

Trabajos de Investigación

VARIACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA SEGÚN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE MICROSOMAS HEPÁTICOS DE AVES

MC Lozano¹, B Iglesias², P Leaden², M Marmunti²,
A Palacios², V Piergiacomini^{2,3}

¹Becaria JICA. Departamento de Farmacia,
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

²Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata,

³Profesional de Apoyo, Cat. Principal, Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia de Buenos Aires (CIC)

RESUMEN: En este trabajo se estudió la composición de ácidos grasos de microsomas hepáticos de pato, codorniz y pollo y se analizó su comportamiento durante la peroxidación lipídica. La composición de ácidos grasos varió entre las diferentes especies, los microsomas de pato presentaron mayor contenido de ácidos grasos polinosaturados, principalmente ácidos araquidónico (C20:4 n6) y docosahexahenóico (C22:6 n3), mientras que en codornices y pollos el contenido de ácido palmitoléico (C16:1 n7) y ácido oléico (C18:1 n9) fue significativamente mayor. Se incubaron microsomas hepáticos de las diferentes especies en un sistema no enzimático en presencia de ascorbato-Fe²⁺, solo los microsomas obtenidos de hígado de pato mostraron un incremento en la quimioluminiscencia (emisión lumínica), mientras que el análisis de la composición de ácidos grasos permitió observar correlativamente una disminución significativa de los ácidos grasos polinosaturados. Los resultados muestran una estrecha relación entre la composición microsomal de ácidos grasos (porcentaje de ácidos grasos polinosaturados) y los valores de quimioluminiscencia obtenidos durante la lipoperoxidación in vitro. De las muestras evaluadas solo los microsomas de pato resultan sensibles a la lipoperoxidación, a diferencia de los de pollos y codornices. Estos resultados son similares con los de otros trabajos en los que se informa que las diferentes especies aviares poseen una variada susceptibilidad a tóxicos que tienen la habilidad de generar radicales libres (por ejemplo, la aflatoxina B1).

PALABRAS CLAVE: Peroxidación lipídica, Microsomas, Ácidos grasos, Aves, Aflatoxina B1

LIPID PEROXIDATION VARIATION ACCORDING TO FATTY ACIDS COMPOSITION OF HEPATIC MICROSOMES OBTAINED FROM POULTRY SPECIES

ABSTRACT: Studies were done to analyze the fatty acid composition and sensitivity to lipid peroxidation of hepatic microsomes from duck, quail and chicken. Fatty acid profiles differed among species. Duck microsomes had significantly higher content of polyunsaturated fatty acids, especially arachidate (C20:4 n6) and docosahexahenoate (C22:6 n3). Palmitoleate (C16:1 n7) and oleate (C18:1 n9) was significantly higher in quails and ducks. Lipid peroxidation were induced with ascorbate-Fe²⁺ and determined by the increase in light emission through chemiluminescence. Only duck membranes were successfully peroxidized. Moreover, duck microsomes decreased its polyunsaturated fatty acids content after lipid peroxidation. The results indicate a close relationship between tissue sensitivity to lipid peroxidation in vitro and polyunsaturated fatty acid concentration. Duck microsomes were very sensitivity to lipid peroxidation in contrast to chicken and quail microsomes. This coincides with the wide in vivo susceptibility reported for substances that have the ability of originating free radicals (for example aflatoxine B1).

KEY WORDS: Lipid peroxidation, Microsomes, Fatty acids, poultry, aflatoxine B1

Fecha de recepción: 05/11/05

Fecha de aprobación: 02/02/07

Dirección para correspondencia: V Piergiacomini, Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, CC 296 (B1900AVW) Argentina. Tel/Fax: +54-221-4257980

E-mail: vpier@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La degeneración oxidativa de los ácidos grasos insaturados presentes en las membranas biológicas puede iniciarse por la presencia de radicales libres y posteriormente continuar con una reacción en cadena que conduce a peroxidación lipídica (1). Aunque la reducción biológica de oxígeno molecular es la principal vía para el desarrollo de radicales libres, éstos pueden también formarse durante el metabolismo de químicos carcinogénicos (2). Recientemente ha sido confirmada la capacidad de la aflatoxina B1 para generar este tipo de reacciones (3). La aflatoxina B1 es una micotoxina fuertemente hepatotóxica producida por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Estos hongos pueden contaminar alimentos de consumo animal y bajo condiciones ambientales apropiadas producir la mencionada toxina (4). Las aves son especies con una variada susceptibilidad a la aflatoxina B1. Los patos y pavos son altamente susceptibles, los pollos particularmente resistentes y las codornices presentan una susceptibilidad intermedia (5). Es probable que además de la activación metabólica de la aflatoxina B1 (6) existan otros factores que expliquen esta diversa susceptibilidad. Se sabe que la cantidad de ácidos grasos polinosaturados de cadena larga presentes en las membranas biológicas de diferentes especies pueden variar, lo cual las haría más o menos susceptibles a la peroxidación (7). Posiblemente existen diferencias en la peroxidación y perfil de ácidos grasos de membranas biológicas entre diversas especies de aves, lo que haría que la susceptibilidad a agentes prooxidantes, como la aflatoxina B1, varíe *in vivo*. El propósito de este estudio es establecer potenciales diferencias entre aves (patos, codornices y pollos) en la composición de ácidos grasos de membranas microsomales hepáticas, así como la sensibilidad de estas fracciones a la lipoperoxidación *in vitro* iniciada por la adición de ascorbato en presencia de oxígeno e hierro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de microsomas

Se seleccionaron tres aves adultas de cada una de las siguientes especies: pollo de engorde (*Gallus domesticus*), codorniz japonesa (*Coturnix japonica*) y pato (*Cairina moschata*). Luego de sacrificar los animales, por dislocación cervical, se remueven los hígados, se pesan y se cortan en pequeños trozos, se lavan con solución 0,15 M NaCl. La homogeneización se realiza con solución 0,25 M sacarosa, 0,01M Tris HCl pH 7,4. Este procedimiento se lleva a cabo con un homogeneizador Potter Elvehjem. Estos homogeneizados se centrifugan a 3000 rpm 10 min, obteniéndose un *pellet* que contendrá células rotas, núcleos y un sobrenadante que posteriormente se centrifuga a 13.500 rpm 10 min. Se obtiene un *pellet* de

mitocondrias y un sobrenadante postmitocondrial que se aplica a columnas de Sepharosa 4B (buffer de elusión Tris HCl 0,01 M, pH 7,4) para separar material particulado (microsomas) de la fracción soluble (citosol). Las operaciones se realizan a 4 °C.

Determinación de proteínas

Se determinan según el método descripto por Lowry y col.(10)

Peroxidación de microsomas

La peroxidación de las membranas se realiza en un sistema *in vitro*, no enzimático a 37 °C con buffer fosfato 0,01M pH 7,4, ascorbato 0,4 mM, volumen final 2 ml, se utilizan microsomas control a los que no se les agrega ascorbato. La emisión lumínica se determina durante 180 minutos. La quimioluminiscencia se mide cada 10 minutos y es registrada como cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo líquido Packard 1900 TR.

Separación de lípidos de membrana

Los lípidos de las diferentes muestras se extraen por el método de Folch (cloroformo metanol 2:1 v/v) (11) con BHT 0,01 % como antioxidante.

Interesterificación y análisis del contenido de ácidos grasos por cromatografía gaseosa computarizada

Los ácidos grasos se transmetilan con F₃B en metanol a 65 °C por 3 h. Los ésteres de ácidos grasos se analizan en un cromatógrafo de gas (Shimadzu Kyoto, Japón) equipado con una columna (1.80m x 4 mm i.d.) GP 10 % DEGS-PS on 80/100 Supelcoport. Nitrógeno se usa como gas carrier. Las temperaturas del inyector y el detector son mantenidas a 250 °C, la temperatura de la columna a 200 °C. Los picos obtenidos se comparan con los tiempos de retención de los standard. El índice de instauración (UI) fue calculado de acuerdo a: $UI = \sum (\text{porcentaje de ácido graso})^2$ (número de dobles enlaces).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados a través de la prueba *t*-Student para determinar diferencias significativas entre las fracciones microsomales peroxidadas y las no peroxidadas. Igualmente fue desarrollado un ANOVA para reconocer la presencia de diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos entre especies.

RESULTADOS

Composición de ácidos grasos de microsomas no peroxidados

En los microsomas hepáticos no sometidos a peroxidación *in vitro* de las tres especies de

aves evaluadas, existe una proporción similar de ácidos grasos saturados (42 - 47 %) y de no saturados (53 -56 %) (Tabla 1). Sin embargo, si se analiza el grupo de los ácidos grasos no saturados, puede observarse que el pato posee mayor porcentaje de ácidos polienólicos, mientras que el pollo y la codorniz tienen mayormente ácidos monoenólicos. Así, las membranas microsomales hepáticas de los patos presentan una proporción significativamente mayor de ácidos grasos polinosaturados, en especial C20:4 n6 y C22:6 n3 con respecto a las de codornices y pollos (Figura 1). Por lo tanto el UI de los lípidos de las membranas microsomales de patos es superior en un 34 y 41 % en relación con el de codornices y pollos respectivamente, diferencia con significancia estadística (Figura 2). Como se mencionó otra diferencia significativa observada se aprecia en el porcentaje de ácido mono-insaturados palmitoléico (C16:1 n7) y oléico (C18:1 n9), que fue mayor en las membranas microsomales de codorniz y pollo en relación con las de pato (Figura 3).

Composición de ácidos grasos en microsomas peroxidados

Una vez sometidos a peroxidación *in vitro* los microsomas hepáticos de pato, se observó que la proporción de ácidos grasos polinosaturados con respecto al control de la misma especie disminuyó en un 54 %. Esta variación significativa ocurrió particularmente por una reducción del 38 y 73 % en la proporción de los ácidos oléico (18:1 n9) y araquidónico (20:4 n6), respectivamente. Así mismo en esta especie, el UI disminuyó un 39 % en los microsomas de los animales sometidos a peroxidación con respecto a los microsomas control (Tabla 1). En las muestras evaluadas de pollos y codornices no se observaron diferencias significativas en la proporción de ácidos grasos entre los microsomas control y los que fueron peroxidados.

Quimioluminiscencia

La diferencia en la peroxidación de las membranas microsomales de pato fue estadísticamente significativa al comparar las muestras control y las incubadas en presencia de ascorbato. La emisión luminica fue 3,5 veces superior en los microsomas peroxidados de los patos, mientras que en los de codornices y pollos no se presentaron variaciones importantes en la quimioluminiscencia entre las muestras control y las peroxidadas (Figura 4).

DISCUSIÓN

Esta investigación evaluó la susceptibilidad a la peroxidación lipídica presente en las membranas microsomales hepáticas de pato, codorniz y pollo; así como el perfil de ácidos grasos de estas fracciones y su variación debida a la peroxidación

inducida por ascorbato y Fe⁺⁺.

A pesar de que la composición de ácidos grasos insaturados de los microsomas hepáticos control de las aves evaluadas en este estudio fue similar, se observaron diferencias en el contenido de los ácidos grasos polinosaturados entre especies. Los patos presentaron 2 y 2,8 veces mayor contenido de estos ácidos que pollos y codornices, respectivamente. Esto obedece a la presencia de un mayor contenido de ácido araquidónico (C20:4 n6) y docosahexanoico (C22:6 n3) en las membranas microsomales de los patos. A pesar de no ser regla general (10), algunos estudios han demostrado que el grado de insaturaciones presentes en los fosfolípidos de membrana determina el nivel de lipoperoxidación de las mismas (11). Los resultados de la presente investigación respaldan esta hipótesis ya que un contenido significativamente mayor de ácidos grasos polinosaturados presente en las membranas microsomales hepáticas de patos, en relación con codornices y pollos, está acompañado por una mayor emisión luminica de los microsomas control con respecto a los sometidos a peroxidación. En concordancia con estos hallazgos, en los microsomas de pollo y codorniz, se observa un mayor contenido de ácidos monoinsaturados, menos susceptibles de ser peroxidados.

Adicionalmente, se observa una disminución significativa en el contenido de ácidos grasos polinosaturados de los microsomas peroxidados con respecto a los control, lo cual se relaciona directamente con la lipoperoxidación observada en esta especie. Hallazgos similares han sido reportados por Gutierrez *et al.* (12) quienes también demuestran una disminución en el contenido de C20:4 n6 y C22:6 n3 en membranas hepáticas de pato peroxidadas, con respecto a las no peroxidadas.

En las membranas biológicas de diferentes especies de aves se ha reportado un alto porcentaje en el contenido de C18:1 n9 (12,13), igualmente predominante en los microsomas hepáticos aquí evaluados. Sin embargo, existe un contenido significativamente menor de este ácido graso en los microsomas de patos. La presencia predominante de este ácido graso mono-insaturado en las fracciones hepáticas de codornices y pollos puede contribuir con la ausencia de lipoperoxidación registrada en los microsomas de estas especies, situación opuesta a lo ocurrido con los patos.

Las especies reactivas de oxígeno con capacidad de inducir la lipoperoxidación, son en su mayoría originadas a partir de la reducción de oxígeno molecular (14), sin embargo, durante el metabolismo de ciertos xenobióticos, pueden originarse estos productos (15). Por lo tanto, los resultados de esta investigación podrían reflejar la acción de sustancias tóxicas con capacidad de provocar estrés oxidativo.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas hepáticos de pato, pollo y codorniz.

Ácidos grasos	Pato		Pollo		Codorniz	
	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado
C16:0	27,29±1,26	30,93±2,11	32,30±0,69	31,94±1,88	28,37±1,47	28,07±2,07
C16:1 n7	2,23±0,3	1,65±1,21	6,03±1,28	5,98±0,86	5,07±1,19	5,08±0,72
C18:0	19,56±2,25	24,44±5,35	13,83±1,28	14,67±2,00	14,02±2,62	15,18±3,43
C18:1 n9	26,05±1,96	31,48±2,45	36,30±1,16	38,35±3,66	43,09±4,19	43,81±5,05
C18:2 n6	8,01±0,94	5,00±1,09*	6,22±0,94	5,52±1,62	5,3±1,43	5,29±0,64
C18:3 n3	0,35±0,18	0,63±0,32	0,57±0,29	0,28±0,33	0,20±0,28	0,14±0,15
C20:4 n6	11,66±1,97	3,17±1,39*	2,39±1,06	2,39±0,32	1,90±0,17	1,43±0,23
C22:6 n3	4,86±0,62	2,7±1,89	2,35±1,34	0,87±0,62	0,72±0,35	0,87±0,39
Saturados	46,85±2,87	55,36±4,85	46,13±1,41	46,62±3,86	42,39±3,70	43,25±5,44
Monocilénicos	28,28±2,02	33,13±3,49	42,34±2,17	44,32±4,49	48,16±3,67	48,88±5,62
Polinsaturados	24,88±1,82	11,5±1,72*	11,53±1,41	9,06±2,72	8,12±1,99	7,74±0,29
Total de no saturados	53,16±2,87	44,63±4,86	53,87±1,41	53,39±3,86	56,28±5,57	56,63±5,6
Saturados/No saturados	0,89±0,09	1,27±0,23	0,86±0,05	0,88±0,14	0,77±0,15	0,78±0,17
UI	121,15±9,28	73,91±10,12*	80,16±5,40	70,99±6,72	71,29±9,2	70,87±4,79

Los datos muestran el porcentaje del contenido total de ácidos grasos, expresados como el promedio ± D.S. de 3 individuos. Las diferencias significativas entre el grupo control y el peroxidado de cada una de las especies estudiadas se indica por * (P<0.05).

Se ha reconocido que la aflatoxina B1, toxina ante la cual las especies presentan una variada susceptibilidad *in vivo*, es capaz de ocasionar la formación de lipoperóxidos (3, 16, 17). En esta investigación se observa que los microsomas hepáticos de pato, especie altamente sensible a la aflatoxina B1, tienen una mayor tendencia a ser lipoperoxidados en relación con los de pollo y codorniz, especies con mayor resistencia a la mencionada toxina.

Es posible que el diferente perfil de ácidos grasos de las especies y su capacidad de ser peroxidados sea un elemento clave en determinar la susceptibilidad a sustancias tóxicas que, como la aflatoxina B1, tienen la capacidad de generar estrés oxidativo. En futuras investigaciones, deberían ser evaluados otros mecanismos de protección contra radicales libres presentes en

diferentes especies de aves que puedan estar contribuyendo con la variada susceptibilidad a la lipoperoxidación. Igualmente, podrían emplearse reconocidas sustancias tóxicas generadoras de radicales libres para inducir la lipoperoxidación de membranas y de esta manera elucidar con mayor certeza el mecanismo de acción de este tipo de químicos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Agencia Internacional de Cooperación del Japón (JICA).

BIBLIOGRAFÍA

1. Minoti G, Aust SD. Redox cycling iron and lipid peroxidation. *Lipids*. 1992; 27: 219-226.

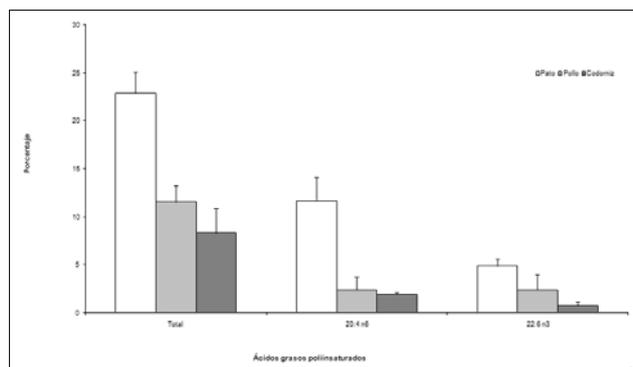


Figura 1. Composición de ácidos grasos poliinsaturados de microsomas hepáticos control de diferentes aves. Los resultados se expresan como el promedio \pm D.S. de tres individuos. Las diferencias estadísticamente significativas entre las aves están indicadas por diferentes letras ($P < 0.05$).

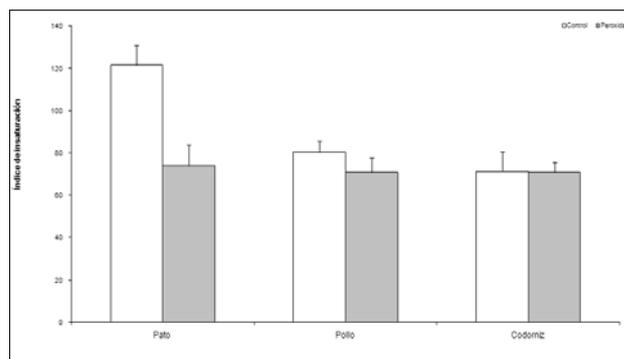


Figura 2. Índice de insaturación (UI) de los lípidos de membranas microsomales hepáticas peroxidadas y no peroxidadas de diferentes aves. Los resultados se expresan como el promedio \pm D.S. de tres individuos. Las diferencias estadísticamente significativas entre las membranas control y las peroxidadas se indican por * y las presentes entre los microsomas control de pato, pollo y codorniz se indican por letras diferentes ($P < 0,05$).

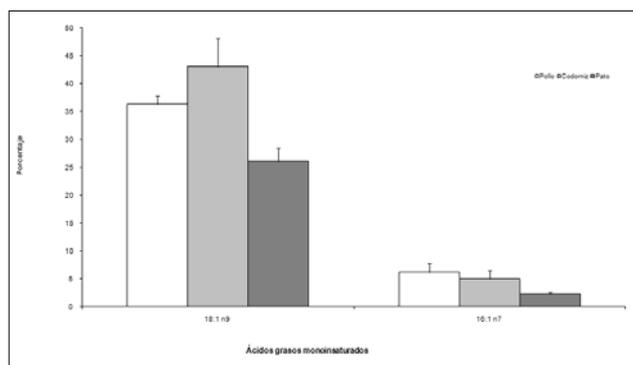


Figura 3. Composición de ácidos grasos monoinsaturados de microsomas hepáticos control de diferentes aves. Los resultados se expresan como el promedio \pm D.S. de tres individuos. Las diferencias estadísticamente significativas entre las aves están indicadas por diferentes letras ($P < 0.05$).

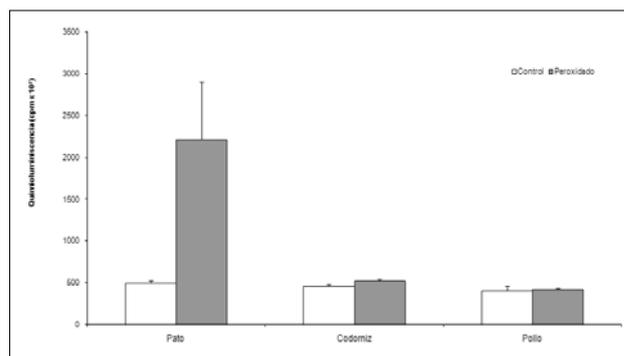


Figura 4. Peroxidación lipídica de microsomas hepáticos de diferentes aves. La quimioluminiscencia fue determinada durante un período de 180 minutos y registrada como cuentas por minuto (cpm) cada 10 minutos. La suma del total de quimioluminiscencia fue usada para calcular cpm/mg de proteína. Los resultados se expresan como el promedio \pm D.S. de tres individuos. Las diferencias estadísticamente significativas entre el control y los peroxidados están indicadas por * ($P < 0,05$).

2. Pitot H, Dragan Y. Chemical carcinogenesis. En: Cassarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons, Ed. Klaassen C.D. Mc Graw Hill. USA. 2001; p 241-319.

3. Towner RA, Qian SY, Kadiiska MB, Mason RP. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. Free Radical Biol Med. 2003; 35:1330-1340.

4. Hussein SH, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology. 2001;167:101-134.

5. Leeson S, Diaz GJ, Summers JD. Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins.. University Books, Guelph, Ontario. 1995; p 249-280.

6. Guengerich FP, Johnson WW, Shimada T, Ueng YF, Yamazaki H, Langouet S. Activation and detoxication of aflatoxin B1. Mutat Res. 1998; 402:121-128.

7. Gutiérrez AM, Reboredo GR, Arcemis CJ, Catalá A. Non enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria isolated from liver and heart of pigeon and rat. Int J Biochem Cell Biol. 2000; 32:79-79.

8. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Fandall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
9. Folch J, Lees N, Sloane Stanley GA. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226:497-509.
10. Rosa D, Catalá A. Fatty acids profiles and non enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from bovine liver, kidney, lung and heart. *Arch Physiol Biochem.* 1998; 106:33-37.
11. Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry.* 1994; 33:4449-4453.
12. Gutiérrez AM, Reboredo GR, Catalá A. Fatty acids profiles and lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from liver, heart and brain of *Cairina moschata*. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34:605-612.
13. Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Ledo F, Gredilla R, Barja G. Herat fatty acid unsaturation and lipid peroxidation and aging rate are lower in the canary and parakeet than in the mouse. *Age Clin Exp Res.* 1999; 11:44-49.
14. Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1362:116-127.
15. Joseph PD. *Molecular Toxicology.* Oxford University Press. New York. 1997; p 336.
16. Shen HM, Ong CN, Shi CY. Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B₁-induced cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicology.* 1995; 99:115-