EFECTO DEL AUMENTO DE LOS ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (OMEGA 6) DIETETICOS EN EL CONTENIDO DE GLUTATION HEPATICO Y ACTIVIDAD DE GAMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA EN RIÑON DE RATAS

Julia Araya[1], *Gloria Vera*[2], *Héctor Araya*[3] *y Nelly Pak*[4]

Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Santiago, Chile

RESUMEN

Se estudió el efecto de la alimentación de ratas macho, cepa Wistar, desde los 24 a los 52 días de edad, con dietas de frijol deficientes en aminoácidos azufrados o suplementados con 0.3% DL-metionina y con dos concentraciones de aceite de maíz, 2% y 20% (g/kg dieta), sobre el contenido de glutatión en hígado (GSH) y sobre la actividad de gama glutamil transpeptidasa renal (GGTP) (E.C.2.3.2.2.). Los resultados indicaron que las ratas alimentadas con la dieta de frijol con 2% de aceite de maíz, disminuyeron significativamente el contenido de GSH hepático y la actividad de GGTP renal.

La suplementación con 0.3% de metionina y/o el incremento al 20% del aceite de maíz en la dieta, estimularon significativamente el contenido de GSH hepático y la actividad transpeptidásica en el riñón.

Se postula que el aumento de los ácidos grasos poliinsaturados estimuló la actividad de GGTP como una manera de aumentar la biodisponibilidad de sustratos para síntesis de novo de GSH hepático, necesario para la protección de la formación de hidroperóxidos atribuido al incremento de los ácidos grasos poliinsaturados a nivel celular.

Manuscrito modificado recibido: 30-4-90.

1 Profesor Titular y Director, Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, 2º. Piso, Santiago, Chile.

2 Profesor Auxiliar del citado Departamento.

3 Profesor Asociado, Departamento de Nutrición, de la misma Facultad.

4 Profesor Titular, Departamento de Nutrición, de la citada Universidad.

INTRODUCCION

El consumo diario de proteínas en las poblaciones de los países en vías de desarrollo resulta adecuado si se le compara con el nivel seguro de ingesta propuesto por FAO/OMS/UNU 1985. No obstante, las proteínas base de esas dietas habitualmente son limitantes en aminoácidos azufrados y/o lisina. El mayor problema de los países pobres, en cambio, es la deficiente ingesta calórica de sus habitantes; por ello, se ha propuesto elevar la densidad energética sobre la base de aumentar el contenido de grasa, particularmente de aceite vegetal.

Los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en los aceites son susceptibles de peroxidarse, de tal manera que un aumento en el consumo de éstos incrementaría la probabilidad de formar hidroperóxidos a nivel celular. Para evitar esta alteración, la célula recurre a la acción concertada de varios sistemas de protección celular, entre los cuales se encuentra el glutatión (GSH), tripéptido cuya característica estructural es contener grupos sulfhidrilo y un enlace gama glutamilo (1). El GSH se metaboliza a través del ciclo gama glutamilo, ciclo de importancia en la degradación y síntesis del GSH, y el que es catalizado por seis enzimas (2). La primera enzima en la ruta del catabolismo y utilización del GSH es la gama glutamil transpeptidasa (GGTP) (E.C.2.3.2.2.). El hígado, por su baja actividad transpeptidasa, exporta GSH hacia el plasma, mientras que el riñón que está muy bien equipado de GGTP, utiliza efectivamente el GSH del plasma, segmentándolo en sus aminoácidos constitutivos, los que vuelven a circular para una síntesis posterior de novo de GSH (2). La actividad de la GGTP se eleva cuando se induce la utilización de GSH (3). Puesto que las funciones del glutatión son la de proteger contra los intermediarios —oxígeno reactivos, radicales libres y compuestos tóxicos— se debe considerar que un aumento en el nivel de glutatión celular podría ser benéfico bajo ciertas condiciones (4).

Con estos antecedentes, estudiamos el efecto de aumentar el consumo de aceite de maíz rico en ácidos grasos poliinsaturados omega 6, en el contenido de GSH hepático y en el actividad de GGTP renal, en ratas alimentadas con dietas elaboradas con frijol, deficientes en aminoácidos azufrados, o con dietas suplementadas con metionina.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 40 ratas macho cepa Wistar, de 22 a 24 días de edad, las que se dividieron en cinco grupos de ocho ratas cada uno. Cada grupo consumió durante 28 días una de las cinco dietas descritas en la Tabla 1. Las ratas de todos los grupos se ubicaron en jaulas individuales con libre acceso al agua bebida y a la dieta asignada. Se controló la temperatura (25°C), humedad (75%) y luz (12 horas de luz/12 horas de obscuridad) del vivero. Durante la experiencia se registró la evolución ponderal y la ingesta individual de cada dieta. El

TABLA 1

COMPOSICION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES[1]

	Ingredientes (en gramos)	Dietas				
		1	2	3	4	5
a)	Aceite maíz	20	200	20	200	100
b)	Frijol solo460	460	—	—	—	
	Frijol + 0.3% metionina	—	—	460	460	—
	Caseína				118	
	Maicena 420	240	417	237	679	
	Celulosa 50	50	50	50	50	
	Vitaminas*10	10	10	10	10	
	Minerales**	40	40	40	40	40
	DL-metionina	—	—	3	3	3
	Total	1000	1000	1000	1000	1000

1 En las dietas suplementadas con DL-metionina, ésta se incorporó a expensas de la maicena.

* 1 g de mezcla vitamínica contiene: vitamina A, 1000 U.I.; vitamina D, 100 U.I.; vitamina E, 10 U.I.; vitamina K (menadiona), 0.5 mg; tiamina, 0.5 mg; riboflavina, 1.0 mg; piridoxina, 0.4 mg; ácido pantoténico, 4.0 mg; niacina, 4.0 mg; colina, 200 mg; inositol, 25 mg; ácido para aminobenzoico, 10 mg; vitamina B_{12}, 2 µg.; biotina, 0.02 mg y ácido fólico, 0.2 mg.

** Mezcla de minerales g/kg dieta: $CaCO_3$, 12.2; K_2HPO_4, 13.1; $CaHPO_4.2H_2O$, 3.1; NaCl, 6.8; $MgSO_4.7H_2O$, 4.1; citrato férrico, 0.41; $MnSO_4$, 0.2; $ZnCl_2$, 0.030; $CuSO_4$, 0.02; KI, 0.004; $COCl_2$, 0.001; $KAl(SO_4)_2$, 0.0002; NaF, 0.004; Na_2SeO_3, 0.0008.

a) El aceite de maíz usado en esta experiencia estaba libre de peróxidos.

b) El frijol se preparó sometiéndolo a remojo previo de 12 horas. El agua de remojo se descartó y se reemplazó por agua fresca en la que se cocieron durante 2 horas a ebullición. El poroto blando se secó en corriente de aire caliente, luego se transformó en un polvo fino previa molienda en un molino Thomas-Wiley.

Grupo 5 —cuya dieta fue caseína suplementada con 0.3% DL-metionina— se consideró como control. Las dietas se prepararon una vez a la semana y fueron almacenadas de inmediato en cámara frigorífica a —20°C. Cada dieta se proporcionó diariamente *ad libitum*, y cada mañana se descartó todo lo que el animal había dejado en el comedero el día anterior.

Después de 28 días de iniciar la experiencia, todas las ratas fueron sacrificadas previo ayuno de 12 horas. Se les extrajo sangre por punción cardíaca usando heparina como anticoagulante, y los híga-

dos se eliminaron rápidamente para determinar su contenido de GSH, según Reed *et al.* (5). Se extrajeron los riñones, se homogeneizaron en buffer Tris 0.1 M, pH 8.0, y se determinó la actividad de GGTP en el sobrenadante, de acuerdo a la técnica de Meister y Tate (6). La proteína del sobrenadante se estableció según Lowry *et al.* (7). Luego, se calculó el promedio y la desviación estándar de los resultados, y se aplicó la prueba "t" de Student para determinar las significancias entre los promedios.

RESULTADOS

La ingesta de proteína, aminoácidos azufrados, ácidos grasos poliinsaturados y alfa tocoferol en los cinco grupos de ratas, se informa en la Tabla 2. Según se observa, los Grupos 1, 4 y 5 consu-

TABLA 2

INGESTA DE PROTEINA, AMINOACIDOS AZUFRADOS ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS Y TOCOFEROL (VIT. E) DURANTE 28 DIAS EN LOS CINCO GRUPOS EXPERIMENTALES

No. Grupos	Proteína (g/28 días) (mg/28 días)	Aminoácidos azufrados	AGPI* (g/28 días)	Tocoferol (mg/28 días)
1 - Frijol + 2% aceite maíz	d 27.96 ± 3.22	a 522 ± 60.1	a 3.29 ± 0.38	a 28.65 ± 3.30
2 - Frijol + 20% aceite maíz	a 21.81± 2.48	a 408 ± 43.2	b 25.72 ± 2.72	a 30.53 ± 3.23
3 - Frijol + 0.3% metionina + 2% aceite maíz	b 40.53 ± 4.72	b 1,884± 219	a 4.60 ± 0.54	b 40.07 ± 4.67
4 - Frijol + 0.3% metionina + 20% aceite maíz	c 26.93 ± 5.44	b 1,300± 263	b 31.80± 6.42	b 37.74 ± 7.62
5 - Caseína + 0.3% metionina + 10% aceite maíz	d 28.83 ± 3.81	c 1,881± 226	c 19.24± 2.31	b 38.5 ± 5.1

Valores promedio ± desviación estándar de 8 animales por grupo.
Las diferencias de los promedios analizados verticalmente que no tienen letra común, son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).
Si la misma letra figura sobre el promedio, las diferencias entre los promedios no son estadísticamente significativas.
* AGPI = Acidos grasos poliinsaturados omega 6.

mieron cantidades similares de proteína. El Grupo 2, cuya dieta contenía 20% de aceite de maíz, consumió significativamente menos proteína, y el Grupo 3, suplementado con metionina y con 2% de aceite de maíz, consumió significativamente más proteína que los otros cuatro grupos. La ingesta de lípidos estuvo directamente relacionada con el contenido de aceite de las diferentes dietas. La ingesta de alfa tocoferol fue similar en los Grupos 1 y 2, y significativamente menor que en los otros tres grupos.

La Tabla 3 da cuenta del peso del hígado y el contenido de GSH en sangre e hígado, después de 28 días de alimentar a cada uno de los cinco grupos con sus respectivas dietas. Puede advertirse que el

TABLA 3

PESO DEL HIGADO, CONTENIDO DE GLUTATION (GSH) EN HIGADO (μmol/g) Y EN SANGRE (μmol/ml) DESPUES DE 28 DIAS DE ALIMENTAR CON CINCO DIETAS EXPERIMENTALES

Grupos	Peso hígado (g/28 días)	GSH hígado (μmol/g)	GSH sangre (μmol/ml)
1 - Frijol + 2% aceite maíz	a* 3.80 ± 0.45	a 0.873 ± 0.21	a 1.095 ± 0.11
2 - Frijol + 20% aceite maíz	a 3.06 ± 0.65	b 1.49 ± 0.27	b 0.667 ± 0.10
3 - Frijol + 0.3% DL-metionina + 2% aceite maíz	b 6.65 ± 1.08	b 1.48 ± 0.39	a 0.987 ± 0.10
4 - Frijol + 0.3% DL-metionina + 20% aceite maíz	b 6.24 ± 1.03	c 2.73 ± 1.02	b 0.739 ± 0.11
5 - Caseína + 0.3% DL-metionina + 10% aceite maíz	b 6.45 ± 1.09	d 3.78 ± 0.64	b 0.754 ± 0.11

* Valores promedio ± desviación estándar obtenida de 8 animales en cada grupo.

tamaño del hígado de los grupos suplementados con 0.3% de metionina duplicó el peso de los grupos deficientes en aminoácidos azufrados. El contenido de GSH hepático del Grupo 1 que consumió dieta con frijol y 2% de aceite, se encontró significativamente disminuido respecto a los otros cuatro grupos. El contenido de GSH en hígado se elevó en los grupos con frijol suplementado con metionina y en los grupos que aumentaron el consumo de aceite de maíz del 2% al 20%; sin embargo, esa alza no alcanzó el contenido del Grupo Control (Grupo 5).

La concentración de GSH en sangre total se encontró más alta en los grupos que consumieron la dieta con 2% de aceite y significativamente más baja cuando el contenido de aceite de la dieta ascendió al 20%, disminución que dio valores similares a los del Grupo Control.

La actividad de GGTP renal y el peso de cada riñón se exponen en la Tabla 4. La actividad específica de la enzima (µmol/de sustrato transformado/mg proteína) fue similar en los cinco grupos con dife-

TABLA 4

PESO RIÑON Y ACTIVIDAD DE GAMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA (GGT) EN RIÑON DE RATAS ALIMENTADAS CON CINCO DIETAS EXPERIMENTALES

Grupos	Actividad de gama glutamil transpeptidasa (GGT)		
	GGT (µmol/g órgano)	GGT (µmol/mg prot-1)	Peso riñón (mg/1 riñón)
1 - Frijol + 2% aceite maíz	a* 329 ± 51.7	9.67 ± 1.56	364 ± 60
2 - Frijol + 20% aceite maíz	b 442 ± 71.2	9.93 ± 1.93	442 ± 71
3 - Frijol + 0.3% DL-metionina + 2% aceite maíz	c 409 ± 44.5	9.45 ± 1.06	637 ± 61
4 - Frijol + 0.3% DL-metionina + 20% aceite maíz	b 448 ± 57.2	9.73 ± 2.00	612 ± 88
5 - Caseína + 0.3% DL-metionina + 2% aceite maíz	b 387 ± 77.0	9.13 ± 1.72	581 ± 66

* Promedio ± desviación estándar de 8 animales en cada grupo.
Las diferencias de los promedios analizados que no tienen la misma letra sobreescrita son estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Los que tienen la misma letra sobreescrita sobre el promedio no son estadísticamente significativas.

rentes tratamientos dietéticos. La actividad de la enzima expresada por gramo de órgano se vio estimulada por la suplementación de la dieta con 0.3% de metionina, y por el incremento del contenido del aceite de maíz de las dietas consumidas por los Grupos 2 y 4, alcanzando en estos grupos actividades comparables al Grupo Control. El peso de los riñones se duplicó en los tres grupos que consumieron dietas suplementadas con metionina, respecto a los grupos cuyas dietas no fueron suplementadas con metionina.

DISCUSION

Los resultados de este estudio muestran que el consumo de una dieta preparada con proteína de frijol y con 2% de aceite de maíz disminuyó el contenido de GSH hepático y la actividad de GGTP renal, pero aumentó significativamente el contenido de GSH en sangre. Al suplementar la dieta de frijol con metionina y/o con 20% de aceite de maíz, la concentración de GSH en el hígado, y la actividad transpeptidásica renal aumentaron significativamente, y simultáneamente disminuyó la concentración de GSH en sangre.

El alza del contenido de glutatión hepático por efecto del incremento de la metionina dietética de 0 a 0.8%, ha sido comunicada por Seligson y Rotruck (8).

En este estudio la magnitud del aumento en el contenido de GSH hepático de las ratas alimentadas con la dieta de frijol fue igual, ya sea que la dieta se suplementara con 0.3% de DL-metionina o si se aumentara el contenido de aceite de maíz de 2% a 20%. Se observa un efecto aditivo cuando en la misma dieta se incrementa el contenido de aminoácidos azufrados y ácidos grasos poliinsaturados.

Estudios *in vitro* han demostrado que la enzima GGTP es mucho más activa en catalizar la ruptura del GSH cuando se agregan aminoácidos aceptores, sin deprimir los niveles de GSH, presumiblemente debido a su rápida resíntesis (9).

En el presente estudio, la mayor actividad de la GGTP se asoció a un alza del GSH hepático y a un descenso de GSH en sangre, cuando las dietas se suplementaron con metionina y/o con aceite de maíz.

El estímulo en el contenido del GSH hepático exhibido por los grupos que consumieron dietas altas en aceite de maíz, podría atribuirse a una mayor necesidad intracelular de este tripéptido en el hígado, como una manera de protegerse contra la toxicidad de los peróxidos provenientes del aumento de poliinsaturados en el medio.

Izaki, Yoshikawa y Uchiyama (10), estudiaron el efecto de la ingesta de aceites oxidados por un proceso térmico y demostraron que el GSH hepático aumentó significativamente en proporción al grado de oxidación de los aceites recalentados, en comparación con el Grupo Control.

Por otra parte, el hallazgo del estímulo de la actividad de GGTP renal, asociada al aumento del consumo de ácidos grasos poliinsaturados, hace reflexionar acerca de si el nivel de GSH hepático es regulado por la GGTP cuando en el medio aumentan las sustancias

tóxicas o extrañas como son los ácidos grasos poliinsaturados peroxidados, o si el incremento en consumo de ácidos grasos altamente poliinsaturados cambia la composición lipídica de la membrana plasmática, influenciando la actividad de proteínas asociadas a dicha membrana. Robblee y Clandinin demostraron cambios en la actividad de la ATPasa mitocondrial cardíaca en ratas alimentadas con dietas que tenían un contenido elevado de aceite de soya (11).

A juicio de los autores, estos resultados abren una interesante perspectiva para considerar la interrelación entre los diferentes ítems de la dieta, particularmente en el caso de aquellas poblaciones cuya dieta es deficiente en aminoácidos azufrados, y donde se recomienda aumentar la densidad energética de la dieta a base de grasa poliinsaturada.

SUMMARY

EFFECT OF INCREASING DIETARY POLYUNSATURATED FATTY ACIDS (OMEGA 6) ON THE CONTENT OF GLUTATHION IN LIVER AND GAMMA GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE ACTIVITY IN KIDNEY, IN RATS

The effect of feeding 24 to 52-days-old male rats of the Wistar strain, with beans diet deficient in sulfur-containing amino acids or supplemented with 0.3% DL-methionine and two corn oil concentrations, 2% and 20% (g/kg/diet), on the glutathione content (GSH) in liver, and on the renal gamma glutamyl transpeptidase (GGTP) (E.C.2.3.2.2) activity was studied. Results indicated that rats fed the bean diet with 2% corn oil decreased significantly the liver GSH content and GGTP renal activity.

Supplementation with 0.3% methionine and/or the 20% increment of the diet corn oil, significantly stimulated the liver GSH content and the transpeptidase activity in the kidney.

It is postulated that the increase of polyunsaturated fatty acids, stimulated the GGTP activity as a way of increasing substrate bioavailability for synthesis de novo of liver GSH, necessary for the protection of the hydroperoxides formation, attributed to the increment of polyunsaturated acids at cellular level.

BIBLIOGRAFIA

1. Meister, A. & S.S. Tate. Glutathione and related gama glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. **Ann. Rev. Biochem.**, 45: 559-604, 1976.
2. Meister, A. Metabolism and transport of glutathione and other gamma glutamyl compounds. In: **Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Chemical Aspects.** A. Larson *et al.* (Eds.). New York, N.Y., Raven Press, 1983, p. 1-22.
3. Higashi, T., N. Tateishi, A. Naruse, & Y. Sakamoto. Decrease of glutathione and induction of gama glutamyltransferase by dibutyryl 3'5' cyclic AMP in rat liver. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 68: 1280-1286, 1976.

4. Meister, A. New aspects of glutathione biochemistry and transport-selective alteration of glutathione metabolism. **Nutr. Revs., 42**: 397-410, 1984.
5. Reed, D.J., J.R. Babson, P.W. Beatty, A.E. Brodie, W.W. Ellis & D.W. Potter. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide and related thiols and disulfides. **Anal. Biochem., 106**: 55-62, 1980.
6. Meister, A., S.S. Tate & O.W. Griffith. Gamma glutamyl transpeptidase. **Methods Enzymol., 77**: 237-253, 1981.
7. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, & R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. .Chem., 193**: 265-275, 1951.
8. Seligson, F.H. & J.T. Rotruck. Tissue non protein sulfhydryl content and weight gain of rats as affected by dietary methionine level. **J. Nutr., 113**: 98-104, 1983.
9. Griffith, O.W., R.J. Bridges & A. Meister. Evidence that gamma glutamyl cycle functions in vivo using intracellular glutathione: Effects of amino acids and selective inhibition of enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci., 75**: 5405-5408, 1979.
10. Izaki, Y., S. Yoshikawa & M. Uchiyama. Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats. **Lipids, 19**: 324-332, 1984.
11. Robblee, N.M. & M.T. Clandinin. Effect of dietary fat level and polyunsatured fatty acid content on the phospholipid composition of rat cardiac mitochondrial membranes and mitochondrial ATPase activity. **J. Nutr., 114**: 263-269, 1984.