

## Cambios en la composición lipídica de microsomas hepáticos de rata inducidos por la dieta

Por V. Ruíz-Gutiérrez, A. Pérez Espinosa y F. J. García Muriana

Instituto de la Grasa y sus Derivados (C.S.I.C.) Apartado 1078. 41012-Sevilla.(España)

### RESUMEN

#### Cambios en la composición lipídica de microsomas hepáticos de rata inducidos por la dieta

Se realiza un estudio comparativo para determinar el efecto sobre los microsomas del hígado de ratas tras ser alimentadas con aceites de oliva virgen (10%) o pescado (10%), suplementados o no con colesterol (1%). Se emplearon ratas machos Wistar recién destetadas, y la composición en ácidos grasos, desaturados y microviscosidad (fluidez de membrana) fueron determinados. Por el conjunto de resultados obtenidos en este trabajo podemos deducir que la composición y propiedades de las membranas microsomas hepáticas varían dependiendo de la alimentación. Destaca el incremento de la rigidez y el descenso significativo de la actividad desaturasa  $\Delta 6$  de los microsomas hepáticos de los animales alimentados con las dietas ricas en colesterol.

**PALABRAS-CLAVE:** Ácido graso (composición en) — Hígado — Microsomas — Rata.

### SUMMARY

#### Changes in the lipid composition of rat hepatic microsomes induced by the diet

The effect on the hepatic microsomes from rats fed with either virgin olive oil (10%) or fish oil (10%), with or without added cholesterol (1%), has been studied. The fatty acid composition, desaturase activities and microviscosity (membrane fluidity) using male Wistar rats after weaning were determined. The results show that the fatty acid composition and other properties of the hepatic microsomes change with the diet. After cholesterol feeding, an increase in membrane microviscosity and a decrease in the activity of  $\Delta 6$  desaturase were observed.

**KEY-WORDS:** Fatty acid (composition in) — Liver — Microsomes — Rat.

## 1. INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados procedentes de los aceites marinos (familia n-3) tienen un efecto antiaterogénico al reducir la viscosidad de la sangre por aumento de la deformabilidad de los glóbulos rojos (Herold, 1986). Esto permite una mejora en el abastecimiento de oxígeno a tejidos irrigados por microcapilares. Además, el aceite de pescado ocasiona una moderada reducción de la presión arterial y aumenta la relajación endotelial de las arterias coronarias (Kromhout, 1985).

Por otro lado, los ácidos grasos monoinsaturados, que se encuentran por ejemplo en el aceite de oliva, tienen un efecto hipocolesterolemico y se relacionan con una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares

(Mensik, 1987). Así, en estudios anteriores hemos observado un descenso de los niveles de colesterol libre en el corazón de animales alimentados con aceite de oliva virgen (Ruíz-Gutiérrez, 1990a). Este descenso fue más efectivo que cuando se utilizaron aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-6 (aceites de maíz o de soja), y similar al conseguido con aceite de pescado. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos que indican una reducción en el nivel de lipoproteínas de baja densidad asociadas a colesterol, tras la ingestión de aceite de oliva en la dieta de humanos (Mensik, 1987; Mattson, 1985). Por otra parte, se ha visto que los ácidos grasos de la familia n-3 tienen efectos de otro tipo. Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de los ácidos eicosapentaenoico o docosahexaenoico en los fosfolípidos de membranas celulares afectan a las propiedades físicas de las mismas (Field, 1987). Esto se produce por modificación del microambiente en el que estas proteínas de membrana (receptores, transportadores y/o enzimas) se encuentran (Deuel, 1976; Brenner, 1984). El presente trabajo ha sido realizado para obtener mayor información acerca del efecto que producen los aceites de oliva virgen y pescado, en presencia de colesterol, sobre la composición lipídica de las membranas microsomas del hígado de animales de experimentación. Además, se han estudiado las actividades de algunas enzimas del metabolismo lipídico, concretamente las desaturasas  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$ . Finalmente se estudió el efecto del aporte de colesterol en la dieta sobre la fluidez de membranas mediante la técnica de polarización de fluorescencia.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Animales y dietas

Se utilizaron ratas Wistar machos (Iffa Credo, Lyon, Francia) de tres semanas de edad. Después de una semana de aclimatación se dividieron en cuatro grupos de seis ratas, distribuidas de la siguiente forma:

- Grupo alimentado con un 10% de aceite de oliva virgen.
- Grupo alimentado con un 10% de aceite de oliva virgen +1% de colesterol.
- Grupo alimentado con un 10% de aceite de pescado.
- Grupo alimentado con un 10% de aceite de pescado + 1% de colesterol.

La temperatura del animalario fué de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , y el ciclo luz-oscuridad de 12 horas. La composición porcentual de la dieta base fué: 20,8% de caseína de leche, 19,6% de almidón de maíz, 37% de glucosa, 5,3% de celulosa, 6,3% de mezcla de minerales y 1,0% de vitaminas (PANLAB, Barcelona, España). La composición de los dos aceites de suplementación viene dada en la tabla I. Como

**Tabla I. Composición en ácidos grasos de las grasas de la dieta**

Ácidos grasos, %	AO	AP
14:0	-	3.8
16:0	10.4	13.9
16:1(n-7)	0.9	15.1
18:0	3.0	0.9
18:1(n-9)	77.8	26.2
18:2(n-6)	5.9	5.1
18:3(n-3)	0.6	0.2
18:4(n-3)	-	2.5
20:0	0.4	-
20:1(n-9)	0.3	2.4
20:2(n-6)	-	1.4
20:3(n-6)	-	0.4
20:4(n-3)	-	0.6
20:5(n-3)	-	13.8
22:4(n-6)	-	0.3
22:5(n-3)	-	0.4
22:6(n-3)	-	12.7
24:0	0.4	-
Otros	0.3	0.3

AO = aceite de oliva virgen.

AP = aceite de pescado.

Una dieta libre de grasa es suplementada con el 10% de aceite de oliva virgen o de pescado.

Los resultados se expresan en porcentaje total de ésteres metílicos de ácidos grasos.

se puede observar, hay una gran diferencia en la concentración del ácido palmitoleico (16:1(n-7)), que en el aceite de pescado es del 15,1%, mientras que en el aceite de oliva virgen no excede del 1%. Con el ácido mirístico (14:0) sucede lo mismo. Sin embargo, la gran diferencia entre ambos aceites viene dada por la alta concentración del ácido oleico (18:1(n-9)) en el aceite de oliva virgen, y la alta concentración de 20:5(n-3) y 22:6(n-3) en el aceite de pescado. Las dietas experimentales y el agua se suministraron "ad libitum" y todas las dietas se prepararon semanalmente y se conservaron a  $4^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{N}_2$ . Después de 6 semanas de alimentación, los animales se sacrificaron por decapitación. Los hígados se extrajeron inmediatamente, se pesaron, y se homogeneizaron en una solución amortiguadora conteniendo 10mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,25M sacarosa, 20mM EGTA y 5mM DTT. Para la trituración se usó un homogenizador Potter-Elvehjem. La preparación de los microsomas se realizó por el mismo método que se describe en anteriores trabajos (Muriana, 1991). La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry *et al.* (Lowry, 1951).

## 2.2 Medidas enzimáticas

Las actividades de las desaturasas  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  se midieron de acuerdo con el procedimiento descrito en trabajos previos (Ruíz-Gutiérrez, 1992). La  $\Delta 9$  desaturasa es una enzima que cataliza la conversión del ácido palmítico a ácido palmitoleico. La  $\Delta 6$  desaturasa convierte el ácido linoleico en ácido  $\gamma$ -linolénico; mientras que la  $\Delta 5$  desaturasa cataliza la conversión del ácido eicosatrienoico a ácido araquidónico. En función de la dieta es posible estimular o deprimir de distinta manera la actividad de cada una de estas enzimas, modulando la composición lipídica de las membranas.

## 2.3 Análisis de lípidos

Los lípidos de los microsomas hepáticos fueron extraídos por el método de Folch *et al.* (Folch, 1957). La composición en ácidos grasos se determinó por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5710 A, equipado con una columna capilar de sílice fundida Supelcowax 10 (60m x 0,25mm) (Ruíz-Gutiérrez, 1990b).

## 2.4 Estudios de polarización

Las medidas de polarización de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo 650-40, utilizando como sonda 1,6-difenilhexatrieno (Muriana, 1991). La longitud de onda de excitación fue de 360nm y la de emisión de 440nm. A partir de la anisotropía de fluorescencia se obtuvo el parámetro de orden,  $S$  (Melchior, 1980).

## 2.5 Análisis estadístico

Todos los datos de las tablas vienen expresados por la media  $\pm$  desviación típica, siendo el nivel de significación de  $p < 0,05$ . La diferencia entre las distintas dietas se ha realizado mediante el test t de Student.

## 3. RESULTADOS

Los datos relativos al peso de los animales, al peso de los hígados y a la ingesta de los alimentos, aparecen en la tabla II. En ellos podemos observar como la ingestión de alimentos es similar en los distintos grupos. Sin embargo, se registra un descenso en el peso de los animales que tenían el suplemento de aceite de pescado en la dieta. En cuanto al peso del hígado, se puede ver que éste aumenta ligeramente en los animales a los que se les ha suministrado una dieta con aporte de colesterol.

La tabla III se refiere a la composición en ácidos grasos de los microsomas del hígado de las ratas alimentadas con las distintas dietas. Se puede observar que los microsomas de animales alimentados con aceite de oliva virgen tienen una gran cantidad de 18:1 (n-9 + n-7). Este hecho se debe sin duda a la abundancia de éste ácido graso en el aceite de oliva virgen (tabla I). Sin embargo, en los animales que están alimentados con aceite de pescado, los microsomas hepáticos presentan una gran acumulación de 22:6(n-3), y al mismo tiempo de ácido eicosapentaenoico (20:5 (n-3)), este último ausente en el

Tabla II. Efectos de la dieta sobre el peso de los animales, peso del hígado y consumo de alimentos

	AO	AO+Coolesterol	AP	AP+Coolesterol
Peso de los animales <sup>a</sup> (g)	210±7.1*	212±8.3*	174±5.5**	175±6.3**
Consumo de alimentos (g/día)	16.9±1.1	17.2±1.2	17.3±1.4	16.5±1.0
Peso del hígado (g)	11.0±1.2	11.8±1.2	8.8±1.1	9.4±1.1

Los resultados se expresan por la media ± la desviación típica de seis animales por grupo.

Diferencias significativas p<0.05\*, p<0.01\*\*.

<sup>a</sup> Indica la diferencia de pesos entre el final y el comienzo del tratamiento.

Tabla III. Composición en ácidos grasos de microsomas de hígado de ratas alimentadas con distintas dietas

	AO	AO+Coolesterol	AP	AP+Coolesterol
14:0	1.15±0.32	0.94±0.22	1.66±0.31	1.13±0.27
16:0	17.86±2.25	17.73±3.26	22.56±2.77	22.42±3.33
16:1(n-7)	1.70±0.27	1.35±0.33	1.05±0.31	1.54±0.24
16:1(n-5)	0.23±0.09	0.44±0.13	0.17±0.08	0.19±0.11
18:0	15.85±1.55	15.97±1.44	27.42±2.33**	27.28±3.44**
18:1(n-9)	23.58±3.44***	27.37±4.33***	6.59±1.43**	6.47±0.57**
18:1(n-7)	1.67±0.23*	1.17±0.33*	0.34±0.01*	0.30±0.05*
18:1(n-5)	0.42±0.12	0.44±0.01	0.22±0.05	0.31±0.03
18:2(n-6)	6.85±1.13*	9.32±1.17*	1.52±0.07**	1.33±0.15***
18:3(n-3)	0.77±0.32	0.57±0.02	0.59±0.01	0.59±0.02
20:0	0.25±0.02	0.24±0.02	0.36±0.12	0.22±0.13
20:1(n-9)	0.15±0.02	0.20±0.02	0.16±0.12	0.22±0.13
20:1(n-7)	0.32±0.07	0.33±0.12	0.41±0.07	0.33±0.05
20:4(n-6)	19.83±3.22	15.02±1.13	6.85±0.21***	4.68±0.14***
20:5(n-3)	-	-	6.65±0.37**	7.08±0.32*
22:5(n-3)	4.14±1.22	5.83±1.03	4.27±1.22	11.33±2.76
22:6(n-3)	4.64±1.22*	2.51±0.22*	17.27±1.22***	14.36±2.76**
18:2/20:4	0.34	0.62	0.22	0.29
Σsat	35.11	34.88	52.00	51.05
Σmonoinsat	28.07	31.30	8.92	9.36
Σpoliinsat	36.23	33.25	37.15	39.37

Los resultados se expresan en medias ± desviación típica del porcentaje total de ésteres metílicos de ácidos grasos.

Diferencias significativas p<0.05\*, p<0.01\*\*, p<0.001\*\*\*.

Tabla IV. Actividades desaturadas<sup>a</sup> y parámetro de orden en microsomas hepáticos de ratas alimentadas con distintas dietas

	AO	AO+Coolesterol	AP	AP+Coolesterol
Δ9 desaturasa	400.4±17.8	2200.6±23.1***	1200.1±11.2	2200.9±34.5***
Δ6 desaturasa	1900.9±12.1	600.1±15.3**	1500.3±84.9	200.7±5.6***
Δ5 desaturasa	1500.1±14.4	1100.9±14.9**	1100.1±23.2	1300.7±11.2***
S	0.202±0.006	0.230±0.009**	0.188±0.005	0.213±0.008**

<sup>a</sup>Actividad expresada en pmol.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>.

Los resultados se corresponden a la media ± la desviación típica de seis animales por grupo. Diferencias significativas p<0.01\*\*, p<0.001\*\*\*.

grupo de animales que recibieron una dieta con aceite de oliva virgen. Por otra parte, los niveles de 18:2(n-6) y 20:4(n-6) son mucho más altos en los animales que recibieron aceite de oliva virgen que en los que recibieron aceite de pescado. Esto provoca un valor significativamente menor del cociente (n-6)/(n-3) en las ratas alimentadas con aceite de pescado. Lo cual coincide con resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en un trabajo anterior (Ruíz-Gutiérrez, 1990b). En la tabla IV se muestran las actividades de las enzimas desaturasas, donde se aprecian unos valores inferiores de la  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  tras el tratamiento con aceite de pescado cuando se compara con el aceite de oliva virgen. En presencia de coles-

terol, esta dinámica sólo se mantiene con la desaturasa  $\Delta 6$ , que además disminuye drásticamente su actividad. Los resultados relativos a la fluidez de membrana se expresan por el parámetro  $S_{DPH}$ . Este parámetro (menor cuanto mayor es la fluidez de membrana) indica que la microviscosidad de los microsomas de animales que se alimentaron con aceite de pescado es significativamente menor que la que presentan los animales alimentados con aceite de oliva virgen. Sin duda, la composición en ácidos grasos de los microsomas hepáticos es determinante en esta propiedad. La figura 1 representa de una forma gráfica la probable composición de las membranas microsomas de los animales tratados en este estudio.

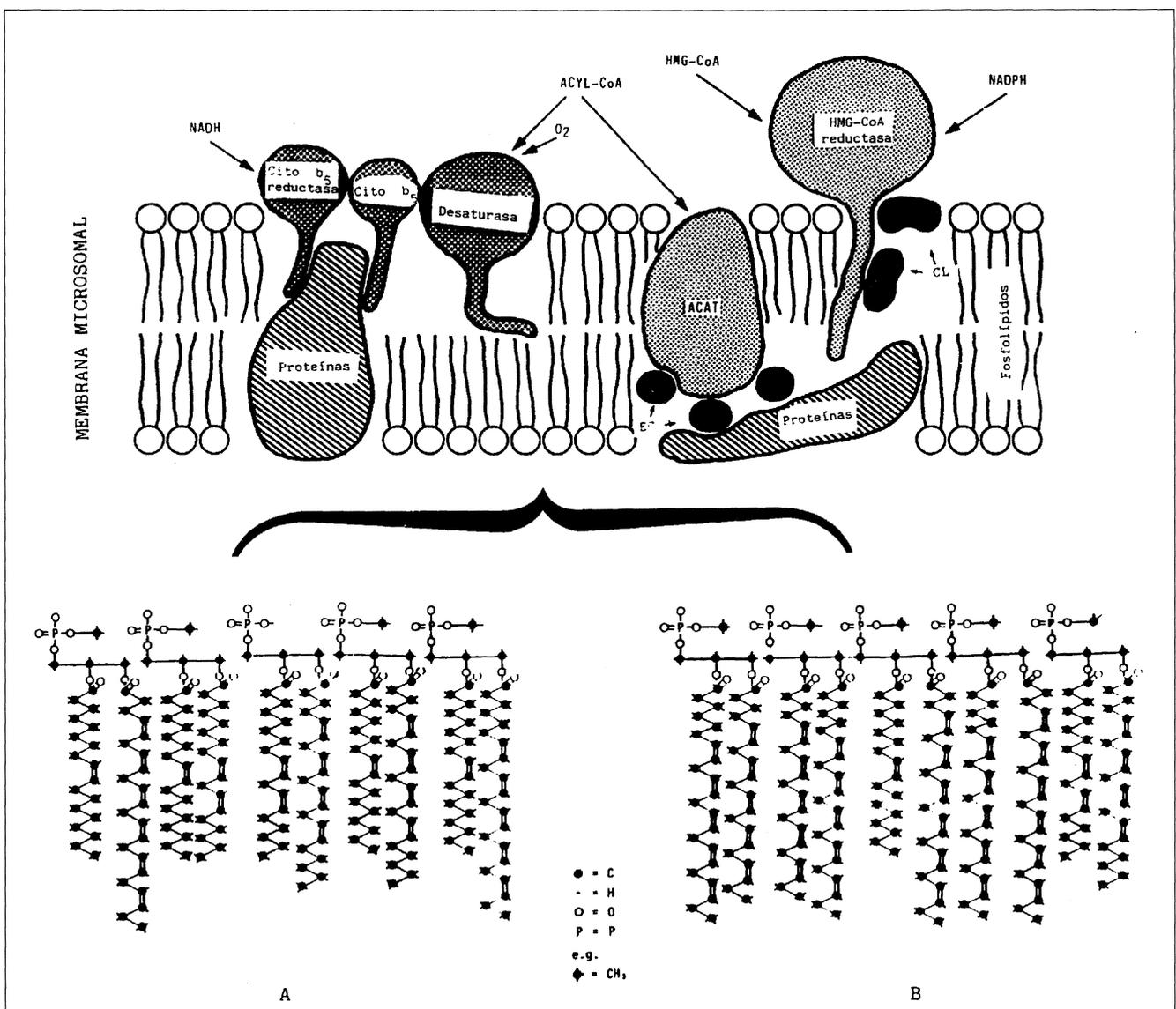


FIGURA 1

Probable estructura de la membrana microsomal de hígado de rata, según las condiciones de este estudio. Se pueden observar los sistemas de desaturación de ácidos grasos, así como los sistemas de biosíntesis y esterificación de colesterol. En el parte inferior del esquema se observa la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos que componen la membrana: A(B), los fosfolípidos de los microsomas de animales alimentados con aceite de oliva virgen (aceite de pescado).

Simbología: NAD(P)H, nicotinamida adenín dinucleótido (fosfato) en su forma reducida; cito, citocromo; CoA, coenzima A; ACAT, acil-CoA-colesterol aciltransferasa; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A; EC, colesterol esterificado; CL, colesterol libre.

#### 4. DISCUSIÓN

En la actualidad, se admite que el balance entre los ácidos grasos n-6 y n-3 es un factor determinante en la regulación de las características fisicoquímicas de la matriz lipídica de las membranas biológicas. Por otra parte, las enzimas unidas a membrana también se ven influenciadas por estos ácidos grasos (Cook, 1987). Así, se ha demostrado que los ácidos grasos n-3 inhiben el metabolismo de los n-6, especialmente al actuar sobre el sistema de desaturación (Garg, 1988; Garg, 1990). Los resultados del presente estudio indican que una dieta rica en aceite de pescado (por lo tanto, rica en ácidos grasos n-3) reduce las actividades de las desaturasas  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  en microsomas hepáticos de rata, en relación con una dieta rica en ácidos grasos n-6 (aceite de oliva virgen). El mecanismo implicado en ésta disminución es aún desconocido. Es probable que tanto el ácido eicosapentaenoico como el docosahexaenoico entren en competición con el ácido araquidónico (Nassar, 1986) y se incorporen más rápida y preferencialmente en los fosfolípidos de membrana. Entonces, los procesos de homeóstasis mantendrán un suficiente grado de insaturación compatible con bajos niveles de desaturación.

Cuando realizamos el estudio sobre los animales alimentados con un aporte extra de colesterol en la dieta, vimos que en los microsomas hepáticos de los grupos de aceite de oliva virgen y de aceite de pescado se producía un incremento en el contenido del ácido linoleico concomitante con una disminución en el contenido del ácido araquidónico. Como consecuencia de este hecho, el cociente entre 18:2(n-6) y 20:4(n-6) es mayor. Esto nos indica que la conversión de 18:2(n-6) a 20:4(n-6) puede estar parcialmente inhibida en los animales sujetos a este tipo de dieta, aunque resulte sólo aparente en el caso del tratamiento con el aceite de oliva virgen. También es posible que este descenso en la concentración del ácido araquidónico sea debido al incremento en la demanda de su utilización para formar los ésteres de colesterol dentro de las lipoproteínas de baja densidad. Por otra parte, hemos visto que el colesterol en la dieta incrementa los niveles de 22:5(n-3) y 18:1(n-9), a la vez que disminuye los de 22:6(n-3), en los microsomas hepáticos de los animales alimentados con los aceites de oliva virgen o de pescado. Comparando estos resultados con las actividades de las enzimas desaturasas, es evidente la complejidad de los mecanismos de regulación que tratan de mantener un equilibrio entre la desaturación y elongación de ácidos grasos. La microviscosidad de los microsomas hepáticos es otro parámetro que parece estar relacionado no sólo con la composición en ácidos grasos de la membrana, pero también con el contenido de colesterol y otros factores, probablemente la interacción lípido/proteína, que aún son desconocidos. En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que la manipulación de la dieta es capaz de provocar cambios en las membranas, tanto en la composición lipídica y fluidez como en los sistemas de desaturación asociados a la misma. No obstante, necesitamos llevar a cabo más estudios para considerar una posible

mejora nutricional relacionada con el uso del aceite de oliva virgen o del aceite de pescado. El consumo de alguno de estos aceites puede presentar distintos aspectos beneficiosos a la salud, aunque los dosis, los efectos imprevistos, la compatibilidad entre ambos, las condiciones carenciales que justifiquen su empleo y otros factores, están todavía por definir.

#### BIBLIOGRAFIA

- Brenner, R.R. (1984).- "Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics" - *Prog. Lipid. Res.* **23**, 69-96.
- Cook, H.W. y Spence, M.W. (1987).- "Interaction of n-3 and n-6 fatty acids in desaturation and chain elongation of essential fatty acids in cultured glioma cells".- *Lipids* **22**, 613-619.
- Deuel, R.A. y Dekruiff, B. (1976).- "The function of sterols in membranes".- *Biochim. Biophys. Acta.* **457**, 109-132.
- Field, F.J.; Albright, E.J. y Mathur, S.N. (1987).- "Effect of dietary n-3 fatty acids on HMG-CoA reductase and ACAT activities in liver and intestine of the rabbit".- *J. Lipid. Res.* **28**, 50-58.
- Folch, J.; Lees, M. y Sloane-Stanley, G.H. (1957).- "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues".- *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Garg, M.L.; Sebokova, E.; Thomson, A.B.R. y Clandinin, M.T. (1988).- " $\Delta 6$  desaturase activity in liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and/or n-3 fatty acids".- *Biochem. J.* **249**, 351-356.
- Garg, M.L.; Thompson, A.B. y Clandinin, M.T. (1990).- "Interactions of saturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids to modulate arachidonic acid metabolism".- *J. Lipid. Res.* **31**, 271-277.
- Herold, P.M. y Kinsella, J.E. (1986).- "Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human feeding trials".- *Am. J. Clin. Nutr.* **43**, 566-598.
- Kromhout, D.; Bosschieter, E.B. y Culander, C.L. (1985).- "The inverse relation between fish consumption and 20 year mortality from coronary heart disease".- *N. Engl. J. Med.* **312**, 1205-1209.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951).- "Protein measurement with Folin phenol reagent".- *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Mattson, F.H. y Grundy, S.M. (1985).- "Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid on plasma lipids and lipoproteins in man".- *J. Lipid Res.* **26**, 194-202.
- Melchior, D.L.; Scavitto, F.J. y Stein, J.M. (1980).- "Dilatometry of dipalmitoyllecithin-cholesterol bilayers".- *Biochemistry* **19**, 4828-4834.
- Mensik, R.P. y Katan, M.B. (1987).- "Effect of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on high density lipoproteins in healthy men and women".- *Lancet* **1**.
- Muriana, F.J.G.; Ruíz-Gutiérrez, V. y Vázquez, C.M. (1991).- "Effect of benzyl viologen on the phospholipid fatty acid composition and some properties in hepatic microsomal membrane of rats".- *Mol. Cell. Biochem.* **108**, 125-131.
- Nassar, B.; Huang, Y.; Manku, M.; Das, U.; Mores, N. y Horrobin, D. (1986).- "The influence of dietary manipulation with n-3 and n-6 fatty acids on liver and plasma phospholipid fatty acids in rats".- *Lipids* **21**, 652-656.
- Ruíz-Gutiérrez, V.; Molina, M.T. y Vázquez, C.M. (1990a).- "Comparative effects of feeding different fats on fatty acid composition of major individual phospholipids of rat hearts".- *Ann. Nutr. Metab.* **34**, 350-358.
- Ruíz-Gutiérrez, V.; Quintero, F.J. y Galan Soldevilla, H. (1990b).- "Estudio comparativo del efecto de los aceites de onagra y pescado sobre la composición de fosfolípidos microsomales en el hígado de rata".- *Grasas y Aceites* **41**, 242-247.
- Ruíz-Gutiérrez, V. y Muriana, F.J.G. (1992).- "Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on desaturase activities and fluidity in rat-liver microsomes".- *J. Nutr. Biochem.* **3**, 75-79.

(Recibido: Septiembre 1993)