Capítulo 3

Efecto de isómeros conjugados de ácido linoleico (CLAs) sobre la peroxidación lipídica de triglicéridos ricos en ácidos grasos n-3.

3.1. Introducción

La mayor parte de los ácidos grasos poli-no-saturados (PUFAs) se caracterizan por presentar sus dobles enlaces separados entre sí por grupos metileno. Una excepción a esta regla la constituyen los ácidos grasos conjugados. Los ácidos grasos conjugados más abundantes son los isómeros del ácido linoleico (CLAs).

Estructura, isómeros y fuentes. Existen 28 isómeros posibles de CLA que difieren en la posición (por ej.: 7 y 9, 8 y 10, 9 y 11, 10 y 12, 11 y 13 – contando a partir del grupo carboxilo) y configuración (*cis* o *trans*) de los dobles enlaces. El isómero más común encontrado en aceites vegetales comunes como el aceite de soja o de maíz y en carne y leche de rumiantes (vacas, ovejas y cabras) (Gagliostro y col, 2002), donde puede alcanzar hasta 0,65% de los lípidos totales (Fritsche y Steinhart, 1998), es el llamado ácido ruménico (18:2 c9,t11), producto intermedio de la biohidrogenación del ácido linoleico (LA, 18:2 n-6) por la bacteria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens* (Pinto y col, 2002).

Incorporación y metabolismo. Se ha demostrado que CLAs, al igual que otros PUFAs, se incorporan en lípidos de membrana en un rango que abarca de 1 a 50% del total de ácidos grasos de fosfolípidos, dependiendo del tipo celular (Subbaiah y col, 2010). Goedecke y col. (2009) han demostrado que una suplementación diaria de CLAs (50:50; t10, c12: c9, t11) durante 12 semanas aumenta el contenido de t10, c12 en triglicéridos de tejido adiposo mientras que el isómero c9, t11 tiende a aumentar en fosfolípidos de músculo esquelético. La incorporación de CLAs en lípidos neutros resulta en la acumulación en tejidos que son particularmente ricos en estos lípidos, tales como tejido mamario y adiposo (Banni, 2002).

Efectos sobre la salud. Se le atribuyen diversos efectos benéficos tales como: regulador metabólico, efectos hipocolesterolémicos, antiaterogénicos, anticarcinogénicos, antioxidantes, e incluso presenta efectos favorables en la prevención y/o tratamiento de ciertas alergias alimentarias (Sanhueza y col, 2002). Ha sido reconocido por la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, como el único ácido graso que ha presentado inequívocamente la propiedad de inhibir la carcinogénesis en animales experimentales (Kelly y col, 1998). Sehat y colaboradores (1998) señalaron que el isómero *c*9, *t*11 tendría un efecto anticancerígeno, mientras que el isómero *t*10, *c*12 actuaría en el aumento de la masa muscular y en la disminución del porcentaje de grasa.

El papel que los CLAs juegan en el balance oxidativo ha sido investigado en algunos modelos y sistemas biológicos ya que éste podría ser la razón de algunos de sus efectos beneficiosos (Belury, 2002). Algunos autores demostraron que CLAs poseen actividad antioxidante y propusieron este mecanismo como explicación de sus efectos anticancerígeno y antiaterogénico. Sin embargo, otros investigadores señalaron que los CLAs poseen efectos prooxidantes (Basu y col, 2000). Paradójicamente, se descubrió su efecto anticancerígeno en un estudio que incluía carne frita (Pariza y Hargraves, 1985; Pariza y col, 1986). Hasta el presente no se sabe cómo estos ácidos grasos de estructura relativamente simple pueden tener tal variedad de funciones biológicas, por lo que es necesario profundizar el estudio de los diferentes efectos de los isómeros CLAs.

En el presente capítulo se planteó el objetivo de:

✓ Estudiar el efecto antioxidante de isómeros conjugados del ácido linoleico (CLAs), ácido linoleico y metil linoleato sobre triglicéridos ricos en PUFAs n-3 disueltos en cloroformo, cuando la reacción es iniciada por tert-butil hidroperóxido.

El progreso de la reacción de peroxidación fue determinado por **quimioluminiscencia**. Se analizó la capacidad secuestradora de radicales de estos compuestos mediante el **ensayo de DPPH**. A diferencia de la complejidad de los sistemas en los que se ha estudiado el comportamiento de los isómeros de ácido linoleico conjugado, el presente estudio *in vitro* elimina la contribución de enzimas y otros compuestos antioxidantes, midiendo la actividad antioxidante directa del compuesto analizado.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Materiales

El proceso de peroxidación lipídica se estudió en aceite comercial de pescado (triglicéridos enriquecidos en ácidos grasos n-3, Tg PUFAs n-3) donado por *Winterization Europe Fécamp Cedex*, Francia. Los triglicéridos utilizados contenían, según datos del productor, 20% de ácido eicosapentenoico (EPA, 20:5 n-3) y 40% de ácido docosahexenoico (DHA, 22:6 n-3). Los isómeros de ácido linoleico conjugado CLA c9, t11y CLA t10, c12 (ambos 90%) fueron provistos por *Natural ASA*, Lysaker, Noruega. Ácido linoleico (LA) (> 99%), metil linoleato (MLA) (>99%), 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH•) como radical libre (90%), tert-butil hidroperóxido (tBHP), trizma base y otros reactivos fueron suministrados por *Sigma*, St. Louis, MO, EEUU. Los solventes utilizados fueron de calidad cromatográfica.

Para los ensayos de determinación de quimioluminiscencia se empleó un contador fotónico (luminómetro) modelo 20/20n de *Turner Biosystems*, Sunnyvale, EEUU, con rango de respuesta espectral entre 350 y 650 nm.

El ensayo de DPPH• fue llevado a cabo en un espectrofotómetro Agilent Chem Station UV-VIS con arreglo de diodos.

3.2.2. Métodos y técnicas

3.2.2.1. Determinación de peroxidación lipídica de ácido linoleico libre, metil linoleato, CLA c9, t11 y CLA t10, c12 por detección de quimioluminiscencia.

LA, sus isómeros conjugados (CLA c9, t11 y CLA t10, c12) y su metil éster (MLA) disueltos en cloroformo (C_f: 1, 4, 10, 20, 100 y 200 mM) fueron incubados durante 60 minutos en una cámara termostatizada a 37°C (volumen final: 1 ml). La reacción de peroxidación fue iniciada por el agregado de 10 µl de solución metanólica de tBHP (C_f: 36,4 mM) cuya acción como iniciador de reacción es análoga a la de hidroperóxido de cumeno. Las unidades lumínicas relativas (RLUs) fueron determinadas mediante un luminómetro cada 5 minutos. La quimioluminiscencia total se determinó mediante la sumatoria de RLUs (RLUs totales), tomadas entre 15 y 45 minutos. Todas las soluciones fueron preparadas en el día. Se determinó la quimioluminiscencia de controles sin agregado de tBHP y estos valores se restaron a los valores obtenidos para las muestras peroxidadas.

3.2.2.2. Determinación de peroxidación lipídica de Tg PUFAs n-3 por detección de quimioluminiscencia. Efecto de CLAs, LA y MLA

Un volumen de 100 µl de aceite de pescado comercial (Tg PUFAs n-3) disuelto en cloroformo fue incubado durante 60 min a 37 °C en tubos Eppendorf en una cámara termostatizada (la C_f de lípidos equivale ≈100 mM tomando un PM promedio de triglicéridos ≈900 g/mol y una densidad de 0,94 g/ml). La reacción de peroxidación fue iniciada por adición de 10 µl de solución metanólica de tBHP (C_f= 36,4 mM). Para analizar el efecto de CLAs, LA y MLA se utilizó el mismo procedimiento incubando los Tg PUFAs n-3 con estos compuestos (C_f= 0, 1, 4, 10, 20, 100 y 200 mM) durante 15 minutos previos al agregado de tBHP. En todos los casos el volumen final fue 1 ml. El progreso de la reacción fue determinado mediante quimioluminiscencia. Para monitorear la reacción de peroxidación se determinó la intensidad lumínica en función del tiempo con un luminómetro, registrándose las unidades lumínicas relativas (RLUs) cada 5 minutos. Para comparar el efecto producido por los diferentes compuestos analizados se determinó la sumatoria de RLUs entre 15 y 45 minutos (RLUs totales).

3.2.2.3. Determinación de actividad secuestradora de radicales de CLAs, LA y MLA por ensayo de DPPH.

La actividad secuestradora de radicales libres de los isómeros CLA, LA y MLA se determinó mediante su capacidad para decolorar el radical estable DPPH. 1 ml de solución etanólica de diferentes concentraciones (C_f= 5, 10, 15, 20 y 25 mM) de isómeros CLA, LA o MLA fueron agregados a 1 ml de solución etanólica de DPPH (C_f= 31,5 µM). La absorbancia se midió a 518 nm durante 120 min contra un blanco de etanol. La absorbancia inicial fue cercana a 0,4 en todos los casos. El parámetro para estimar la actividad secuestradora de radicales de los compuestos fue el EC_{50} (ver Materiales y Métodos, Capítulo 2).

3.2.2.4. Expresión de resultados

Se calcularon la media ($\bar{x}$) y desviación estándar (SD) de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA y Test Múltiple de Rango basado en el método de Tukey HSD ($p < 0.05$) para identificar diferencias significativas

3.3. Resultados

Determinación de peroxidación lipídica de ácido linoleico libre, metil linoleato, CLA c9, t11 y CLA t10, c12 por detección de quimioluminiscencia.

Se analizó la respuesta quimioluminiscente de la reacción de LA, MLA e isómeros CLAs (c9, t11 y t10, c12) con tBHP. El agregado de tBHP a diferentes concentraciones de LA (**Figura 3.1**) y MLA (**Figura 3.2**) no produjo un aumento significativo de la quimioluminiscencia con respecto al control (0 mM) a ninguna de las concentraciones analizadas. En contraposición, CLA c9, t11 (**Figura 3.3**) y CLA t10, c12 (**Figura 3.4**) mostraron aumento significativo de la fotoemisión con respecto al control, a 100 y 200 mM. Estos resultados determinaron que los isómeros conjugados de ácido linoleico poseen mayor susceptibilidad a la acción de tBHP que el LA y su metil derivado. Cada punto en los perfiles de quimioluminiscencia representa la media de tres experimentos independientes. Las desviaciones estándar fueron omitidas intencionalmente para simplificar la visión de los resultados.

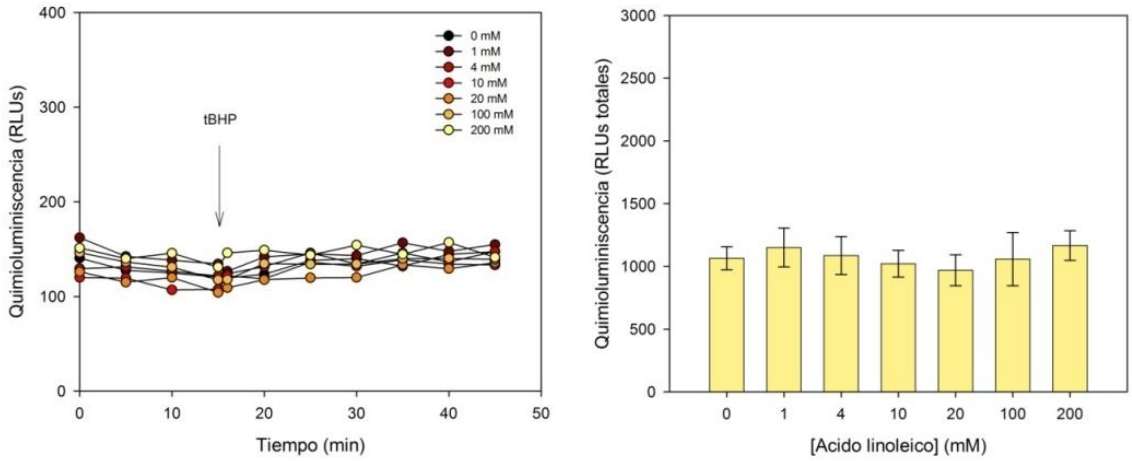

Figura 3.1. Izq. Quimioluminiscencia en función del tiempo durante la peroxidación lipídica iniciada por tBHP de diferentes concentraciones de ácido linoleico libre. Cada punto representa la media de tres determinaciones. **Der. RLUs totales, sumadas entre 15 y 45 minutos, en función de las concentraciones de LA**. Cada barra representa $\bar{x} \pm$ SD de tres experimentos independientes.

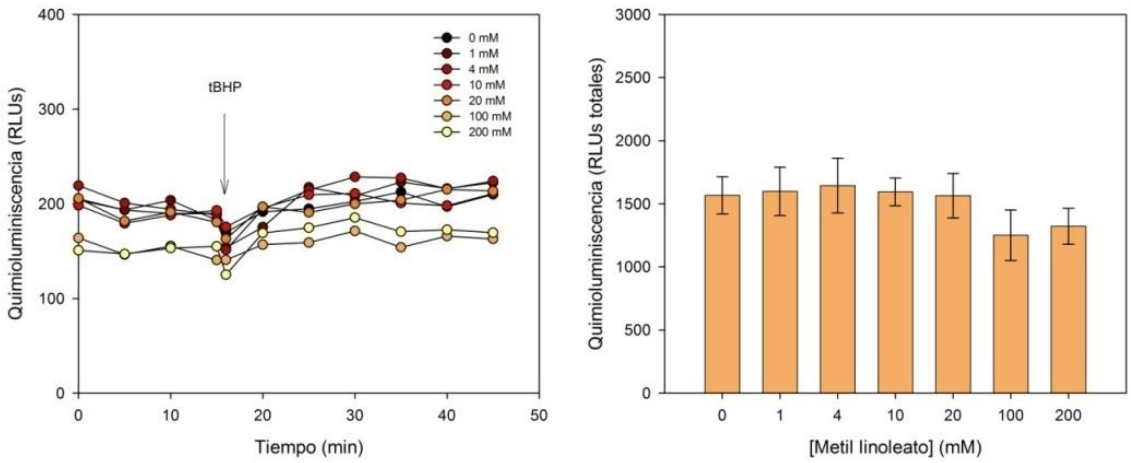

Figura 3.2. Izq. Quimioluminiscencia en función del tiempo durante la peroxidación lipídica iniciada por tBHP de diferentes concentraciones de metil linoleato. Cada punto representa la media de tres determinaciones. **Der. RLUs totales, sumadas entre 15 y 45 minutos, en función de las concentraciones de MLA**. Cada barra representa $\bar{x}$ ± SD de tres experimentos independientes.

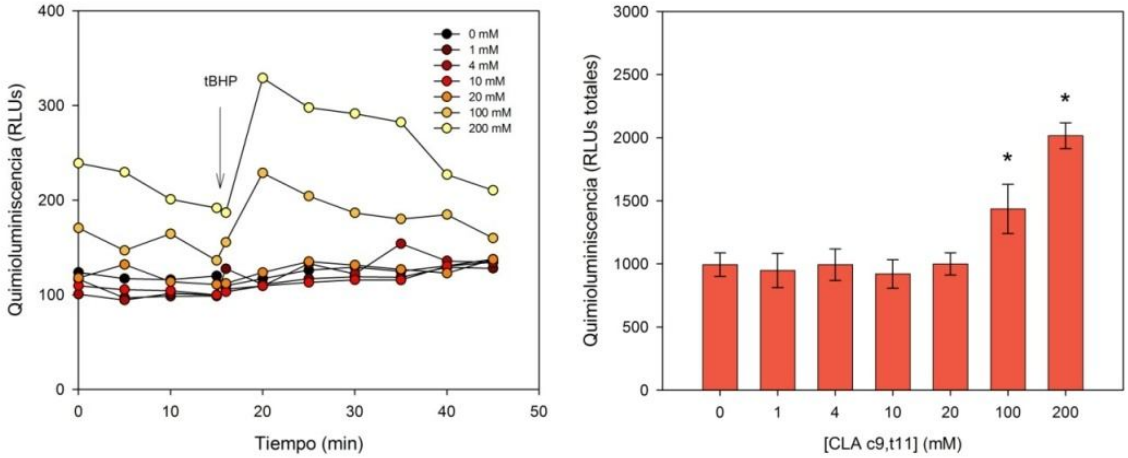

Figura 3.3. Izq. Quimioluminiscencia en función del tiempo durante la peroxidación lipídica iniciada por tBHP de diferentes concentraciones de CLA c9, t11. Cada punto representa la media de tres determinaciones. **Der. RLUs totales, sumadas entre 15 y 45 minutos, en función de las concentraciones de CLA c9,t11**. Cada barra representa $\bar{x}$ ± SD de tres experimentos independientes. Un asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al control (0 mM), $p<0,05$

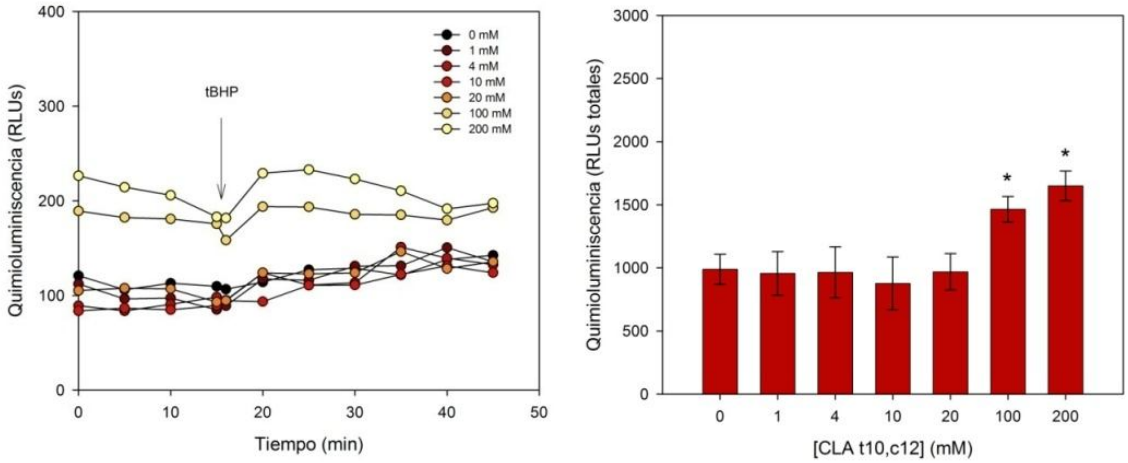

Figura 3.4. Izq. Quimioluminiscencia en función del tiempo durante la peroxidación lipídica iniciada por tBHP de diferentes concentraciones de CLA t10, c12. Cada punto representa la media de tres determinaciones. **Der. Sumatorias de las RLUs totales, tomadas entre 15 y 45 minutos, en función de las concentraciones de CLA t10, c12**. Cada barra representa $\bar{x}$ ± SD de tres experimentos independientes. Un asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al control (0 mM), $p<0,05$

Determinación de peroxidación lipídica de Tg PUFAs n-3 por detección de quimioluminiscencia. Efecto de CLAs, LA y MLA

Como se observa en la **figura 3.5** triglicéridos ricos en ácidos grasos n-3 (Tg PUFAs n-3) producen un máximo de fotoemisión (3151 ± 134 RLUs) 5 minutos después de agregado el tBHP.

Los Tg PUFAs n-3 peroxidados en presencia de diferentes concentraciones (de 1 a 200 mM) de LA (**Figura 3.6 A**) y de MLA (**Figura 3.6 B**) no produjeron modificaciones en los niveles de fotoemisión con respecto al control (0 mM). Cuando los triglicéridos se incubaron con CLA c9,t11 y CLA t10,c12, tras el agregado de tBHP se observó inhibición de la quimioluminiscencia: CLA t10, c12 disminuyó significativamente la fotoemisión a 100 y 200 mM (**Figura 3.6 D**), mientras que CLA c9, t11 sólo produjo disminución significativa a una concentración de 200 mM (**Figura 3.6 C**).

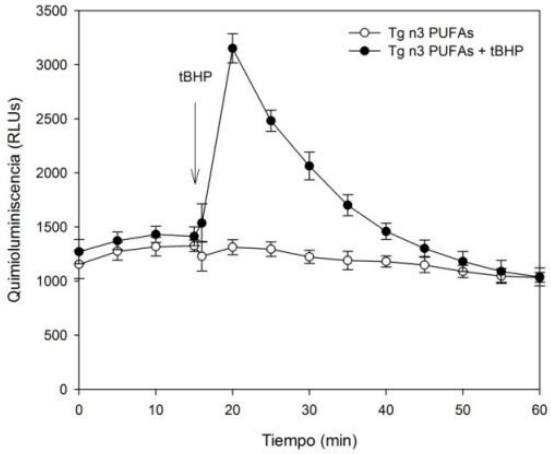

Figura 3.5. Perfil de quimioluminiscencia producida por la peroxidación lipídica de Tg PUFAs n-3 en función del tiempo. Cada punto representa $\bar{x} \pm$ SD de tres experimentos independientes.

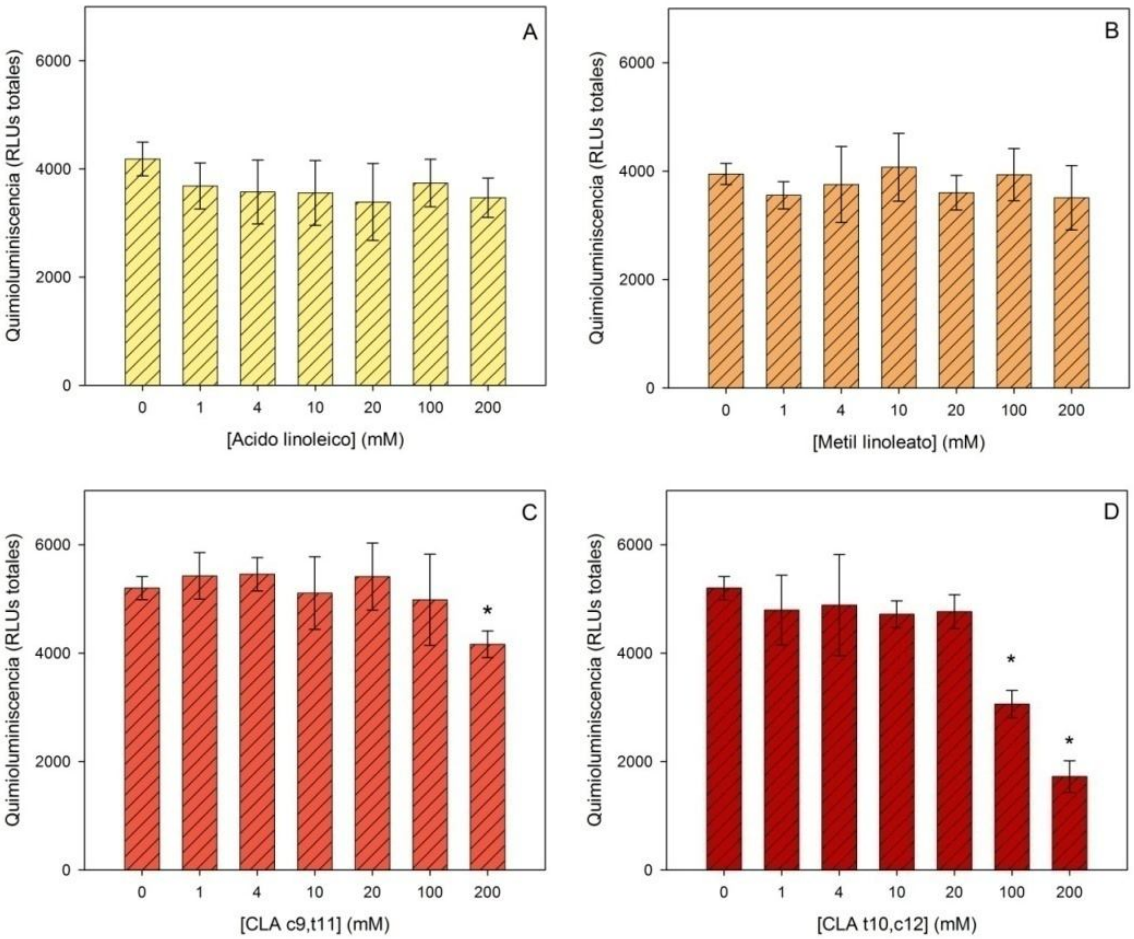

Figura 3.6. Efecto de la concentración de A) LA, B) MLA, C) CLA c9,t11 y D) CLA t10,c12 sobre la peroxidación lipídica de Tg PUFAs n-3 determinada por quimioluminiscencia. Cada barra representa la media de la sumatoria de RLUs

(entre 15 y 45 minutos) ± SD, para tres experimentos independientes. Un asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al control (0 mM), $p<0.05$.

Determinación de actividad secuestradora de radicales de CLAs, LA y MLA por ensayo de DPPH.

En las **figuras 3.7A** y **B** se observa que LA y MLA no presentaron actividad secuestradora de radical DPPH a las concentraciones ensayadas (5-25 mM). En estas figuras sólo se representa la máxima concentración (25 mM) para una mejor visualización de los resultados. Tanto CLA c9, t11 como CLA t10, c12 presentaron actividad secuestradora de radicales dependiente de la concentración (**Figuras 3.5 C** y **D**).

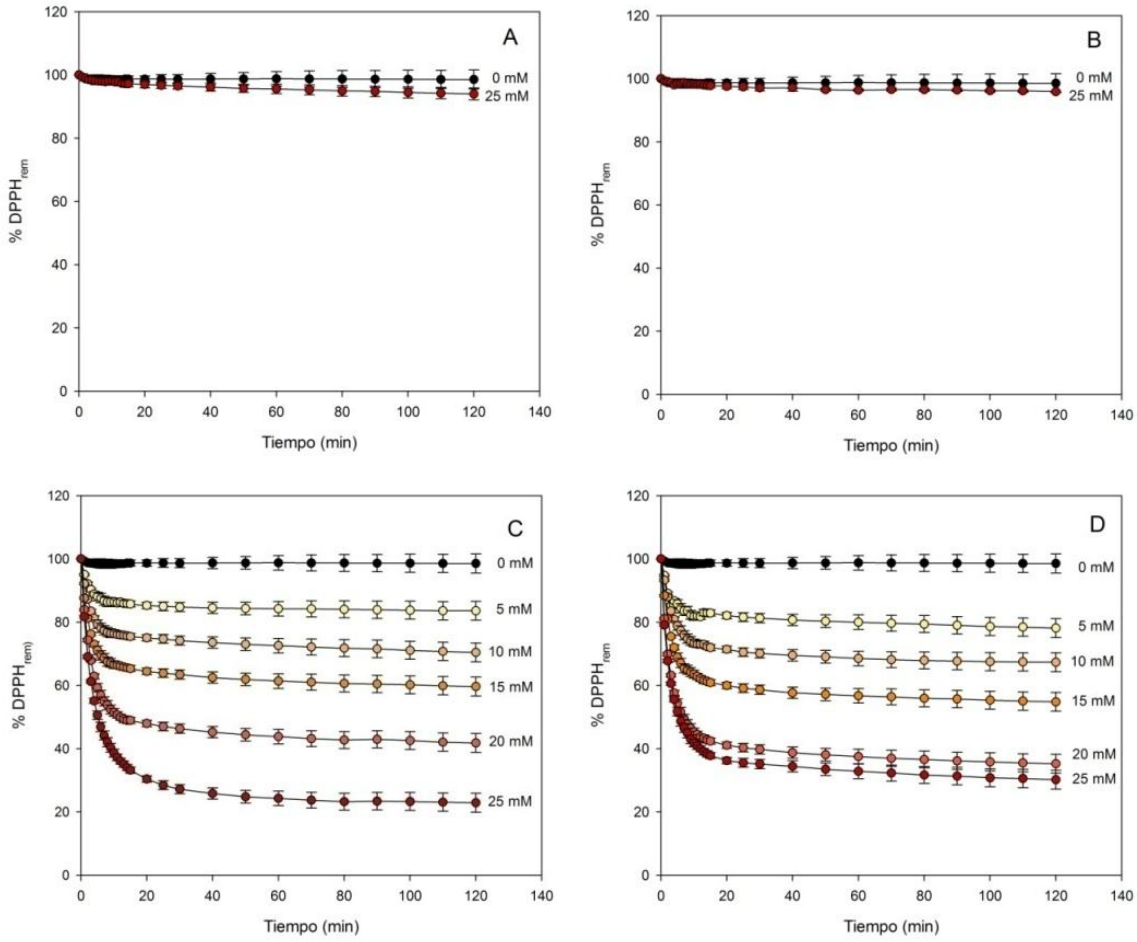

Figura 3.7. Reacción de DPPH con diferentes concentraciones de: A) LA, B) MLA, C) CLA c9, t11 y D) CLA t10, c12 en función del tiempo. Cada punto representa $\bar{x}$ ± SD de tres experimentos independientes.

El %DPPH$_{rem}$ en el estado estacionario se graficó en función de la concentración de CLAs (**Figura 3.8**) para obtener EC_{50} cuyos valores promedio fueron 16,9±0,9mM para CLA c9, t11 y 16,4±0,8mM para CLA t10, c12. Estos valores de EC_{50} no poseen diferencias estadísticamente significativas, por lo que ambos isómeros CLA parecen poseer la misma actividad secuestradora de radicales, determinada por ensayo de DPPH.

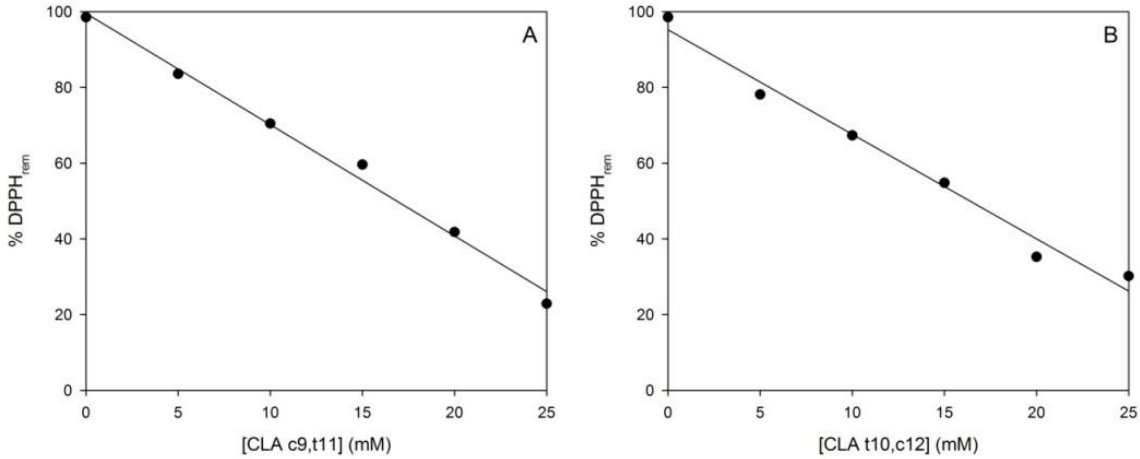

Figura 3.8. Dependencia del %DPPH$_{rem}$ con la concentración de **A)** CLA c9,t11 y **B)** CLA t10, c12

3.4. Discusión

Desde su descubrimiento como inhibidor de la carcinogénesis el ácido linoleico conjugado ha sido descripto como responsable de una gran variedad de efectos biológicos (Pariza, 2004). En realidad, el término "ácido linoleico conjugado" abarca a más de 20 isómeros estructurales. Entre ellos, los isómeros c9, t11 y t10, c12 han demostrado ser igualmente efectivos en la inhibición de la carcinogénesis (Ip y col, 1991). Sin embargo, isómeros diferentes parecen tener diferentes efectos aunque sus mecanismos bioquímicos aún necesitan ser estudiados. Por esta razón en este capítulo se detallan los resultados de nuestros estudios direccionados a investigar el efecto antioxidante de estos compuestos, lo que podría estar relacionado con sus efectos anticancerígenos. En este contexto se analizó la reactividad de dos de los isómeros CLA más importantes (c9, t11 y t10, c12) con radicales lipoperoxilos y con DPPH.

Nuestros resultados demuestran que CLAs fueron más susceptibles a la peroxidación que LA y MLA cuando se analizaron por quimioluminiscencia. Esta característica podría tener dos consecuencias diferentes: los CLAs podrían ser facilitadores de la fase de propagación de la peroxidación o bien, podrían retener la función radical estabilizándola en su estructura y actuando así como antioxidantes. Para definir cuál de estos mecanismos propician los CLAs estudiamos su efecto sobre un sistema de peroxidación de triglicéridos ricos en PUFAs. Los resultados indican que los CLAs lograron inhibir la reacción de peroxidación de los triglicéridos con una efectividad dependiente de la concentración mientras que LA y MLA no tuvieron esta capacidad. Por lo tanto, la diferencia estructural que distingue a los CLAs del LA determina una diferencia funcional que les da carácter antioxidante. No obstante, debemos considerar que las concentraciones de CLAs que resultaron efectivas fueron muy elevadas (≥100 mM). Existe evidencia que demuestra que CLAs, con sus dos dobles enlaces conjugados, serían más vulnerables a la autooxidación que el ácido linolénico, con tres dobles enlaces separados por puentes metileno. Esto se debe a que CLAs pueden donar un electrón o un hidrógeno eficientemente para formar un intermediario radical estabilizado por resonancia (Zhang y Chen, 1997). Tvrzicka y colaboradores (2011) atribuyeron el efecto antioxidante de CLAs a una mayor facilidad para formar estructuras furano.

La mayor reactividad de CLAs frente a radicales comparada con la de LA y MLA también se observó en el ensayo de DPPH donde también se hizo evidente el elevado valor de EC_{50} obtenido para CLAs. Fue necesaria una concentración ≈ 16 mM de CLAs para poder decolorar una solución ≈30 μM de DPPH. Es decir, fue necesaria una concentración de CLAs tres órdenes de magnitud mayor que la de DPPH. Debido a que las concentraciones efectivas de CLAs

fueron muy elevadas creemos que estudios adicionales son necesarios para determinar la actividad secuestradora de radicales de estos compuestos en sistemas que simulen condiciones fisológicas y buscar una correlación entre su actividad antioxidante y sus ya asignados efectos biológicos.