden afectar la cuantificación correcta del colesterol LDL por métodos de fácil acceso en cualquier laboratorio.

Uno de los cambios que se producen en las gallinas ponedoras, en el momento en que empiezan a producir huevo, es el aumento de la concentración de los triglicéridos en suero, causando una hipertrigliceridemia normal en dicha especie, los triglicéridos (TAG) son cargados por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés: very low density lipoprotein) que poseen la apolipoproteína VLDL-II (apo VLDL-II), proteína necesaria para la captación de esta lipoproteína por los oocitos¹⁶.

Los estudios iniciales donde evaluaron el perfil lipídico de las gallinas, utilizaron métodos como el de ultracentrifugación + electroforesis para la cuantificación de las lipoproteínas, pero este método está siendo desplazado a pesar de ser aceptado como método de referencia junto con el de β -cuantificación para medir las LDL², debido a que el método de ultracentrifugación presenta difícil recuperación de las lipoproteínas y falta de homogeneidad de las fracciones

obtenidas¹². Por tal razón, en las investigaciones recientes de las gallinas ponedoras, han utilizado métodos más fáciles y accesibles para la evaluación del C-LDL, y todos estos métodos se conocen como métodos enzimáticos-colorimétricos^{7,17,18}.

Debido a la diferencia que tienen las gallinas ponedoras en producción con las gallinas ponedoras inmaduras, en el presente artículo se evalúa, el comportamiento de dos métodos enzimáticos-colorimétricos, uno de precipitado a base de polivinil sulfato y otro directo a base de detergentes y N,N-bis (4-sulfobutil)-m-toluidina, para medir los niveles séricos de C-LDL en gallinas ponedoras.

Materiales y métodos

Animales y dieta

Gallinas de la línea Hy-Line W-36, fueron criadas en la Granja Montelindo 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 (siendo específico según la etapa del crecimiento), 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, torta de soya y aceite de soya (Tabla 1). La producción para la semana 26 de las gallinas escogidas fue del 96%, con un peso corporal promedio de 1.444 g. Se realizó un ayuno previo de 16 h \pm 1 hora para la toma de muestras. El número de aves fue de 40, 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.

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

<i>Ingredientes</i>	<i>Kg</i>
<i>Maíz</i>	<i>59,12</i>
<i>Salvado de trigo</i>	<i>2,65</i>
<i>Torta de soya (48)</i>	<i>25,72</i>
<i>DL- metionina</i>	<i>0,22</i>
<i>L- treonina</i>	<i>0,06</i>
<i>Carbonato de calcio</i>	<i>8,63</i>
<i>Dicalfos (fosfato bical)</i>	<i>1,82</i>
<i>Aceite de soya</i>	<i>1,25</i>
<i>Colina</i>	<i>0,20</i>
<i>Premezcla de vitaminas y minerales</i>	<i>0,10</i>
<i>Sal</i>	<i>0,25</i>
<i>Composición calculada:</i>	
<i>Proteína cruda %</i>	<i>17,61</i>
<i>Aminoácidos digestibles en %:</i>	
<i>Metionina</i>	<i>0,47</i>
<i>Metionina + cisteína</i>	<i>0,74</i>
<i>Lisina</i>	<i>0,83</i>
<i>Triptófano</i>	<i>0,19</i>
<i>Treonina</i>	<i>0,65</i>
<i>Extracto Etéreo %</i>	<i>3,83</i>
<i>Ácido linoleico %</i>	<i>1,9</i>
<i>Fibra cruda %</i>	<i>2,38</i>
<i>Energía metabolizable kcal/kg</i>	<i>2748,97</i>

Métodos de análisis

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

Determinación de los niveles de colesterol total

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

de colesterol se hidrolizaron por la colesterol esterasa, dando 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.

Determinación de los niveles de triglicéridos

Se determinaron los TAG en suero, utilizando 10 μ L de la muestra y 1 mL de Reactivo (Pipes 45 mmol/L, 4-clorofenol 6 mmol/L, cloruro magnésico 5 mmol/L, lipasa >100 U/mL, glicerol-quinasa >1,5 U/mL, glicerol-3P-oxidasa >4 U/mL, peroxidasa >0,8 U/mL, 4-AA 0,75 mmol/L, ATP 0,9 mmol/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.

Determinación del colesterol LDL mediante el método de precipitado (Polivinil sulfato)

Se utilizaron 0,2 mL de reactivo (Polivinil sulfato 3 g/L, polietilenglicol 3 g/L) y 0,4 mL de la muestra de suero, los dos se mezclaron, se agitaron y se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugaron por 15 minutos a 4000 rpm. En el procedimiento las LDL presentes en la muestra, precipitaron en presencia de polivinil sulfato y polietilenglicol, este último sirvió como acelerador de la precipitación. En el sobrenadante quedaron las VLDL, las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, del inglés: Intermediate Density lipoprotein, y las

lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés: High Density Lipoprotein).

Finalmente, se recogieron con cuidado 20 μ L del sobrenadante, depositándolo en otro tubo de ensayo, se mezcló con 1 mL del reactivo para CT y se incubó por 10 minutos al baño maría a 37 °C. El colesterol del sobrenadante, se cuantificó espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación: La colesterol esterasa y colesterol oxidasa dieron lugar a colesteno y peróxido de hidrógeno, el cual por acción de la peroxidasa junto con la 4-AA + fenol formaron la quinonaimina. Esta es proporcional al colesterol VLDL, IDL y HDL.

La concentración de colesterol LDL se calculó mediante la siguiente fórmula: C-LDL = CT - colesterol del sobrenadante.

Determinación del colesterol LDL mediante el método directo (detergente)

Este método consta de: Un Reactivo A: Buffer MES >30mmol/L, colesterol esterasa <1,5 U/mL, colesterol oxidasa <1,5 U/mL, 4-AA 0,5 mmol/L, ascorbato oxidasa <3,0 U/L, peroxidasa >1 U/mL, detergente, pH 6,3. Un Reactivo B: Tampón MES >30 mmol/L, DSBmT 1 mmol/L, detergente, pH 6,3.

Se pipetearon: 750 μ L del Reactivo A y 7 μ L 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, 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 añadió al producto del paso anterior 250 μ L del reactivo B y se dejó incubar por 5 minutos 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. Se evaluó el coeficiente de correlación de Pearson entre CT y C-LDL (métodos precipitado y directo) con una significancia $P < 0,01$.

Resultados

Se encontró diferencia significativa entre los dos métodos utilizados para analizar el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad. Las medias \pm desviación estándar para los niveles de C-LDL, por los métodos precipitado y directo, en mg/dL fueron: $117,3 \pm 38,6$ y $49,3 \pm 11,1$; respectivamente. El P valor del test F fue inferior a 0,05 y evidenció diferencias estadísticamente significativas, con una confianza del 95% entre métodos (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de CT, C-LDL método de precipitado y C-LDL método directo en gallinas ponedoras.

	<i>CT</i>	<i>TG</i>	<i>C-LDL Sobrenadante</i>	<i>C-LDL Precipitado*</i>	<i>C-LDL Directo**</i>
<i>Media</i>	142,3	777,4	25,01	117,3	49,3
<i>Desviación estándar</i>	33,3	284,2	9,10	38,6	11,1
<i>Mínimo</i>	92,1	129,7	10,51	48,9	30,5
<i>Máximo</i>	255,5	1398,2	47,60	238,9	71,9
<i>Rango</i>	163,4	1268,4	37,08	189,9	41,5
<i>P-valor</i>	0,000				

*C-LDL: Colesterol de la lipoproteína de baja densidad *Método de precipitado con polivinil sulfato **Método directo con detergente y N,Nbis 4-sulfobutil)-m-toluidina*

Los niveles de CT se correlacionaron positiva y significativamente con los valores de C-LDL por el método de precipitado con polivinil sulfato y con el método directo a base de detergente y DSBmT, con una confianza del 99% (Tabla 3).

Tabla 3. Coeficiente de correlación de CT, TAG, y colesterol LDL precipitado y directo.

	<i>Colesterol Total</i>
<i>C-LDL precipitado (polivinil sulfato)</i>	0,97**
<i>C-LDL directo (DSBmT)</i>	0,80*

**Correlación moderadamente fuerte **Correlación relativamente fuerte. C-LDL: colesterol de la lipoproteína de baja densidad*

Discusión

La determinación del C-LDL por el método de precipitado con polivinil sulfato, tiene como ventaja ser estable en el pH del suero, a diferencia del método de precipitado a base de heparina, el cual necesita un control estricto del pH a 5.12,^{9,13} La desventaja, del método de precipitado con polivinil sulfato, es la alteración de los resultados, cuando los niveles de TAG en suero son elevados⁶, especialmente valores superiores a 400 mg/dL, dando como resultado datos falsos en el proceso de precipitación con dicho reactivo¹³. No obstante, según las indicaciones del fabricante de los reactivos utilizados, no debería presentarse problemas con muestras <1000 mg/dL. Por esta razón y a pesar de que las gallinas ponedoras, tienen altos niveles de TAG^{11,14}, se realizó el análisis de las muestras por este método y los resultados mostraron una media de 117,3 mg/dL. Con todo lo anterior, hay que tener en cuenta que en el presente trabajo, se encontró que el 17 % de las muestras fueron mayores a 1000 mg/dL y el 7,5 % eran menores a 400 mg/dL.

Debido a que los niveles de C-LDL calculado por el método de precipitado, dependen directamente de los niveles de colesterol total de la muestra, se presenta una relación significativa entre el CT y el C-LDL precipitado, lo cual es confirmado al observar la correlación entre estos dos parámetros, presentados en la Tabla 3.

En contraste a los resultados de la presente investigación, el trabajo que realizaron Yin et al.¹⁷ en dos líneas de gallinas ponedoras, y donde evaluaron el colesterol de las LDLs por el método de precipitado con polivinil sulfato (comunicación interna), de los laboratorios Beijing Biological Technology Co., mostraron valores en un rango muy inferior (entre 9 y 13 mg/dL).

La cuantificación del colesterol LDL por los métodos directos o métodos conocidos como técnicas de ensayos con líquidos homogéneos, han sido promocionados como métodos viables en personas que al momento de la toma las muestras, han consumido alimento; igualmente,

estos métodos han sido diseñados para medir el C-LDL en muestras con niveles de TAG mayores a 400 mg/dL⁴.

El método directo a base de detergente +DSBmT, utilizado en el presente trabajo, recomienda que los niveles de TAG no deben superar los 1290 mg/dL. La concentración de triglicéridos en las gallinas ponedoras analizadas, presentan una media 777,4 mg/dL cumpliendo con el máximo permitido, excepto por una de las muestras, la cual tiene un valor de 1398 mg/dL, por lo tanto, este valor de los TAG puede afectar el resultado del colesterol LDL de esa única muestra en forma negativa⁸.

La correlación positiva y significativa entre el CT y C-LDL analizado por el método directo, confirma que lipoproteína de baja densidad es una de las lipoproteínas encargadas del transporte del colesterol¹⁰, sin ser este análisis dependiente de los resultados del colesterol de cada ave analizada, como sí ocurre con el método de precipitado.

Al comparar los resultados arrojados en la presente investigación con los valores obtenidos en trabajos anteriores. Se encontró que los resultados del C-LDL analizados con el método directo son similares a los datos en el estudio donde analizaron en la dieta los subproductos del cártamo¹, los autores presentaron valores en un rango entre 30-41 mg/dL, utilizando el método de ultracentrifugación junto con un Kit enzimático para colesterol; los resultados, también coincidieron con el trabajo donde evalúan las hojas de Ginkgo (*Candida utilis*)¹⁹, donde los autores utilizaron un kit de los laboratorios: Nanjing Jian cheng Bioengineering Institute, Nanjing, PR China) y sus resultados oscilaban entre 46-70 mg/dL, desafortunadamente no especificaron que tipo de método (precipitado o directo) utilizaron; pero, difirieron con los datos del trabajo donde analizaron aceites oxidados en la dieta¹⁸, los cuales estaban en un rango entre 7,34-9,66 mg/dL, el problema con este último estudio, es que aunque utilizaron en kit enzimático-colorimétrico de los laboratorios: Beijing BHKT Clinical Reagent Co. Ltd, tampoco mostraron con claridad si utilizaron un método de precipitado o un método directo para los análisis del C-LDL en suero.

Conclusiones

En la presente investigación se confirmó que el método directo a base de detergente + DSBmT, es viable para la cuantificación de C-LDL, en muestras de suero con niveles de triglicéridos elevados (hasta 1290 mg/dL). El método de precipitado con polivinil sulfato presenta fallas, dando valores superiores a los reales del colesterol de estas lipoproteínas, probablemente debido a la presencia de las altas concentraciones de TAG transportados por las VLDL que son específicas de la yema de huevo de las gallinas ponedoras.

Agradecimientos

A la Universidad de Caldas por prestar las instalaciones de la granja Montelindo donde se alojaron las aves. Al doctor William Narváz por su colaboración en el balance de la dieta. Al Profesor Jorge Enrique Pérez por su colaboración en el análisis de las muestras en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Caldas.

Referencias

1. An BK, *et al.* Dietary safflower phospholipid reduces liver lipids in laying hens. *Poult Sci* 1997; 76 (5):689-695.
2. Bachorik PS. 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; 2000. p. 245-64.
3. Demacker P. *et al.* Five methods for determining low-density lipoprotein cholesterol compared. *Clin Chem* 1984; 30 (11):1797-800.
4. Fei H. *et al.* Evaluation of two different homogeneous assays for LDL-cholesterol in lipoprotein-X-positive serum. *Clin Chem* 2000; 46 (9):1351- 1356.
5. Hermier D. *et al.* Alterations in plasma lipoproteins and apolipoproteins associated with estrogen-induced hyperlipidemia in the laying hen. *Eur J Biochem* 1989; 184 (1):109-118.
6. Kerscher L. *et al.* Precipitation methods for the determination of LDL-cholesterol. *Clin Biochem* 1985; 18 (2):118-125.
7. Liu X. *et al.* Effect of plant sterol-enriched diets on plasma and egg yolk cholesterol concentrations and cholesterol metabolism in laying hens. *Poult Sci* 2010; 89 (2):270-275.
8. Miller WG. *et al.* Performance of four homogeneous direct methods for LDL-cholesterol. *Clin Chem* 2002; 48 (3):489-498.
9. Nauck M, Russell WG and Rifai N. Methods for Measurement of LDL-Cholesterol: A Critical Assessment of Direct Measurement by Homogeneous Assays versus Calculation. *Clin Chem* 2002; 48 (2):236-254.
10. Newsholme EA, Leech AR. *Bioquímica Médica*. 1 ed. Madrid, España: Interamericana McGraw-Hill; 1987.
11. Onbasilar EE, Aksoy FT. Stress parameters and immune response of layers under different cage floor and density conditions. *Livest Prod Sci*. 2005; 95:255-263.
12. Palacios M. *et al.* Recomendaciones para la determinación de la concentración en suero de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad. *Quim Clin* 1999; 18 (1):33-40.
13. Rifai N. *et al.* Measurement of low-density lipoprotein cholesterol in serum: a status report. *Clin Chem* 1992; 38 (1):150-160.
14. Shi SR, Gu H, Chang LL, Wang ZY, Tong HB, Zou JM. Safety evaluation of daidzein in laying hens: Part I. Effects on laying performance, clinical blood parameters, and organs development. *Food Chem Toxicol*. 2013; 55:684-688.

15. Usui S, Kakuuchi H, Okamoto M, Mizukami Y, Okazaki M. Differential reactivity of two homogeneous LDL cholesterol methods to LDL and VLDL subfractions, as demonstrated by ultracentrifugation and HPLC. Clin Chem 2002; 48 (11):1946-1954.
16. Walzem RL. *et al.* Estrogen induction of VLDL Assembly in Egg-Laying hens. J Nutri 1999; 129 (2):467S-72S.
17. Yin JD. *et al.* Effects of dietary conjugated linoleic acid on the fatty acid profile and cholesterol content of egg yolks from different breeds of layers. Poult Sci 2008; 87 (2):284–290.
18. Yue HY. *et al.* Effects of dietary oxidized oil on laying performance, lipid metabolism, and apolipoprotein gene expression in laying hens. Poult Sci 2011; 90 (8):1728-1736.
19. Zhao L, Zhang X, Cao F, Sun D, Wang T, Guibin W. Effect of dietary supplementation with fermented Ginkgo-leaves on performance, egg quality, lipid metabolism and egg-yolk fatty acids composition in laying hens Livest Sci. 2013; 155:77-85.