



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

***Composición de ácidos grasos y peroxidación
lipídica de mitocondrias y microsomas aislados de
hígado, corazón y cerebro de aves de diferentes
especies: relación con el tamaño corporal***

Tesis Doctoral

Ana María Gutiérrez

Director: Prof. Dr. Angel Catalá

Codirector: Prof. Dra. Susana Mosca

2015

El presente trabajo de Tesis, para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales, se realizó en la Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias y en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas, (INIFTA-CCT La Plata-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Angel Catalá y la codirección de la Dra.Susana Mosca.

A Daniel, Carolina y Sergio

Mi reconocimiento:

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por haberme brindado la posibilidad de realizar el presente trabajo de investigación en las instalaciones de esa Unidad Académica.

A la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme permitido el uso de sus equipos e instalaciones para la realización de esta Tesis.

Mi agradecimiento:

Al Dr. Ángel Catalá por haberme dado la posibilidad de realizar este trabajo y por demostrarme permanentemente su compromiso y dedicación en mi formación científica

A la Dra Susana Mosca por haber aceptado la responsabilidad de ser mi codirector, por sus atinados consejos, por su valiosa ayuda y el tiempo brindado para realizar este trabajo.

Al Lic. Guillermo Reboredo por la contribución en la realización de este trabajo, por su compañerismo y amistad.

Al Med Vet César Arcemis por su excelente asistencia técnica y por su compañerismo.

A todos mis excelentes compañeros del laboratorio y Cátedra de Bioquímica por su apoyo, comprensión y afecto. Y especialmente a la Lic. Margarita Guajardo y Lic. Ana María Terrasa, que en todos estos años contribuyeron en mi formación.

A la Dra. Mónica Marmunti, Dra. Mariana Gavazza, Lic. Viviana Piergiacomini y al Med Vet Diana Rosa por todos los momentos de amistad compartidos.

RESUMEN

Las aves pueden vivir dos veces más tiempo y poseen tasas metabólicas específicas 2.3 veces mayores que las de los mamíferos de similar tamaño corporal. La temperatura del cuerpo está 3°C por encima de la que presentan los mamíferos y los niveles de glucosa en sangre son 2 a 4 veces más altos.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el ácido araquidónico (C20:4n6) y el ácido docosahexenoico (C22:6n3) juegan un papel importante en una variedad de funciones biológicas. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), son biomoléculas muy susceptibles de ser atacadas por radicales libres, proceso que se denomina peroxidación lipídica. Los radicales libres son generados en las células a través de varios tipos de reacciones bioquímicas y aunque pueden ser potencialmente perjudiciales debido a su alta reactividad química, son especies intermediarias necesarias para la normal actividad metabólica de la célula viviente.

La concentración intracelular de los radicales libres es controlada fisiológicamente por radicales secuestradores, por restricciones espaciales y limitaciones en su difusión intracelular. Sin embargo, en ciertos estados de enfermedad ó bajo la acción de xenobióticos, radiación ó durante los procesos de envejecimiento, la producción de dichas especies aumenta y esto conduce a la alteración de las funciones celulares.

La peroxidación lipídica es una secuencia de reacciones caracterizada por 3 pasos diferentes conocidos como iniciación, propagación y terminación. Como modelo para estudiar los lípidos, nosotros utilizamos ensayos de peroxidación no enzimática cuantificada mediante quimioluminiscencia. Algunos productos de la peroxidación lipídica son emisores de luz, y la medida de esta se puede utilizar como un marcador interno del estrés oxidativo de lípidos que, es generalmente considerado como uno de los principales mecanismos de lesión de las células en los organismos aeróbicos.

Las mitocondrias y microsomas obtenidas de mamíferos y aves son susceptibles a la peroxidación lipídica. La composición de los ácidos grasos de las membranas varía en las diferentes especies y tejidos de una misma especie lo que determina la mayor ó menor vulnerabilidad a la peroxidación lipídica.

Datos previos realizados en mamíferos muestran que la composición de ácidos grasos y el índice de peroxidación varían en relación con la masa corporal. Si bien existen algunos trabajos que tratan de establecer dicha relación en las aves, los resultados no son concluyentes. Teniendo en cuenta estas consideraciones, los objetivos de este trabajo de tesis fueron estudiar la composición de ácidos grasos y peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas aislados de hígado, corazón y cerebro de aves de diferentes especies: relación con el tamaño corporal y máximo de vida.

A continuación se detallan en forma abreviada los resultados obtenidos:

a. Composición de ácidos grasos de las mitocondrias y microsomas

- Los ácidos grasos saturados que presentaron mayor porcentaje fueron el C16:0 y el C18:0.

- El ácido graso monoetilénico predominante fue el C18:1n9.
- Los ácidos grasos poliinsaturados mayoritarios fueron el C18:2n6 y el C20:4n6.
- Las mitocondrias y microsomas de cerebro de las especies de aves examinadas, presentaron altos niveles de ácido C22:6n3, siendo la concentración de este ácido graso mayor que la observada en otros tejidos, lo que estaría en relación a la función del órgano.
- En las aves analizadas predominan los PUFAs n6 que son generalmente más resistentes a la peroxidación que los PUFAs n3.
- El porcentaje total de ácidos grasos no saturados fue similar en todos los órganos examinados, pero la contribución de cada ácido graso fue diferente.
- La composición de ácidos grasos de la dieta no es la responsable del bajo grado de no saturación de los ácidos grasos observados en los órganos de las aves.
- El bajo grado de no saturación es uno de los atributos que presentan los mamíferos y las aves longevas. Esto puede ser debido a un menor contenido de ácidos grasos altamente no saturados como el C22:6n3 y una mayor presencia de ácidos grasos menos no saturados como C18:2n6, sin que existan cambios en el total de ácidos grasos poliinsaturados. Esta redistribución de los ácidos grasos conduce a disminuir los niveles de peroxidación lipídica.

b. Relación entre masa corporal y composición de ácidos grasos

- Las mitocondrias y microsomas de corazón y cerebro de las aves de mayor tamaño, mostraron un menor contenido de C18:0 en comparación con las aves más pequeñas.
- Las mitocondrias de corazón de las especies de aves más grandes presentaron un mayor contenido de C16:1n7.
- Los ácidos grasos monoetilénicos de todos los órganos estudiados sufrieron variaciones con respecto a la masa corporal, pero mientras que en algunos órganos aumentó su concentración en otros disminuyó.
- Las mitocondrias de hígado y cerebro y los microsomas de los tres órganos estudiados mostraron una correlación positiva entre el contenido de C18:2n6, los ácidos grasos poliinsaturados y la masa corporal. La misma tendencia pero sin alcanzar significación estadística fue observada en las mitocondrias de corazón.

c. Relación entre masa corporal, composición de ácidos grasos, peroxidación lipídica y máximo de vida (MLSP).

- El análisis del MLSP y los ácidos grasos mostró que las aves más longevas poseen un perfil de ácidos grasos similar al de las aves de mayor tamaño.
- El contenido de ácidos grasos monoetilénicos de las mitocondrias de cerebro fue significativamente menor en las aves más longevas. Los microsomas de las aves con mayor MLSP presentaron una disminución significativa del C18:0 y un aumento del C18:2n6, de los ácidos grasos poliinsaturados y del total de ácidos grasos no saturados.
- La MLSP y la sensibilidad a la peroxidación lipídica de las mitocondrias y microsomas de hígado y cerebro no se correlaciona con el tamaño corporal.
- Es importante señalar que las mitocondrias y microsomas de hígado y corazón de codorniz (ave pequeña y de corta vida) presentaron ácidos grasos con bajo grado de insaturación, similar a lo observado en las aves longevas. Este hecho podría conferirles a estos órganos

una mayor resistencia a la peroxidación lipídica y esto confirmaría, que la composición de ácidos grasos de las aves es una característica propia de las mismas.

- Algo también importante de subrayar es que, independientemente del tamaño corporal y del MLSP, los corazones de las aves examinadas mostraron una alta resistencia a la peroxidación lipídica. Este comportamiento podría contribuir a la preservación de la función cardíaca.

Los resultados indican que en las aves examinadas predominan los ácidos grasos con bajo grado de no saturación y una alta resistencia a la peroxidación lipídica. Ambas características posiblemente contribuyan para explicar la excepcional longevidad de las aves.

SUMMARY

Birds can live two times longer and have specific metabolic rates 2.3 times those of the mammals of similar body size. Body temperature is 3°C above the presenting mammals and blood glucose levels are 2 to 4 times higher.

Polyunsaturated fatty acids such as arachidonic acid (C20:4n6) and docosahexaenoic acid (C22:6n3) play an important role in a variety of biological functions. Polyunsaturated fatty acids are molecules very susceptible to attack by free radicals, a process called lipid peroxidation. Free radicals are generated in cells by various types of biochemical reactions and although they can be potentially harmful because of their high chemical reactivity, are intermediate species necessary for normal metabolic activity of living cells. The intracellular concentration of free radicals is controlled physiologically by radical scavenger, spatial restrictions and limitations in their intracellular diffusion. However, in certain disease states, or under the action of xenobiotics, radiation or during the aging process, the production of these species increases and this leads to alteration of cell functions.

The lipid peroxidation reaction sequence is characterized by three distinct steps called initiation, propagation and termination. As a model for studying lipid peroxidation we used nonenzymatic assays quantified by chemiluminescence. Some products of lipid peroxidation are light emitters, and this measurement can be used as an internal marker of lipid oxidative stress, which is generally regarded as one of the major mechanisms of injury of the cells in aerobic organisms.

Mitochondria and microsomes obtained from mammals and birds are susceptible to lipid peroxidation. The fatty acid composition of the membranes varies in different species and tissues of the same species which determines the greater or lesser susceptibility to lipid peroxidation.

Previous data performed in mammals show that the fatty acid composition and the rate of peroxidation vary with body mass ratio. Although there are some works that try to establish this relationship in birds, the results are inconclusive. Given these considerations, the objectives of this thesis were to study the fatty acid composition and lipid peroxidation of mitochondria and microsomes isolated from liver, heart and brain of birds of different species: relation to body size and maximum life span.

Summary of results:

a. Fatty acid composition of mitochondria and microsomas

- The C16:0 and C18:0 saturated fatty acids were the most abundant.
- The C18:1n9 monoethylene fatty acid was the predominant.
- The major polyunsaturated fatty acids were C18:2n6 and C20:4n6.
- The brain mitochondria and microsomes of the bird species examined showed high levels of C22:6n3. The concentration of this fatty acid was greater than that observed in other tissues, which would be related to the function of the organ.

- In the birds analyzed predominates the n6 PUFAs are generally more resistant to peroxidation than n3 PUFAs.
- The total percentage of unsaturated fatty acids was similar in all organs examined, but the contribution of each fatty acid was different.
- The fatty acid composition of the diet is not responsible for the low degree of unsaturation of fatty acids observed in the organs of the birds.
- The low degree of unsaturation is one of the attribute that have the long-lived mammals and birds. This may be due to a lower content of highly unsaturated fatty acids as C22:6n3 and an increased presence of less unsaturated fatty acids as C18:2n6, without any changes in total polyunsaturated fatty acids. This redistribution of the fatty acids leads to low levels of lipid peroxidation.

b. Relationship between body mass and fatty acid composition

- Heart and brain mitochondria and microsomes of larger birds showed a lower content of C18:0 compared to the smaller birds.
- The heart mitochondria of larger bird species had a higher content of C16:1n7 than smaller.
- Monoethylenic fatty acids of all organs studied show variations with respect to body mass, but while in some organs their concentrations increased in other decreased.
- The brain and liver mitochondria and microsomes of the three organs studied showed a positive correlation between the content of C18:2n6, polyunsaturated fatty acids and body mass. The same trend was observed in heart mitochondria, although it did not reach statistical significance.

c. Relationship between body weight, fatty acid composition, lipid peroxidation and maximum life span (MLSP)

- Analysis of MLSP and fatty acids showed that the long-lived birds have a fatty acid profile similar to larger size birds.
- The monoethylenic fatty acid content of brain mitochondria was significantly lower in birds that live longer. Bird's microsomes with higher MLSP had significantly decreased the C18:0 and an increase of C18:2n6, polyunsaturated fatty acids and total unsaturated fatty acids.
- The MLSP and sensitivity to lipid peroxidation of mitochondria and microsomes of liver and brain were not correlated with body size.
- It is important to note that mitochondria and microsomes of liver and heart quail (bird small and short-lived) had fatty acids with low degree of unsaturation, similar to that observed in long-lived birds. This could confer to these organs greater resistance to lipid peroxidation.
- Something important to emphasize is that, regardless of body size and the MLSP, the hearts of the birds examined showed a high resistance to lipid peroxidation. This behavior could contribute to the preservation of cardiac function.

The results indicate that in birds examined predominate fatty acids with low degree of unsaturation and a high resistance to lipid peroxidation. Both features may help to explain the exceptional longevity of birds.

Publicaciones en revistas científicas periódicas derivadas de este trabajo de tesis

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Catalá, A. (2002). Fatty acid profiles and lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from liver, heart and brain of *Cairina moschata*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34:605–612.

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Mosca, S.M., Catalá, A. (2004). Fatty acid composition and lipid peroxidation induced by ascorbate-Fe²⁺ in different organs of goose (*Anser anser*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 137:123–132.

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Mosca, S.M., Catalá, A. (2006). A low degree of fatty acid unsaturation leads to high resistance to lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of different organs of quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Mol. Cell. Biochem.* 282:109–115.

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Mosca, S.M., Catalá, A. (2007). Non enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from liver, heart and brain of the bird *Lonchura striata*: relationship with fatty acid composition. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 146: 415-421.

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Mosca, S.M., Catalá, A. (2008). An allometric study of fatty acids and sensitivity to lipid peroxidation of brain microsomes and mitochondria isolated from different bird species. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 150(3): 359-65.

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Mosca, S.M., Catalá, A. (2009). High resistance to lipid peroxidation of bird heart mitochondria and microsomes: Effects of mass and maximum lifespan. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* Part A, 154(3):409-16.

Índice

CAPITULO I	INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	1
I.1.	CONSIDERACIONES GENERALES	2
I.1.2.	ORIGEN Y FUNCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN LA NATURALEZA	2
I.1.3.	RADICALES LIBRES	3
I.1.3.1.	Concepto de radical libre	3
I.1.3.2.	Origen de los radicales libres	6
I.1.4.	ESTRÉS OXIDATIVO	9
I.1.4.1.	Concepto de estrés oxidativo	9
I.1.4.2.	Daño oxidativo a lípidos	9
I.1.5.	COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	13
I.1.6.	TAMAÑO CORPORAL	16
I.1.7.	MÁXIMO DE VIDA (MLSP)	18
I.1.8.	MAMÍFEROS	20
I.1.8.1	Tasa metabólica y tamaño corporal	20
I.1.8.2.	Máximo de vida, tamaño corporal y gasto energético	21
I.1.8.3.	Producción mitocondrial de radicales libres y defensas antioxidantes	22
I.1.8.4.	Composición de la membrana, peroxidación lipídica, tamaño del cuerpo, y máximo vida de los mamíferos	23
I.1.9.	AVES	25
I.1.9.1.	Máximo de vida, tamaño corporal y gasto energético	26
I.1.9.2.	Análisis comparativo entre mamíferos y aves	27
	OBJETIVOS	30
CAPITULO II	MATERIALES Y MÉTODOS	32
II.1.	MATERIALES	33
II.1.1.	Animales utilizados	33
II.1.2.	Material de cromatografía	34
II.1.3.	Estándares	34
II.1.4.	Otros materiales	34
II.2.	MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS	35
II.2.1.	Métodos utilizados para la obtención de fracciones subcelulares	35
II.2.1.1.	Preparación de mitocondrias y microsomas	35
II.2.1.2.	Obtención de microsomas por filtración a través de sepharosa 4B	35
II.2.2.	Determinación de proteínas	37
II.2.3.	Quimioluminiscencia y lipoperoxidación de mitocondrias y microsomas	37
II.2.4.	Métodos empleados para la obtención de lípidos	38

II.2.4.1.	Extracción de lípidos	38
II.2.4.2.	Análisis del contenido de ácidos grasos por cromatografía gaseosa	39
II. 3	CALCULOS	39
II.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
CAPITULO III	PEROXIDACIÓN LIPÍDICA NO ENZIMÁTICA DE MICROSOMAS Y MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO, CORAZÓN Y CEREBRO DE MANÓN (<i>Lonchura striata</i>). RELACIÓN CON LA COMPOSICIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS	42
III.1.	INTRODUCCIÓN	43
III.2.	RESULTADOS	43
III.2.1.	Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro de manón	43
III.2.2.	Composición de ácidos grasos de la dieta	51
III.2.3.	Quimioluminiscencia de mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro: perfil de ácidos grasos	51
III.3.	DISCUSIÓN	53
CAPITULO IV	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA NO ENZIMÁTICA DE MITOCONDRIAS Y MICROSOMAS OBTENIDOS DE HÍGADO, CORAZÓN Y CEREBRO DE CODORNIZ (<i>Coturnix coturnix japonica</i>)	55
IV.1.	INTRODUCCIÓN	56
IV.2.	RESULTADOS	56
IV.2.1.	Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro de la codorniz	56
IV.2.2.	Perfil de ácidos grasos y quimioluminiscencia de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro	63
IV.3.	DISCUSIÓN	66
CAPITULO V	PEROXIDACIÓN LIPÍDICA NO ENZIMÁTICA EN MICROSOMAS Y MITOCONDRIAS OBTENIDAS DE HÍGADO, CORAZÓN Y CEREBRO DE PALOMA CASERA (<i>Columba livia</i>). CAMBIOS OBSERVADOS EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS	68
V.1.	INTRODUCCIÓN	69
V.2.	RESULTADOS	69
V.2.1.	Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro de paloma (<i>Columba livia</i>)	69
V.2.2.	Quimioluminiscencia de mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro: perfil de ácidos grasos	75
V.3.	DISCUSIÓN	76
CAPITULO VI	PEROXIDACIÓN LIPÍDICA NO ENZIMÁTICA EN MICROSOMAS Y MITOCONDRIAS OBTENIDAS DE HÍGADO, CORAZÓN Y CEREBRO DE PATO CRIOLLO (<i>Cairina moschata</i>). CAMBIOS OBSERVADOS EN EL PERFIL ÁCIDOS GRASOS	78
VI.1.	INTRODUCCIÓN	79
VI.2.	RESULTADOS	79
VI.2.1.	Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro	79
VI.2.2.	Perfil de ácidos grasos y quimioluminiscencia de mitocondrias y	80

VI.2.3.	microsomomas obtenidos de hígado Perfil de ácidos grasos y quimioluminiscencia de las mitocondrias y microsomomas obtenidos de corazón	85
VI.2.4.	Perfil de ácidos grasos y quimioluminiscencia de mitocondrias y microsomomas obtenidos de cerebro	85
VI.2.5.	Composición de ácidos grasos de la dieta	88
VI.3.	DISCUSIÓN	89
CAPITULO VII	PEROXIDACIÓN LIPÍDICA NO ENZIMÁTICA EN MICROSOMAS Y MITOCONDRIAS OBTENIDAS DE HÍGADO, CORAZÓN Y CEREBRO DE GANSO COMUN (<i>Anser anser</i>). CAMBIOS OBSERVADOS EN EL PERFIL ÁCIDOS GRASOS	91
VII.1.	INTRODUCCIÓN	92
VII.2.	RESULTADOS	92
VII.2.1.	Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro de ganso	92
VII.2.2.	Comparación de la composición de ácidos grasos de las organelas con la dieta	98
VII.2.3.	Perfil de ácidos grasos y quimioluminiscencia obtenida de mitocondrias y microsomomas de hígado, corazón y cerebro de ganso	99
VII.3.	DISCUSIÓN	102
CAPITULO VIII	RELACIÓN ENTRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS, LIPOPEROXIDACIÓN Y MÁXIMO DE VIDA EN MITOCONDRIAS Y MICROSOMAS DE HÍGADO DE AVES DE DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL	104
VIII.1.	INTRODUCCIÓN	105
VIII.2.	RESULTADOS	105
VIII.2.1.	Relación entre la masa hepática y la masa corporal	105
VIII.2.2.	Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomomas de hígado	107
VIII.2.3.	Relación entre la masa corporal y la composición de ácidos grasos	110
VIII.2.4.	Relación entre el máximo de vida y la composición de ácidos grasos	115
VIII.2.5.	Comparación entre el efecto de la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomomas de hígado con el tamaño corporal y el máximo de vida	117
VIII.3.	DISCUSIÓN	121
CAPITULO IX	RELACIÓN ENTRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS, LIPOPEROXIDACIÓN Y MÁXIMO DE VIDA EN MITOCONDRIAS Y MICROSOMAS DE CORAZÓN DE AVES DE DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL	123
IX.1.	INTRODUCCIÓN	124
IX.2.	RESULTADOS	124
IX.2.1.	Relación entre el tamaño del corazón y la masa corporal	124
IX.2.2.	Composición de ácidos grasos de las mitocondrias y microsomomas de corazón	126
IX.2.3.	Comparación de la peroxidación lipídica en mitocondrias y microsomomas de corazón aislados de diferentes especies de aves	134
IX.3.	DISCUSIÓN	135

CAPITULO X	RELACIÓN ENTRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS, LIPOPEROXIDACIÓN Y MÁXIMO DE VIDA EN MITOCONDRIAS Y MICROSOMAS DE CEREBRO DE AVES DE DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL	138
X.1.	INTRODUCCIÓN	139
X.2.	RESULTADOS	139
X.2.1.	Composición de ácidos grasos de las mitocondrias y microsomas de cerebro	140
X.2.2.	Relación entre la masa corporal y la composición de ácidos grasos	143
X.2.3.	Relación entre la composición de ácidos grasos y máximo de vida de las mitocondrias y microsomas	145
X.2.4.	Comparación entre el efecto de la peroxidación lipídica de las mitocondrias y microsomas de cerebro con el tamaño corporal	145
X.2.5.	Comparación entre el efecto de la peroxidación lipídica de las mitocondrias y microsomas de cerebro y el máximo de vida	150
X.3.	DISCUSIÓN	151
	CONCLUSIONES GENERALES	154
	BIBLIOGRAFIA	160

Abreviaturas

µg: microgramo

µl: microlitro

ATP: adenosín trifosfato

BSA: albúmina sérica bovina

cpm: cuentas por minuto

g: gramo

M: molar

mg: miligramo

min: minuto

ml: mililitro

mM: milimolar

mmol: milimol

PM: peso molecular

S: segundo

SD: desviación estándar

Tris: 2-amino-2 hidroximetil propano-1,3 diol

v/v: volumen en volumen

Vt: volumen total

g: fuerza de la gravedad

log: logaritmo

CAPITULO I

Introducción general y objetivos del trabajo

I.1 CONSIDERACIONES GENERALES

Las aves son un grupo diverso con aproximadamente 9600 especies distribuidas en 29 órdenes que, en general, son notables por su longevidad (Gill, 2007).

El tamaño del cuerpo de las aves varía aproximadamente 40.000 veces desde la más pequeña a la más grande. El rango de variación en las tasas metabólicas, tiempo de vida y modelos de envejecimiento son igualmente asombrosos (Holmes y col., 1995a, b; Holmes y col., 2001). Las aves pueden vivir dos veces más tiempo que los mamíferos de igual masa corporal. Documentaciones sobre máximos de vida muestran que un ratón de laboratorio que pesa 20 g raramente vive más de cuatro años, mientras que pequeñas aves cantoras a menudo exceden los 10 años. Los ejemplos más paradójicos de longevidad en aves son los picaflores. Ellos constituyen las aves más pequeñas, con las mayores tasas metabólicas. Individuos de algunas especies han sobrevivido más de 14 años en su hábitat natural (Calder, 1985). Las aves poseen tasas metabólicas específicas 2.3 veces mayores que las de los mamíferos de similar tamaño corporal (Speakman, 2005; Ricklefs, 2008), la temperatura del cuerpo está 3 °C por encima de la que presentan los mamíferos y los niveles de glucosa en sangre son 2 a 4 veces más altos (Holmes y Ottinger, 2003).

I.1.2. ORIGEN Y FUNCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN LA NATURALEZA

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) constituyen una amplia familia de biomoléculas lipídicas cuya estructura básica consta de una cadena hidrocarbonada lineal (-CH₂-CH₂-CH₂-) que contiene uno o más dobles enlaces (también denominados insaturaciones) y está delimitada por un extremo metilo (-CH₃) y otro carboxilo (-COOH). Si la molécula contiene un solo doble enlace, el ácido graso se denomina monoetilénico (MUFA), en cambio si contienen dos o más dobles enlaces, se denominan poliinsaturados (PUFAs). Teniendo en cuenta la posición del doble enlace más cercano al extremo metilo de la cadena hidrocarbonada, se determina tanto la serie, como las propiedades físicas y fisiológicas de los distintos MUFAs y PUFAs. Se conocen 4 familias independientes de ácidos grasos poliinsaturados:

Serie n₃, derivados del ácido α-linolénico (18:3n₃)

Serie n6, derivados del ácido linoleico (18:2n6)

Serie n7, derivados del ácido palmitoleico (16:1n7)

Serie n9, derivados del ácido oleico (18:1n9)

Los PUFAs y sus metabolitos tienen una variedad de funciones fisiológicas que incluyen la provisión de energía, estructura de la membrana, señalización celular y regulación de la expresión génica.

Los animales son absolutamente dependientes de las plantas porque éstas les proporcionan los dos principales precursores de los ácidos grasos n-6 y n-3 (ácido linoleico y linolénico). Estos precursores se convierten en ácidos grasos que contienen desde tres hasta seis dobles enlaces (Poulos, 1995). En los animales, algunas de las necesidades diarias de PUFAs de cadena larga se obtienen de la dieta. Sin embargo, la mayoría de los PUFAs de cadena larga que se encuentran en los tejidos animales derivan de elongaciones y desaturaciones a partir de la conversión de los ácidos grasos esenciales.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el ácido araquidónico (C20:4n-6) y el ácido docosahexenoico (C22:6n-3) juegan un papel importante en una variedad de funciones biológicas (Spector, 1999). Los ácidos grasos poliinsaturados son componentes esenciales en eucariotas superiores confiriendo fluidez, flexibilidad y permeabilidad selectiva a las membranas celulares. Los PUFAs afectan a muchos procesos fisiológicos de las plantas y de los animales (Catalá, 2006, 2009, 2010, 2011).

I.1.3. RADICALES LIBRES

I.1.3.1. Concepto de radical libre

Radical libre es aquella especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia. La presencia de electrones desapareados hace que los radicales libres sean muy reactivos. Debido a su gran reactividad, se caracterizan por tener una vida media del orden de milisegundos, aunque varía según el tipo de radical libre (Simic y cols., 1988)

En la naturaleza los radicales libres son compuestos generalmente oxigenados y se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS).

Las reacciones por ROS son abundantes en los sistemas vivos. Una explicación razonable sobre la presencia de esta clase de reacciones químicas surge de los estudios sobre el origen y evolución de la vida (Harman, 2001).

Parece ser que la vida se originó espontáneamente hace 3.500 millones de años a partir de los aminoácidos, nucleótidos y otras sustancias químicas básicas. Estas moléculas fueron el producto de componentes simples reducidos de la atmósfera primitiva, sometidos a reacciones por radicales libres, iniciadas esencialmente por la intensa radiación ionizante del sol.

Debido a que los organismos se desarrollan en presencia de oxígeno, están expuestos a la generación de ROS. Éstos son responsables del daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas (Sies y col., 1983; Halliwell y col., 1989; Halliwell y col., 1996). Así pues, participan en mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, como algunos tipos de cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos (Wolf y col., 1986), patologías gastrointestinales o procesos neurodegenerativos.

También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento, el daño causado por el ejercicio físico agotador (Davies y col., 1982; Sastre y col., 1992) y otros.

Asimismo, existen también radicales libres nitrogenados o especies reactivas de nitrógeno (RNS), cuya importancia ha crecido considerablemente en los últimos tiempos.

Tabla I.1.3.1. Importantes especies reactivas de oxígeno y aldehídos de lípidos

Especies reactivas de oxígeno y aldehídos			
Radicales		No radicales	
Hidroxilo	(HO [•])	Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
Superóxido	(O ₂ ^{•-})	Oxígeno singlete	¹ O ₂
Peroxilo Lipídico	(LOO [•])	Hidroperóxido lipídico	LOOH
Alcoxilo	(RO [•])	4-hidroxi-2-hexenal	HHE
Peroxilo	(ROO [•])	4-hidroxi-2-nonenal	HNE

ROS es un término colectivo que incluye a los radicales así como los no radicales derivados del oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1999; Tabla I.1.3.1).

La oxidación mitocondrial es esencial para obtener energía que asegure las funciones vitales de la célula. El ciclo de los ácidos tricarbónicos es el responsable de la mayor parte de la oxidación de los glúcidos de la dieta. Posteriormente, en el proceso de transporte de electrones la mayor parte de los mismos se utilizan para reducir el oxígeno hasta H₂O produciendo adenosín trifosfato (ATP), molécula fundamental, que es la fuente energética celular. Sin embargo, un pequeño número de electrones se une al oxígeno prematuramente formando el anión superóxido (O₂^{•-}). Ésta es la vía de producción mayoritaria de ROS.

La reducción del oxígeno genera tres tipos principales de ROS: los radicales superóxido e hidroxilo, y el no radical peróxido de hidrógeno. Como hemos dicho el anión superóxido es el primer ROS producido. Se forma fundamentalmente en la oxidación mitocondrial pero también en otros procesos enzimáticos (como en las reacciones catalizadas por oxidasas/deshidrogenasas, flavoproteínas y metaloproteínas), por lo que es el ROS más abundante. Carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas ya que posee una vida media del orden de milisegundos. Sin embargo, puede iniciar la cadena de formación de ROS directamente o, de forma más frecuente a través de procesos catalizados por enzimas o metales. El radical hidroxilo es extremadamente reactivo, reacciona con todas las moléculas que encuentra a su alcance. Tiene una vida muy corta in vivo (del orden de 10⁻⁹ segundos), lo que limita su capacidad de

difusión tisular. Puede ser generado por la combinación del radical superóxido y H_2O_2 mediante la secuencia conocida como reacción de Haber-Weiss, descrita en 1932:



Sin embargo, el peróxido de hidrógeno y el superóxido no pueden reaccionar directamente *in vivo*, por lo que la activación ocurre según se describe en una reacción en la que los metales de transición (fundamentalmente hierro y en menor medida el cobre) actúan como catalizadores. Es la llamada reacción de Fenton:



El estado redox de la célula está muy relacionado con el hierro. A pH fisiológico el porcentaje más alto de hierro está oxidado y unido a sus quelantes biológicos en forma de Fe^{+3} . Para participar en la reacción de Fenton el hierro tiene, por lo tanto, que ser convertido a Fe^{+2} . Sin embargo, *in vivo* y bajo condiciones de estrés celular, un exceso de anión superóxido libera hierro de sus moléculas quelantes, desencadenando la reacción de Fenton (Fenton, 1894)

Así, H_2O_2 , aunque no es un radical en sí, puede comportarse como un caballo de Troya y difundir a distancia de los sitios de su producción para generar hidroxilo y otros radicales reactivos en otros puntos celulares, propagando de este modo el daño oxidativo.

I.1.3.2. Origen de los radicales libres

Los radicales libres pueden ser de origen endógeno o exógeno (Freeman y Crapo, 1982; Frei, 1994).

Fuentes exógenas generadoras de radicales libres

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies activadas de oxígeno son las siguientes:

- Muchos agentes antineoplásicos (Deno y col., 1982), tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos (Doroshov y col., 1982).
- La exposición de los organismos a las radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) o a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (Bielsky y col., 1977).
- Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solvente, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Mason, 1982).

Fuentes endógenas generadoras de radicales libres

- **La cadena de transporte de electrones mitocondrial**

La cadena de transporte de electrones mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en el interior de la célula.

- **El sistema hipoxantina/xantina oxidasa**

La xantina deshidrogenasa es una metaloflavoenzima compleja que participa en el metabolismo de las purinas, oxidando la hipoxantina a xantina y esta a ácido úrico.

- **Sistemas de transporte de electrones del retículo endoplásmico**

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P450 y b_5 , que pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenobióticos.

- **Fagocitos activados**

Los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar $\bullet\text{O}_2^-$ y H_2O_2 como mecanismo para combatir a los microorganismos (Babior, 1978).

- **Microsomas**

Término ideado por el bioquímico francés A. Claude para designar uno de los productos de la ultracentrifugación de hígado homogeneizado. En la actualidad los microsomas tienen un sentido mucho más amplio, que no corresponde a una estructura celular definida, y están formados por membranas de retículo endoplasmático liso y rugoso. Estos microsomas tienen función oxidasa que depende del citocromo P450. (Brown y Borutaite, 2012)

- **Diversas enzimas**

Las principales enzimas que contribuyen a la generación endógena de especies reactivas de oxígeno son:

- Enzimas citosólicas solubles como la aldehído oxidasa y la óxido nítrico sintasa.
- Enzimas unidas a la membrana plasmática, como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa. Participan en el metabolismo del ácido araquidónico, generando radicales libres durante su ciclo de catálisis (Freeman y Crapo, 1982; Frej, 1994).

- **Oxidación de moléculas por el oxígeno**

Muchas moléculas del cuerpo reaccionan directamente con el oxígeno, siendo el superóxido el principal radical formado (Halliwell, 1994). Algunas de estas moléculas son la dopamina, la adrenalina (Fridovich, 1986).

A menudo se supone que las mitocondrias son la principal fuente de ROS en células de mamíferos, pero no hay ninguna evidencia experimental convincente para ello en la literatura. En efecto, el retículo endoplásmico y los peroxisomas tienen una mayor capacidad de producir ROS que las mitocondrias, al menos en el hígado. Las mitocondrias pueden degradar rápidamente ROS y por lo tanto son potenciales receptores de ROS (Brown y Borutaite, 2012).

Los microsomas representan fracciones del retículo endoplásmico. Estas organelas celulares contienen el sistema que interviene en la desaturación de ácidos grasos (Enoch y col., 1976) y además el sistema P450, que está presente en todas las especies aeróbicas y realiza procesos oxidativos vitales; a saber: detoxificación de compuestos extraños y biosíntesis de hormonas y otras moléculas esenciales (Coon, 2003). Durante los procesos oxidativos mediados por P450, la reducción de oxígeno conduce a la hidroxilación de sustrato y también produce la liberación de ion superóxido y peróxido de hidrógeno. Cuando el sistema está desacoplado, la reducción de equivalentes de oxígeno consumido se desvía de la ruta normal de hidroxilación de sustrato, lo que resulta en la formación de uno o más de los productos secundarios de reducción de oxígeno (H_2O_2 , O_2^-). Los resultados presentados por Svingen y col. (1979), demostraron un mecanismo de peroxidación de

lípidos NADPH-dependiente en microsomas y su secuencia de reacciones en la etapa de propagación que ha sido fundamental para establecer los mecanismos involucrados en la peroxidación lipídica (enzimática y no enzimática).

I.1.4. ESTRÉS OXIDATIVO

I.1.4.1. Concepto de estrés oxidativo

A pesar del papel fisiológico que desempeñan los ROS, estos también son capaces de producir reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes (Halliwell, 1996).

La formación de ROS es un proceso normal e inevitable (Slater, 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. Estas especies no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes.

Cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras (Sies, 1986), el resultado es un daño oxidativo, que puede afectar a diversas moléculas, y que puede reflejarse en sus funciones fisiológicas.

I.1.4.2. Daño oxidativo a lípidos

Los lípidos, sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por radicales libres (Cheeseman y Slater, 1993). Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son el radical hidroxilo ($\text{HO}\bullet$), el peroxilo ($\text{ROO}\bullet$), el alcoxilo ($\text{RO}\bullet$) y el alquílico ($\text{R}\bullet$).

El proceso de ataque oxidativo a los lípidos se denomina peroxidación lipídica. Los radicales libres son generados en las células a través de varios tipos de reacciones bioquímicas y aunque pudieran ser potencialmente perjudiciales debido a su alta reactividad química, son especies intermediarias necesarias para la normal actividad metabólica de la célula viviente. La concentración intracelular de los radicales libres es controlada fisiológicamente por radicales secuestradores, por restricciones espaciales y limitaciones en

su difusión intracelular. Sin embargo, en ciertos estados de enfermedad ó bajo la acción de xenobióticos ó radiación ó durante los procesos de envejecimiento, los radicales libres generados endógenamente pueden ser perjudiciales y tener serias consecuencias para las funciones celulares (Slater, 1984; Comporti, 1985; Halliwell y col., 1986; Ames y col., 1982).

La peroxidación lipídica es un proceso de reacción en cadena que involucra la participación de diferentes ROS. Numerosas evidencias establecen una relación entre peroxidación lipídica, genotoxicidad y carcinogénesis (Ames B. y col., 1982, 1983; Kensler y col., 1984).

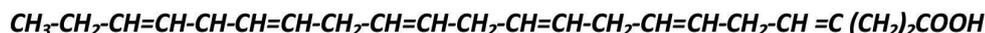
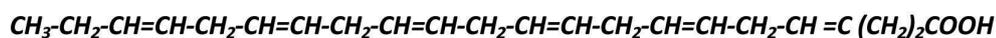
La peroxidación lipídica es una secuencia de reacciones caracterizada por 3 pasos diferentes conocidos como iniciación, propagación y terminación. La Fig. I.4.2 muestra un diagrama esquemático de la peroxidación lipídica no enzimática del ácido docosahexaenoico (22:6 n-3), lípido estructural muy importante en el sistema nervioso. (Vaca, C.E. y col., 1988; Catalá, 2010, 2011).

Comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Frei, 1994; Halliwell, 1994). Esta reacción se produce significativamente en los carbonos contiguos a dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se estabilizan por resonancia con el doble enlace. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O₂ y forma un radical peroxilo, R-COO•. Los radicales peroxilos pueden reaccionar a su vez con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, se forma un radical alquílico (R'-CH•) y un peróxido lipídico, propagándose la reacción en cadena radicalaria (Halliwell, 1994). O sea que, el ataque por un solo radical libre da lugar a la formación de un gran número de especies activas, lo cual desemboca en la oxidación de una gran cantidad de productos de reacción, sobre todo hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano y aldehídos como malondialdehído, 4-hidroxi-2-nonenal y 4-hidroxi-2-hexenal (Freeman y Crapo, 1982; Halliwell, 1991; Cheeseman y Slater, 1993; Halliwell, 1994; Catalá, 2006, 2009, 2010, 2011). El 4-hidroxi-2-nonenal es un electrófilo, uno de los principales productos finales del metabolismo de lípidos. Un electrófilo es un reactivo químico atraído hacia zonas ricas en electrones, que participa en una reacción química aceptando un par de electrones, formando un enlace de tipo covalente con un nucleófilo (especie que reacciona cediendo un par de electrones libres a otra especie). La mayoría de

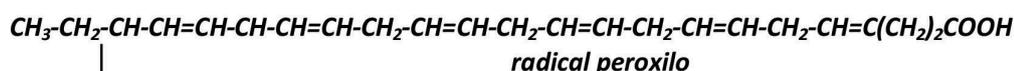
los electrófilos celulares son generados a partir de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, reacción en cadena que es fácilmente provocada por el oxígeno centrado en los radicales, que se propaga sin más intervención que los ROS. Evidencias actuales justifican que la peroxidación de los lípidos de membrana y por lo tanto los electrófilos son capaces de modular la vida (Zimnia, 2011). También, muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, causando mutaciones en el ADN, y produciendo daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Frei, 1994).

Esos productos de degradación también pueden difundir lejos de su lugar de producción y causar edema celular, además de influir sobre la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Asimismo, ellos pueden alterar la actividad de fosfolipasas e inducir la liberación de ácido araquidónico, con la subsiguiente formación de prostaglandinas y endoperóxidos o también en esta fase de terminación se pueden producir compuestos no reactivos mediante reacciones con antioxidantes.

INICIACION



•

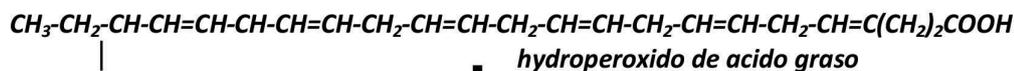


radical peroxilo

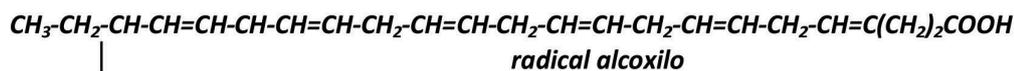
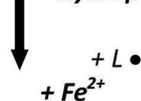
PROPAGACION



radical peroxilo



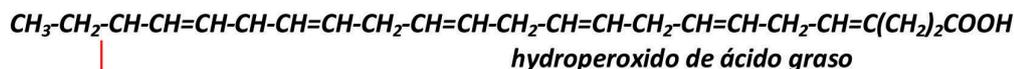
hidroperoxido de ácido graso



radical alcoxilo



TERMINACION



hidroperoxido de ácido graso



4-hydroxy-2-nonenal (HNE) 1.4.2

Figura 1.4.2 -Representación esquemática de la peroxidación del ácido docosahexaenoico inducida por radicales hidroxilo (Vaca, C.E. y col., 1988).

La peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados puede ser enzimática y no enzimática.

La peroxidación no enzimática, mediante ensayos de quimioluminiscencia, se utilizó como modelo para estudiar el proceso degradativo de los ácidos grasos poliinsaturados. Algunos productos de la peroxidación lipídica son emisores de especies de luz (quimioluminiscencia, ver Material y Métodos), y su luminosidad se puede utilizar como un marcador interno del estrés oxidativo de lípidos que, es generalmente considerado como uno de los principales mecanismos de la lesión de las células en los organismos aeróbicos.

La peroxidación lipídica no enzimática puede ser iniciada por la adición de ascorbato en presencia de oxígeno y de iones Fe^{2+} o Fe^{3+} . La medición de la peroxidación lipídica es uno de los métodos de evaluación más utilizados para medir los daños inducidos por ROS (Pamplona y col., 1998; Ozgova y col., 2003; Hsieh y Kinsella, 1989; Dmitriev, 2001; Catalá, 2006).

Hay dos resultados generales de la peroxidación lipídica: daño estructural de las membranas y la generación de productos secundarios. El daño de la membrana deriva de la generación de la fragmentación de las cadenas de ácido graso, formación de enlaces lípido-lípido y lípido-proteína. Por lo tanto la peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el C20:4n6 y el C22:6n3 produce isoprostanos y neuroprostanos, respectivamente, llevando a alteraciones de la función de las membranas, inactivación enzimática, efectos tóxicos en la división celular, etc, (Halliwell y Gutteridge, 1990; Bonorden y Pariza, 1994; Aruoma, 1994).

I.1.5. COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los ROS pueden atacar moléculas celulares como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e hidratos de carbono (Sanz y col., 2006). Los daños a los lípidos de membrana también son muy relevantes para la determinación del máximo de vida. La susceptibilidad de la membrana lipídica al daño oxidativo está relacionada con dos propiedades.

La primera, es que el oxígeno y muchas especies de radicales son varias veces más solubles en la bicapa lipídica que en el medio acuoso (Moreau y col., 2005). La segunda propiedad está relacionada con el hecho de que no todas las cadenas de ácidos grasos son

igualmente sensibles al ataque de los ROS. Es esta segunda propiedad la clave para el vínculo entre la composición de la membrana y el daño oxidativo. Los átomos de carbono que son más susceptibles a ataque radical son los carbonos de enlace simple ubicados entre los carbonos de doble enlace de las cadenas acilo (Halliwell y Gutteridge, 1999). Los átomos de hidrógeno adyacentes a estos átomos de carbono se denominan bis-alílicos. El proceso de ataque y daño oxidativo que sufren los lípidos no saturados se debe a reacciones en cadena mediadas por radicales libres, iniciadas por la abstracción de un átomo de hidrógeno del metileno bis-alílico del lípido no saturado por un radical libre reactivo y seguido por una secuencia de reacciones propagadoras. Esto significa que las cadenas saturadas y de ácidos grasos monoinsaturados (SFA y MUFA, respectivamente) son esencialmente resistentes a la peroxidación y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son los más sensibles. Además, los PUFA con mayor grado de polinsaturación, son los más propensos al daño peroxidativo. Holman (1954) empíricamente determinó (por medio del consumo de oxígeno) las susceptibilidades relativas de las diferentes cadenas acilo (Fig.I.1.5.). El C22:6n3, es altamente polinsaturado, posee seis dobles ligaduras, es muy susceptible a ataque peroxidativo y es ocho veces más propenso a la peroxidación que el C18:2n6, que tiene sólo dos dobles enlaces. El C22:6n3, es 320 veces más susceptible a la peroxidación que el ácido oleico (Holman, 1954). El índice de peroxidación (PI) de una membrana no es igual que el índice de no saturación (UI) a veces también llamado índice de dobles ligaduras, que es una medida de la cantidad de dobles ligaduras en la membrana. (Ver Material y Métodos). Por ejemplo, una membrana constituida únicamente por ácidos grasos monoinsaturados tendrá un índice de no saturación de 100 y un índice de peroxidación de 2.5 mientras que una membrana constituida por un 95 % de ácidos grasos saturados y 5 % de C22:6n3, tendrá un índice de no saturación de 30 y un índice de peroxidación de 40. Esto quiere decir, que, aunque el 5 % de la membrana que contiene C22:6n3 tiene sólo un 30 % de dobles ligaduras y es 16 veces más susceptible a la peroxidación que aquella que contiene ácidos grasos monoinsaturados.

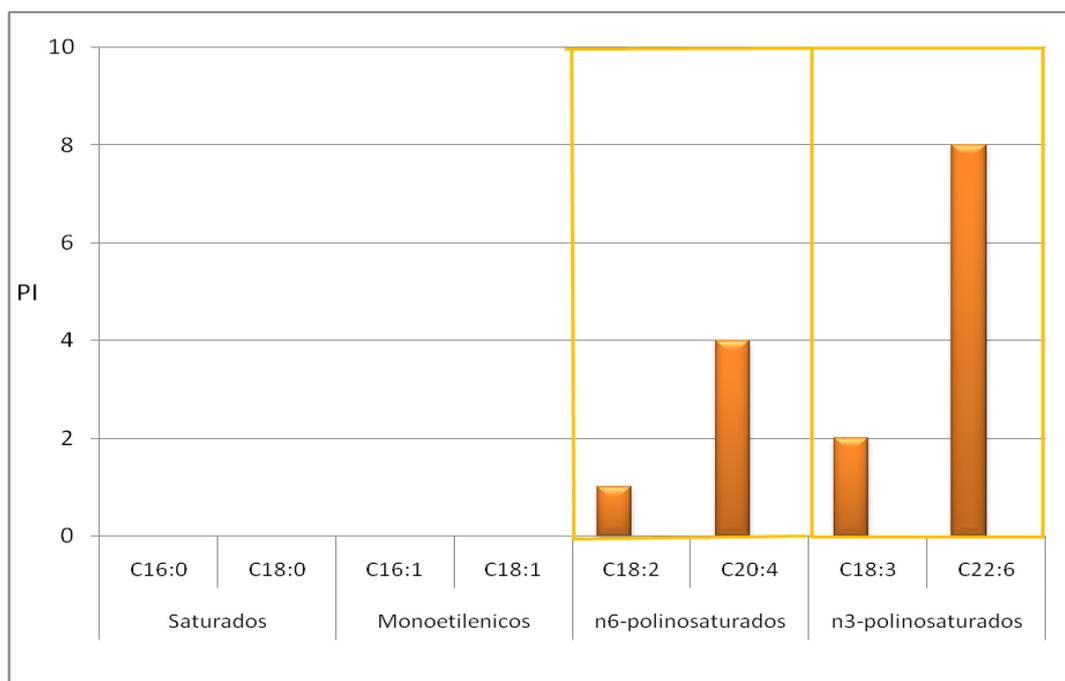


Figura I.1.5. Susceptibilidad relativa de determinados ácidos grasos a la peroxidación. Los valores fueron determinados empíricamente por consumo de oxígeno y expresados en relación con la tasa del ácido linoleico 18:2 n6, que se le da un valor de 1 (Holman, 1954).

Los radicales libres reactivos remueven los átomos de hidrógeno bis alílicos de las cadenas de los ácidos grasos poliinsaturados y el carbono de donde el hidrógeno es extraído ahora tiene un electrón desapareado (es decir, es también un radical libre). Cuando tales radicales C^{\bullet} son generados en el interior hidrofóbico de membranas, este es un destino probable de combinación con el oxígeno disuelto en la misma. El radical peroxilo resultante es altamente reactivo: puede atacar proteínas de la membrana y también puede oxidar cadenas de ácidos grasos poliinsaturados adyacentes. Así, la reacción inicial, es una reacción en cadena que se propaga. A menos que sea neutralizada por antioxidantes, la peroxidación lipídica es una autopropagación autocatalítica que produce varios potentes ROS. Puede también generar hidroperóxidos de lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1999), que son más hidrofílicos que las cadenas de ácidos grasos no peroxidables y estos así pueden alterar la estructura de la membrana, modificando la fluidez y otras propiedades funcionales de las membranas.

Los hidroperóxidos y endoperóxidos generados por la peroxidación de los lípidos, pueden fragmentarse para producir una amplia gama de moléculas, tales como alcanos, alquenos, hidroxialquenos, glioxal y malonaldehído (Catalá, 2009, 2010, 2011) Estos compuestos carbonilos (colectivamente descritos como “propagadores”) tienen propiedades únicas contrastadas con los radicales libres. Por ejemplo, en comparación con ROS o RNS, los aldehídos reactivos tienen un período de semi desintegración más largo (minutos en lugar de microsegundos y nanosegundos característicos de la mayoría de los radicales libres).

Los ácidos grasos no saturados son también responsables de la naturaleza "fluída" de las membranas biológicas. Se ha demostrado que la introducción del primer doble enlace a una cadena acilo, es responsable de su fluidez a temperaturas fisiológicas normales. La introducción de más dobles enlaces a la cadena de acilo tiene poco efecto adicional en la fluidez de membrana (Brenner, 1984). Así, la sustitución de los ácidos grasos con cuatro o seis dobles enlaces por aquellos que poseen sólo dos (o a veces tres) dobles enlaces disminuirá fuertemente la susceptibilidad a la peroxidación lipídica manteniendo la fluidez de membrana. Este hecho podría explicar la longevidad (Pamplona y Barja, 2003).

Se destaca que la composición de ácidos grasos de membrana influye: 1) en la tasa metabólica (a través de los efectos sobre las propiedades físicas de las bicapas de las membranas y 2) en el grado de estrés oxidativo y daño a moléculas celulares (a través de la peroxidación de las cadenas de ácidos grasos).

I.1.6. TAMAÑO CORPORAL

Para mantener un diseño funcionalmente equilibrado, la forma, o sea, las proporciones entre las distintas partes del cuerpo, cambian con el tamaño corporal (masa ó peso del cuerpo). Los animales tratan de minimizar las diferentes velocidades de crecimiento entre superficie y volumen con diseños que compensen esas diferencias. Este cambio de forma correlacionado con un cambio de tamaño se denomina alometría. Puesto que el cambio de tamaño más evidente se da durante la ontogenia, cuando tiene lugar el crecimiento de embriones, larvas y/o jóvenes, muchos de los ejemplos de alometría son de tipo ontogenético. Sin embargo, los cambios de proporción asociados a los de tamaño también se dan en la evolución a través del tiempo de numerosos grupos de animales, o

cuando se comparan especies distintas de un mismo grupo, y en esos casos se habla de alometría filogenética (Pérez Zaballos y col., 2009; Hill y col., 2006)

La alometría también sirve para estudiar, por ejemplo, la dependencia de ciertas magnitudes (energía consumida, superficie de la piel, tamaño del cerebro, frecuencia cardíaca y respiratoria, densidad mitocondrial, etc.) con respecto al tamaño de los organismos.

Todos los cambios de forma pueden generalizarse con esta expresión matemática:

$$y = a x^b$$

donde **a** y **b** son constantes, **y** es la variable dependiente (o sea, la parte del cuerpo cuyos cambios de proporción queremos estudiar), y **x** la variable independiente (o sea, la parte del cuerpo que tomamos como estructura de referencia, normalmente una medida del tamaño «global» del organismo).

De esta ecuación nos interesan dos aspectos:

- Aquel que determina si hay isometría o alometría, y, si la alometría es positiva o negativa en relación con el exponente (**b**). Es fácil comprobar que cuando $b = 1$, la forma se mantiene (isometría), cuando $b > 1$ la variable dependiente crece más de prisa que la estructura de referencia (alometría positiva), y cuando $b < 1$ la variable dependiente crece más despacio que la estructura de referencia (alometría negativa).

- El segundo aspecto que nos interesa es que, si tomamos logaritmos, la ecuación se convierte en una recta, lo que facilita la estimación de **b** y la interpretación de los resultados:

$$y = a x^b$$

$$\log y = \log a + b \log x$$

Es decir: tomando logaritmos, o usando un gráfico bilogarítmico, **b** es simplemente la pendiente de la recta de regresión que relaciona **log y** con **log x** (Fig. I.1.6)

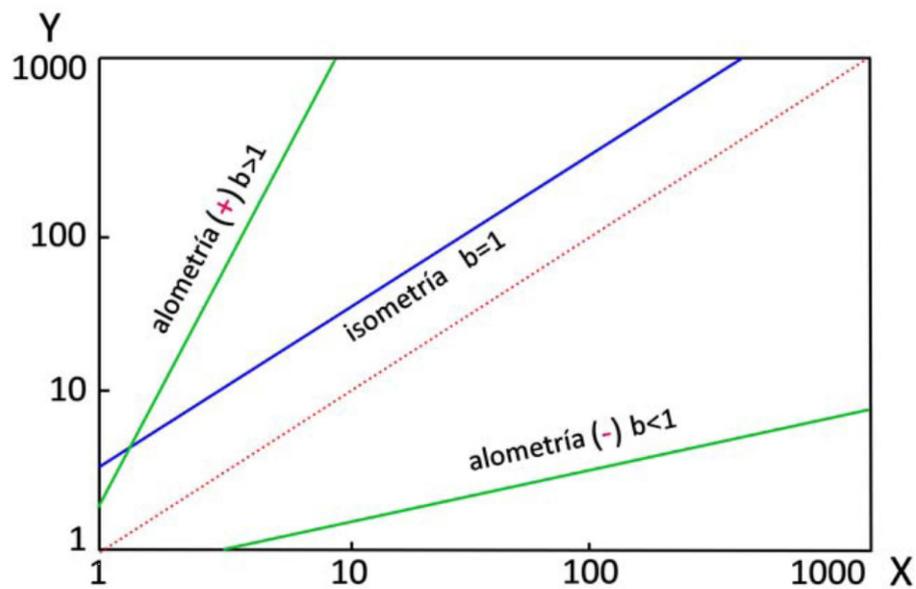


Figura I.1.6. Las gráficas logarítmicas facilitan la interpretación de las alometrías observando la pendiente.

Se habla de isometría cuando $b = 1$ la proporción es igual cualquiera sea la talla corporal. Si b no es igual que 1, la pendiente que se obtenga por azar no es proporcional y se conoce como ecuación alométrica. Cuando $b > 1$ se denomina alometría positiva (el órgano o parte es mayor cuanto mayor es el tamaño del cuerpo) y si es $b < 1$: alometría negativa (cuanto mayor es el animal, el órgano en cuestión es proporcionalmente más pequeño).

I.1.7. MÁXIMO DE VIDA (MLSP)

La longevidad máxima (MLSP, Maximum Life Span Potential) representa el número máximo de años que puede vivir un individuo. La longevidad máxima esta determinada por el genoma, por lo que es constante y característica de cada especie.

Se conoce desde hace mucho tiempo que en los animales la tasa metabólica y el máximo de vida están relacionados con el tamaño corporal. Es un paso primordial en la larga búsqueda de lo que determina la longevidad máxima de cada una de las especies. Rubner (1908) observó que el máximo de vida de los mamíferos se incrementaba con el tamaño del cuerpo y que la tasa metabólica específica (tasa metabólica por unidad de masa corporal) de

los mamíferos disminuye con el tamaño corporal (Rubner, 1883). Combinó el MLSP y las tasas metabólicas de cinco especies (conejiillo de Indias, gato, perro, vaca y caballo) para calcular su "energía potencial de vida" (es decir, la masa específica y producción de energía de vida en reposo) y encontró un valor relativamente constante para estas especies. Curiosamente, no incluye a los humanos en los cálculos de comparación, presumiblemente porque este mamífero es de muy larga vida y no se ajusta a su generalización. Harman (1956) propone que la producción de radicales libres originados por el metabolismo normal aeróbico y el consiguiente daño constituyen la base fisiológica del envejecimiento. A esto se denominó teoría de los radicales libres del envejecimiento. Como algunas moléculas reactivas derivadas de oxígeno causan daños y no son radicales libres, el término más genérico ROS fue utilizado para describir esta teoría. Así "radicales libres y teoría del envejecimiento" se transformó posteriormente en "estrés oxidativo y teoría del envejecimiento". En endotermos existe una relación entre la velocidad del metabolismo y la longitud de la vida. Los endotermos con altas tasas metabólicas específicas tienden a tener una vida corta. Sin embargo, algunas salvedades son también evidentes. 1) el ejercicio voluntario y su consiguiente aumento de la tasa metabólica no reduce la expectativa de vida de las ratas (Holloszy y col., 1985) o de los seres humanos (Lee y col., 1995) 2) del mismo modo, dentro de las poblaciones existe una considerable variación entre individuos tanto en la tasa metabólica como en la longevidad. 3) ha sido demostrado que la restricción calórica prolonga la longevidad de los roedores y en muchas otras especies (Masoro, 2002) y aunque originalmente se pensó que este efecto podría deberse a una reducción en la tasa metabólica, no parece ser el caso. 4) las aves viven en promedio, dos veces más que los mamíferos de similar tamaño y dentro de ambos grupos de endotermos, existen importantes diferencias entre las especies en el MLSP que no se pueden explicar por diferencias en la tasa metabólica.

Recientemente se ha demostrado que la composición de ácidos grasos de la membrana celular, varía de manera sistemática con el tamaño corporal en mamíferos (Couture, 1995; Hulbert y col., 2002a) y en aves (Brand y col., 2003; Hulbert y col., 2002b).

También se ha demostrado que la composición de ácidos grasos de la membrana está relacionada con MLSP (Pamplona y Barja, 2003; Pamplona y col., 1998, 1999c; Pamplona y col., 1996, 1999 a, b). Estas observaciones, combinadas con la susceptibilidad de los ácidos

grasos al daño peroxidativo (Holman, 1954), fueron pioneras en el desarrollo de la "teoría marcapasos de la membrana del envejecimiento" (Hulbert, 2005). Estas modificaciones de la teoría del "estrés oxidativo del envejecimiento" enfatizan los efectos de la peroxidación lipídica (y sus productos) sobre la composición de ácidos grasos de la membrana en el proceso de envejecimiento y podrían determinar la vida máxima distintiva de la especie.

I.1.8. MAMÍFEROS

I.1.8.1. Tasa metabólica y tamaño corporal de los mamíferos

El término metabolismo es un conjunto de eventos bioquímicos y fisiológicos que tienen lugar en la célula y en el organismo. En un contexto más amplio es la respuesta del organismo a factores ambientales que afectan el consumo de O₂ y la producción de CO₂.

La tasa metabólica (TM): es la energía química consumida por un animal para su crecimiento y mantenimiento en la unidad de tiempo. La TM se calcula a través de la media del consumo de oxígeno. La tasa metabólica basal (TMB) es el metabolismo energético medido en condiciones de ayuno y de mínimo estrés ambiental y fisiológico. La TMB varía sustancialmente entre los diferentes animales (Kleiber, 1961), siendo la masa corporal y el grupo filogenético al que pertenece un animal dos de sus principales determinantes. Es posible predecir matemáticamente la TMB de un animal si se conocen estos dos factores.

El tamaño del cuerpo es una característica importante de la especie que influye en casi todos los aspectos biológicos del organismo (Calder, 1996).

A medida que aumenta el tamaño de las especies, obviamente requieren más energía, pero la tasa metabólica no aumenta en proporción directa a los aumentos en la masa corporal. La TMB en los mamíferos está en función de escalas alométricas con la masa corporal. Se ha determinado que la TMB aumenta sólo 59-69% con cada duplicación de la masa corporal (Kleiber, 1961; White y Seymour, 2003). Cuando los datos se expresan en tasa metabólica específica (tasa metabólica por unidad de masa corporal, TME) las especies pequeñas de mamíferos tienen una mayor TME que los mamíferos más grandes, de tal manera que por cada duplicación en el tamaño corporal hay una disminución del 15-20% en el TME. Quizá esta relación se puede apreciar mejor comparando un ratón de 30 g y una

vaca de 300 kg. En términos absolutos, la TMB de la vaca es 1.000 veces mayor que la del ratón, pero si se considera la masa específica del ratón, este tiene un metabolismo basal 10 veces mayor que el de la vaca.

No todos los tejidos del cuerpo contribuyen por igual a TMB. Por ejemplo, aproximadamente el 70% de la TMB de los seres humanos es aportada por los órganos internos que constituyen aproximadamente el 7% de la masa corporal (Schmidt-Nielsen, 1990). La variación de la TMB entre las especies, es debida tanto a la variación en el tamaño del tejido y la tasa metabólica del mismo (Hulbert y Else, 2000).

I.1.8.2. Máximo de vida, tamaño corporal y gasto energético de por vida de los mamíferos

Aunque la muerte no siempre puede ser debida a la disminución en la función fisiológica y/o al desequilibrio homeostático que ocurren durante el envejecimiento, MLSP es sin embargo una importante característica de las especies. Se observó que el MLSP varía más de 40.000 veces en todo el reino animal. Por lo general, el MLSP de los mamíferos se incrementa con el tamaño del cuerpo, de tal manera que los mamíferos más pequeños (musarañas) viven 1 año, mientras que el máximo lapso de vida reportado para los elefantes es de aproximadamente 80 años (Carey y Judge, 2000). Así el lapso máximo de vida se relaciona positivamente con la masa corporal en mamíferos, de tal manera que por cada duplicación de la masa corporal en los mamíferos, hay un aumento promedio del 16% en MLSP (Speakman, 2005). Desde hace tiempo se conoce que, en los mamíferos, TMB y MLSP están correlacionados con la masa corporal, aunque la correlación más fuerte se da entre TMB y masa corporal. Por ejemplo, mientras que la variación de la masa corporal estadísticamente puede explicar el 64% de la variación de TMB, sólo explica el 35% de la variación en MLSP.

Un patrón diferente surge cuando la variación intraespecífica es examinada en relación con las comparaciones interespecíficas en mamíferos. Estudios intraespecíficos realizados en perros (Speakman y col., 2003), ratones (Miller y col., 2002; Speakman y col., 2004), y humanos (Rizzo y col., 2005) revelan una asociación positiva entre la esperanza de vida máxima y la TME y una relación negativa entre la duración de la vida y el tamaño corporal. Por ejemplo, las razas de perros grandes tienen una menor TME que los perros más

pequeños y también muestran una reducción en la esperanza de vida máxima. Sin embargo, otros estudios centrados dentro de una determinada raza de perro (Galis y col., 2007; Patronek y col., 1997) revelaron una clara relación entre el tamaño del cuerpo y TME. Varios estudios intraespecíficos con ratones y ratas (Liang y col., 2003; Speakman y col., 2003, 2004) no han mostrado una relación inversa entre TME y MLSP.

La vida máxima de la rata topo desnuda (*Heterocephalus glaber*) es de aproximadamente 30 años, siendo 9 veces mayor que la de los ratones (Buffenstein, 2008). Los lípidos de la membrana de la rata topo desnuda son menos susceptibles a peroxidación que los de las membranas del ratón (Hulbert y col., 2006; Mitchell y col., 2007). Este hallazgo es coincidente con otras comparaciones entre especies descritas anteriormente. Sin embargo, otros resultados se han obtenido con la rata topo desnuda que plantean notables desafíos teóricos. Las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa o catalasa son semejantes en la rata topo desnuda y el ratón mientras que la glutatión peroxidasa es menor en las ratas topo (Andziak y col., 2005). El isoprostano urinario (un marcador de estrés oxidativo) es mayor en las ratas topo que en los ratones (Andziak y col., 2006). Por lo tanto, las ratas topo disfrutan de una vida excepcionalmente larga y un largo período reproductivo, a pesar de que el daño oxidativo es bastante grave (Buffenstein, 2008; Buffenstein y col., 2008). En los ratones, la formación de 4-HNE es alta y la tasa de eliminación es baja, por lo tanto se produce un rápido envejecimiento. La situación se invierte en la rata topo desnuda. Esta interpretación sugiere que derivados de lípidos, como los aldehídos electrófilos son relevantes para el envejecimiento, probablemente gracias a su capacidad para reaccionar con sitios específicos de las proteínas, mientras que muchos otros tipos de cambios oxidativos son bien tolerados (Zimnia, 2011). Todos estos hallazgos dificultan cualquier conclusión definitiva.

I.1.8.3 Producción mitocondrial de radicales libres y defensas antioxidantes de los mamíferos

La disminución de la TME con el aumento del tamaño corporal en los mamíferos también se asocia con una disminución en la densidad de las membranas mitocondriales internas (Eise y Hulbert, 1985), sitio de la producción mitocondrial de ROS. Estudios

realizados in vitro sobre las tasas de producción de superóxido (Sohal y col., 1989) y peróxido de hidrógeno (Sohal y col., 1990) de mitocondrias aisladas de hígado de mamíferos que van desde los ratones a la vaca, muestran que hay una disminución del 10% en la producción de superóxido y del 18% en la producción del peróxido de hidrógeno por miligramo de proteína mitocondrial, por cada duplicación de la masa corporal. Un estudio realizado en mitocondrias de hígado de mamíferos que va de los ratones a los caballos (Porter y col., 1996) informó que la cantidad de membrana mitocondrial por miligramo de proteínas disminuye aproximadamente un 7% por cada duplicación de la masa del cuerpo. Así, el vínculo entre la vida máxima y el TME en mamíferos de diferente tamaño corporal está asociado con cambios en las tasas de producción primaria de ROS al menos en mitocondrias aisladas de hígado. Es decir, pequeños mamíferos con MLSP corto muestran una elevada producción mitocondrial de ROS debido a que sus tasas de consumo de oxígeno mitocondrial son más altas. Muchas reacciones bioquímicas, además del consumo de oxígeno se producen a un ritmo acelerado con tasas metabólicas altas, y, algunas de ellas, sin relación con la producción de ROS. También esto, en principio, podría ser responsable de la aceleración de la tasa de envejecimiento de los mamíferos. Se ha propuesto también que las defensas antioxidantes serían las responsables del MLSP en los mamíferos de mayor tamaño. Sin embargo, el nivel de antioxidantes endógenos de las especies de mamíferos longevas son más bajos que el de los mamíferos de corta vida (Andziak y Buffenstein, 2006; Barja, 2004; Pérez-Campo y col., 1994; Sanz y col., 2006), lo que sugiere que las defensas antioxidantes no son la razón de la mayor longevidad sino que es más probable un reflejo del grado de estrés oxidativo. Estos resultados son compatibles con la idea de que las defensas antioxidantes endógenas ya están en niveles óptimos en los animales y que su suplemento, por lo general no tiene influencia significativa en MLSP.

I.1.8.4. Composición de la membrana, peroxidación lipídica, tamaño del cuerpo, y máximo de vida de los mamíferos

Gudbjarnason y col. (1978) publicaron una relación poco conocida entre el contenido de docosahexaenoico de los fosfolípidos y la frecuencia cardíaca en reposo en especies de mamíferos, que van desde los ratones hasta las ballenas. Para nuestro conocimiento, este es

el primer registro de una relación entre la composición de ácidos grasos de las membranas celulares y la tasa metabólica.

Más tarde, se demostró la composición de ácidos grasos de membranas de otros tejidos metabólicos importantes, sobre todo hígado, riñón y músculo esquelético. (Couture y Hulbert, 1995; Hulbert y col., 2002b) y su relación con el tamaño corporal. Se encontró que cuando la masa corporal se duplica hay una disminución del 12-24% en el contenido de docosahexanoico de las membranas celulares (Hulbert y col., 2002b), que no es muy diferente a la disminución de aproximadamente 19% de la TME. Las membranas celulares de las pequeñas especies de mamíferos poseen mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados que las especies más grandes. Un número considerable de procesos asociados a las membranas también han demostrado que varían con el tamaño corporal y esta diferencia se ha relacionado con la composición de las mismas. Así como la composición de ácidos grasos de membranas de una variedad de tejidos de mamíferos se encuentran relacionados con TMB (Couture y Hulbert, 1995; Hulbert y Else, 1999; Hulbert y Else, 2000), Pamplona y col. (Pamplona y Barja, 2003; Pamplona y col., 1998, 1999 a,b,c,2002) demostraron que en los mamíferos de larga vida, el bajo grado de no saturación de los ácidos grasos de la membrana va acompañado por una baja sensibilidad a la peroxidación lipídica *in vivo* e *in vitro*. Estos hallazgos son consistentes con la correlación negativa entre MLSP y la sensibilidad a la auto-oxidación de lípidos de riñón de mamífero y homogeneizado de cerebro que fueron descritos algunos años antes (Cutler, 1985).

Si se conoce la composición de ácidos grasos de la membrana, es posible calcular el índice de peroxidación (PI), que es un número que expresa la susceptibilidad de la membrana a la peroxidación lipídica (Hulbert y col., 2007; Hulbert, 2010). Cuando se hizo el cálculo tanto para los fosfolípidos de mitocondrias de hígado y de músculo esquelético en diferentes especies de mamíferos con una amplia gama de tamaños, se pudo observar que hay una relación inversa entre el PI y MLSP (Hulbert, 2005c; Hulbert y col., 2007). Curiosamente, la relación entre los fosfolípidos de las mitocondrias de hígado, PI y MLSP tiene una pendiente similar a las del músculo esquelético. Así, el PI de la membrana mitocondrial de hígado y de músculo esquelético disminuyó un 24% y un 19% respectivamente, cuando el máximo vida se duplicó. Aunque la vida máxima puede variar entre especies de mamíferos, también pueden ser significativas las diferencias de longevidad

dentro de una misma especie. Por ejemplo, las poblaciones de ratones silvestres muestran una mayor longevidad (dos y medio veces) que las de ratones de laboratorio cuando se mantienen en condiciones idénticas (Miller y col., 2002). El PI de los fosfolípidos del músculo esquelético y del hígado de los ratones silvestres (con mayor longevidad) se reduce significativamente en comparación con los ratones de laboratorio (Hulbert y col., 2006a). Esto es importante porque las diferentes cepas de ratones fueron alimentados con la misma dieta, lo que estaría indicando que las diferencias en la composición de la membrana están bajo control genético y no dietario. Poco se conoce acerca de si los mecanismos de regulación de control de la composición de ácidos grasos de la membrana difieren entre las especies. Debido a que los ácidos grasos poliinsaturados no pueden ser sintetizados de novo por los animales superiores, son componentes esenciales de la dieta. Otra fuente de ácidos grasos poliinsaturados es su biosíntesis por los microorganismos intestinales. Sin embargo, es posible variar la disponibilidad de los diferentes tipos de grasas en las dietas de laboratorio. En estudios realizados en ratas, la composición de ácidos grasos de la membrana muestra un grado de homeostasis resistente a las alteraciones dietarias (Hulbert y col., 2005c, 2014).

La disminución en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas de los mamíferos grandes es de esperar que resulte en una disminución de la tasa de peroxidación de lípidos. Si bien existen evidencias que muestran que la composición de ácidos grasos de la membrana afecta la tasa de peroxidación lipídica medida *in vitro*, existen menos evidencias que indiquen efectos sobre la peroxidación lipídica *in vivo*. Uno de los productos de la peroxidación de n-3 PUFAs es el etano y la tasa de exhalación del mismo se ha utilizado como un método no invasivo para evaluar la peroxidación de lípidos *in vivo*.

I.1.9. AVES

Muchos años después de la famosa publicación de la curva de Benedict (1938) del "ratón al elefante", que demostró que en los mamíferos la TMB está relacionada alométricamente con la masa corporal, se realizó una curva comparable en aves, del "colibrí al avestruz" (Lasiewski y Dawson, 1967). Un estudio posterior, también demuestra que la TMB de las aves es alométrica con la masa corporal (King y Farner, 1961). Las aves pequeñas,

principalmente pájaros, tienen tasas metabólicas relativamente más altas que las previstas por las relaciones alométricas y, en consecuencia, se producen dos relaciones alométricas por separado: una en la que se muestra una elevada tasa metabólica para las aves de percha (*Aves passeriformes*) y una más baja para las aves no passerinas.

Información actualizada realizada sobre un conjunto de valores de TMB aviares con un enfoque filogenético (Reynolds y Lee, 1996), mostró que no existen diferencias significativas entre las TMB de los passeriformes y no passeriformes. Este resultado también fue confirmado más tarde (McKechnie AE, Wolf, 2004).

El contenido de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas mitocondriales del hígado aviar se relaciona negativamente con la masa corporal, principalmente debido a la disminución de los niveles de ácidos grasos poliinsaturados n-6 con el aumento de la masa corporal (Brand y col., 2003). Esto difiere de los mamíferos donde los poliinsaturados n-3 son los que varían con el tamaño del cuerpo (Porter y col., 1996).

I.1.9.1. Máximo de vida, tamaño corporal y gasto energético

Las estimaciones de MLSP para muchas especies de aves sufren similares restricciones a la de los mamíferos. Hay una escasez de datos sobre longevidad para la mayoría de especies de vida libre, e incluso el desconocimiento de la causa de muerte (externa o por envejecimiento endógeno) en muchos individuos silvestres podría ocultar el MLSP real. La primera caracterización formal de MLSP aviar en relación con el tamaño fue realizada por Lindstedt y Calder (1976). En base a la información limitada disponible en ese momento, estos autores mostraron que la longevidad de las aves y de los mamíferos aumenta con el tamaño corporal (Lindstedt y Calder, 1976). Estudios más recientes sobre longevidad en aves, usando un mayor número de datos (Hulbert y col., 2007b) revelan que las aves viven, en promedio, dos veces más que los mamíferos de similar tamaño (Hulbert y col., 2007b; Speakman, 2005). Aunque la relación TMB con respecto a MLSP en las aves es estadísticamente significativa, la masa corporal es un mejor indicador en aves que en mamíferos. Por ejemplo, la masa corporal puede explicar el 84% de la variación de la TMB en las aves, en comparación con el 64% en los mamíferos y puede explicar el 48% de la

variación MLSP en las aves, en comparación con el 35% en los mamíferos (Hulbert y col., 2007b).

I.1.9.2. Análisis comparativo entre mamíferos y aves

Se sugirió que la longevidad de las palomas es 10 veces mayor que la de las ratas y esto se debió principalmente a una menor tasa de producción de peróxido de hidrógeno y de superóxido (Barja y col., 1994b; Ku y Sohal, 1993). La disminución de los niveles de producción de ROS por las células de las aves podría, a su vez, requerir bajos niveles de antioxidantes para protegerse contra el daño oxidativo. Varios estudios previos, muestran que las aves y mamíferos con mayor MLSP poseen niveles más bajos de antioxidantes endógenos (López-Torres y col., 1993; Barja y col., 1994 a, b; Pérez-Campo y col., 1998; Jaensch y col., 2001). Otros autores, en cambio, reportaron resultados opuestos encontrando niveles más altos de la superóxido dismutasa, glutatión y glutatión peroxidasa en los tejidos de las aves en comparación con los de mamíferos (Ku y Sohal 1993; Ku y col., 1993).

Un estudio comparativo más exhaustivo de los niveles de antioxidantes endógenos en las aves realizado por Cohen y col. (2008) evaluó la capacidad antioxidante total, la respuesta del antioxidante al estrés, y los niveles de ácido úrico, vitamina E y carotenoides en 95 especies de aves en relación con los patrones de la historia de vida. Mayores niveles de antioxidantes se encontraron en general asociados con las aves de menor tamaño. Estudios comparativos similares también se han realizado en los mamíferos, incluso dentro de un mismo orden, con MLSP de vida muy diferentes (Buffenstein y col., 2008). Todo lo mencionado es consistente con la falta de pruebas predecibles entre los niveles de antioxidantes y la longevidad (Holmes y Martin, 2009)

Es importante destacar que las aves tienen mayor MLSP y una TMB más alta que la de los mamíferos. Barja y col. (1994) mostraron que la tasa de producción de ROS mitocondrial por unidad de oxígeno consumido fue considerablemente menor en las palomas que en las ratas. La idea de que MLSP está inversamente relacionada con la tasa de producción mitocondrial de ROS ha ganado mayor apoyo después que se ha constatado que en las mitocondrias de corazón la producción de H_2O_2 en canarios (MLSP aproximadamente

24 años) y periquitos (MLSP aproximadamente 21 años) también fue significativamente menor que en los ratones (MLSP aproximadamente 3,5 años) (Herrero y Barja, 1998). Además de las bajas tasas de formación de ROS mitocondrial, en estas especies de aves se ha demostrado también que la composición de ácidos grasos de la membrana es considerablemente más resistente a la peroxidación que membranas equivalentes de mamíferos y también tienen bajos niveles de productos de lípoperoxidación en sus tejidos en comparación con mamíferos (Pamplona y col., 1996, 1999 a y b). La diferencia en la composición de ácidos grasos de la membrana de los mamíferos y de aves fue un factor determinante de este bajo nivel de peroxidación lipídica en los tejidos de aves y fue demostrado por la reducción drástica de malondialdehído (MDA) aviar producida por las mitocondrias en comparación con las mitocondrias de mamíferos, cuando fueron sometidos a un sistema *in vitro* (Pamplona y col., 1999 a y b; Montgomery, 2011). Estudios sobre la composición de ácidos grasos realizados en tejidos de diferentes especies de aves, muestran que, como en los mamíferos, las aves pequeñas tienen más ácidos grasos poliinsaturados en las membranas que las especies más grandes (Brand y col., 2003; Hulbert y col., 2002a) y también se confirma un menor nivel de poliinsaturación en la membrana de las aves, en comparación con los mamíferos. Los fosfolípidos de las membranas de las aves tienen PUFAs con un balance a favor de n-6 PUFAs sobre los n-3.

La mayor parte de los estudios mencionados han sido realizados utilizando a la paloma, canario y/o loro como especies representativas de las aves, abarcando no todos los órganos de dichas especies ni profundizando en la peroxidación de sus membranas. Sin embargo, aún no se conoce la composición de ácidos grasos de un gran número de especies de aves y no está debidamente aclarada la relación entre dicha composición y el tamaño corporal. También existen pocos datos acerca de la relación entre la peroxidación - dependiente de la composición lipídica- y el máximo de vida.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se utilizaron aves con diferente tamaño corporal y máximo de vida y de fácil manejo en el laboratorio. De las especies seleccionadas se extrajeron los siguientes órganos: el **hígado**, por ser un gran generador de radicales libres; el **cerebro**, por su elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados -blancos de la peroxidación- y el **corazón**, por ser el órgano que bombea la

sangre con altos niveles de oxígeno. De cada uno de estos órganos aislamos las **mitocondrias** y **microsomas**, que constituyen los sitios productores de ROS más importantes

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La composición de ácidos grasos de las membranas mitocondriales y microsomales difiere entre las diferentes especies de aves y entre los tejidos de la misma especie. Las aves de mayor tamaño poseen un predominio de ácidos grasos con un menor número de dobles enlaces en comparación con las especies de menor tamaño. En la mayoría de los tejidos de las aves predominan los ácidos grasos con bajo grado de insaturación, siendo una de las posibles causas de la baja sensibilidad a la peroxidación lipídica y del máximo de vida observado en las mismas, parámetros estrechamente vinculados con la masa corporal. Teniendo en cuenta estas consideraciones nuestra hipótesis de trabajo estuvo dirigida a confirmar estas aseveraciones.

Objetivos

- 1.- Establecer la composición de ácidos grasos de microsomas y mitocondrias de hígado, corazón y cerebro de diferentes especies de aves.*
- 2.- Evaluar la capacidad de peroxidación lipídica no enzimática inducida por ascorbato-Fe²⁺ en microsomas y mitocondrias examinando el efecto de la misma sobre la composición de ácidos grasos.*
- 3.- Establecer la correlación entre el tamaño corporal, composición de ácidos grasos, máximo de vida y sensibilidad a la peroxidación lipídica en mitocondrias y microsomas de las diferentes especies de aves estudiadas.*

CAPITULO II

Materiales y métodos

II.1. MATERIALES

II.1.1. Animales utilizados

En este estudio se utilizaron especies de aves voladoras pertenecientes a las Neognathas, las cuales comparten características anatómicas que recientemente han sido confirmadas con estudios genéticos, comprendiendo las Eoaves (Galloanserae: Galliformes y Anseriformes) y Neoaves (Columbiformes y Passeriformes) (Hackett y col., 2008, McCormack y col., 2013). El peso corporal de las mismas osciló entre 13.55 g y 5040 g, esto representa un rango de 372 veces. Las aves examinadas fueron adultos de ambos sexos. Los valores de la tasa metabólica específica fueron obtenidos de la literatura y se muestran en la Tabla II.1

Tabla II.1. Aves utilizadas en este trabajo

Nombre vulgar	Nombre científico	Masa corporal (g)	Máximo de vida (años)	Tasa metabólica específica (ml de O ₂ g ⁻¹ h ⁻¹)
Manón	<i>Lonchura striata</i> (3)	13.55 ± 0.50	9	3.28 (a)
Codorniz	<i>Coturnix coturnix var japonica</i> (4)	142.88 ± 15.20	6	1.64 (b)
Paloma casera	<i>Columba livia</i> (3)	347.50 ± 3.50	35	0.66 (c)
Pato criollo	<i>Cairina moschata</i> (3)	2200.00 ± 2.80	21	0.62 (d)
Ganso común	<i>Anser anser</i> (3)	5040.00 ± 1.90	35	0.54 (e)

Los datos de masa corporal son expresados como la media ± SD. Entre paréntesis se indica el número de ejemplares utilizados. Los datos de longevidad para las distintas especies de aves fueron obtenidos del Handbook of the Biology of Aging (2005). Tasa metabólica específica: (a): Calculado a partir de la ecuación de passeriformes de Lasiewski y Dawson (1967); (b, c, d y e): datos obtenidos de Lasiewski y Dawson (1967).

Los manones, las palomas y las codornices fueron comprados en locales de venta de mascotas. Los patos y gansos fueron obtenidos de granjas de los alrededores de la ciudad de La Plata. La dieta se basó fundamentalmente en mezclas de semillas para aves, presentando

variaciones para cada una de las especies por lo que se tomaron muestras de cada una de ellas para su posterior análisis. Las edades de las aves corresponden a valores máximos de vida (MLSP) expresados en años y fueron obtenidos de la literatura (Masoro y Austad, 2005).

Los protocolos de tratamiento de los animales fueron previamente aprobados por el comité local de ética, y están en conformidad con el cuidado y tratamiento de animales de laboratorio recomendadas por el Servicio de Salud Pública de EEUU, 1985.

Las aves, después de ser pesadas, se sacrificaron por dislocación cervical y a continuación se les extrajo el hígado, el corazón y el cerebro, los cuales fueron pesados y utilizados inmediatamente.

Todas las aves fueron utilizadas en forma individual, excepto el manón que debido a su pequeña masa corporal fue necesario realizar un pool de tres animales para disponer de suficiente tejido para la realización de cada uno de los ensayos.

II.1.2. Material de cromatografía

Sepharosa 4B fue obtenida de Pharmacia Fine Chemicals Inc. Piscataway, NJ, USA.

II.1.3. Estándares

- Albúmina sérica bovina (fracción V): Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japón.
- Estándares de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos de Nu Check Prep. Inc. Elysian, MN, USA.

II.1.4. Otros materiales

- Sacarosa: J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA.
- 2,6-di-tert-butil-p-cresol (BHT), Fenil metil sulfonil fluoruro (PMFS) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.
- Reactivo de Folin-Cicolteu y ácido tricloroacético: Merck, Darmstadt, Alemania.

- Cloroformo; Etanol absoluto; Eter de Petróleo; Metanol (grado analítico): fueron adquiridos en Merck Química Argentina.
- Otras drogas (grado analítico) empleadas en la realización de este trabajo se obtuvieron de fuentes comerciales reconocidas.

II.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS

II.2.1. Métodos utilizados para la obtención de fracciones subcelulares (Figura II.2.1.)

Las fracciones subcelulares utilizadas fueron mitocondrias y microsomas, consideradas como sitios de mayor producción de ROS (Brown y Borutaite, 2012).

II.2.1.1. Preparación de mitocondrias y microsomas

El hígado, el corazón y el cerebro de las aves fueron rápidamente extraídos, pesados (peso húmedo) y lavados con solución fisiológica (NaCl 0.15 M) fría. Los órganos fueron cortados en pequeños trozos y se les adicionaron 3 ml por gramo de tejido de una solución conteniendo 0.25 M de sacarosa, 0.01 M Tris HCl pH 7.4, 0.1 mM PMSF. Posteriormente fueron homogeneizados en un sistema Potter-Elvehjem operado mecánicamente (tres golpes de émbolo).

El homogeneizado se centrifugó en una centrífuga Kubota (Tokio, Japón) a 1000 x g durante 10 min. Los núcleos y restos celulares fueron descartados y el sobrenadante fue centrifugado a 20000 x g durante 10 min. Las mitocondrias fueron resuspendidas en 3 volúmenes de la solución conteniendo 0,25M de sacarosa, 0,01 M Tris HCl pH 7,4; 0,1 mM PMSF (Schneider y col., 1950; Boveris y col., 1999). El sobrenadante fue utilizado para la preparación de microsomas. Todos los pasos fueron realizados a 4 °C.

II.2.1.2. Obtención de microsomas por filtración a través de Sepharosa 4B

5 ml de sobrenadante postmitocondrial, obtenido de cada uno de los órganos estudiados, fue aplicado a una columna de Sepharosa 4B cuya dimensión fue 1.6 x 12 cm, la que se eluyó con el buffer de equilibrio 0,01 M Tris-HCl pH 7,4; 0,01% NaN₃. El flujo fue 30 ml /h y se colectaron fracciones de 2 ml durante 1 h 30 min.

Se utilizó la fracción microsomal (Tangen y col., 1973) que aparece en el espacio vacío (12-20 ml) como una solución opalescente mientras que el citosol (30-40 ml) fue descartado.

La suspensión de microsomas fue estabilizada con el agregado de sacarosa sólida, hasta alcanzar una concentración 0,25 M. Todas las operaciones fueron realizadas a 4 °C.

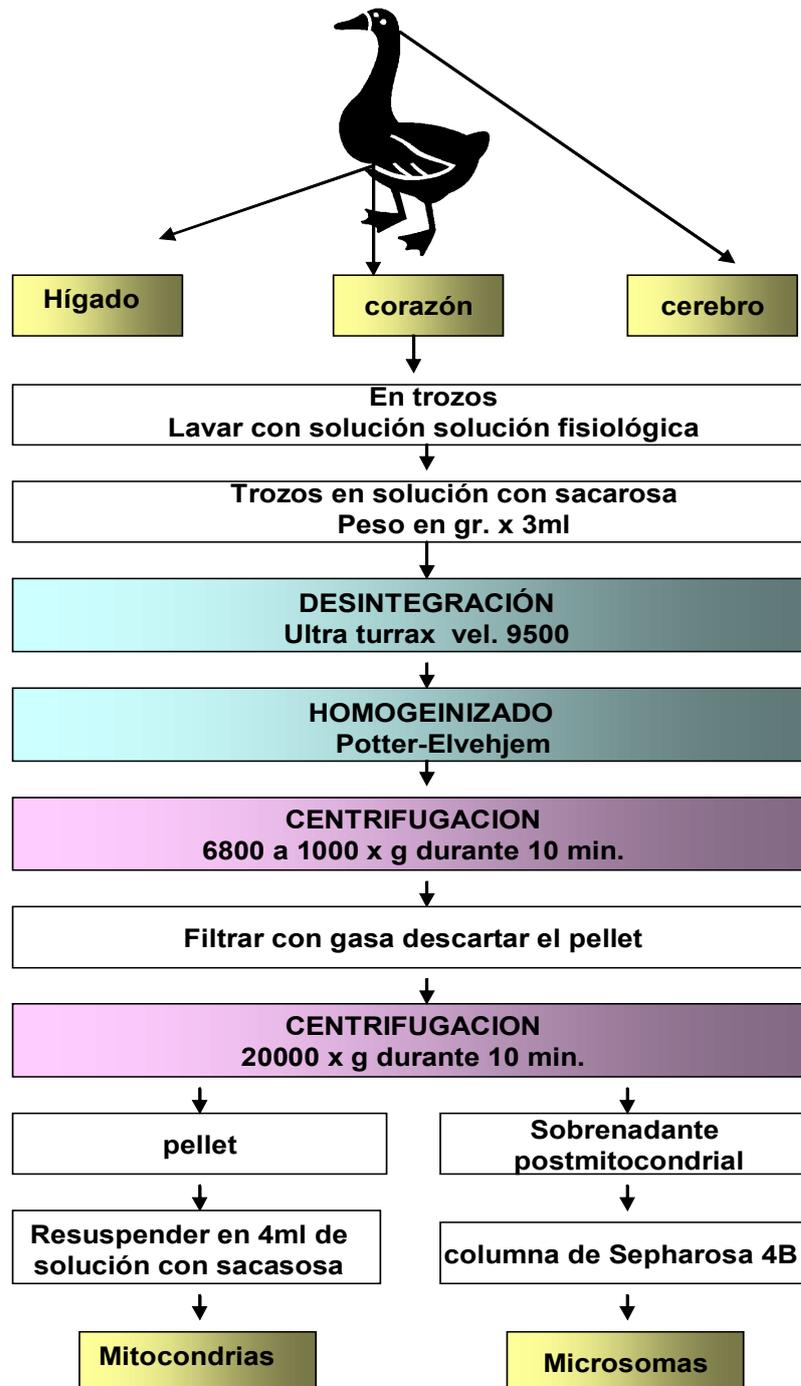


Figura II.2.1.: Esquema de la metodología utilizada para la obtención de mitocondrias y microsomas

II.2.2. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas de las muestras utilizadas en los distintos experimentos, se determinó mediante la aplicación de un método espectrofotométrico descrito por Lowry y col., (1951) y posteriormente modificado por Schacterle y col. (1973).

Reactivos utilizados:

Reactivo alcalino de cobre:

NaOH.....	2g
Na ₂ CO ₃	10g
Tartrato de Na y K.....	1g
SO ₄ Cu.....	0.05g
Agua destilada....c.s.p.....	100 ml

Reactivo del fenol, Folin-Ciocalteu, 1 ml; agua destilada, 17 ml.

Procedimiento:

Se toma un volumen de muestra de hasta 0.5 ml, completándolo a 0.5 ml con agua destilada. Se añaden 0,5 ml de reactivo alcalino de cobre, agitando inmediatamente. Se deja reposar 10 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se agregan con agitación, 2 ml de reactivo del fenol. Las muestras se dejan reposar durante 5 min en baño a 55 °C. Luego de este tiempo, las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente. La lectura de las absorbancias se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu, UV 160 U (Tokio, Japón), a 650 nm contra un blanco de reacción en el que el volumen de muestra se reemplazó por agua destilada.

Como testigo se empleó una solución de albúmina de suero bovino (fracción V), de concentración 1 mg/ml.

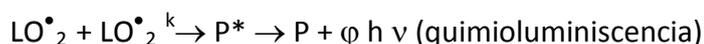
II.2.3. Quimioluminiscencia y lipoperoxidación de mitocondrias y microsomas

La peroxidación lipídica no enzimática ascorbato-Fe²⁺ dependiente se analizó incubando mitocondrias y/o microsomas de hígado, corazón y cerebro (1 mg de proteína) en buffer fosfato 0.05 M, pH 7.4 a 37 °C (volumen final 1 ml). La reacción de lipoperoxidación se inició mediante el agregado de ascorbato (concentración final 0.4 mM).

El buffer fosfato se encuentra contaminado con suficiente cantidad de hierro para proveer el hierro ferroso o férrico necesario para la peroxidación lipídica. En todos los casos se realizó en forma simultánea un blanco sin ascorbato (organela + buffer) considerado control. El proceso fue cuantificado por medida de quimioluminiscencia = emisión lumínica empleando un contador de centelleo líquido Packard 1900 TR, (Meriden, CT, USA) provisto de un programa de quimioluminiscencia (Wright y col., 1979).

Las lecturas de quimioluminiscencia (cuantificada como cuentas por minuto), se realizaron cada 10 min durante un período de 120 min.

La luminiscencia se produce cuando dos especies radicales (lipoperoxilo) reaccionan entre sí para formar un compuesto no radical excitado energicamente que finalmente se estabiliza por la emisión de un fotón.



La reacción es particularmente interesante ya que es acompañada con quimioluminiscencia cuya intensidad (I) puede servir como una medida de la concentración del radical libre peróxilo (LO^{\bullet}_2) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$I = K \phi k [LO^{\bullet}_2]^2$$

Donde ϕ representa el Quantum de quimioluminiscencia y K es un coeficiente que depende de la sensibilidad neta del instrumento. LO^{\bullet}_2 es un radical libre producido a partir de moléculas lipídicas (Vladimirov y col., 1980).

II.2.4. Métodos empleados para la obtención de lípidos

II.2.4.1. Extracción de lípidos

Los lípidos totales fueron extraídos con $Cl_3CH:CH_3OH$ (2:1, v/v) conteniendo 0.01% de BHT como antioxidante, siguiendo el procedimiento descrito por Folch y col (1957), en una relación de una parte de muestra a 5 partes de mezcla extractiva. La mezcla resultante se filtró por papel de filtro, el que luego de la filtración fue lavado con $Cl_3CH:CH_3OH$ (2:1, v/v) para evitar pérdidas del extracto lipídico, al filtrado se le agregó un 20 % de su volumen de agua destilada, se agitó y se dejó decantar a baja temperatura para permitir la separación de dos fases: una superior metanólica acuosa y una inferior clorofórmica. La fase superior fue desechada y la inferior se llevó a seco bajo corriente de nitrógeno.

II.2.4.2. Análisis del contenido de ácidos grasos por cromatografía gaseosa

Los lípidos de las diferentes muestras en estudio: nativas (organelas sin tratamiento), controles (organelas + buffer), peroxidadas (organelas + ascorbato) y la dieta de las aves fueron extraídos por el método de Folch (1957). Una vez evaporada la fase clorofórmica, los lípidos totales fueron transmetilados con 20 % BF_3 en metanol a 65 °C durante 180 min (Morrison y Smith, 1964).

Luego se agregó 1 ml de H_2O . Se extrajo 2 veces con 2 ml de hexano cada vez. Se filtró sobre un embudo conteniendo Na_2SO_4 anhidro. Se evaporó a sequedad el hexano, se agregaron 200 μl de hexano BHT y se realizó cromatografía gaseosa.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos fueron analizados en un cromatógrafo gaseoso GC 14 A (Shimadzu, Kyoto, Japón), equipado con una columna empacada (1.80 m x 4 mm i.d, J y V Scientific, Folsom, CA, USA). GP 10 % DEGS-PS en 80/100 SUPELCOPORT. Se utilizó nitrógeno como gas "carrier".

La temperatura del inyector y del detector fue mantenida a 250 °C y la de la columna a 200 °C durante 60 min.

Los picos correspondientes a los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron identificados mediante la comparación de los tiempos de retención con aquellos de los estándares.

La composición de cada ácido graso fue expresada como porcentaje de los ácidos grasos totales.

II. 3. CÁLCULOS

- Ácidos grasos saturados (SFA): $=\sum \% (16:0 + 18:0)$

- Ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) $=\sum \% (16:1 + 18:1)$

- Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) $=\sum \% (18:2 + 18:3 + 20:4 + 22:6)$

- Ácidos grasos no saturados (UFA) $=\sum \% (\text{MUFA} + \text{PUFA})$

- PUFA n6= $\sum \% (18:2n6 + 20:4n6)$

- PUFA n3= $\sum \% (18:3n3 + 22:6n3)$

- 20:4n6 / 18:2n6 representa la relación ácido araquidónico / ácido linoleico y expresa el coeficiente de actividad de las enzimas de la vía de biosíntesis del ácido araquidónico a partir del ácido linoleico.

- 22:6n3/ 18:3n3 representa la relación ácido docosahexanoico / ácido linolénico y expresa el coeficiente de actividad de las enzimas de la vía de biosíntesis del ácido docosahexanoico a partir del ácido α -linolénico.

- Índice de no saturación (UI) = \sum del área % de ácidos grasos no saturados x número de dobles ligaduras de cada ácido graso (Llanillo y col., 1995).

- Índice de peroxidabilidad (PI) = [(porcentaje de ácidos monoenoicos X 0.025) + (porcentaje de ácidos dienoicos X 1) + (porcentaje de ácidos trienoicos X 2) + (porcentaje de ácidos tetraenoicos X 4) + (porcentaje de ácidos hexaenoicos X 8)] (Pirozhkov y col., 1992).

- Promedio del largo de la cadena carbonada (ACL) = $(\sum \% \text{ Total} \times 14 + \dots + \sum \% \text{ Total} \times n) / 100$ (n= número de carbonos).

II.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SD de tres experimentos independientes. Los datos fueron evaluados estadísticamente por el método test "t" de Student.

Las relaciones masa corporal, ácidos grasos, quimioluminiscencia, metabolismo y máximo de vida se estudiaron mediante ecuaciones de regresión lineal obtenidas después de la transformación logarítmica de las variables ($\log y = \log a + b \log x$). Las correlaciones se

analizaron mediante el coeficiente de Pearson (r). Las regresiones fueron determinadas y testeadas para su significación usando los valores promedio para cada especie. El valor de $p < 0.05$ fue tomado como el punto mínimo de significación estadística.

CAPITULO III

Peroxidación lipídica no enzimática de microsomas y mitocondrias aisladas de hígado, corazón y cerebro de manón (Lonchura striata). Relación con la composición de los ácidos grasos

III.1. INTRODUCCIÓN

Trabajos previos realizados por Pamplona y col. (1996, 1999) e investigaciones de nuestro laboratorio (Gutiérrez y col., 2000) demuestran que las membranas mitocondriales de diferentes tejidos de aves, poseen ácidos grasos con bajo grado de no saturación y son más resistentes a la peroxidación lipídica que las de mamíferos de similar tamaño corporal. Sin embargo, hasta donde nosotros conocemos no existe mucha información sobre la peroxidación lipídica de membranas de aves paserinas. Por otro lado, también es conocido que las especies que poseen las más altas tasas metabólicas tienen un mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas (Hulbert, 2005).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo de este capítulo fue analizar la composición de ácidos grasos y la sensibilidad a la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro de “manón” (*Lonchura striata var.domestica*), un ave pequeña perteneciente al Orden Passeriformes.

III.2. RESULTADOS

III.2.1. Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro de manón

El C16:0 y C18:0 fueron los ácidos grasos saturados más abundantes de las mitocondrias (Tablas III, 1-3) y microsomas (Tablas III. 4-6) de los órganos examinados.

El porcentaje de ácidos grasos no saturados fue de aproximadamente de 30-60% en mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro. En ambas organelas el ácido graso monoetilénico predominante fue el C18:1n9.

El porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados fue de aproximadamente 20% en mitocondrias de hígado y corazón y 30% en las de cerebro.

El contenido de ácidos grasos poliinsaturados fue de 18%, 5% y 10% en microsomas de hígado, corazón y cerebro, respectivamente.

El porcentaje de ácido C20:4n6 fue 7% en mitocondrias de hígado y cerebro y 3% en las de corazón.

El porcentaje de ácido C22:6n3 fue de 8% en mitocondrias de cerebro y aproximadamente 2-3% en corazón e hígado.

Las mitocondrias de hígado y corazón presentaron un similar índice de no saturación (UI), mientras que en las de cerebro el UI fue aproximadamente 1.5 veces superior. El UI de los microsomas de hígado fue 2 veces mayor que el de corazón y cerebro.

El índice de peroxidabilidad (PI) de las mitocondrias de cerebro fue 2 veces superior que el de mitocondrias de hígado y 3 veces superior al de mitocondrias de corazón. El PI de microsomas de hígado fue 3 y 1.4 veces superior que el de microsomas de corazón y cerebro, respectivamente. Estas diferencias podrían explicarse considerando que los microsomas de cerebro y corazón poseen menor porcentaje de UFA y PUFA que los de hígado.

Tabla III.1: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de hígado de *Lonchura striata*

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	25.06 ± 0.07	24.96 ± 0.62	26.07 ± 0.21
16:1n7	1.42 ± 0.32	1.60 ± 0.04	1.49 ± 0.31
18:0	27.57 ± 1.68	29.95 ± 2.18	29.68 ± 0.95
18:1n9	22.98 ± 0.97	22.32 ± 1.49	21.46 ± 1.33
18:2n6	7.28 ± 0.57	7.26 ± 0.26	7.73 ± 1.34
18:3n3	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.35 ± 0.02
20:4n6	7.78 ± 0.50	7.02 ± 0.63	4.23 ± 0.14**
22:6n3	3.14 ± 0.24	3.32 ± 0.21	2.27 ± 0.09 **
SFA	52.63 ± 1.61	54.91 ± 1.57	55.75 ± 1.09
UFA	42.92 ± 2.11	41.82 ± 1.81	37.54 ± 0.52 *
MUFA	24.40 ± 1.08	23.92 ± 1.46	22.95 ± 1.26
PUFA	18.52 ± 1.13	17.90 ± 0.93	14.59 ± 1.41 *
PUFA-n6	15.06 ± 1.08	14.28 ± 1.02	11.96 ± 1.81
PUFA-n3	3.46 ± 0.43	3.61 ± 0.29	2.62 ± 0.12
UI	89.87 ± 5.06	87.36 ± 3.72	70.02 ± 1.97 **
PI	64.75 ± 6.79	63.12 ± 5.06	44.30 ± 1.19**
S/U	1.23 ± 0.09	1.32 ± 0.07	1.49 ± 0.05 *
20:4/18:2	1.07 ± 0.04	0.96 ± 0.09	0.55 ± 0.09**
22:6/18:3	9.72 ± 0.84	11.29 ± 1.17	6.42 ± 0.19**

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos control y peroxidado están indicados por *p < 0,05; **p < 0,01.

Tabla III.2: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de corazón de *Lonchura striata*

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	30.23 ± 2.16	29.36 ± 1.67	28.76 ± 0.80
16:1n7	2.31 ± 0.07	2.28 ± 0.56	2.46 ± 0.14
18:0	25.57 ± 0.27	25.49 ± 0.13	23.45 ± 1.51
18:1n9	26.54 ± 3.00	28.78 ± 0.72	27.57 ± 1.40
18:2n6	11.52 ± 0.86	11.56 ± 1.23	10.95 ± 0.23
18:3n3	0.45 ± 0.08	0.51 ± 0.08	0.46 ± 0.06
20:4n6	2.83 ± 0.08	2.69 ± 0.07	2.83 ± 0.10
22:6n3	2.05 ± 0.12	2.37 ± 0.13	2.22 ± 0.18
SFA	55.80 ± 2.04	54.85 ± 1.57	52.21 ± 2.25
UFA	45.71 ± 3.66	48.18 ± 1.58	46.48 ± 1.78
MUFA	28.85 ± 2.96	31.06 ± 0.56	30.03 ± 1.49
PUFA	16.86 ± 1.12	17.12 ± 1.35	16.45 ± 0.32
PUFA-n6	14.35 ± 1.14	14.25 ± 1.58	13.78 ± 0.21
PUFA-n3	2.50 ± 0.25	3.12 ± 0.14	2.68 ± 0.25
UI	76.89 ± 5.05	80.65 ± 3.43	77.93 ± 2.94
PI	40.91 ± 3.11	40.02 ± 3.76	41.68 ± 2.83
S/U	1.23 ± 0.14	1.14 ± 0.01	1.12 ± 0.01
20:4/18:2	0.25 ± 0.01	0.23 ± 0.03	0.25 ± 0.01
22:6/18:3	4.66 ± 0.79	4.82 ± 1.23	4.92 ± 0.75

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Tabla III.3: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de cerebro de *Lonchura striata*

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	20.80 ± 0.06	19.99 ± 0.21	21.65 ± 0.46
16:1n7	2.24 ± 0.17	2.02 ± 0.36	2.83 ± 0.58
18:0	18.68 ± 0.17	19.86 ± 0.39	20.27 ± 0.16
18:1n9	28.66 ± 0.20	29.33 ± 0.38	27.73 ± 0.69
18:2n6	13.60 ± 1.31	12.49 ± 0.69	13.00 ± 1.78
18:3n3	0.77 ± 0.06	0.73 ± 0.04	0.78 ± 0.06
20:4n6	6.68 ± 0.13	6.52 ± 0.23	2.10 ± 0.56 ***
22:6n3	8.33 ± 0.23	7.84 ± 0.58	2.53 ± 0.33 ***
SFA	39.49 ± 0.13	39.85 ± 0.60	41.92 ± 0.38
UFA	60.29 ± 1.21	58.94 ± 0.72	48.96 ± 2.36**
MUFA	30.90 ± 0.26	31.35 ± 0.39	30.56 ± 0.60
PUFA	29.38 ± 1.29	27.59 ± 1.07	18.40 ± 1.84**
PUFA-n6	20.28 ± 1.45	19.01 ± 0.63	15.09 ± 1.93
PUFA-n3	9.10 ± 0.11	8.58 ± 0.70	3.30 ± 0.38***
UI	137.13 ± 2.82	131.67 ± 3.87	82.44 ± 4.95***
PI	114.62 ± 10.84	103.56 ± 5.94	43.92 ± 5.52***
S/U	0.66 ± 0.01	0.68 ± 0.02	0.86 ± 0.05**
20:4/18:2	0.50 ± 0.08	0.52 ± 0.05	0.17 ± 0.04**
22:6/18:3	10.82 ± 0.87	10.74 ± 1.42	3.27 ± 0.65***

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independiente s. Las diferencias significativas entre los grupos control y peroxidado están indicados por **p < 0.01; ***p < 0.001.

Tabla III.4: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de hígado de *Lonchura striata*

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	36.84 ± 4.56	33.92 ± 3.50	38.25 ± 1.52
16:1n7	2.86 ± 0.29	3.56 ± 0.28	2.78 ± 0.48
18:0	20.78 ± 6.30	27.23 ± 4.02	24.94 ± 4.13
18:1n9	29.14 ± 3.70	23.36 ± 2.83	24.65 ± 1.73
18:2n6	7.74 ± 0.10	5.41 ± 0.31	5.19 ± 0.18
18:3n3	1.13 ± 0.23	1.30 ± 0.10	0.96 ± 0.17
20:4n6	5.22 ± 0.46	4.48 ± 0.21	1.12 ± 0.45 **
22:6n3	4.13 ± 0.56	4.36 ± 0.28	1.38 ± 0.06 ***
SFA	57.63 ± 10.71	61.15 ± 7.37	63.19 ± 3.32
UFA	50.21 ± 3.07	42.47 ± 2.36	36.09 ± 2.73 **
MUFA	31.99 ± 3.61	26.92 ± 2.91	27.44 ± 2.06
PUFA	18.22 ± 1.19	15.55 ± 0.55	8.65 ± 0.68 **
PUFA-n6	12.96 ± 0.50	9.89 ± 0.45	6.31 ± 0.74***
PUFA-n3	5.26 ± 0.97	5.66 ± 0.22	2.34 ± 0.24***
UI	96.51 ± 4.59	85.73 ± 0.64	53.44 ± 4.21 ***
PI	64.79 ± 10.51	61.97 ± 2.77	23.21 ± 1.58***
S/U	1.16 ± 0.27	1.45 ± 0.24	1.79 ± 0.22
20:4/18:2	0.68 ± 0.04	0.83 ± 0.07	0.21 ± 0.11***
22:6/18:3	3.70 ± 0.40	3.39 ± 0.54	1.42 ± 0.54***

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos control y peroxidado están indicados por **p < 0.01; ***p < 0.001.

Tabla III.5: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de corazón de *Lonchura striata*

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	39.53 ± 1.70	41.51 ± 1.23	40.86 ± 3.12
16:1n7	6.73 ± 0.45	6.44 ± 0.42	4.84 ± 0.38
18:0	30.39 ± 2.10	29.68 ± 2.27	28.24 ± 3.23
18:1n9	19.92 ± 2.15	22.77 ± 0.70	23.04 ± 3.34
18:2n6	2.49 ± 0.45	2.03 ± 0.08	1.93 ± 0.31
18:3n3	-	-	-
20:4n6	1.20 ± 0.14	1.44 ± 0.16	1.42 ± 0.26
22:6n3	1.41 ± 0.14	1.41 ± 0.15	1.42 ± 0.15
SFA	69.91 ± 0.98	71.18 ± 3.18	69.10 ± 3.71
UFA	31.74 ± 2.85	34.09 ± 1.42	32.64 ± 2.66
MUFA	26.65 ± 2.20	29.21 ± 1.11	27.88 ± 3.19
PUFA	5.09 ± 0.68	4.88 ± 0.32	4.76 ± 0.72
PUFA-n6	3.68 ± 0.72	3.47 ± 0.29	3.34 ± 0.70
PUFA-n3	1.40 ± 0.17	1.40 ± 0.18	1.41 ± 0.17
UI	44.85 ± 4.25	47.47 ± 2.48	45.91 ± 1.97
PI	19.20 ± 3.27	19.89 ± 3.03	19.50 ± 4.37
S/U	2.22 ± 0.22.	2.09 ± 0.09	2.14 ± 0.30
20:4/18:2	0.48 ± 0.05	0.70 ± 0.06	0.73 ± 0.02

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Tabla III.6: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de cerebro de *Lonchura striata*

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	31.24 ± 7.32	34.71 ± 2.51	35.21 ± 0.95
16:1n7	1.62 ± 0.27	2.23 ± 0.30	1.99 ± 0.18
18:0	29.45 ± 1.09	38.33 ± 3.58	34.87 ± 4.47
18:1n9	20.90 ± 0.86	18.82 ± 1.46	19.01 ± 1.11
18:2n6	3.12 ± 0.13	2.97 ± 0.25	3.99 ± 0.29
18:3n3	0.71 ± 0.14	0.76 ± 0.16	0.59 ± 0.14
20:4n6	2.28 ± 0.35	2.40 ± 0.58	1.98 ± 0.22
22:6n3	3.67 ± 0.18	3.70 ± 0.17	3.83 ± 0.19
SFA	60.69 ± 6.23	73.03 ± 6.04	70.08 ± 3.68
UFA	32.31 ± 1.20	30.88 ± 1.23	31.40 ± 1.51
MUFA	22.52 ± 1.08	21.04 ± 1.20	21.00 ± 1.28
PUFA	9.79 ± 0.69	9.84 ± 0.47	10.40 ± 0.51
PUFA-n6	5.41 ± 0.55	5.37 ± 0.63	5.97 ± 0.36
PUFA-n3	5.81 ± 3.28	4.47 ± 0.15	4.61 ± 0.36
UI	62.07 ± 3.02	61.10 ± 2.24	61.69 ± 3.10
PI	46.61 ± 1.54	44.25 ± 3.15	43.76 ± 2.90
S/U	1.89 ± 0.25	2.37 ± 0.24	2.24 ± 0.14
20:4/18:2	0.72 ± 0.01	0.82 ± 0.38	0.47 ± 0.16
22:6 / 18:3	5.37 ± 1.25	5.14 ± 1.73	7.18 ± 1.99

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

III.2.2. Composición de ácidos grasos de la dieta

La tabla III.7 muestra que en la dieta predominan los ácidos grasos saturados de cadena larga y ácidos grasos no saturados, especialmente C18:1n9 y C18:2n6 y pequeñas cantidades de C18:3n3, no hallándose ácidos grasos altamente no saturados como C20:4n6 y C22:6n3.

Tabla III.7: Composición de ácidos grasos de la dieta suministrada a Manón

Acido graso	%
16:0	12.84 ± 0.64
16:1 n7	0.71 ± 0.43
18:0	18.47 ± 0.27
18:1 n9	37.06 ± 0.56
18:2 n6	29.92 ± 0.31
18:3 n3	0.82 ± 0.06

Los datos son expresados como la media ± SD

III.2.3. Quimioluminiscencia de mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro: perfil de ácidos grasos

En la Figura III. 1 se graficaron los resultados de quimioluminiscencia de las muestras controles y peroxidadas. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la emisión de luz entre las muestras control y peroxidadas cuando se utilizaron microsomas de cerebro y organelas de corazón. Por lo tanto, el perfil de ácidos grasos, UI y PI de las organelas de corazón y microsomas de cerebro no fueron afectados por el proceso de peroxidación lipídica (Tablas III 2, 5 y 6).

En cambio, la emisión de luz fue estadísticamente significativa en mitocondrias de cerebro y en las organelas de hígado (Figura III. 1), presentando valores de emisión lumínica 3 veces mayor que las producidas por las muestras controles. Los microsomas de hígado también presentaron valores de emisión lumínica 1.7 veces superiores al de los controles.

Las mitocondrias de cerebro y organelas de hígado peroxidadas mostraron además una disminución significativa de los ácidos C20:4n6, C22:6n3, UI y PI (Tablas III. 1, 3 y 4).

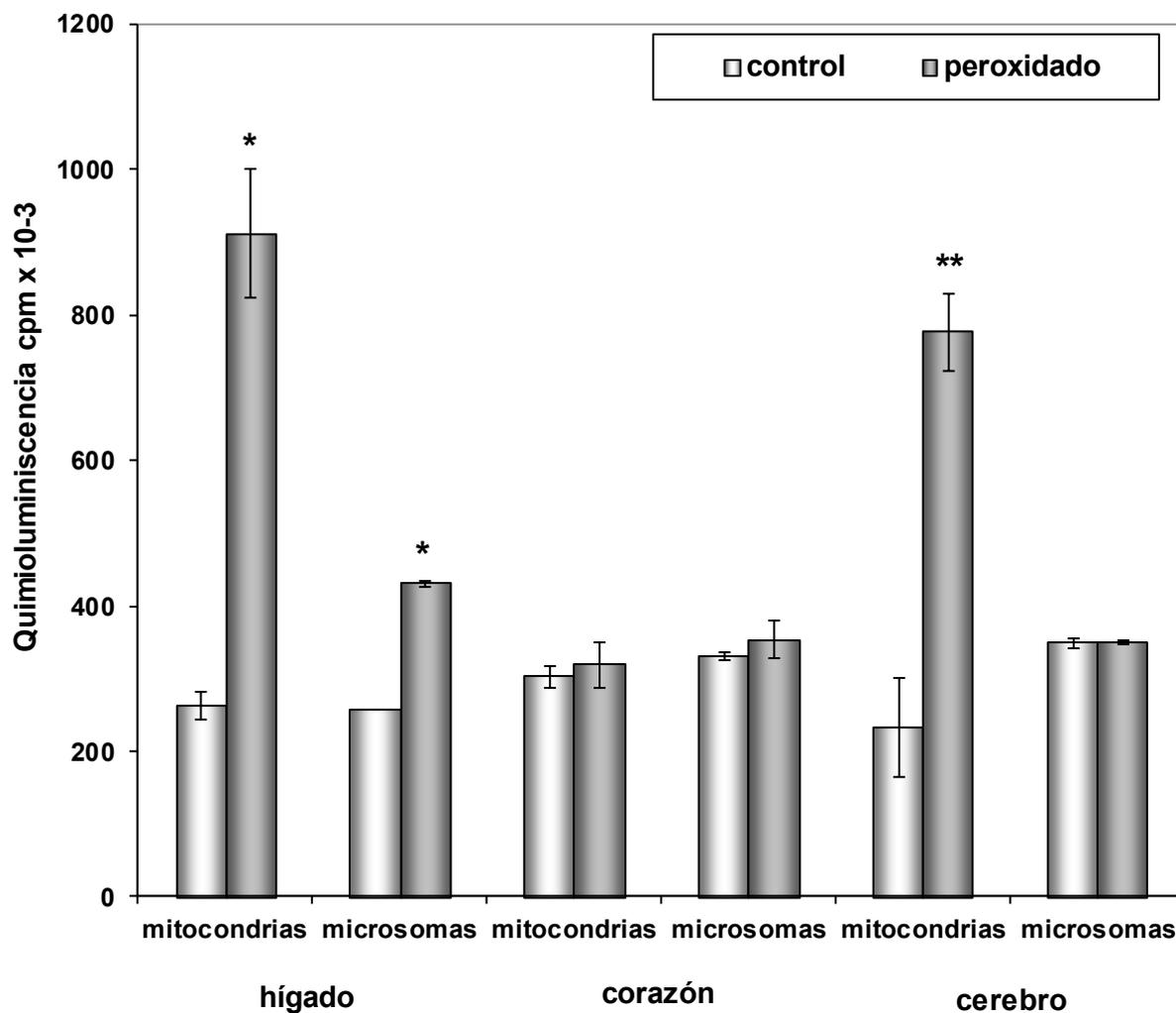


Figura III.1. Quimioluminiscencia total producida por mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro (expresada como cpm/mg de proteína). Los datos son expresados como la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticas entre las muestras controles y peroxidadas fueron indicadas por * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$.

III.3. DISCUSIÓN

En el presente estudio observamos que el porcentaje de ácidos grasos no saturados y poliinsaturados fue diferente en las organelas de los órganos estudiados. El C18:1n9 fue el ácido graso no saturado predominante en *L. Striata*. Estos valores altos también fueron hallados en la paloma (Pamplona et al., 1996), en canarios y periquitos (Pamplona et al., 1999).

Las mitocondrias de cerebro de manón poseen un mayor contenido de C20:4n6 y C22:6n3 que los microsomas de cerebro e hígado y que las organelas de corazón. Aunque hay pequeñas diferencias en la composición de ácidos grasos entre los vertebrados, está claro que hay un requerimiento específico y funcional para las altas concentraciones de C22:6n3. De hecho, C22:6n3 parece prevalecer en el cerebro de la mayoría de los vertebrados (Else y Wu, 1999; Farkas y col., 2000; Turner y col., 2005 b). El consenso general sugiere que los fosfolípidos que contienen C22:6n3 le aportan fluidez y permeabilidad a las membranas celulares neuronales, acomodando las acciones de las proteínas de membrana involucradas en el mecanismo de transmisión neuronal (Salem y col., 2001).

Estudios simultáneos del perfil de ácidos grasos de la dieta y de las mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro de manón demuestran que la composición de ácidos grasos de la dieta no es la responsable de las diferencias observadas en el contenido de dobles enlaces de las organelas. Estas diferencias pueden estar correlacionadas con la regulación homeostática de cada órgano principalmente debido a un control genético de la delta-5/-6 desaturasa (Pamplona y col., 2002, 1999).

En *L. striata*, las mitocondrias de cerebro y las organelas de hígado fueron las más susceptibles a la peroxidación lipídica. Esto podría atribuirse a los elevados valores del PI y de las relaciones 20:4/18:2 y 22:6/18:3. En cambio las organelas de corazón no fueron afectadas por el proceso de peroxidación lipídica y mostraron la presencia de ácidos grasos con bajo grado de no-saturación con respecto a las organelas de hígado y cerebro. Estas características de los ácidos grasos y otros factores, entre ellos la presencia de plasmalógenos, podrían protegerlas del daño oxidativo. En este sentido, trabajos recientes muestran que los plasmalógenos son lípidos que pueden actuar como antioxidantes (Jimenez y col., 2014; Hulbert y col., 2014).

Con respecto a los microsomas, sólo los de hígado fueron afectados por la peroxidación lipídica, mostrando un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados que los microsomas de corazón y de cerebro. El bajo grado de no-saturación que presentan las membranas celulares es uno de los atributos que presentan los mamíferos y las aves longevas. Esto es principalmente debido a un menor contenido de ácidos grasos altamente no saturados como el 22:6n3 y a una mayor presencia de ácidos grasos menos no saturados como 18:2n6, sin que existan cambios en el total de ácidos grasos poliinsaturados. Esta redistribución de los ácidos grasos conduce a disminuir los niveles de peroxidación lipídica (Sanz y col., 2006).

Las mitocondrias de cerebro y las organelas de hígado fueron las más susceptibles al proceso de peroxidación lipídica y exhibieron los valores más altos de PI, mostrando una correlación positiva con el largo de la cadena de los ácidos grasos poliinsaturados. Otro hallazgo interesante de este estudio, fue la menor sensibilidad a la peroxidación lipídica *in vitro* observada en las organelas de corazón, las cuales exhibieron valores de PI menores que los hallados en el hígado y cerebro. Este hecho contribuye a la protección de este tejido contra el daño oxidativo y por consiguiente a la preservación de función cardíaca.

CAPITULO IV

***Análisis de la composición de ácidos grasos
y peroxidación lipídica no enzimática de
mitocondrias y microsomas obtenidos de
hígado, corazón y cerebro de codorniz
(Coturnix coturnix japónica)***

IV.1. INTRODUCCIÓN

Como ya fuera mencionado (Introducción General Capítulo I) existe un consenso general acerca de que las aves son excelentes modelos de laboratorio para diferentes estudios biológicos. En la mayoría de los casos se han utilizado aves pequeñas, domésticas, de diferentes órdenes incluyendo especies de corta vida, como la codorniz y varias especies de jaula. La codorniz se ha empleado como modelo de envejecimiento relacionado con la declinación de la reproducción (Ottinger, 2001), pero no se conocen datos sobre de la composición de ácidos grasos y la sensibilidad a la peroxidación lipídica de sus órganos.

En el presente estudio hemos analizado el perfil de ácidos grasos y la peroxidación lipídica *in vitro* en mitocondrias y microsomas aislados de hígado, corazón y cerebro de codorniz (*Coturnix coturnix japónica*), ave pequeña y de envejecimiento rápido.

IV.2. RESULTADOS

IV.2.1. Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro de codorniz

Los ácidos grasos saturados de cadena larga presentes en las mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro fueron principalmente C16:0 y C18:0, en un porcentaje de aproximadamente 40-50%. La concentración de ácidos grasos no saturados fue de aproximadamente 50% en mitocondrias y microsomas de hígado, 34 y 55% en mitocondrias y microsomas de corazón, respectivamente y en las organelas de cerebro fue aproximadamente 40%. El contenido de ácidos grasos monoetilénicos de mitocondrias y microsomas de hígado fue mayor que el obtenido de las organelas aisladas de cerebro y corazón. La concentración de ácidos grasos poliinsaturados fue diferente en cada uno de los órganos estudiados: en mitocondrias y microsomas de hígado aproximadamente 15%, en microsomas y mitocondrias de corazón 10 y 30%, respectivamente y en ambas organelas de cerebro aproximadamente 20%. La concentración de ácido araquidónico en las organelas de hígado y cerebro y mitocondria de corazón fue aproximadamente 5-7%, mientras que los microsomas de corazón exhibieron un menor contenido (2%). El porcentaje del ácido

docosaheptaenoico fue aproximadamente 7-10 veces mayor en las organelas de cerebro que en las organelas de corazón y microsomas de hígado y estuvo ausente en las mitocondrias de hígado. La relación 20:4n6/18:2n6 fue mayor en las organelas de cerebro que en las de hígado y corazón, exhibiendo las mitocondrias de cerebro el valor más alto (Tablas IV. 1-6).

Tabla IV.1: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de hígado de codorniz

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	28.93 ± 2.0	32.70 ± 1.18	31.09 ± 2.46
16:1n7	4.71 ± 0.50	5.29 ± 0.32	5.38 ± 1.04
18:0	15.33 ± 1.74	17.02 ± 0.68	16.86 ± 1.30
18:1n9	26.67 ± 3.49	29.84 ± 2.61	30.81 ± 2.03
18:2n6	11.39 ± 1.99	10.51 ± 2.37	8.32 ± 1.08
18:3n3	-	-	-
20:4n6	5.83 ± 0.44	4.65 ± 0.37	4.12 ± 0.08
22:6n3	-	-	-
SFA	44.26 ± 3.41	49.72 ± 0.68	47.96 ± 3.56
UFA	48.60 ± 3.24	50.29 ± 3.15	48.63 ± 3.85
MUFA	31.38 ± 3.80	35.13 ± 2.74	39.19 ± 3.02
PUFA	17.22 ± 2.22	15.16 ± 2.18	12.44 ± 1.00
UI	77.48 ± 4.78	74.75 ± 4.85	68.35 ± 4.62
PI	35.50 ± 3.16	30.00 ± 2.00	25.70 ± 0.83
S/U	0.91 ± 0.01	0.99 ± 0.07	0.99 ± 0.13
20:4/18:2	0.52 ± 0.09	0.46 ± 0.11	0.50 ± 0.08

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. S/U: saturados/no saturados.

Tabla IV.2: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de corazón de codorniz

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	20.68 ± 0.46	29.39 ± 0.64	24.87 ± 1.55
16:1n7	2.37 ± 0.16	2.65 ± 0.20	3.02 ± 0.58
18:0	15.72 ± 0.72	17.41 ± 0.99	16.34 ± 1.64
18:1n9	21.39 ± 1.25	23.13 ± 0.54	24.07 ± 1.25
18:2n6	23.81 ± 0.95	21.80 ± 1.73	20.14 ± 3.58
18:3n3	0.72 ± 0.24	0.73 ± 0.25	0.51 ± 0.14
20:4n6	6.00 ± 0.56	5.53 ± 0.49	5.08 ± 0.14
22:6n3	0.80 ± 0.08	0.78 ± 0.10	0.70 ± 0.06
SFA	36.40 ± 1.09	40.80 ± 0.79	41.21 ± 2.82
UFA	55.08 ± 1.48	54.72 ± 2.24	53.53 ± 5.17
MUFA	23.75 ± 1.42	25.78 ± 0.46	27.10 ± 1.56
PUFA	31.33 ± 1.18	28.84 ± 1.86	26.44 ± 3.86
UI	102.32 ± 3.11	98.36 ± 4.58	92.45 ± 9.61
PI	56.23 ± 2.35	52.26 ± 3.02	47.78 ± 4.75
S/U	0.66 ± 0.02	0.75 ± 0.02	0.78 ± 0.12
20:4/18:2	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.27 ± 0.12

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes

Tabla IV.3: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de cerebro de codorniz

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	28.77 ± 0.69	28.49 ± 0.49	28.75 ± 0.67
16:1n7	-	-	-
18:0	22.67 ± 1.26	23.36 ± 1.02	23.76 ± 0.81
18:1n9	20.64 ± 0.71	24.89 ± 1.73	25.33 ± 2.23
18:2n6	2.48 ± 0.45	2.36 ± 0.07	2.53 ± 0.65
18:3n3	-	-	-
20:4n6	8.07 ± 0.84	7.31 ± 0.40	2.71 ± 0.72*
22:6n3	10.67 ± 0.52	8.98 ± 0.68	0.77 ± 0.08*
SFA	51.44 ± 1.64	51.85 ± 1.25	52.51 ± 0.92
UFA	41.86 ± 1.51	43.54 ± 2.44	31.39 ± 0.92
MUFA	20.64 ± 0.71	24.89 ± 1.73	25.33 ± 2.23
PUFA	21.22 ± 0.87	18.65 ± 0.88	6.06 ± 1.34*
UI	121.88 ± 4.65	112.72 ± 6.14	45.95 ± 1.84*
PI	120.62 ± 5.04	104.04 ± 6.07	20.23 ± 3.23**
S/U	1.23 ± 0.04	1.19 ± 0.08	1.67 ± 0.04*
20:4/18:2	3.34 ± 0.69	3.10 ± 0.16	1.15 ± 0.22

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticas entre las muestras controles y peroxidadas fueron indicadas por * $p < 0.001$;

** $p < 0.0001$.

Tabla IV.4: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de hígado de codorniz

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	28.93 ± 2.00	32.60 ± 3.36	31.88 ± 2.89
16:1n7	4.71 ± 0.50	3.39 ± 0.47	3.04 ± 0.17
18:0	15.33 ± 1.74	16.12 ± 1.80	17.62 ± 2.34
18:1n9	26.67 ± 3.49	29.21 ± 2.74	30.51 ± 1.84
18:2n6	11.39 ± 1.99	9.37 ± 1.70	8.54 ± 1.19
18:3n3	-	-	-
20:4n6	5.83 ± 0.44	3.82 ± 0.17	3.70 ± 0.17
22:6n3	-	0.86 ± 0.11	0.72 ± 0.13
SFA	48.32 ± 5.04	48.72 ± 4.42	49.50 ± 4.41
UFA	46.20 ± 3.37	46.65 ± 4.02	46.50 ± 2.73
MUFA	30.96 ± 2.98	32.60 ± 2.61	33.54 ± 1.81
PUFA	15.24 ± 2.16	14.05 ± 1.77	12.96 ± 0.99
UI	71.49 ± 5.39	71.75 ± 5.63	69.72 ± 3.43
PI	31.95 ± 2.12	32.30 ± 1.82	28.41 ± 2.19
S/U	1.05 ± 0.15	1.05 ± 0.16	1.07 ± 0.14
20:4/18:2	0.33 ± 0.06	0.41 ± 0.05	0.43 ± 0.07

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Tabla IV.5: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de corazón de codorniz

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	35.21 ± 5.62	30.23 ± 4.10	34.62 ± 4.99
16:1n7	2.27 ± 0.21	2.61 ± 0.43	2.96 ± 0.46
18:0	23.82 ± 2.07	25.30 ± 4.18	24.40 ± 2.52
18:1n9	20.55 ± 2.32	17.19 ± 1.37	17.88 ± 0.42
18:2n6	6.82 ± 0.41	6.92 ± 0.30	7.65 ± 0.51
18:3n3	1.42 ± 0.31	1.41 ± 0.13	1.34 ± 0.30
20:4n6	2.12 ± 0.37	1.89 ± 0.83	1.26 ± 0.43
22:6n3	0.90 ± 0.06	0.87 ± 0.03	0.96 ± 0.06
SFA	59.03 ± 6.66	55.61 ± 8.15	59.03 ± 5.36
UFA	34.09 ± 2.45	30.89 ± 1.64	32.04 ± 1.08
MUFA	22.82 ± 2.24	19.80 ± 1.40	20.84 ± 0.54
PUFA	11.26 ± 0.84	11.09 ± 0.92	11.20 ± 0.85
UI	54.61 ± 3.38	50.66 ± 4.00	50.93 ± 2.91
PI	27.60 ± 3.20	24.76 ± 3.59	23.54 ± 2.27
S/U	1.75 ± 0.29	1.81 ± 0.30	1.81 ± 0.30
20:4/18:2	0.31 ± 0.05	0.27 ± 0.12	0.16 ± 0.05

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Tabla IV.6: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de cerebro de codorniz

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
16:0	21.32 ± 1.13	21.73 ± 0.84	24.37 ± 0.78
16:1n7	1.96 ± 0.23	2.19 ± 0.28	2.38 ± 0.31
18:0	23.64 ± 0.65	24.25 ± 0.89	22.72 ± 1.61
18:1n9	20.17 ± 0.87	20.16 ± 0.58	20.11 ± 0.33
18:2n6	6.87 ± 0.61	6.66 ± 0.46	6.58 ± 0.29
18:3n3	0.92 ± 0.05	0.91 ± 0.06	0.99 ± 0.23
20:4n6	5.84 ± 0.22	5.64 ± 0.19	4.97 ± 0.51
22:6n3	6.99 ± 0.44	6.93 ± 0.12	7.04 ± 0.05
SFA	44.97 ± 1.31	45.99 ± 0.52	47.09 ± 1.56
UFA	42.76 ± 1.50	42.49 ± 0.61	42.07 ± 0.58
MUFA	22.13 ± 0.77	22.35 ± 0.49	22.49 ± 0.13
PUFA	20.62 ± 1.11	20.14 ± 0.24	19.58 ± 0.61
UI	103.96 ± 4.21	102.54 ± 1.24	100.75 ± 2.08
PI	88.57 ± 5.33	87.04 ± 1.49	85.32 ± 2.51
S/U	1.05 ± 0.07	1.84 ± 0.14	1.12 ± 0.05
20:4/18:2	0.84 ± 0.06	0.85 ± 0.10	0.75 ± 0.06

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Tabla IV.7: Composición de ácidos grasos de la dieta suministrada a las codornices

Ácido graso	%
C16:0	18.36 ± 0.41
C16:1n7	-
C18:0	26.52 ± 0.96
C18:1n9	48.76 ± 0.29
C18:2n6	3.86 ± 0.58
C18:3n3	0.15 ± 0.04

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

La Tabla IV.7 muestra que en la dieta predominan los ácidos grasos saturados de cadena larga y ácidos grasos no saturados, especialmente C18:1n9 y pequeñas cantidades de poliinsaturados con bajo contenido de dobles enlaces.

IV.2.2. Perfil de ácidos grasos y quimioluminiscencia de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro

Las muestras controles y peroxidadas de las organelas de hígado y corazón no mostraron diferencias significativas en cuanto a la emisión lumínica ó quimioluminiscencia (Figura. IV.1).

El perfil de ácidos grasos, UI y PI de mitocondrias y microsomas de hígado y de corazón no fue alterado por el proceso de peroxidación (Tablas IV.1, 2, 4 y 5; Figura IV.2).

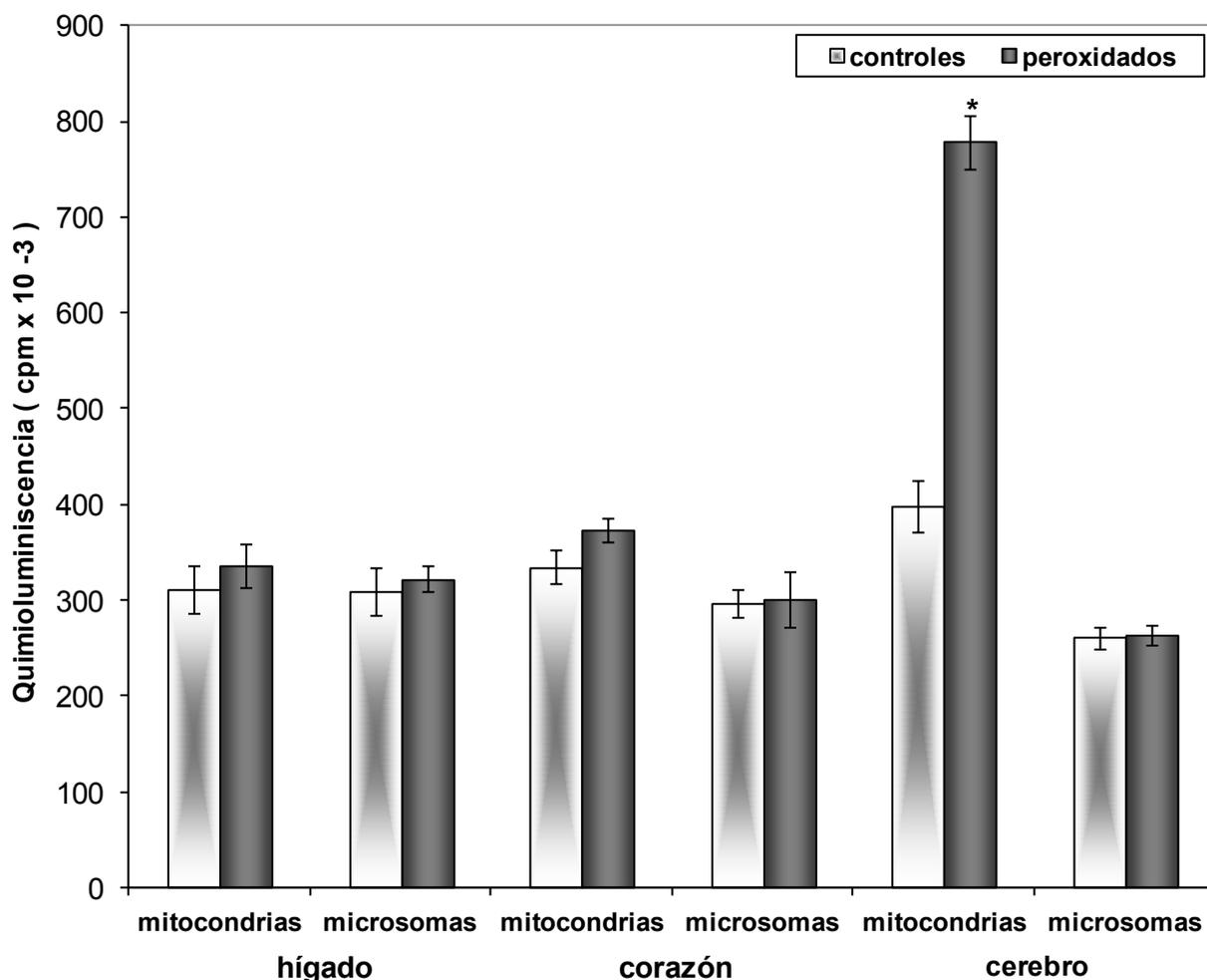


Figura IV.1. Quimioluminiscencia total producida por mitocondrias y microsomas de hígado, de corazón y de cerebro (expresada como cpm/mg de proteína). * $p < 0.001$.

La composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas controles de cerebro fue diferente. La relación 20:4n6/18:2n6 fue 3.6 veces mayor en mitocondrias que en microsomas (Tablas IV.3 y 6). La emisión lumínica de las muestras peroxidadas de mitocondrias de cerebro fue significativamente mayor que la observada en las muestras controles (Figura IV.1). Las mitocondrias peroxidadas presentaron además una disminución significativa de los ácidos C20:4n6, C22:6n3 y de UI y PI (Figura IV.2 y Tabla IV.3). En cambio, en microsomas, la peroxidación no modificó la composición de ácidos grasos, ni los índices UI y PI (Figura IV.2 y Tabla IV.6).

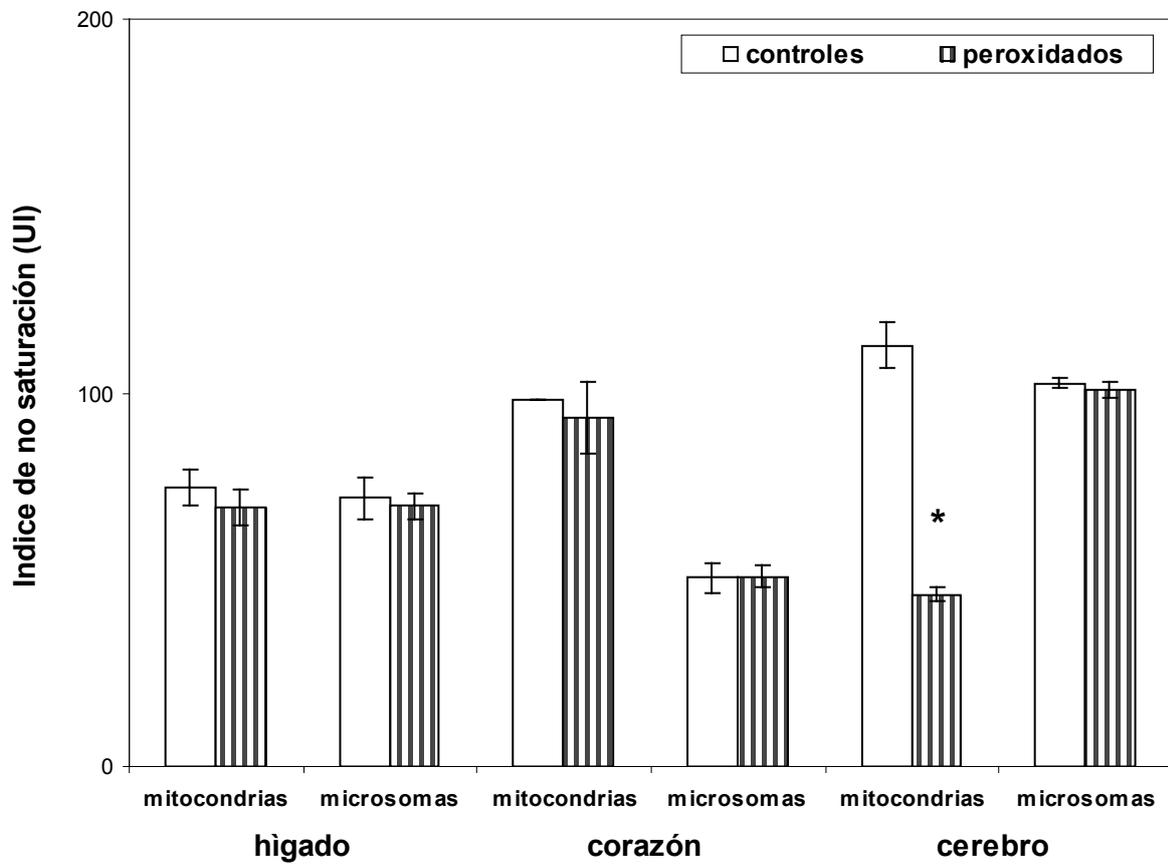


Figura IV.2: Índice de no saturación de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro de la codorniz. * $p < 0.001$.

IV.3. DISCUSIÓN

Si bien el porcentaje total de ácidos grasos no saturados fue similar en todos los órganos examinados de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) la contribución de cada ácido graso fue diferente. Las mitocondrias y microsomas de cerebro poseen un mayor contenido de C20:4n6 y de C22:6n3 que las organelas de hígado y de corazón.

Estudios simultáneos del perfil de ácidos grasos de la dieta y de las mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro muestran que la composición de ácidos grasos de la dieta no es responsable de las diferencias observadas en el contenido de dobles enlaces de los ácidos grasos presentes en dichas organelas. Este análisis coincide con las observaciones de Pamplona y col. (1999 b), quienes demostraron que el menor grado de no saturación de los ácidos grasos hallado en las aves fue independiente de la composición de la dieta. Las diferencias observadas en el perfil de los ácidos grasos entre las organelas de los tejidos estudiados podrían estar correlacionadas a la regulación homeostática de cada órgano (Maresca y col., 1993; Salem y col., 2001). El control del grado de no saturación de los lípidos de la membrana se ha atribuido a una retroalimentación negativa de genes de transcripción de las desaturasas dependiente de la composición lipídica (Maresca y col., 1993; Vigh y col., 1993) y a la modulación de desaturasas por el estado metabólico-hormonal (Guéraud y Paris, 1997).

En este estudio demostramos que las mitocondrias y microsomas de hígado y corazón de la codorniz, especie que muestra un envejecimiento rápido, presentan una baja sensibilidad a la peroxidación lipídica (Ottinger, 2001; Holmes y col., 2001). Estos resultados sugieren que aves de corta vida, de manera similar que las longevas, poseen una alta resistencia al ataque producido por los ROS. Entre los mecanismos de defensa de la codorniz, la composición de ácidos grasos puede jugar un papel importante en la resistencia a la peroxidación lipídica. En mitocondrias de cerebro observamos una relación estrecha entre la sensibilidad del tejido a la peroxidación lipídica *in vitro* y el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (C20:4n6 y C 22:6n3). Sin embargo, aunque los microsomas de cerebro poseen una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, ellos fueron resistentes a la peroxidación lipídica. Es importante señalar que los microsomas de cerebro presentaron un aumento en el contenido de C18:2n6 con una disminución

paralela en el C20:4n6 con respecto a las mitocondrias de cerebro. Estas diferencias y otros factores podrían estar involucrados en la baja sensibilidad a la peroxidación lipídica observada en los microsomas. El hallazgo más interesante fue que las organelas de hígado y corazón de la codorniz (ave pequeña y de corta vida), posean ácidos grasos con bajo grado de no saturación, similar a lo observado en las aves longevas y esto podría conferirles a estos órganos una mayor resistencia a la peroxidación lipídica.

CAPITULO V

Peroxidación lipídica no enzimática en microsomas y mitocondrias obtenidas de hígado, corazón y cerebro de paloma (Columba livia). Cambios observados en el perfil de ácidos grasos

V.1. INTRODUCCIÓN

Barja y col. (1994) han demostrado que las mitocondrias de cerebro, pulmón e hígado de paloma producen menos ROS que las mitocondrias obtenidas de rata. Estudios posteriores realizados por Pamplona y col. (1996) mostraron resultados similares.

La baja tasa de producción de ROS mitocondrial en la paloma podría ser parcialmente responsable de su longevidad. Barja y col. (1994) y López-Torres y col. (1993) han propuesto que las mitocondrias de humano presentan una capacidad similar a la de paloma.

Teniendo en cuenta la relevancia de los hallazgos anteriormente mencionados y siguiendo nuestros objetivos elegimos para este estudio a la paloma por ser de fácil obtención, similar tamaño corporal al de la rata de laboratorio y con características similares a la de los animales longevos. Estas razones la convierten en un importante modelo para poder realizar estudios en el laboratorio.

En este Capítulo el objetivo fue analizar la composición de ácidos grasos y sensibilidad a la peroxidación lipídica en mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro de la paloma (*Columba livia*).

V.2. RESULTADOS

V.2.1. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro de paloma (*Columba livia*)

El C16:0 y C18:0 fueron los ácidos grasos saturados más abundantes de las mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y en mitocondrias de cerebro (Tablas V.1–5). La concentración de ácidos grasos no saturados fue de aproximadamente 50% en mitocondrias y microsomas de hígado y corazón y alrededor de un 40% en mitocondrias de cerebro. En ambas organelas el ácido graso monoetilénico predominante fue el C18:1n9. El contenido de ácidos grasos monoetilénicos de ambas organelas de todos los órganos estudiados fue aproximadamente de 25%. El contenido de ácidos grasos poliinsaturados de las organelas vario entre 25 y 35 %. El porcentaje de ácido linoleico fue 36 veces mayor en las organelas de hígado y corazón que en las mitocondrias de cerebro. El contenido de ácido

C20:4n6 fue de aproximadamente 8 % en mitocondrias y 4 % en microsomas de los órganos estudiados. El porcentaje del ácido docosaheptaenoico fue de 2 % en mitocondrias de hígado y corazón y 8 % en mitocondrias de cerebro. Las mitocondrias y microsomas de hígado y corazón presentaron un similar índice de no saturación.

Tabla V.1: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de hígado de paloma (*Columba livia*)

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	17.08 ± 0.81	16.04 ± 1.50	17.31 ± 2.29
C16:1n7	3.50 ± 0.18	3.44 ± 0.64	4.52 ± 1.03
C18:0	14.42 ± 1.03	15.90 ± 3.16	13.33 ± 1.68
C18:1n9	23.91 ± 1.12	23.22 ± 3.83	29.13 ± 6.40
C18:2n6	25.83 ± 1.48	26.08 ± 3.19	9.61 ± 1.32*
C18:3n3	0.64 ± 0.20	0.38 ± 0.21	1.40 ± 0.91
C20:4n6	7.13 ± 0.55	7.05 ± 1.85	0.90 ± 0.35*
C22:6n3	2.54 ± 0.33	2.37 ± 0.31	-
SFA	31.50 ± 1.55	31.44 ± 3.40	30.63 ± 3.95
UFA	63.54 ± 0.42	61.42 ± 5.13	45.55 ± 7.36
MUFA	27.40 ± 1.30	25.82 ± 5.29	33.65 ± 7.28
PUFAs	36.14 ± 3.37	35.62 ± 3.85	11.91 ± 0.74
S/ U	0.50 ± 0.04	0.51 ± 0.09	0.68 ± 0.06
UI	124.73 ± 10.91	119.34 ± 10.58	60.75 ± 7.81*
PI	76.63 ± 2.35	74.67 ± 1.37	16.31 ± 2.02**

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos control y peroxidado están indicados por *p < 0.05; **p < 0.01.

Tabla V.2: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de hígado de paloma (*Columba livia*)

Acidos graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	18.28 ± 0.84	17.12 ± 2.73	23.81 ± 1.75
C16:1n7	5.75 ± 0.87	5.75 ± 2.63	4.70 ± 1.45
C18:0	15.66 ± 1.11	15.65 ± 3.27	18.05 ± 2.45
C18:1n9	22.58 ± 4.10	22.58 ± 4.16	23.43 ± 6.22
C18:2n6	26.14 ± 2.36	26.14 ± 2.08	15.26 ± 3.02*
C18:3n3	0.42 ± 0.10	0.42 ± 0.10	-
C20:4n6	7.05 ± 1.11	7.05 ± 1.32	3.25 ± 0.59*
C22:6n3	1.50 ± 0.25	1.50 ± 0.22	0.6 ± 0.02
SFA	33.94 ± 1.25	31.77 ± 3.43	41.86 ± 3.47
UFA	61.09 ± 4.54	61.09 ± 1.76	47.33 ± 2.55
MUFA	28.33 ± 4.42	28.32 ± 4.89	28.14 ± 0.89
PUFAs	35.11 ± 4.34	35.11 ± 4.35	19.11 ± 3.64
S/ U	0.55 ± 0.07	0.53 ± 0.04	0.87 ± 0.15
UI	118.07 ± 10.73	118.05 ± 9.41	72.85 ± 6.84*
PI	69.65 ± 4.25	69.07 ± 6.02	34.65 ± 2.82*

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos control y peroxidado están indicados por * $p < 0.05$.

Tabla V.3: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de corazón de paloma (*Columba livia*)

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	14.17 ± 0.01	14.16 ± 2.29	19.37 ± 2.29
C16:1n7	3.20 ± 0.01	3.22 ± 0.97	4.80 ± 0.94
C18:0	10.33 ± 0.02	10.30 ± 0.49	15.32 ± 3.54
C18:1n9	22.10 ± 0.04	22.09 ± 2.34	23.92 ± 2.02
C18:2n6	24.90 ± 1.16	26.43 ± 3.51	24.98 ± 4.48
C18:3n3	1.10 ± 0.05	1.05 ± 0.34	4.89 ± 2.25
C20:4n6	7.84 ± 0.50	9.32 ± 0.91	8.61 ± 1.62
C22:6n3	2.28 ± 0.19	2.30 ± 0.41	5.25 ± 3.58
SFA	24.50 ± 0.02	24.46 ± 2.48	34.69 ± 4.71
UFA	61.43 ± 0.57	61.48 ± 5.83	69.67 ± 2.74
MUFA	25.30 ± 0.05	24.50 ± 3.90	28.87 ± 2.49
PUFAs	36.13 ± 0.52	36.98 ± 8.00	40.95 ± 2.97
S/ U	0.40 ± 0.01	0.39 ± 0.03	0.49 ± 0.07
UI	123.45 ± 0.77	131.60 ± 7.53	134.04 ± 14.94
PI	77.33 ± 2.56	84.84 ± 7.01	111.92 ± 10.60

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes

Tabla V.4: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de corazón de paloma (*Columba livia*)

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	19.77 ± 1.41	20.08 ± 0.93	20.50 ± 3.59
C16:1n7	6.52 ± 0.37	6.76 ± 1.81	-
C18:0	9.25 ± 0.24	9.31 ± 1.72	11.15 ± 1.65
C18:1n9	29.27 ± 7.10	29.28 ± 7.99	18.16 ± 1.37
C18:2n6	23.66 ± 4.86	22.45 ± 7.42	12.02 ± 1.98
C18:3n3	2.88 ± 1.01	3.10 ± 1.94	1.66 ± 0.44
C20:4n6	4.18 ± 0.32	3.88 ± 0.78	7.40 ± 2.58
C22:6n3	3.35 ± 0.10	3.27 ± 0.17	3.25 ± 1.93
SFA	29.02 ± 1.18	28.90 ± 2.08	31.73 ± 4.33
UFA	69.86 ± 3.88	62.92 ± 10.70	40.95 ± 2.97
MUFA	35.79 ± 7.46	32.67 ± 11.29	23.52 ± 1.81
PUFAs	34.07 ± 3.80	30.25 ± 7.47	41.69 ± 2.17
S/ U	0.42 ± 0.01	0.47 ± 0.10	0.76 ± 0.15
UI	128.57 ± 0.90	110.01 ± 18.14	89.20 ± 14.16
PI	73.83 ± 3.70	66.67 ± 6.80	71.39 ± 3.25

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Tabla V.5: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de cerebro de paloma (*Columba livia*)

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	25.51 ± 3.39	24.67 ± 1.14	35.47 ± 0.93
C16:1n7	1.11 ± 0.09	1.13 ± 0.07	1.54 ± 0.27
C18:0	25.52 ± 2.52	28.04 ± 2.32	29.17 ± 2.24
C18:1n9	21.09 ± 1.72	21.19 ± 1.75	23.92 ± 2.28
C18:2n6	0.80 ± 0.21	0.60 ± 0.13	0.61 ± 0.15
C18:3n3	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.04
C20:4n6	12.70 ± 1.07	8.83 ± 1.83	4.62 ± 0.70*
C22:6n3	13.14 ± 2.04	8.46 ± 0.94	2.78 ± 0.91**
SFA	51.03 ± 3.10	52.71 ± 1.18	64.64 ± 2.59**
UFA	48.92 ± 2.50	40.33 ± 3.98	36.60 ± 4.14
MUFA	22.20 ± 1.81	22.32 ± 1.68	25.46 ± 2.54
PUFAs	26.76 ± 1.62	18.02 ± 2.48	8.14 ± 1.73**
S/ U	1.05 ± 0.12	1.32 ± 0.15	1.96 ± 0.32
UI	153.65 ± 11.17	109.98 ± 13.09	62.24 ± 10.67**
PI	137.43 ± 10.20	102.98 ± 14.19**	42.25 ± 12.37 **

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos controles y peroxidados están indicados por *p < 0,05; **p < 0,01.

Tabla V.6. Composición de ácidos grasos de la dieta suministrada a las palomas

Acido graso	%
C16:0	15.80 ± 0.25
C16:1n7	-
C18:0	22.92 ± 0.26
C18:1n9	45.93 ± 0.43
C18:2n6	3.15 ± 0.23
C18:3n3	1.17 ± 0.08

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

La tabla V.6 muestra que en la dieta predominan los ácidos grasos saturados de cadena larga y ácidos no saturados, especialmente C18:1n9 y pequeñas cantidades de poliinsaturados con bajo contenido de dobles enlaces.

V.2.2. Quimioluminescencia de mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro: perfil de ácidos grasos

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la emisión de luz entre las muestras control y peroxidadas cuando se utilizaron las organelas de corazón (Figura.V.1). El perfil de ácidos grasos, UI de mitocondrias y microsomas de corazón no fue alterado por el proceso de peroxidación (Tablas V.3 y 4).

En cambio, la emisión de luz fue estadísticamente significativa en mitocondrias de cerebro y en las organelas de hígado (Fig. V. 1). Estas organelas presentaron valores de emisión lumínica entre 5 y 3 veces mayores que las producidas por las muestras controles. Las mitocondrias de cerebro y las organelas de hígado peroxidadas mostraron además una disminución significativa de los ácidos C20:4n6, C22:6n3, UI y PI (Tablas V.1, 2 y 5).

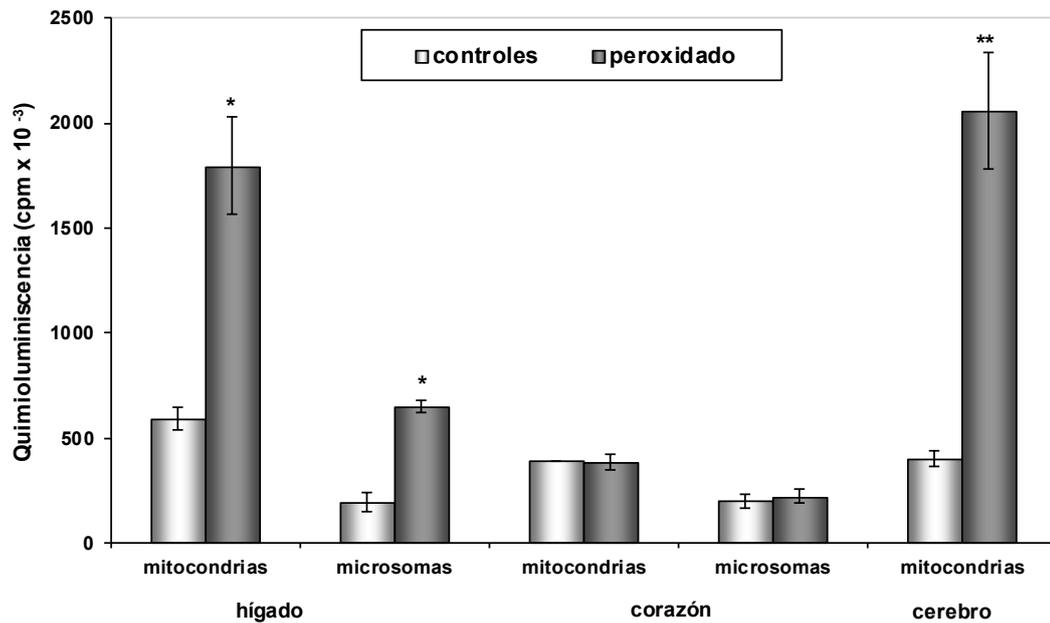


Figura V.1. Quimioluminiscencia total producida por mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro (expresada como cpm/mg de proteína). * $p < 0.001$; ** $p < 0.0001$.

V.3. DISCUSIÓN

Las aves son únicas, puesto que pueden combinar altos consumos de oxígeno con altas tasas de vida. Una situación similar está presente en primates, incluyendo los seres humanos, que muestran máximos de vida superiores a los estipulados por el consumo de oxígeno (López-Torres y col., 1993; Barja y col., 1994).

Estudios previos muestran que las mitocondrias de paloma producen menos ROS por unidad de oxígeno consumido que las mitocondrias de rata (Barja y col., 1994; Ku y Sohal, 1993).

En este estudio observamos que las mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro de *Columba livia* muestran un alto contenido de C18:1n9. Estos ácidos grasos también fueron hallados en alto porcentaje en manón, codorniz, canario y periquitos (Pamplona y col., 1999 b).

Las mitocondrias de cerebro poseen un mayor contenido de C20:4n6 y de C22:6n3 que las organelas de hígado y de corazón. Si bien entre los vertebrados hay pequeñas

diferencias en la composición de ácidos grasos del cerebro, está claro que hay un requerimiento específico y funcional de altas concentraciones de C22:6n3 (Else y Wu, 1999; Farkas y col., 2000; Turner y col., 2005).

Las organelas de hígado fueron menos afectadas por el proceso de peroxidación lipídica que las mitocondrias de cerebro lo que podría deberse a la disminución en los ácidos grasos C20:4n6 y C22:6n3 y a un aumento del C18:2n6.

Las mitocondrias y microsomas de corazón no fueron afectadas por la peroxidación lo que podría atribuirse al alto porcentaje de C18:1n9 y C18:2n6 hallado en estas organelas.

El análisis comparativo del perfil de ácidos grasos de la dieta y de las mitocondrias y microsomas de todos los órganos examinados muestra que la composición de ácidos grasos de la dieta no es la responsable de las diferencias observadas en el contenido de dobles enlaces de las organelas. Nuestros datos coinciden con estudios previos realizados en cepas de ratones y aves como canarios y cotorritas (Pamplona y col., 2002, 1999b; Miller y col., 2002; Hulbert y col., 2006) los que sostienen que la dieta tiene una influencia limitada sobre la composición de ácidos grasos. Si bien no se tiene un conocimiento acabado de los mecanismos responsables, la composición de ácidos grasos de la membrana parece ser un parámetro genéticamente regulado, específico para cada especie.

Podemos concluir diciendo que los órganos que presentaron mayores porcentajes de ácidos grasos con menor número de dobles ligaduras fueron los más resistentes al daño oxidativo.

CAPITULO VI

Peroxidación lipídica no enzimática en microsomas y mitocondrias obtenidas de hígado, corazón y cerebro de pato (Cairina moschata). Cambios observados en el perfil de ácidos grasos

VI.1. INTRODUCCIÓN

Los microsomas y mitocondrias obtenidos de varios mamíferos (Wright y col., 1979, Vladimirov y col., 1980; Catalá y col., 1994, Catalá, 2010, 2011) y diversas especies de aves (Gutiérrez y col., 2000; Pamplona y col., 1999a; Barja y col., 1994) son susceptibles a la peroxidación lipídica.

Estudios previos sugieren que las mitocondrias aviares producen menos ROS y de esta manera logran un menor daño celular (Barja y col., 1994a; Holmes y Austad 1995a, b; Hulbert y col., 2007; Lambert y col. 2007; Holmes y Martin, 2009).

En la mayoría de dichos estudios la resistencia de las membranas de las células aviares al ataque de los ROS fue evaluada por métodos *in vitro*.

Con el fin de aportar nuevos datos, examinamos en este capítulo el perfil de ácidos grasos y la peroxidación lipídica no enzimática de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro de pato (*Cairina moschata*).

VI.2. RESULTADOS

VI.2.1. Composición de ácidos grasos obtenidos de lípidos totales de mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro

El C16:0 y C18:0 fueron los ácidos grasos saturados más abundantes de las mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro.

El contenido de ácidos grasos no saturados fue de aproximadamente un 50 %, con prevalencia del C18:1n9.

En hígado y corazón el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados decrece en el siguiente orden: C20:4n6 > C18:2n6 > C 22:6n3. (TablasVI 1-6).

VI.2.2. Perfil de ácidos grasos y quimioluminiscencia de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado

La composición de ácidos grasos de los lípidos totales aislados de mitocondrias y microsomas de hígado fue diferente. La relación 18:2n6 / 20:4n6 fue 1.3 veces mayor en microsomas que en mitocondrias y la relación 20:4 n6 / 22:6 n6 fue 1 vez mayor en mitocondrias que en microsomas (Tablas VI.1 y 2).

La emisión de luz fue 4.8 y 2 veces mayor en microsomas que en mitocondrias cuando se las sometió a lipoperoxidación (Figura.VI.1). Las Tablas VI.1 y 2 muestran la composición de ácidos grasos de lípidos totales de mitocondrias y microsomas controles y peroxidados. Las organelas de hígado peroxidadas mostraron una disminución significativa de los ácidos C20:4n6, C22:6n3, UI y PI.

Tabla VI.1.: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de hígado de *Cairina moschata*

Ácido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	24.22 ± 2.94	26.25 ± 4.44	32.32 ± 1.31
C16:1n7	1.30 ± 0.49	1.43 ± 0.95	1.41 ± 0.44
C18:0	12.72 ± 1.10	17.36 ± 2.79	18.94 ± 2.39
C18:1n9	22.48 ± 2.86	21.45 ± 2.91	26.00 ± 3.32
C18:2n6	6.91 ± 1.15	6.72 ± 1.28	6.36 ± 1.48
C18:3n3	-	-	-
C20:4n6	11.75 ± 3.25	13.46 ± 1.40	8.86 ± 0.71*
C22:6n3	4.47 ± 1.02	3.92 ± 1.41	1.36 ± 0.18
SFA	36.94 ± 2.60	43.61 ± 1.75	51.26 ± 1.14
UFA	46.91 ± 2.59	46.64 ± 2.05	43.98 ± 1.72
MUFA	23.78 ± 3.06	22.55 ± 3.17	27.41 ± 3.37
PUFAs	23.12 ± 4.12	24.09 ± 2.78	16.58 ± 1.65*
S/ U	0.70 ± 0.13	0.94 ± 0.04	1.17 ± 0.06**
UI	111.43 ± 14.04	113.36 ± 11.29	83.71 ± 0.70*
PI	90.26 ± 19.29	95.51 ± 18.31	53.35 ± 2.31*

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos controles y peroxidados están indicados por *p < 0.05; **p < 0.001.

Tabla VI.2.: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de hígado de *Cairina moschata*

Ácido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	29.39 ± 0.93	29.17 ± 0.99	39.86 ± 0.95
C16:1n7	3.90 ± 0.65	1.63 ± 0.28	-
C18:0	13.82 ± 2.39	14.59 ± 2.16	14.37 ± 3.50
C18:1n9	31.27 ± 3.04	29.31 ± 4.14	32.01 ± 4.00
C18:2n6	6.45 ± 0.40	5.42 ± 0.91	3.98 ± 0.87
C18:3n3	-	0.39 ± 0.35	0.20 ± 0.06
C20:4n6	8.22 ± 2.43	9.76 ± 2.58	4.10 ± 0.61*
C22:6n3	3.27 ± 0.73	3.49 ± 1.03	0.89 ± 0.48*
SFA	43.22 ± 1.95	43.74 ± 1.16	54.23 ± 4.45
UFA	53.13 ± 1.10	50.04 ± 1.20	42.10 ± 3.18*
MUFA	35.18 ± 3.48	30.94 ± 4.33	32.66 ± 4.32
PUFAs	17.28 ± 2.79	19.09 ± 3.18	9.41 ± 1.11*
S/ U	0.81 ± 0.05	0.86 ± 0.03	1.28 ± 0.18*
UI	101.00 ± 7.80	102.86 ± 10.14	62.57 ± 2.44**
PI	70.17 ± 15.12	73.70 ± 19.62	28.91 ± 6.42*

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos controles y peroxidados están indicados por *p < 0.05; **p < 0.001.

Tabla VI.3.: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de corazón de *Cairina moschata*

Ácido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	20.58 ± 0.66	22.14 ± 1.18	28.06 ± 0.71
C16:1n7	3.05 ± 0.77	1.52 ± 0.47	2.41 ± 1.06
C18:0	11.15 ± 0.43	11.96 ± 0.58	8.15 ± 0.99
C18:1n9	28.20 ± 4.06	31.23 ± 3.00	37.45 ± 2.36
C18:2n6	15.01 ± 0.80	13.51 ± 3.06	9.71 ± 1.83
C18:3n3	0.51 ± 0.24	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.03
C20:4n6	17.39 ± 2.32	18.10 ± 0.94	5.17 ± 1.34**
C22:6n3	0.89 ± 0.07	0.83 ± 0.07	0.30 ± 0.11*
SFA	31.75 ± 0.81	34.10 ± 1.47	36.22 ± 1.70
UFA	65.07 ± 2.13	65.32 ± 5.69	55.18 ± 3.96
MUFA	31.25 ± 4.49	32.76 ± 3.61	39.87 ± 2.85
PUFAs	33.82 ± 2.61	32.56 ± 4.05	15.32 ± 2.47*
S/ U	0.48 ± 0.02	0.52 ± 0.06	0.68 ± 0.06
UI	137.72 ± 5.69	137.50 ± 11.21	82.21 ± 7.30*
PI	92.71 ± 13.70	79.04 ± 11.80	34.02 ± 5.25*

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos control y peroxidado están indicados por *p < 0.01; **p < 0.001.

Tabla VI.4.: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de corazón de *Cairina moschata*

Ácido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	29.84 ± 2.26	30.65 ± 1.75	30.21 ± 2.46
C16:1n7	4.66 ± 0.47	3.46 ± 0.23	3.41 ± 0.37
C18:0	13.52 ± 0.79	12.88 ± 0.8	8.41 ± 1.11
C18:1n9	26.71 ± 2.18	24.95 ± 0.70	24.65 ± 0.61
C18:2n6	7.76 ± 1.40	8.11 ± 1.40	8.35 ± 1.04
C18:3n3	0.95 ± 0.10	-	-
C20:4n6	13.39 ± 1.31	12.97 ± 1.59	13.89 ± 0.67
C22:6n3	1.97 ± 0.38	1.68 ± 0.40	2.37 ± 0.20
SFA	43.36 ± 1.60	43.53 ± 1.48	39.29 ± 2.52
UFA	54.79 ± 0.48	51.21 ± 2.52	52.65 ± 1.46
MUFA	30.71 ± 2.05	28.42 ± 0.47	28.07 ± 0.26
PUFAs	24.08 ± 2.27	22.79 ± 2.49	24.58 ± 1.52
S/ U	0.79 ± 0.03	0.84 ± 0.07	0.74 ± 0.05
UI	114.93 ± 3.92	106.65 ± 6.36	114.39 ± 3.69
PI	79.76 ± 3.45	74.14 ± 5.65	83.57 ± 4.81

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes

VI.2.3. Perfil de ácidos grasos y quimioluminiscencia de mitocondrias y microsomas obtenidos de corazón

La composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas de corazón fueron diferentes. La relación 18:2 n6 / 20:4 n6 fue 2 veces mayor en mitocondrias que en microsomas y la relación 20:4 n6 / 22:6 n3 fue 2.9 veces mayor en mitocondrias que en microsomas. El UI fue 1.2 veces mayor en mitocondrias que en microsomas (Tablas VI 3 y 4). La emisión de luz fue estadísticamente significativa en las mitocondrias, pero no en microsomas observándose una disminución significativa del C20:4n6 y C22:6n3 en mitocondrias peroxidadas con respecto a las controles (Figura.VI. 1 y las Tablas VI 3 y 4.)

VI.2.4. Perfil de ácidos grasos y quimioluminiscencia de mitocondrias y microsomas obtenidos de cerebro

Desde el punto de vista de la no saturación, el cerebro fue el órgano que presentó un mayor contenido de C22:6n3.

La relación 18:2 n6 / 20:4 n6 fue 18 veces mayor en microsomas que en mitocondrias y la relación 20:4n6 / 22:6n3 fue de 1.5 veces mayor en microsomas que en mitocondrias. El UI fue 1.4 veces mayor en mitocondrias que en microsomas. (Tablas VI 5 y 6). La emisión de luz fue estadísticamente significativa en mitocondrias, pero no en microsomas (Figura VI.1), observándose una disminución significativa en el contenido de C20:4n6 y C22:6n3 en las mitocondrias peroxidadas. Los microsomas no fueron afectados por el proceso de peroxidación y el perfil de ácidos grasos no fue modificado (TablasVI 5 y 6).

Tabla VI.5.: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de cerebro de *Cairina moschata*

Ácido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	21.97 ± 0.63	24.85 ± 0.32	24.69 ± 3.26
C16:1n7	1.30 ± 0.45	0.78 ± 0.30	8.53 ± 1.07***
C18:0	19.47 ± 0.31	20.42 ± 1.73	21.98 ± 0.51
C18:1n9	20.45 ± 0.50	21.78 ± 1.16	22.97 ± 1.80
C18:2n6	0.70 ± 0.36	1.80 ± 0.18	1.74 ± 0.52
C18:3n3	-	-	-
C20:4n6	9.79 ± 0.40	9.12 ± 0.45	5.86 ± 0.68**
C22:6n3	17.02 ± 0.78	14.99 ± 0.74	7.29 ± 1.47**
SFA	41.44 ± 0.92	45.27 ± 1.43	46.66 ± 3.74
UFA	49.25 ± 0.51	48.47 ± 1.76	46.39 ± 3.46
MUFA	21.75 ± 0.26	22.56 ± 1.14	31.50 ± 2.86*
PUFAs	27.51 ± 0.71	25.91 ± 0.69	14.89 ± 1.50***
S/ U	0.84 ± 0.01	0.93 ± 0.03	1.01 ± 0.01*
UI	164.41 ± 4.82	152.58 ± 5.13	102.15 ± 10.32**
PI	176.56 ± 11.22	158.76 ± 7.19	84.26 ± 16.11**

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos controles y peroxidados están indicados por *p < 0.05; **p < 0.001; ***p < 0.0001.

Tabla VI.6.: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de cerebro de *Cairina moschata*

Ácido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	34.21 ± 0.33	31.77 ± 3.29	27.08 ± 1.04
C16:1n7	4.24 ± 0.24	6.52 ± 0.27	5.28 ± 0.76
C18:0	18.33 ± 1.06	22.69 ± 2.41	22.48 ± 1.75
C18:1n9	21.30 ± 1.29	20.98 ± 1.61	23.60 ± 3.14
C18:2n6	7.93 ± 0.14	7.42 ± 1.79	5.36 ± 0.12
C18:3n3	0.46 ± 0.07	0.52 ± 0.17	0.41 ± 0.07
C20:4n6	6.44 ± 0.22	3.50 ± 0.60	2.75 ± 0.19
C22:6n3	7.76 ± 0.53	5.07 ± 0.10	5.03 ± 0.05
SFA	52.54 ± 0.85	54.46 ± 3.55	49.55 ± 1.34
UFA	48.12 ± 0.98	44.02 ± 3.15	42.43 ± 2.67
MUFA	25.54 ± 1.36	27.50 ± 1.83	28.87 ± 2.47
PUFAs	22.58 ± 0.45	16.51 ± 2.03	13.56 ± 0.39
S/ U	1.09 ± 0.04	1.24 ± 0.04	1.17 ± 0.10
UI	115.06 ± 1.49	88.35 ± 5.70	82.02 ± 3.18
PI	62.08 ± 1.17	63.52 ± 3.31	57.81 ± 1.15

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes

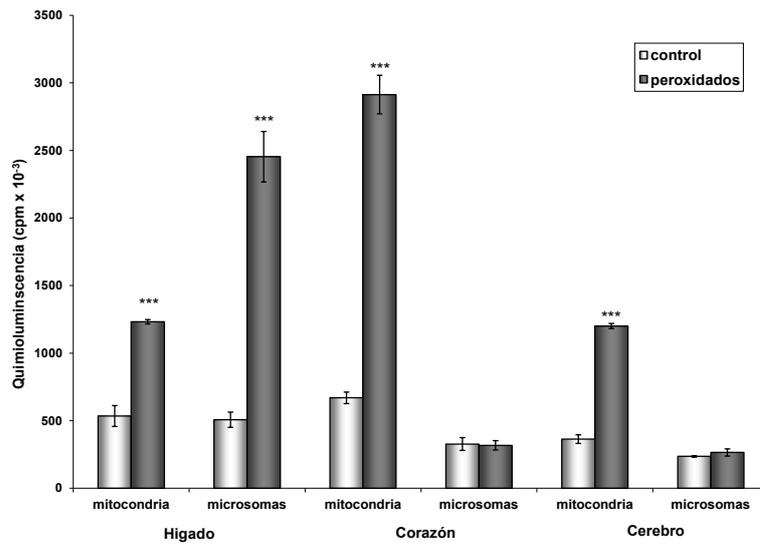


Figura VI.1. Quimioluminiscencia total producida por mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro (expresada como cpm/mg de proteína) de (*Cairina moschata*). Los datos son expresados como la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticas entre las muestras controles y peroxidadas fueron indicadas por *** $p < 0.0001$.

VI.2.5. Composición de ácidos grasos de la dieta

La Tabla VI.7 muestra que en la dieta predominan los ácidos grasos saturados de cadena larga y ácidos grasos no saturados, especialmente C18:1n9 y C18:2n6 y pequeñas cantidades de C18:3n3, no hallándose ácidos grasos poliinsaturados como C20:4n6 y C22:6n3.

Tabla VI.7: Composición de ácidos grasos de la dieta suministrada a los patos

Ácido graso	%
C16:0	14.79 ± 0.24
C16:1n7	-
C18:0	20.01 ± 0.02
C18:1n9	26.59 ± 0.56
C18:2n6	33.59 ± 0.31
C18:3n3	1.12 ± 0.06

Los datos son expresados como la media ± SD

VI.3. DISCUSIÓN

Las mitocondrias y microsomas de corazón, hígado y cerebro de *C. moschata* muestran un alto contenido de C18:1n9. Este ácido graso también se encuentra en alto porcentaje en paloma (Pamplona y col., 1996; Gutiérrez y col., 2000), canario y cotorrita australiana (Pamplona y col., 1999b). Las mitocondrias y microsomas de hígado de pato poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente C20:4n6 y C22:6n3. Ambas organelas de corazón tienen aproximadamente el mismo contenido de ácidos grasos no saturados que las organelas de paloma (Capítulo V). En ambas especies se halló un alto porcentaje de C20:4n6. Sin embargo en las organelas de palomas al igual que en los microsomas de pato se hallaron altos niveles de C18:2 y un bajo PI con respecto a las mitocondrias de pato. El perfil de ácidos grasos sería el determinante de las diferencias en la emisión de luz en estas organelas y estaría implicado en la protección observada en mitocondrias de paloma y microsomas de corazón de ambas especies, preservando de esta manera la función cardíaca.

Las mitocondrias de cerebro poseen un alto contenido de C22:6n3, que se correlaciona con una elevada producción de ROS. Los microsomas poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente C20:4n6 y C22:6n3. Sin embargo no hubo correlación entre el contenido en ácidos grasos poliinsaturados y la emisión de luz. Es

posible que la protección contra el daño oxidativo esté relacionada a las importantes funciones fisiológicas que cumplen los ácidos araquidónico y docosahexaenoico en el cerebro.

Como hemos visto en los capítulos anteriores y en investigaciones llevadas a cabo en otros laboratorios (Pamplona y col., 2002, 1999), la dieta no fue la responsable de la composición de ácidos grasos de las organelas estudiadas. Esto refuerza la idea de un control genético por parte de las células aviares contra el daño oxidativo.

CAPITULO VII

Peroxidación lipídica no enzimática en microsomas y mitocondrias obtenidas de hígado, corazón y cerebro de ganso (Anser anser). Cambios observados en el perfil de ácidos grasos

VII.1. INTRODUCCIÓN

En ensayos anteriores, se observó una estrecha relación entre la sensibilidad del tejido a la peroxidación lipídica *in vitro* y el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en mitocondrias de hígado, corazón y cerebro de pato (*Capítulo VI*).

Consecuentemente con los resultados hallados y con los objetivos planteados, en este capítulo se continuó con el estudio del perfil de ácidos grasos y la peroxidación lipídica *in vitro* en mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro de ganso (*Anser anser*), especie seleccionada por tener un mayor tamaño corporal que las otras especies anteriormente examinadas y por la facilidad de obtención.

VII.2. RESULTADOS

VII.2.1. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro de ganso.

Los ácidos grasos saturados de cadena larga presentes en las mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado, corazón y cerebro fueron principalmente C16:0 y C18:0, en un porcentaje de aproximadamente 30-40%. Las mitocondrias y microsomas de hígado y corazón contienen aproximadamente 53-64 % de ácidos grasos no saturados con un predominio de ácido oleico y ácido linoleico (C18:1n9 + C18:2n6 aproximadamente 50 %) y un bajo contenido en los ácidos araquidónico y docosahexaenoico (C20:4n6 + C22:6n3 aproximadamente 4%). (Tablas VII 1-4).

Tabla VII.1: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de hígado de ganso.

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	22.59 ± 1.37	22.49 ± 1.36	21.19 ± 0.19
C16:1n7	3.06 ± 0.27	2.68 ± 0.35	2.83 ± 0.25
C18:0	18.86 ± 0.16	16.13 ± 0.85	15.82 ± 0.56
C18:1n9	37.74 ± 1.01	37.07 ± 0.38	36.71 ± 0.33
C18:2n6	16.89 ± 0.88	17.12 ± 0.11	17.45 ± 0.40
C18:3n3	0.51 ± 0.07	0.69 ± 0.04	0.70 ± 0.06
C20:4n6	2.43 ± 0.32	2.74 ± 0.30	2.72 ± 0.10
C22:6n3	1.38 ± 0.09	1.17 ± 0.08	1.38 ± 0.32
SFA	41.45 ± 0.29	38.63 ± 1.22	37.02 ± 0.68
UFA	62.01 ± 0.53	61.47 ± 0.26	61.81 ± 0.62
MUFA	40.45 ± 0.80	39.75 ± 0.43	39.54 ± 0.30
PUFAs	21.21 ± 0.92	21.72 ± 0.18	22.26 ± 0.37
S/ U	0.67 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.60 ± 0.02
UI	94.11 ± 1.60	94.04 ± 0.33	95.75 ± 1.78

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Tabla VII.2: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de hígado de ganso.

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	19.65 ± 1.29	21.26 ± 2.26	21.11 ± 0.76
C16:1n7	2.67 ± 0.17	2.31 ± 0.11	2.38 ± 0.32
C18:0	11.75 ± 1.14	14.66 ± 0.48	15.50 ± 0.30
C18:1n9	27.03 ± 1.13	26.29 ± 1.32	25.07 ± 0.55
C18:2n6	21.42 ± 2.41	21.76 ± 1.67	21.82 ± 0.53
C18:3n3	0.34 ± 0.12	0.37 ± 0.14	0.80 ± 0.27
C20:4n6	4.43 ± 0.74	4.22 ± 0.43	3.53 ± 0.22
C22:6n3	1.19 ± 0.36	1.34 ± 0.29	1.37 ± 0.16
SFA	31.39 ± 2.21	35.92 ± 2.04	36.62 ± 0.59
UFA	57.09 ± 1.36	56.29 ± 2.55	54.97 ± 0.32
MUFA	29.70 ± 1.10	28.60 ± 1.30	27.45 ± 0.41
PUFAs	27.39 ± 2.08	27.69 ± 1.98	27.52 ± 0.09
S/ U	0.55 ± 0.03	0.64 ± 0.06	0.67 ± 0.01
UI	98.44 ± 3.12	98.15 ± 4.34	95.85 ± 1.21

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes

Tabla VII.3: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de corazón de ganso.

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	21.97 ± 2.24	32.77 ± 3.24	31.33 ± 0.69
C16:1n7	4.27 ± 0.36	4.41 ± 0.35	3.47 ± 0.96
C18:0	7.85 ± 1.62	15.27 ± 0.73	14.60 ± 0.57
C18:1n9	32.78 ± 1.94	32.64 ± 0.98	30.40 ± 1.51
C18:2n6	23.31 ± 2.41	21.49 ± 0.93	20.47 ± 0.48
C18:3n3	1.03 ± 0.18	1.06 ± 0.05	1.12 ± 0.07
C20:4n6	5.29 ± 0.99	5.03 ± 0.22	4.67 ± 0.31
C22:6n3	0.22 ± 0.08	1.21 ± 0.09	1.23 ± 0.09
SFA	29.82 ± 1.53	48.04 ± 3.97	45.93 ± 0.23
UFA	66.90 ± 2.57	65.85 ± 1.47	61.36 ± 1.59
MUFA	37.05 ± 1.78	37.05 ± 1.14	33.87 ± 0.95
PUFAs	29.85 ± 3.11	28.80 ± 0.77	27.49 ± 0.67
S/ U	0.45 ± 0.03	0.73 ± 0.05	0.75 ± 0.02
UI	109.24 ± 6.73	110.62 ± 2.23	104.23 ± 2.69

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Tabla VII.4 Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de corazón de ganso.

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	24.92 ± 1.46	28.31 ± 1.23	25.92 ± 0.95
C16:1n7	3.91 ± 0.37	3.82 ± 0.08	3.79 ± 0.18
C18:0	9.56 ± 1.02	10.59 ± 0.15	10.48 ± 0.14
C18:1n9	9.44 ± 0.63	10.46 ± 0.39	10.02 ± 0.37
C18:2n6	36.69 ± 1.73	30.71 ± 1.84	30.63 ± 2.26
C18:3n3	0.78 ± 0.03	0.98 ± 0.03	0.85 ± 0.12
C20:4n6	1.72 ± 0.04	1.48 ± 0.22	1.51 ± 0.51
C22:6n3	0.76 ± 0.07	0.77 ± 0.05	0.79 ± 0.07
SFA	34.48 ± 2.05	38.90 ± 1.08	36.41 ± 1.07
UFA	53.30 ± 2.07	48.22 ± 1.98	47.60 ± 2.80
MUFA	13.34 ± 0.42	14.28 ± 0.41	13.81 ± 0.43
PUFAs	39.95 ± 1.80	33.95 ± 1.78	33.78 ± 2.85
S/ U	0.65 ± 0.06	0.81 ± 0.06	0.77 ± 0.06
UI	100.53 ± 4.10	89.19 ± 3.67	88.42 ± 6.64

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

Si bien las organelas de cerebro mostraron porcentajes de ácidos grasos no saturados similares a los hallados en hígado y corazón, el contenido de C20:4n6 + C22:6n3 fue más alto (aproximadamente 16%). Las mitocondrias de cerebro mostraron un menor contenido de C18:1n9 + C18:2n6 (40 %) que los microsomas (45 %). (Tablas VII.5 y 6).

Tabla VII.5: Composición porcentual de ácidos grasos de mitocondrias de cerebro de ganso.

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	23.50 ± 0.79	20.61 ± 0.57	26.43 ± 1.01
C16:1n7	3.22 ± 0.17	2.41 ± 0.22	2.55 ± 0.60
C18:0	19.52 ± 0.72	18.19 ± 0.48	19.80 ± 1.04
C18:1n9	14.94 ± 1.33	13.79 ± 1.16	15.52 ± 0.25
C18:2n6	24.82 ± 0.53	31.53 ± 0.89	30.03 ± 0.21
C18:3n3	0.19 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.27 ± 0.01
C20:4n6	6.47 ± 0.30	6.65 ± 0.20	0.75 ± 0.08**
C22:6n3	10.73 ± 0.36	8.37 ± 0.08	2.15 ± 0.12**
SFA	43.02 ± 0.13	38.81 ± 0.26	46.03 ± 1.47*
UFA	60.37 ± 2.33	63.05 ± 0.21	51.27 ± 0.89**
MUFA	18.15 ± 1.50	16.20 ± 1.01	18.07 ± 0.73
PUFAs	42.21 ± 1.05	46.85 ± 0.93	33.20 ± 0.26**
S/ U	0.71 ± 0.03	0.62 ± 0.00	0.90 ± 0.03**
UI	158.64 ± 5.12	157.00 ± 1.21	94.86 ± 1.38**

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos controles y peroxidados están indicados por *p < 0.01; ** p < 0.001.

Tabla VII. 6: Composición porcentual de ácidos grasos de microsomas de cerebro de ganso.

Acido graso	Nativo	Control	Peroxidado
C16:0	20.60 ± 1.07	20.57 ± 1.60	23.09 ± 1.11
C16:1n7	2.76 ± 0.49	3.21 ± 0.62	3.55 ± 0.12
C18:0	12.89 ± 0.55	14.42 ± 0.85	12.56 ± 0.50
C18:1n9	13.91 ± 1.33	13.23 ± 1.49	12.97 ± 2.36
C18:2n6	31.24 ± 1.90	32.20 ± 0.65	34.15 ± 0.47
C18:3n3	0.28 ± 0.06	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.03
C20:4n6	3.97 ± 0.65	4.24 ± 0.16	4.39 ± 0.35
C22:6n3	10.68 ± 1.88	10.73 ± 0.45	10.37 ± 1.06
SFA	33.49 ± 0.95	34.99 ± 2.44	33.65 ± 0.79
UFA	62.84 ± 2.14	63.89 ± 2.12	65.71 ± 2.84
MUFA	16.66 ± 1.01	16.44 ± 1.82	16.52 ± 2.40
PUFAs	46.18 ± 3.12	47.45 ± 0.44	49.19 ± 1.57
S/ U	0.53 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.54 ± 0.03
UI	159.95 ± 12.16	163.03 ± 4.09	165.45 ± 7.85

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes.

VII.2.2. Comparación de la composición de ácidos grasos de las organelas con la dieta

La organelas de hígado, cerebro y corazón de ganso presentaron un contenido de C18:2n6 aproximadamente 2 veces menor que la dieta (Tabla VII.7). El porcentaje de C18:3n3 que exhibieron las organelas de hígado y corazón fue aproximadamente 2 veces menor que la dieta. Una diferencia aún mayor fue observada en las organelas de cerebro, que presentaron un contenido de C18:3n3 aproximadamente 5 veces menor que la dieta.

Tabla VII.7. Composición de ácidos grasos de la dieta suministrada a los gansos

Acido graso	%
C16:0	14.79 ± 0.45
C16:1n7	-
C18:0	2.01 ± 0.12
C18:1n9	26.59 ± 0.86
C18:2n6	53.59 ± 1.01
C18:3n3	1.12 ± 0.01

Los datos son expresados como la media ± SD de tres experimentos independientes.

El C22:6n3 no está presente en la dieta, se ha sintetizado de su precursor dietario, C18:3n3. Esta síntesis ocurre a través de una serie de elongaciones y desaturaciones a partir del C18:3n3, globalmente estimado por la relación 22:6n3/18:3n3 que fue significativamente superior en mitocondrias y microsomas de cerebro (Tablas VII 5 y 6) que en las organelas de hígado (Tablas VII 1 y 2) y corazón (Tablas VII 3 y 4).

VII.2.3. Perfil de ácidos grasos y quimioluminiscencia obtenida de mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro de ganso

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la emisión de luz entre las muestras control y peroxidadas cuando se utilizaron organelas de hígado y corazón (Figura VII.1). Tampoco se observaron cambios en el perfil de ácidos grasos ni en el UI (Tablas VII.1-4; Figura VII.2).

Las tablas VII.5 y 6 muestran la composición de ácidos grasos de los lípidos totales obtenidos de organelas nativas, controles y peroxidadas de cerebro. En las mismas se observó que la composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas nativos de cerebro fue diferente. La relación 18:2n6/20:4 n6 fue 1.7 veces menor en mitocondrias que en microsomas y la relación 20:4 n6/22:6 n3 fue 1.6 veces mayor en mitocondrias que en microsomas. Cuando se compararon las muestras controles y peroxidadas de ambas organelas se observó que la emisión de luz fue estadísticamente significativa en

mitocondrias pero no en microsomas (Figura VII.1). Las mitocondrias de las muestras peroxidadas mostraron una disminución significativa de C20:4n6, C22:6n3 y del UI con respecto a los controles (Figura VII.2). En cambio, en los microsomas, no se observó diferencia significativa en la emisión lumínica ni en el perfil de ácidos grasos.

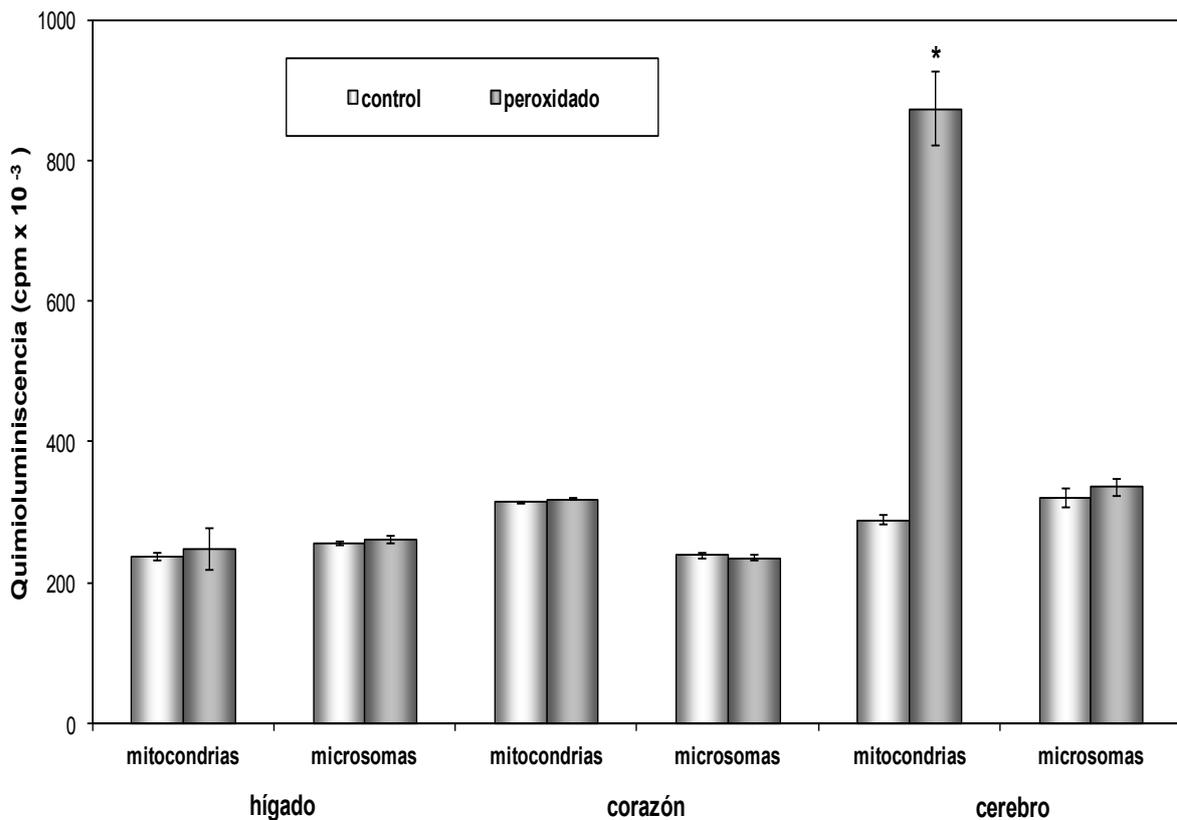


Figura VII.1: Quimioluminiscencia en función del tiempo durante la peroxidación lipídica no enzimática ascorbato-Fe⁺⁺ en mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro ◊ controles (sin ácido ascórbico) ■ peroxidados (con ácido ascórbico). Las diferencias significantivas entre los grupos controles y peroxidados están indicados por * p < 0.0001.

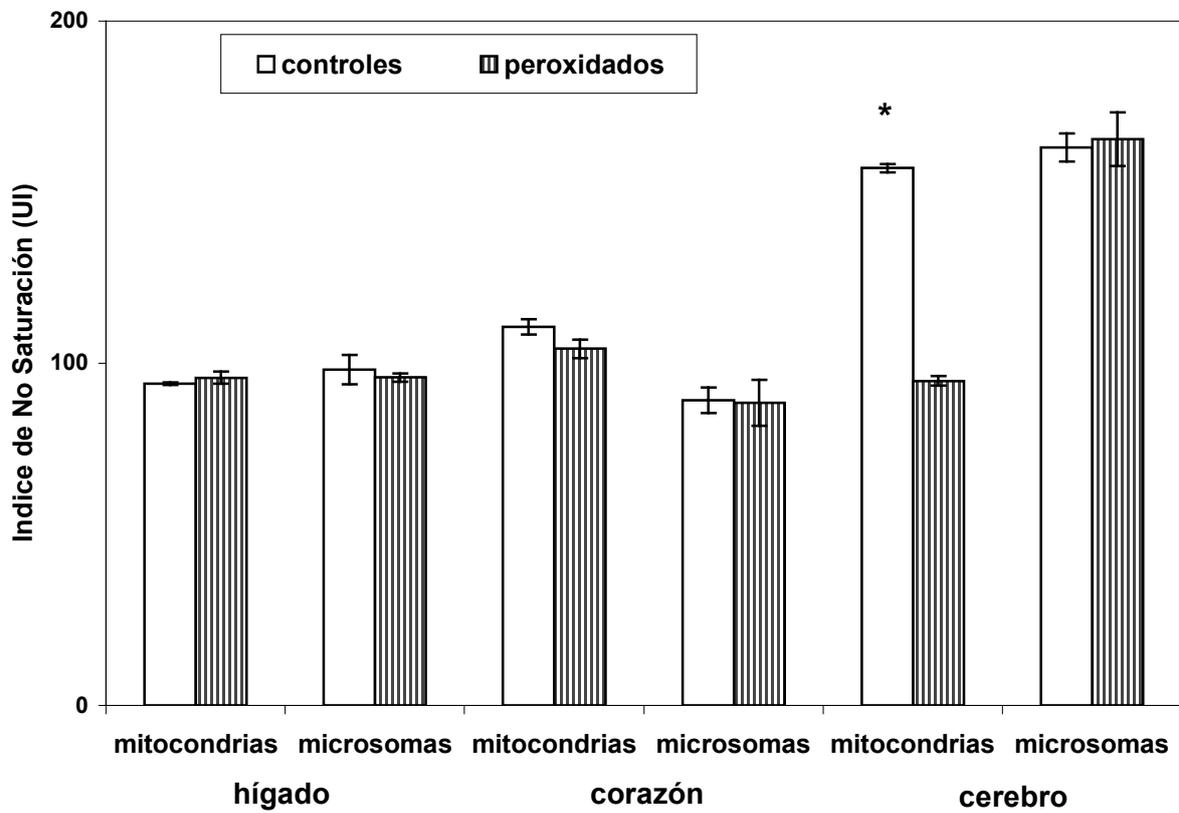


Figura VII.2. Índice de no saturación de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas de hígado, corazón y cerebro de ganso (*A. anser*). Los datos son expresados como la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre los grupos controles y peroxidados están indicados por * $p < 0.001$.

VII.3. DISCUSIÓN

En este estudio mostramos que el total de ácidos grasos no saturados alcanzó valores entre 55-65 % en todos los tejidos examinados, pero la contribución de cada ácido graso fue diferente. Las mitocondrias y microsomas de cerebro poseen un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente C20:4n6 y C22:6n3 y un menor contenido de C18:1n9 o C18:2n6, que las organelas de hígado y corazón. Esta distribución en el tejido analizado fue similar a lo observado en otros laboratorios (Pamplona y col., 1996) y a lo hallado en las aves estudiadas en los Capítulos III, IV, V y VI. El ácido docosaheptaenoico y el araquidónico se sintetizan de sus precursores dietéticos C18:3n3 y C18:2n6 respectivamente (Nakamura y Nara, 2003) y su contenido fue diferente en los tejidos estudiados. Las mitocondrias y microsomas de hígado y corazón exhibieron una menor relación 22:6n3/18:3n3, y las organelas de cerebro, en cambio, mostraron una mayor proporción de 22:6 n3/18:3n3. Estos resultados indican que el nivel de ácidos grasos no saturados está homeostáticamente regulado en los tejidos (Maresca y Cossins, 1993). El control de los ácidos grasos no saturados de las membranas se ha atribuido a una retroalimentación negativa de la transcripción de genes de las desaturasas dependiente de la composición de lípidos (Maresca y Cossins, 1993; Vigh y col., 1993) y a la modulación de desaturasas por el metabolismo hormonal (Guéraud y París, 1997).

Las organelas del ganso exhiben un bajo grado de no saturación coincidente con los resultados de Pamplona y col. (1999a). Estos autores también han demostrado que diferentes especies de aves exhiben un bajo grado de no saturación a pesar de las diferencias en la composición de la dieta. Teniendo en cuenta esta observación nosotros consideramos que el bajo contenido de dobles ligaduras observado en las organelas de ganso sería independiente de la dieta.

El alto contenido de C20:4n6 y C22:6n3 de mitocondrias de cerebro de ganso está en relación con la vulnerabilidad a la peroxidación lipídica observada en esta organela, mostrando altos valores de emisión lumínica comparados con el tejido control. Sin embargo, aunque los microsomas de cerebro poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados ellos fueron resistentes a la peroxidación lipídica. Lo interesante de esto es que los microsomas de cerebro presentaron un aumento en el contenido de C18:2n6,

paralelamente con una disminución del ácido graso C20:4n6 cuando se los comparó con las mitocondrias de cerebro. Estas diferencias y otro/s factor/es pueden estar involucrados en la sensibilidad disminuida a la peroxidación lipídica mostrada por los microsomas de cerebro de ganso. Esto también fue observado en los microsomas de cerebro de las aves estudiadas en los capítulos anteriores.

Las organelas de hígado y corazón de *A anser* fueron menos sensibles a la peroxidación lipídica que las de cerebro, mostrando el mismo perfil de ácidos grasos no saturados que los controles. La emisión de luz en estas organelas no mostró cambios significativos y presentaron un bajo contenido de ácidos grasos altamente no saturados y alto contenido de C18:2n6. Estos serían algunos de los factores que contribuyen a la protección de estas organelas contra el estrés oxidativo. Otro factor, que también podría contribuir a la protección, sería la presencia de plasmalógenos, que según trabajos recientes pueden actuar como antioxidantes (Jimenez y col., 2014; Hulbert y col., 2014).

La conclusión principal de este Capítulo es que un bajo grado de no saturación observado en mitocondrias de hígado y corazón con respecto a las mitocondrias de cerebro, protegen a estos tejidos contra la lipoperoxidación.

CAPITULO VIII

Relación entre la composición de ácidos grasos, la lipoperoxidación, el máximo de vida y el tamaño corporal en mitocondrias y microsomas de hígado de aves de diferentes especies

VIII.1. INTRODUCCIÓN

La composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana, influye en la permeabilidad y en las actividades de muchas moléculas enzimáticas integradas a la misma (Brenner, 1984; Hoch, 1992). Dicha composición parece estar bajo control genético, también determinada por factores ambientales (dieta y temperatura) y hormonales.

La intensidad del metabolismo de los mamíferos varía de manera alométrica con el tamaño corporal (Kleiber, 1961; Holidays y col. 1967; Couture y Hulbert, 1995), teniendo los mamíferos pequeños un ritmo metabólico mayor.

La producción de ROS es mayor en los organismos con elevadas tasas metabólicas (Beckman y Ames 1998) y esto está relacionado con el máximo de vida. Sin embargo muchas especies de aves, a pesar de poseer tasas metabólicas elevadas, son longevas.

Muchas especies de aves son longevas a pesar de poseer tasas metabólicas elevadas. Esto ha sido atribuido a que las aves producen menor cantidad de ROS ó poseen mejores defensas celulares contra el daño oxidativo comparadas con los mamíferos (Holmes y Austad, 1995a, b; Barja, 1998; Hulbert y col., 2007).

En este Capítulo examinamos la relación entre el tamaño corporal y la composición de ácidos grasos, el máximo de vida y la sensibilidad a la peroxidación lipídica en mitocondrias y microsomas aisladas de hígado de manón, codorniz, paloma, pato y ganso.

VIII.2. RESULTADOS

VIII.2.1. Relación entre la masa hepática y la masa corporal de las aves.

El peso del cuerpo y del hígado de las aves analizadas en este estudio se muestra en la Tabla VIII.1. El porcentaje relativo del hígado (peso del hígado/masa corporal) muestra cambios importantes desde el ave más pequeña (manón) a la más grande (ganso), con valores que oscilan entre 8.26 y 2.57 g respectivamente, lo que representa un rango de 3.22 veces en lo que se refiere al tamaño del hígado. La Figura VIII.1 indica que el porcentaje relativo del hígado de las aves disminuye a medida que aumenta el tamaño corporal.

Tabla VIII.1. Peso del cuerpo y del hígado de las aves estudiadas

Nombre vulgar	Nombre científico	Máx.de vida (años)	Peso corporal (g)	Peso del hígado (g)	Porcentaje relativo
Manon	<i>Lonchura striata</i>	9	13.55 ± 0.50	1.12 ± 0.16	8.26
Codorniz	<i>Coturnix coturnix</i>	6	142.88 ± 15.20	4.74 ± 0.68	3.32
Paloma	<i>Columba livia</i>	35	347.50 ± 3.50	8.87 ± 1.86	2.55
Pato	<i>Cairina moschata</i>	21	2200.00 ± 2.80	42.23 ± 5.25	1.92
Ganso	<i>Anser anser</i>	35	5040.00 ± 1.90	129.49 ± 34.06	2.57

Los datos son expresados como la media ± SD

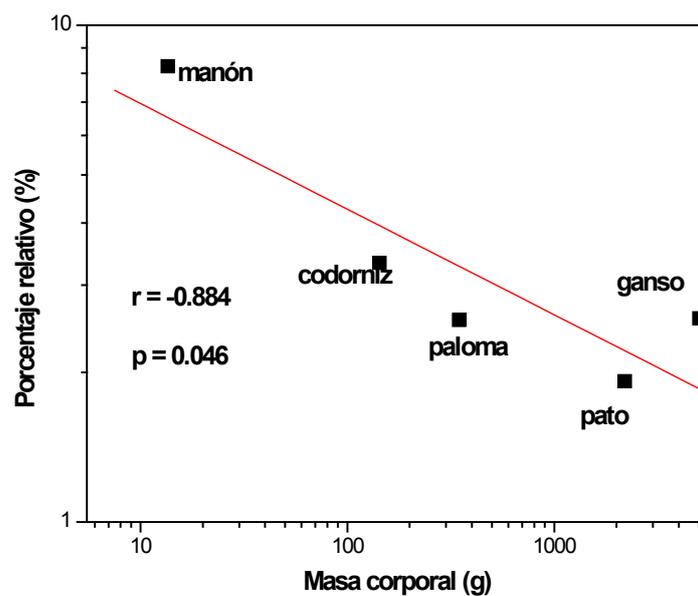


Figura VIII.1. Relación alométrica entre la masa corporal y porcentaje relativo del peso del hígado hallado en las diferentes especies de aves. Los datos fueron analizados a través de la ecuación de regresión lineal: $y = 1.05 - 0.21 x$

VIII.2.2. Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas de hígado.

Los principales ácidos grasos saturados de cadena larga de las mitocondrias y microsomas de hígado de las aves estudiadas fueron el C16:0 y el C18:0. En ambas organelas el ácido graso no saturado predominante fue el C18:1n9. Los ácidos grasos poliinsaturados de mitocondrias y microsomas decrecen en el siguiente orden C18:2n6 > C20:4n6 > 22:6n3 a excepción de *Cairina moschata* que presenta el siguiente orden: C20:4n6 > C18:2n6 > 22:6n3 (Tablas VIII 2 y 3).

Los valores de UI de ambas organelas en las especies de aves estudiadas fueron similares.

Tabla VIII.2. Composición de ácidos grasos de mitocondrias de hígado de diferentes especies de aves

Ácidos grasos	manón		codorniz		paloma		pato		ganso	
	control	peroxidado	control	peroxidado	control	peroxidado	control	peroxidado	control	peroxidado
C16:0	24.96 ± 0.62	26.07 ± 0.21	32.70 ± 1.18	31.09 ± 2.46	16.04 ± 1.50	17.31 ± 2.29	26.25 ± 4.44	32.32 ± 1.31	22.49 ± 1.36	21.19 ± 0.19
C16:1 n7	1.60 ± 0.04	1.49 ± 0.31	5.29 ± 0.32	5.38 ± 1.04	3.44 ± 0.64	4.52 ± 1.03	1.43 ± 0.95	1.41 ± 0.44	2.68 ± 0.35	2.83 ± 0.25
C18:0	29.95 ± 2.18	29.68 ± 0.95	17.02 ± 0.68	16.86 ± 1.30	15.90 ± 3.16	13.33 ± 1.68	17.36 ± 2.79	18.94 ± 2.39	16.13 ± 0.85	15.82 ± 0.56
C18:1 n9	22.32 ± 1.49	21.46 ± 1.33	29.84 ± 2.61	30.81 ± 2.03	23.22 ± 3.83	29.13 ± 6.40	21.45 ± 2.91	26.00 ± 3.32	37.07 ± 0.38	36.71 ± 0.33
C18:2 n6	7.26 ± 0.26	7.73 ± 1.34	10.51 ± 2.37	8.32 ± 1.08	26.08 ± 3.19	9.61 ± 1.32**	6.72 ± 1.28	6.36 ± 1.48	17.12 ± 0.11	17.45 ± 0.40
C18:3 n3	0.30 ± 0.03	0.35 ± 0.02	-	-	0.38 ± 0.21	1.40 ± 0.91	-	-	0.69 ± 0.04	0.70 ± 0.06
C20:4 n6	7.02 ± 0.63	4.23 ± 0.14**	4.65 ± 0.37	4.12 ± 0.08	7.05 ± 1.85	0.90 ± 0.35**	13.46 ± 1.40	8.86 ± 0.71*	2.74 ± 0.30	2.72 ± 0.10
C22:6 n3	3.32 ± 0.21	2.27 ± 0.09**	-	-	2.37 ± 0.31	-	3.92 ± 1.41	1.36 ± 0.18*	1.17 ± 0.08	1.38 ± 0.32
SFA	54.91 ± 1.57	55.75 ± 1.09	49.72 ± 0.68	47.96 ± 3.56	31.44 ± 3.40	30.63 ± 3.95	43.61 ± 1.75	51.26 ± 1.18	38.63 ± 1.22	37.02 ± 0.68
MUFA	23.92 ± 1.46	22.95 ± 1.26	35.13 ± 2.74	36.19 ± 3.02	25.82 ± 5.29	33.65 ± 7.28	22.55 ± 3.17	27.41 ± 3.37	39.75 ± 0.43	39.54 ± 0.30
PUFAs	17.90 ± 0.93	14.59 ± 1.41*	15.16 ± 2.18	12.44 ± 1.00	35.62 ± 3.85	11.91 ± 0.74	24.09 ± 2.78	16.58 ± 1.65*	21.72 ± 0.18	22.26 ± 0.37
UFA	41.82 ± 1.81	37.54 ± 0.62*	50.29 ± 3.15	48.63 ± 3.85	61.42 ± 5.13	45.55 ± 7.36	46.64 ± 2.05	43.98 ± 1.72	61.47 ± 0.26	61.81 ± 0.62
UI	87.36 ± 3.72	70.02 ± 1.97**	74.75 ± 4.85	69.31 ± 4.62	119.34 ± 10.58	60.75 ± 7.81**	113.36 ± 11.29	83.71 ± 0.70*	94.04 ± 0.33	95.75 ± 1.78
PI	63.12 ± 5.06	44.30 ± 0.19**	30.00 ± 2.00	25.70 ± 0.83	74.67 ± 1.37	16.31 ± 2.02**	95.51 ± 18.31	53.35 ± 2.61*	38.73 ± 6.21	41.42 ± 5.26

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre el grupo control y peroxidado están indicadas por *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Tabla VIII.3. Composición de ácidos grasos de microsomas de hígado de diferentes especies de aves

Ácidos grasos	manon		codorniz		paloma		pato		ganso	
	control	peroxidado	control	peroxidado	control	peroxidado	control	peroxidado	control	peroxidado
C16:0	33.92 ± 3.50	38.25 ± 1.52	32.60 ± 3.36	31.88 ± 2.89	17.12 ± 2.73	23.81 ± 1.75	29.17 ± 0.99	39.86 ± 0.95	21.26 ± 2.26	21.11 ± 0.76
C16:1 n7	3.56 ± 0.28	2.78 ± 0.48	3.39 ± 0.47	3.04 ± 0.17	5.96 ± 2.63	4.70 ± 1.45	1.63 ± 0.28	-	2.31 ± 0.11	2.38 ± 0.32
C18:0	27.23 ± 4.02	24.94 ± 4.13	16.12 ± 1.80	17.62 ± 2.34	14.65 ± 3.27	18.05 ± 2.45	14.59 ± 2.16	14.37 ± 3.50	14.66 ± 0.48	15.50 ± 0.30
C18:1 n9	23.36 ± 2.83	24.65 ± 1.73	29.21 ± 2.74	30.51 ± 1.84	32.72 ± 6.46	33.43 ± 6.22	29.31 ± 4.14	32.01 ± 4.00	26.29 ± 1.32	25.07 ± 0.55
C18:2 n6	5.41 ± 0.31	5.19 ± 0.18	9.37 ± 1.70	8.54 ± 1.19	22.14 ± 7.08	15.26 ± 3.02*	5.42 ± 0.91	3.98 ± 0.87	21.76 ± 1.67	21.82 ± 0.53
C18:3 n3	1.30 ± 0.10	0.96 ± 0.17	-	-	-	-	0.39 ± 0.35	0.20 ± 0.06	0.37 ± 0.14	0.80 ± 0.27
C20:4 n6	4.48 ± 0.21	1.12 ± 0.45**	3.82 ± 0.17	3.70 ± 0.17	3.75 ± 1.32	1.25 ± 0.59*	9.76 ± 2.58	4.10 ± 0.61*	4.22 ± 0.43	3.53 ± 0.22
C22:6 n3	4.36 ± 0.28	1.38 ± 0.06***	0.86 ± 0.11	0.72 ± 0.13	-	-	3.49 ± 1.03	0.89 ± 0.48*	1.34 ± 0.29	1.37 ± 0.16
SFA	61.15 ± 7.37	63.19 ± 3.32	48.72 ± 4.42	49.50 ± 4.41	31.77 ± 3.43	41.86 ± 3.47	43.74 ± 1.16	54.23 ± 4.45	35.92 ± 2.04	36.62 ± 0.59
MUFA	26.92 ± 2.91	27.44 ± 2.06	32.60 ± 2.61	33.54 ± 1.81	36.69 ± 9.89	38.14 ± 0.89	30.94 ± 4.33	32.66 ± 4.32	28.60 ± 1.30	27.45 ± 0.41
PUFAS	15.55 ± 0.55	8.65 ± 0.68**	14.05 ± 1.77	12.96 ± 0.99	23.89 ± 8.35	13.19 ± 5.64	19.09 ± 3.18	9.41 ± 1.11*	27.69 ± 1.98	27.52 ± 0.09
UFA	42.47 ± 2.36	36.09 ± 2.73**	46.65 ± 4.02	46.50 ± 2.73	62.59 ± 1.76	51.33 ± 4.55	50.04 ± 1.20	42.10 ± 3.18*	56.29 ± 2.55	54.97 ± 0.32
UI	85.73 ± 0.64	53.44 ± 4.21***	71.75 ± 5.63	69.72 ± 3.43	95.98 ± 9.41	65.70 ± 7.84*	102.86 ± 10.14	62.57 ± 2.44**	98.15 ± 4.34	95.85 ± 1.21
PI	61.97 ± 2.77	23.21 ± 1.58***	32.30 ± 1.82	28.41 ± 2.19	44.07 ± 6.02	21.21 ± 3.82*	73.70 ± 19.62	28.91 ± 6.42*	50.83 ± 3.25	49.29 ± 2.35

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre el grupo control y peroxidado están indicadas por * p<0.05, ** p<0.01 *** p<0.001

VIII.2.3. Relación entre la masa corporal y la composición de ácidos grasos

Los ácidos grasos presentes en las organelas de hígado de las diferentes especies de aves analizadas muestran una diferencia alométrica significativa. En mitocondrias, los ácidos grasos C18:1n9, C18:2n6 y C18:3n3 incrementaron alométricamente ($r = 0.91$, $r = 0.95$, $r = 0.99$, Figura. VIII. 2 a, b y c). El porcentaje de ácidos grasos saturados fue significativamente menor en las aves de mayor tamaño ($r = -0.91$). El contenido de los ácidos grasos monoinsaturados ($r = 0.89$) y el total de no saturados ($r = 0.87$) aumentó significativamente en las aves de mayor tamaño (Tabla VIII. 4 y Figura VIII. 3 a, b y c.). En microsomas de hígado el contenido de C16:1n7 ($r = -0.88$) y C18:3n3 ($r = -0.99$) fue significativamente menor en las aves de gran tamaño (Figura VIII. 4 a y b). En cambio, el C18:2n6 ($r = 0.89$) y los poliinsaturados ($r = 0.92$) mostraron un aumento significativo en las aves de mayor tamaño (Tabla VIII. 4; Figura VIII. 4 c y d). El UI y el PI de las organelas de hígado no mostraron relaciones significativas con la masa corporal (Tabla VIII. 4).

Tabla VIII.4. Correlaciones entre la masa corporal y la composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas de hígado de las aves estudiadas

Ácidos grasos	Mitocondrias		Microsomas	
	r	P	r	P
C16:0	0.29	0.64	0.37	0.53
C16:1 n7	0.74	0.15	-0.88	0.05
C18:0	-0.72	0.17	-0.85	0.06
C18:1 n9	0.91	0.03	0.07	0.90
C18:2 n6	0.95	0.01	0.89	0.04
C18:3 n3	0.99	0.03	-0.99	0.01
C20:4 n6	-0.12	0.84	-0.22	0.72
C22:6 n3	-0.90	0.28	-0.72	0.28
SFA	-0.91	0.03	-0.57	0.31
MUFA	0.89	0.04	0.21	0.73
PUFAs	0.48	0.40	0.92	0.02
UFA	0.87	0.05	0.11	0.85
UI	0.44	0.46	0.72	0.17
PI	0.28	0.65	0.06	0.92

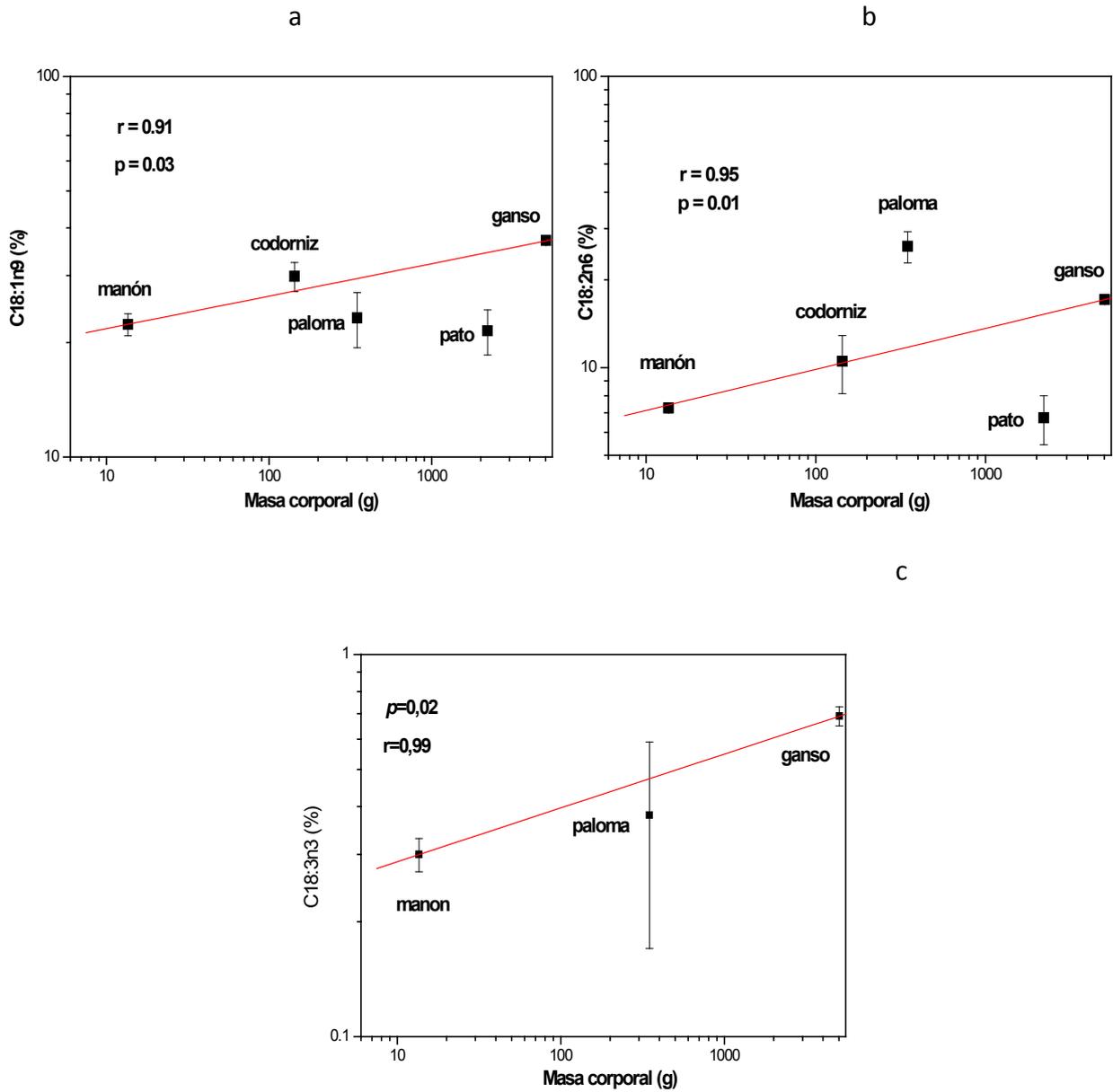


Figura VIII.2. Relación alométrica entre la masa corporal y el porcentaje de ácidos grasos de mitocondrias de hígado de las diferentes especies de aves. a: C18:1 n9; b: C18:2 n6 y c: C18:3 n3. Los datos fueron analizados a través de las siguientes ecuaciones: $y = 1.25 + 0.85 x$; $y = 0.71 + 0.14 x$; $y = -0.68 + 0.14 x$.

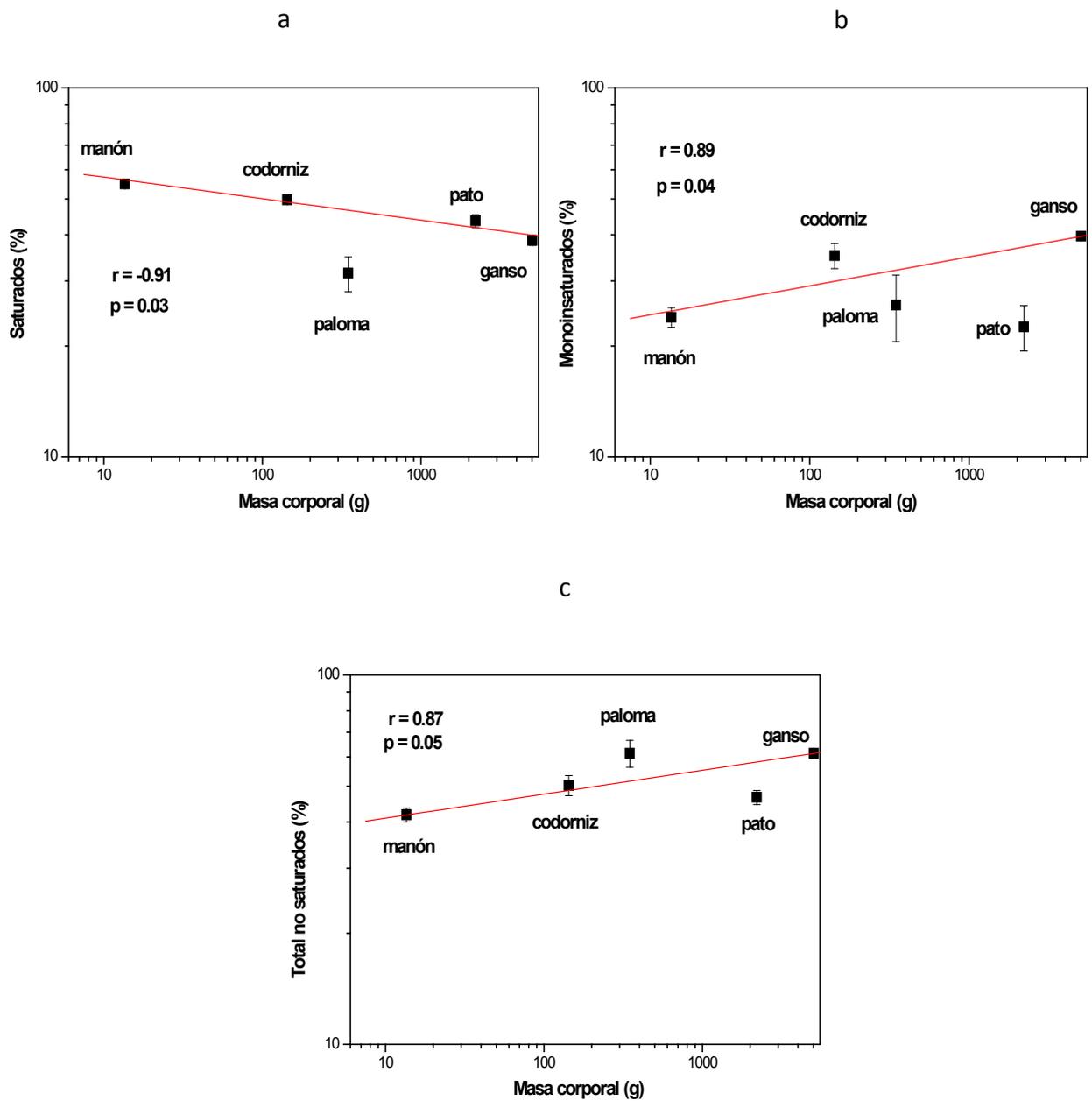


Figura VIII.3. Relación alométrica entre la masa corporal y el porcentaje de ácidos grasos de las mitocondrias de hígado de las diferentes especies de aves. a: saturados; b: monoinsaturados y c: total no saturados. Los datos fueron analizados a través de ecuaciones de regresión lineal $y = 1.81 - 0.06 x$; $y = 1.31 + 0.08 x$; $y = 1.5 + 0.06 x$.

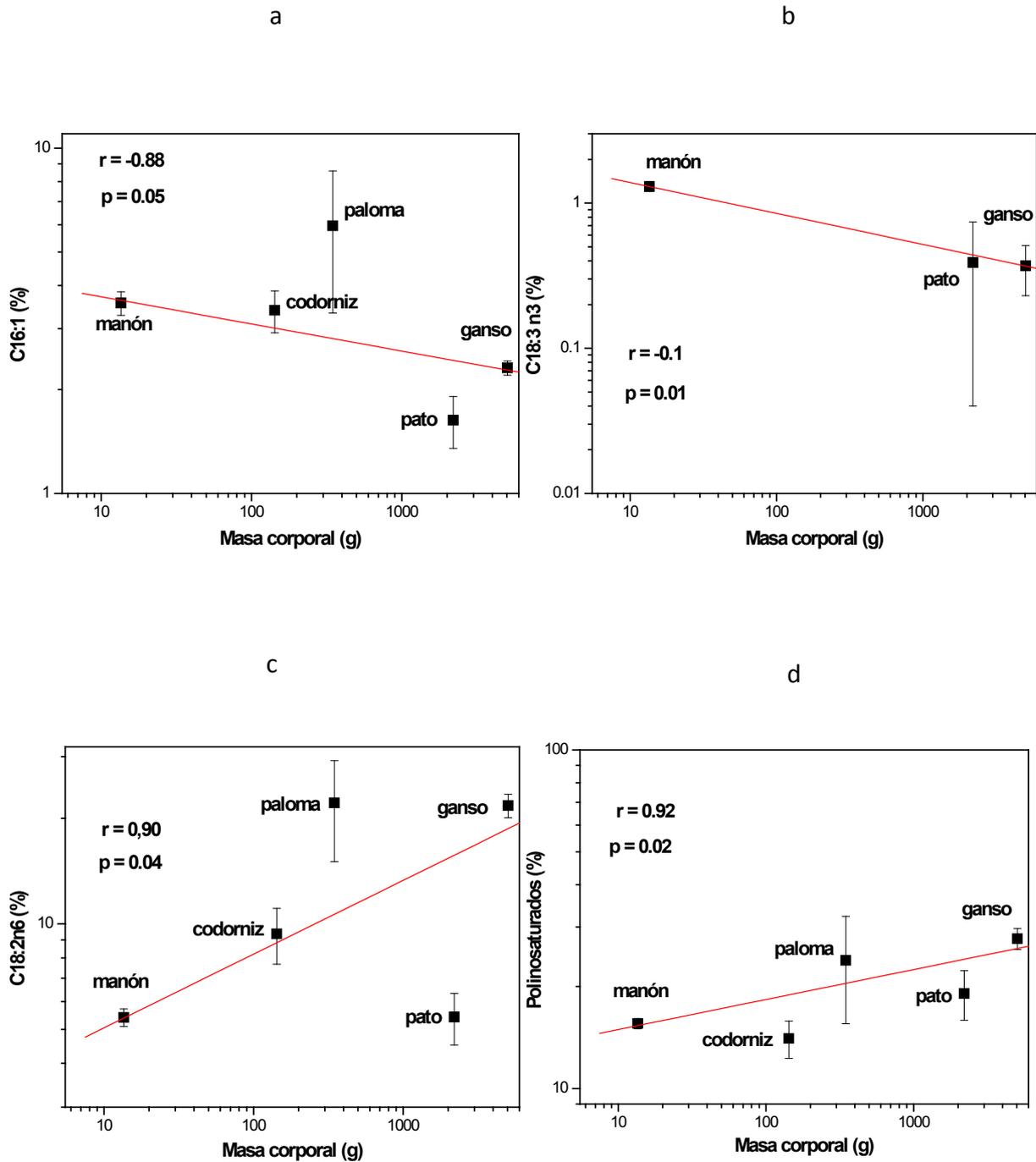


Figura VIII.4. Relación alométrica entre la masa corporal y el porcentaje de ácidos grasos de microsomas de hígado de las diferentes especies de aves. a: C16:1; b: C18:3 n3; c: C18:2n6 y d: Polinsaturados. Los datos fueron analizados a través de las siguientes ecuaciones de regresión lineal $y = 0.65 - 0.08x$; $y = 0.35 - 0.25x$; $y = 0.49 + 0.21x$; $y = 1.08 + 0.88x$

VIII.2.4. Relación entre el máximo de vida y la composición de ácidos grasos

Tanto en mitocondrias ($r = 0.99$) como en microsomas ($r = 0.90$) el contenido de C18:2n6 aumentó en las aves con mayor longevidad (Figura VIII.5 a y b).

En los microsomas de las aves de mayor tamaño, el ácido graso C18:3n3 ($r = -0.99$) disminuyó alométricamente mientras que el UI ($r = 0.89$) mostró un aumento significativo (Figura VIII. 6 a y b). No se halló una correlación significativa entre el PI y el máximo de vida en mitocondrias y microsomas de hígado (Tabla VIII. 5).

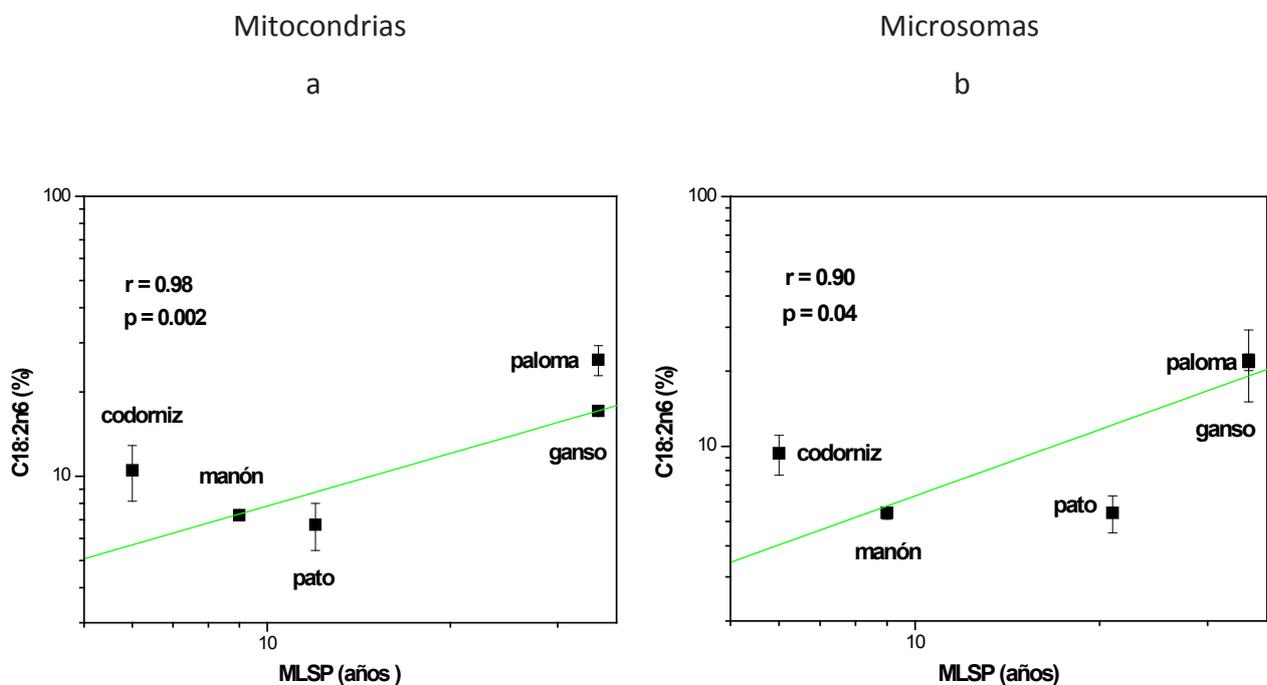


Figura VIII.5. Relación alométrica entre máximo de vida (MLSP) y porcentaje de ácido linoleico de mitocondrias y microsomas de hígado de las diferentes especies de aves estudiadas. a: mitocondrias y b: microsomas. Los datos fueron analizados a través de ecuaciones de regresión lineal $y = 0.27 + 0.62x$; $y = -0.08 - 0.88x$.

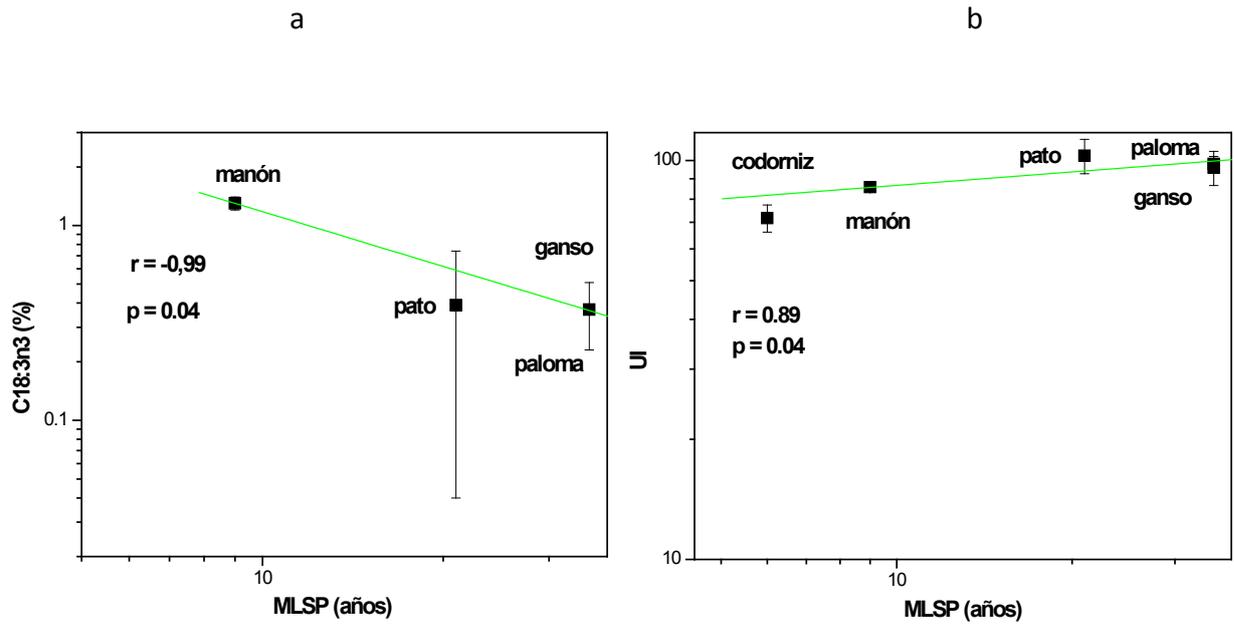


Figura VIII.6. Relación alométrica entre máximo de vida (MLSP) y porcentaje del ácido linolénico y del índice de no saturación (UI) de microsomas de hígado de las diferentes especies de aves. a: C18:3n3 y b: UI. Los datos fueron analizados a través de ecuaciones de regresión lineal $y = 1.00 - 0.93 x$; $y = -1.82 + 0.11 x$.

Tabla VIII.5. Resumen de las correlaciones entre el máximo de vida y la composición de ácidos grasos (área %) e índices de los ácidos grasos de mitocondrias y microsomas de hígado de las especies de aves estudiadas

Ácidos graso	Mitocondrias		Microsomas	
	r	P	r	P
C16:0	-0.79	0.11	-0.72	0.17
C16:1n7	-0.26	0.67	-0.82	0.09
C18:0	-0.23	0.71	-0.62	0.28
C18:1n9	0.85	0.07	-0.16	0.79
C18:2n6	0.98	0.002	0.90	0.04
C18:3n3	0.99	0.07	-0.99	0.04
C20:4n6	-0.01	0.99	0.43	0.47
C22:6n3	0.46	0.69	-0.11	0.88
SFA	-0.82	0.08	-0.82	0.08
MUFA	0.79	0.11	-0.51	0.37
PUFAs	0.66	0.22	0.99	0.001
UFA	0.94	0.01	0.89	0.04
UI	0.66	0.22	0.89	0.04
PI	0.85	0.06	0.30	0.61

VIII.2.5. Comparación entre el efecto de la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas de hígado con el tamaño corporal y el máximo de vida

La quimioluminiscencia fue estadísticamente significativa en mitocondrias y microsomas de manón, paloma y pato. Cuando se compararon las mitocondrias controles y peroxidadas se observó una disminución significativa del C20:4n6 and C22:6n3. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la emisión de luz entre las muestras control y peroxidadas cuando se utilizaron organelas de hígado de la codorniz y del ganso. El perfil de ácidos grasos, UI y PI de mitocondrias y microsomas de hígado no fue alterado por el proceso de peroxidación (Tablas VIII. 2 y 3, Figura VIII. 8, 9 10 y 11)

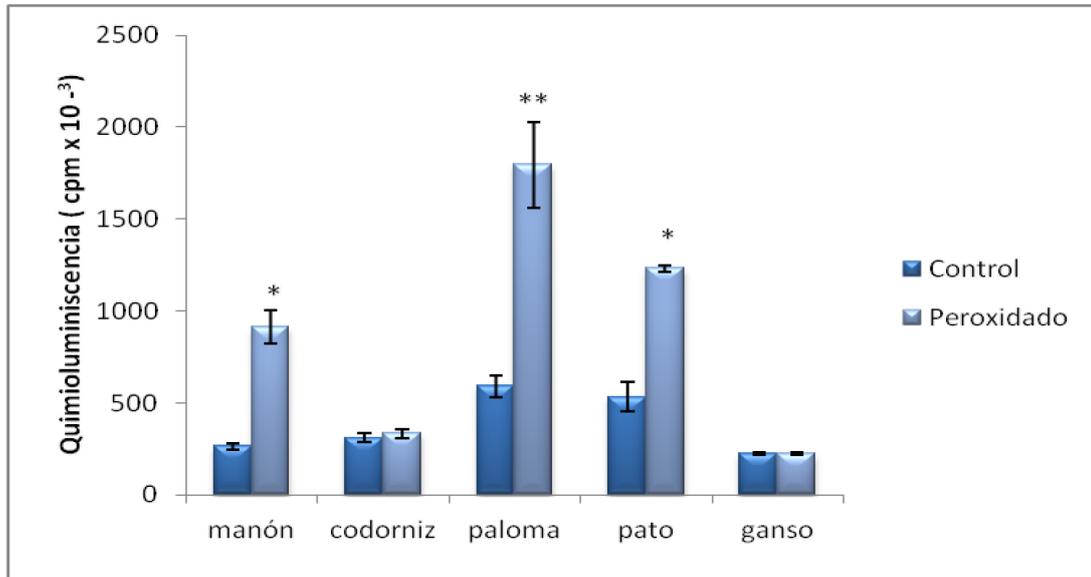


Figura VIII. 8. Quimioluminiscencia total producida por mitocondrias de hígado de diferentes especies de aves. Los datos son expresados como la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticas entre las muestras controles y peroxidadas fueron indicadas por * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$.

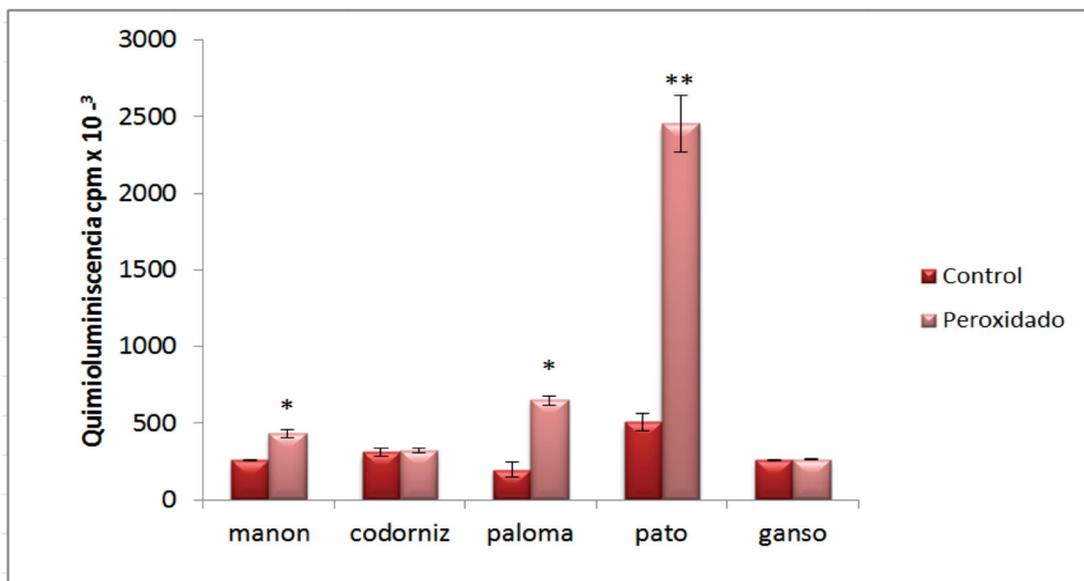


Figura VIII. 9. Quimioluminiscencia total producida por microsomas de hígado de diferentes especies de aves. Los datos son expresados como la media \pm SD de 3 experimentos independientes. * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$.

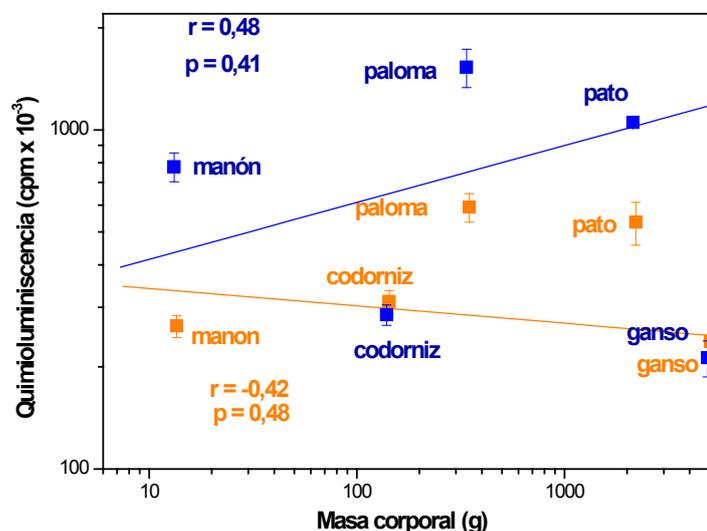


Figura VIII.10. Relación alométrica entre quimioluminiscencia obtenida de mitocondrias de hígado y masa corporal de de las diferentes especies de aves estudiadas. Los datos fueron analizados a través de las siguientes ecuaciones. Controles: $y = 2.58 - 0,05 x$; Peroxidados: $y = -2,52 + 0.17 x$.

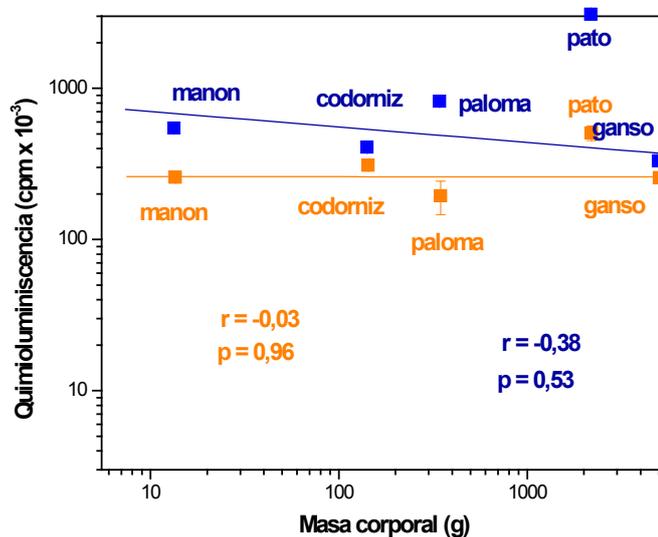


Figura VIII.11. Relación alométrica entre quimioluminiscencia obtenida de microsomas de hígado y masa corporal de las diferentes especies de aves estudiadas. Los datos fueron analizados a través de ecuaciones de regresión lineal. Controles $y = 2.42 - 0,0005 x$; peroxidados $y = -2.84 - 0.10 x$.

El análisis de la relación entre la sensibilidad a la lipoperoxidación de mitocondrias y microsomas de hígado y el tamaño corporal y el máximo de vida no mostraron diferencias significativas (Figuras VIII.12 y 13).

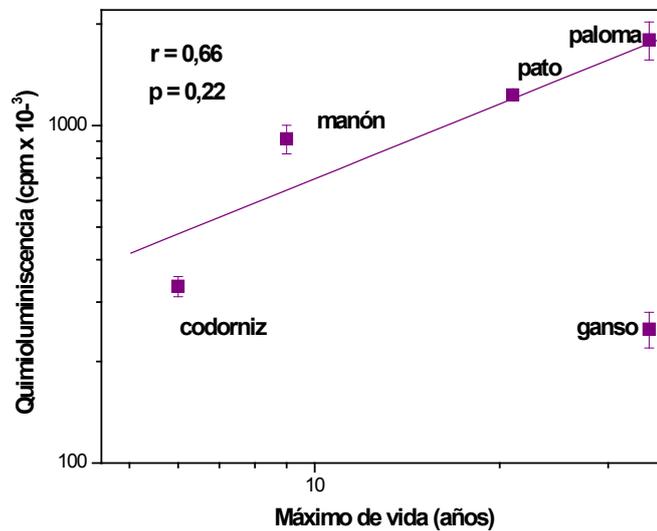


Figura VIII.12 Relación alométrica entre quimioluminiscencia y máximo de vida de mitocondrias de hígado de as diferentes especies de aves estudiadas. Los datos fueron analizados a través de la ecuación $y = 2.10 + 0,74 x$.

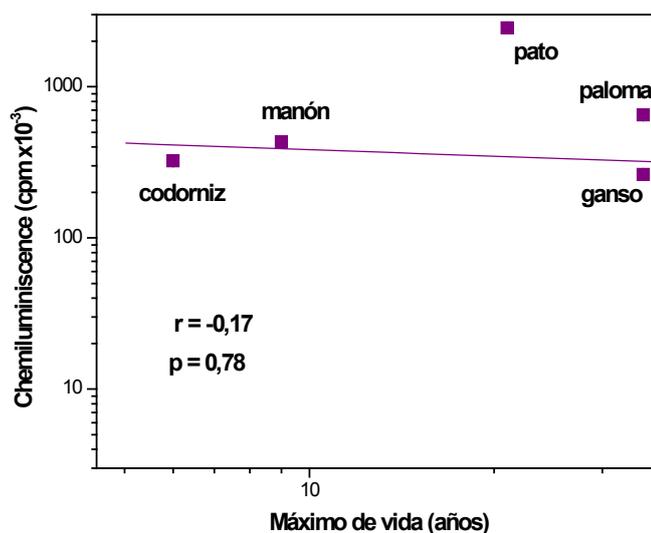


Fig. VIII.13. Relación alométrica entre quimioluminiscencia y máximo de vida de microsomas de hígado de las diferentes especies de aves estudiadas. Los datos fueron analizados a través de la siguiente ecuación $y = 2.72 - 0.14 x$

VIII.3. DISCUSIÓN

Investigaciones previas muestran que la composición de los ácidos grasos de las membranas mitocondriales de los mamíferos está correlacionada con el máximo de vida (Pamplona y col., 1998, 1999).

En este estudio se halló una correlación negativa entre el contenido de ácidos grasos 16:1n7 de los microsomas y una tendencia a la disminución de este ácido graso en mitocondrias. El porcentaje de ácidos saturados de las mitocondrias también presentó una correlación negativa con respecto a la masa corporal y los microsomas del mismo modo marcaron una tendencia negativa sin llegar a la significación estadística.

Se observó una correlación positiva entre el contenido de 18:1n9 de las mitocondrias y la masa corporal, dando lugar a correlaciones positivas en los ácidos grasos monoinsaturados. Asimismo las mitocondrias y microsomas mostraron una correlación positiva entre el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el 18:2n6 y la masa corporal.

La mayoría de las aves analizadas en este estudio presentan una mayor relación PUFA n6/PUFA n3. Los PUFA n6 son generalmente más resistentes a la peroxidación que los PUFA n3. Estas relaciones en particular también fueron halladas en estudios realizados en mitocondrias de hígado de paloma (Pamplona y col. 1996) y en mitocondrias de corazón de tres especies de aves (Pamplona y col. 1999). No observamos diferencias significativas en las relaciones UI y PI y la masa corporal. Hulbert y col. (2002) demostraron en el músculo esquelético de aves, que cuando la masa corporal aumenta, la fracción de ácidos grasos poliinsaturados disminuye, mientras que los ácidos grasos monoinsaturados aumentan. Nuestros resultados con respecto a los ácidos poliinsaturados no coinciden con lo mencionado por Hulbert y col. (2002). Las diferencias podrían atribuirse a que nosotros utilizamos mitocondrias y microsomas de hígado y el rango de aves utilizadas en nuestro laboratorio fue de 372 veces la masa corporal mientras que en el estudio mencionado el rango fue de 3000 veces la masa corporal.

Nuestros datos muestran que las aves más longevas poseen mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados especialmente 18:2n6. Además mostramos que, si bien las aves fueron afectadas por el proceso de lipoperoxidación no hallamos diferencias

significativas en relación a la quimioluminiscencia y al tamaño corporal, ni entre la quimioluminiscencia y el máximo de vida.

De acuerdo a nuestros resultados podemos concluir que las aves de mayor tamaño y las más longevas presentan un alto contenido de 18:2n6, lo que implica una menor sensibilidad a la peroxidación y podría explicar en parte, la gran longevidad de la mayoría de las aves.

CAPITULO IX

Relación entre la composición de ácidos grasos, lipoperoxidación y máximo de vida en mitocondrias y microsomas de corazón de aves de diferente tamaño corporal

IX.1. INTRODUCCIÓN

Los fosfolípidos de la bicapa lipídica de las membranas de los tejidos de los mamíferos pequeños tienen un alto contenido de ácido docosahexaenoico en comparación con las especies de mamíferos de gran tamaño (Couture y Hulbert, 1995). La primera sugerencia de que la tasa metabólica y la composición de la membrana podrían estar vinculadas, proviene del trabajo de Gudbjarnarson y col. (1978), quienes observaron que en el corazón de los mamíferos de diferentes tamaños corporales (que van desde los ratones a las ballenas) había una correlación directa entre la frecuencia cardíaca en reposo y el ácido docosahexaenoico contenido en los fosfolípidos de corazón. En el momento de su publicación la generalización de esta relación no fue apreciada en su totalidad. Más tarde se vio que esta relación no se limitó a fosfolípidos de corazón si no que también se observó en los fosfolípidos de otros órganos vitales como el hígado, riñón y músculo esquelético. La influencia de la composición de la membrana y la peroxidación lipídica en la determinación de la máxima longevidad de las especies ha sido revisado recientemente por Hulbert y col., 2007; Montgomery y col., 2012. El objetivo de esta investigación fue examinar la relación entre el tamaño corporal, composición de ácidos grasos, MLSP y sensibilidad a la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas aislados del corazón de las especies de aves de diferentes tamaños: manón, codorniz, paloma, pato y ganso.

IX.2. RESULTADOS

IX.2.1. Relación entre el tamaño del corazón y la masa corporal de las aves

El peso del cuerpo y del corazón de las aves analizadas en este estudio se muestra en la Tabla IX 1 y en la Figura IX.1. El porcentaje relativo del corazón (peso del corazón/masa corporal) muestra cambios importantes desde el ave más pequeña (manon) hasta la más grande (ganso) con valores que oscilan entre 5.60 y 0.69 respectivamente, lo que representa un rango de 8 veces en lo que se refiere al tamaño del corazón.

Tabla IX.1. Peso del cuerpo y del corazón de las aves

Nombre vulgar	Nombre científico	Masa corporal (g)	Masa del corazón (g)	Porcentaje relativo
Manon	<i>Lonchura striata</i>	13.55 ± 0.50	0.76 ± 0.05	5.60
Codorniz	<i>Coturnix coturnix var japonica</i>	142.88 ± 15.20	1.43 ± 0.12	1.00
Paloma	<i>Columba livia</i>	347.50 ± 3.50	5.80 ± 0.43	1.67
Pato	<i>Cairina moschata</i>	2200.00 ± 2.80	13.36 ± 2.19	0.60
Ganso	<i>Anser anser</i>	5040.00 ± 1.90	34.64 ± 2.39	0.69

Los datos son expresados como la media ± SD

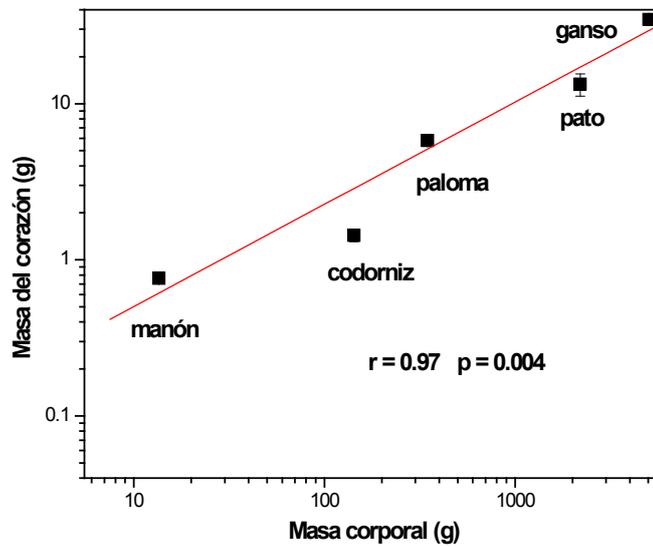


Figura IX. 1. Relación alométrica entre la masa corporal y la del corazón de diferentes especies de aves. Los datos fueron analizados a través de la siguiente ecuación $y = -0.95 + 0.65 x$.

IX 2.2. Composición de ácidos grasos de las mitocondrias y microsomas de corazón

En mitocondrias y microsomas, predominaron los ácidos grasos saturados de cadena larga, principalmente el C16:0 y el C18:0 y los ácidos grasos no saturados fueron el ácido oleico y ácido linoleico (C18:1n9 + C18:2n6 aproximadamente 45%). El contenido de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga del músculo cardíaco de todas las especies estudiadas excepto el pato, disminuyeron en el siguiente orden: C18: 2n6 > C20: 4n6 > C22:6n3 (Tablas IX 2 y 3). Los ácidos grasos presentes en las organelas de corazón de las diferentes especies de aves analizadas mostraron un pequeño número de importantes tendencias alométricas.

El total de ácidos grasos de la serie n6 de las mitocondrias de corazón no presentó correlación significativa con la masa corporal (Tabla IX. 4). Por otra parte, significativas relaciones alométricas fueron descritas para los microsomas (Figura IX. 4A). El total de ácidos grasos de la serie n3 de las mitocondrias y microsomas de corazón indicaron que no hubo una correlación significativa con la masa corporal (Tabla IX. 4). El C18:0 de mitocondrias y microsomas se correlacionó negativamente con la vida. El C16:1n7 de las mitocondrias y el C18:2n6 y los poliinsaturados de la serie n6 de microsomas se correlacionaron significativamente con el máximo de vida (Figura IX. 2c y d, 4b, 5 a y b).

Tabla IX.2. Composición de ácidos grasos de mitocondrias de corazón de diferentes especies de aves

Ácidos grasos	Manón		Codorniz		Paloma		Pato		Ganso	
	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado
C16:0	29.36 ± 1.67	28.76 ± 0.80	29.39 ± 0.64	24.87 ± 1.55	14.16 ± 2.29	19.37 ± 2.29	22.14 ± 1.18	28.06 ± 0.71	32.77 ± 3.24	31.33 ± 0.69
C16:1 n7	2.28 ± 0.56	2.46 ± 0.14	2.65 ± 0.20	3.02 ± 0.58	3.22 ± 0.97	4.80 ± 0.94	1.52 ± 0.47	2.41 ± 1.06	4.41 ± 0.35	3.47 ± 0.96
C18:0	25.49 ± 0.13	23.45 ± 1.51	17.41 ± 0.99	16.34 ± 1.64	10.30 ± 0.49	15.32 ± 3.54	11.96 ± 0.58	8.15 ± 0.99	15.27 ± 0.73	14.60 ± 0.57
C18:1 n9	28.78 ± 0.72	27.57 ± 1.40	23.13 ± 0.54	24.07 ± 1.25	22.09 ± 2.34	23.92 ± 2.02	31.23 ± 3.00	37.45 ± 2.36	32.64 ± 0.98	30.40 ± 1.51
C18:2 n6	11.56 ± 1.23	10.95 ± 0.23	21.80 ± 1.73	20.14 ± 3.58	26.43 ± 3.51	24.98 ± 4.48	13.51 ± 3.06	9.71 ± 1.83	21.49 ± 0.93	20.47 ± 0.48
C18:3 n3	0.51 ± 0.08	0.46 ± 0.06	0.73 ± 0.25	0.51 ± 0.14	1.05 ± 0.34	4.89 ± 2.25	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.03	1.06 ± 0.05	1.12 ± 0.07
C20:4 n6	2.69 ± 0.07	2.83 ± 0.10	5.53 ± 0.49	5.08 ± 0.14	9.32 ± 0.91	8.61 ± 1.62	18.10 ± 0.94	5.17 ± 1.34***	5.03 ± 0.22	4.67 ± 0.31
C22:6 n3	2.37 ± 0.13	2.22 ± 0.18	0.78 ± 0.10	0.70 ± 0.06	2.30 ± 0.41	5.25 ± 3.58	0.83 ± 0.07	0.30 ± 0.11**	1.21 ± 0.09	1.23 ± 0.09
SFA	54.85 ± 1.57	52.21 ± 2.25	40.80 ± 0.79	41.21 ± 2.82	24.46 ± 2.48	34.69 ± 4.71	34.10 ± 1.47	36.22 ± 1.70	48.04 ± 3.97	45.93 ± 0.23
MUFA	31.06 ± 0.56	30.03 ± 1.49	25.78 ± 0.46	27.10 ± 1.56	24.50 ± 3.90	28.87 ± 2.49	32.76 ± 3.61	39.87 ± 2.85	37.05 ± 1.14	33.87 ± 0.95
PUFAs	17.12 ± 1.35	16.45 ± 0.32	28.84 ± 1.86	26.44 ± 3.86	36.98 ± 8.00	40.95 ± 2.97	32.56 ± 4.05	15.32 ± 2.47**	28.80 ± 0.77	27.49 ± 0.67
UFA	48.18 ± 1.58	46.48 ± 1.78	54.72 ± 2.24	53.53 ± 5.17	61.48 ± 5.83	69.67 ± 2.74	65.32 ± 5.69	55.18 ± 3.96	65.85 ± 1.47	61.36 ± 1.59
UI	80.65 ± 3.43	77.93 ± 2.94	98.36 ± 4.58	92.45 ± 9.61	131.60 ± 7.53	134.04 ± 14.94	137.50 ± 11.21	82.21 ± 7.30**	110.62 ± 2.23	104.23 ± 2.69
PUFAs n6	14.25 ± 1.58	13.78 ± 0.21	26.36 ± 0.96	25.22 ± 3.72	29.94 ± 1.41	3.59 ± 3.05	31.62 ± 4.90	14.88 ± 2.95	26.52 ± 0.87	25.14 ± 0.90
PUFAs n3	2.87 ± 0.12	2.68 ± 0.25	1.50 ± 0.27	1.21 ± 0.16	3.25 ± 0.34	2.25 ± 1.66	0.94 ± 0.10	0.43 ± 0.18	2.28 ± 0.15	2.35 ± 0.16

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre el grupo control y peroxidado están indicadas por *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Tabla IX.3. Composición de ácidos grasos de microsomas de corazón de diferentes especies de aves

Ácidos grasos	Manón		Codorniz		Paloma		Pato		Ganso	
	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado
C16:0	41.51 ± 1.23	40.86 ± 3.12	30.23 ± 4.10	34.62 ± 4.99	20.08 ± 0.93	20.50 ± 3.59	30.65 ± 1.75	30.21 ± 2.46	28.31 ± 1.23	25.92 ± 0.95
C16:1 n7	6.44 ± 0.42	4.84 ± 0.38	2.61 ± 0.43	2.96 ± 0.46	6.76 ± 1.81	-	3.46 ± 0.23	3.41 ± 0.37	3.82 ± 0.08	3.79 ± 0.18
C18:0	29.68 ± 2.27	28.24 ± 3.23	25.38 ± 4.18	24.40 ± 2.52	9.31 ± 1.72	11.15 ± 1.65	12.88 ± 0.84	8.41 ± 1.11	10.59 ± 0.15	10.48 ± 0.14
C18:1 n9	22.77 ± 0.70	23.04 ± 3.34	17.19 ± 1.37	17.88 ± 0.42	29.28 ± 7.99	18.16 ± 1.37	24.95 ± 0.70	24.65 ± 0.61	10.46 ± 0.39	10.02 ± 0.37
C18:2 n6	2.03 ± 0.08	1.93 ± 0.31	6.92 ± 0.30	7.65 ± 0.51	22.45 ± 7.42	12.02 ± 1.98	8.11 ± 1.40	8.35 ± 1.04	30.71 ± 1.84	30.63 ± 2.26
C18:3 n3	-	-	1.41 ± 0.13	1.34 ± 0.30	3.10 ± 1.94	1.66 ± 0.44	-	-	0.98 ± 0.03	0.85 ± 0.12
C20:4 n6	1.44 ± 0.16	1.42 ± 0.26	1.89 ± 0.83	1.26 ± 0.43	3.88 ± 0.78	7.40 ± 2.58	12.97 ± 1.59	13.89 ± 0.67	1.48 ± 0.22	1.51 ± 0.51
C22:6 n3	1.41 ± 0.15	1.42 ± 0.15	0.87 ± 0.03	0.96 ± 0.06	3.27 ± 0.17	3.25 ± 1.93	1.68 ± 0.40	2.37 ± 0.20	0.77 ± 0.05	0.79 ± 0.07
SFA	71.18 ± 3.18	69.10 ± 3.71	55.61 ± 8.15	59.03 ± 5.36	28.90 ± 2.08	31.73 ± 4.33	43.20 ± 1.49	38.63 ± 2.65	38.90 ± 1.08	36.41 ± 1.07
MUFA	29.21 ± 1.11	27.88 ± 3.19	19.80 ± 1.40	20.84 ± 0.54	32.67 ± 11.29	18.16 ± 1.37	28.42 ± 0.47	28.07 ± 0.26	14.28 ± 0.41	13.81 ± 0.43
PUFAs	4.88 ± 0.32	4.76 ± 0.72	11.09 ± 0.92	11.20 ± 0.85	30.25 ± 7.47	23.52 ± 1.81	22.79 ± 2.49	24.58 ± 1.52	33.95 ± 1.78	33.78 ± 2.85
UFA	34.09 ± 1.42	32.64 ± 2.66	30.89 ± 1.64	32.04 ± 1.08	62.92 ± 10.70	41.69 ± 2.17	51.21 ± 2.52	52.65 ± 1.46	48.22 ± 1.98	47.60 ± 2.80
UI	47.47 ± 2.48	45.91 ± 1.97	50.66 ± 4.00	50.93 ± 2.91	110.01 ± 18.14	89.20 ± 14.16	106.65 ± 6.36	114.39 ± 3.69	89.19 ± 3.67	88.42 ± 6.64
PUFAs n6	3.47 ± 0.29	3.35 ± 0.70	8.80 ± 0.79	8.90 ± 0.60	24.52 ± 1.51	19.42 ± 2.28	21.11 ± 3.54	22.25 ± 2.03	32.20 ± 2.12	32.14 ± 3.39
PUFAs n3	1.41 ± 0.19	1.42 ± 0.18	2.28 ± 0.15	2.30 ± 0.28	6.37 ± 1.94	4.91 ± 0.44	1.69 ± 0.50	2.37 ± 0.33	1.75 ± 0.08	1.64 ± 0.14

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes

Tabla VIII.4. Resumen de las correlaciones entre la masa corporal y la composición de ácidos grasos e índices de los ácidos grasos de mitocondrias y microsomas de corazón de las especies de aves estudiadas

Acidos graso	Mitocondrias		Microsomas	
	Control		Control	
	r	p	r	p
C16:0	-0.48	0.40	-0.83	0.07
C16:1n7	0.88	0.05	-0.19	0.75
C18:0	-0.90	0.03	-0.97	0.01
C18:1n9	0.35	0.56	0.40	0.50
C18:2n6	0.74	0.15	0.99	0.00
C18:3n3	0.54	0.35	-0.97	0.15
C20:4n6	0.76	0.13	0.55	0.33
C22:6n3	-0.80	0.10	0.05	0.93
SFA	-0.68	0.20	-0.82	0.09
MUFA	0.24	0.69	-0.36	0.54
PUFAs	0.74	0.15	0.99	0.00
UFA	0.85	0.06	0.83	0.08
UI	0.73	0.16	0.90	0.03
∑ n6	0.02	0.98	0.89	0.04
∑ n3	0.54	0.35	-0.29	0.64

r: coeficiente de correlación lineal de Pearson; p: significación estadística. Los números estadísticamente significativos se indican en negrita.

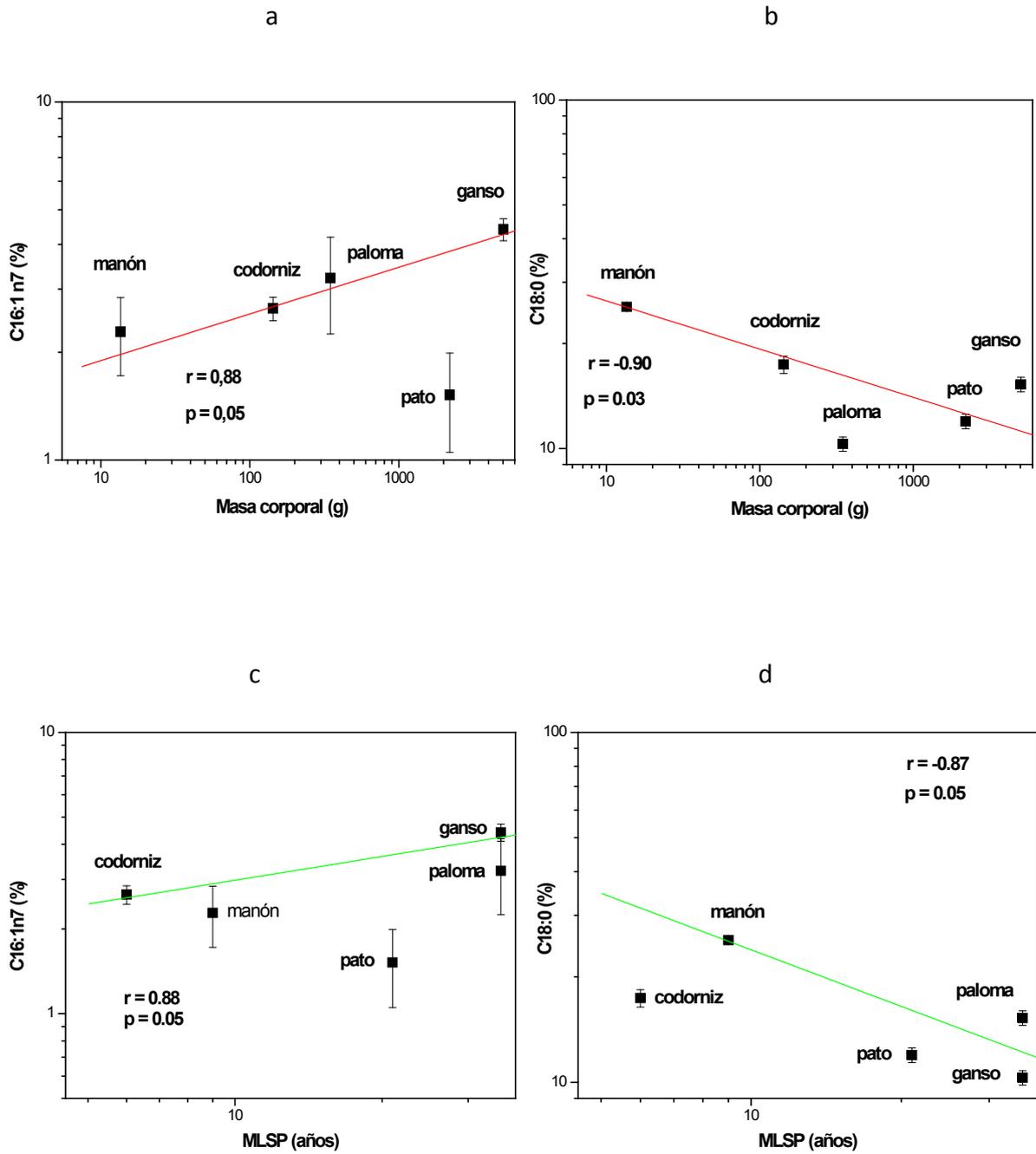


Figura IX.2. Relación alométrica entre la masa corporal y el máximo de vida (MLSP) y el porcentaje de ácidos grasos de las mitocondrias de corazón de las diferentes especies de aves. a y c : C16:1n7; b y d: C18:0. Los datos fueron analizados a través de ecuaciones de regresión lineal. a: $y = 0.15 + 0.13 x$; b: $y = 1.56 + 0.14 x$; c: $y = 0.15 + 0.13 x$; d: $y = 1.92 + 0.54 x$.

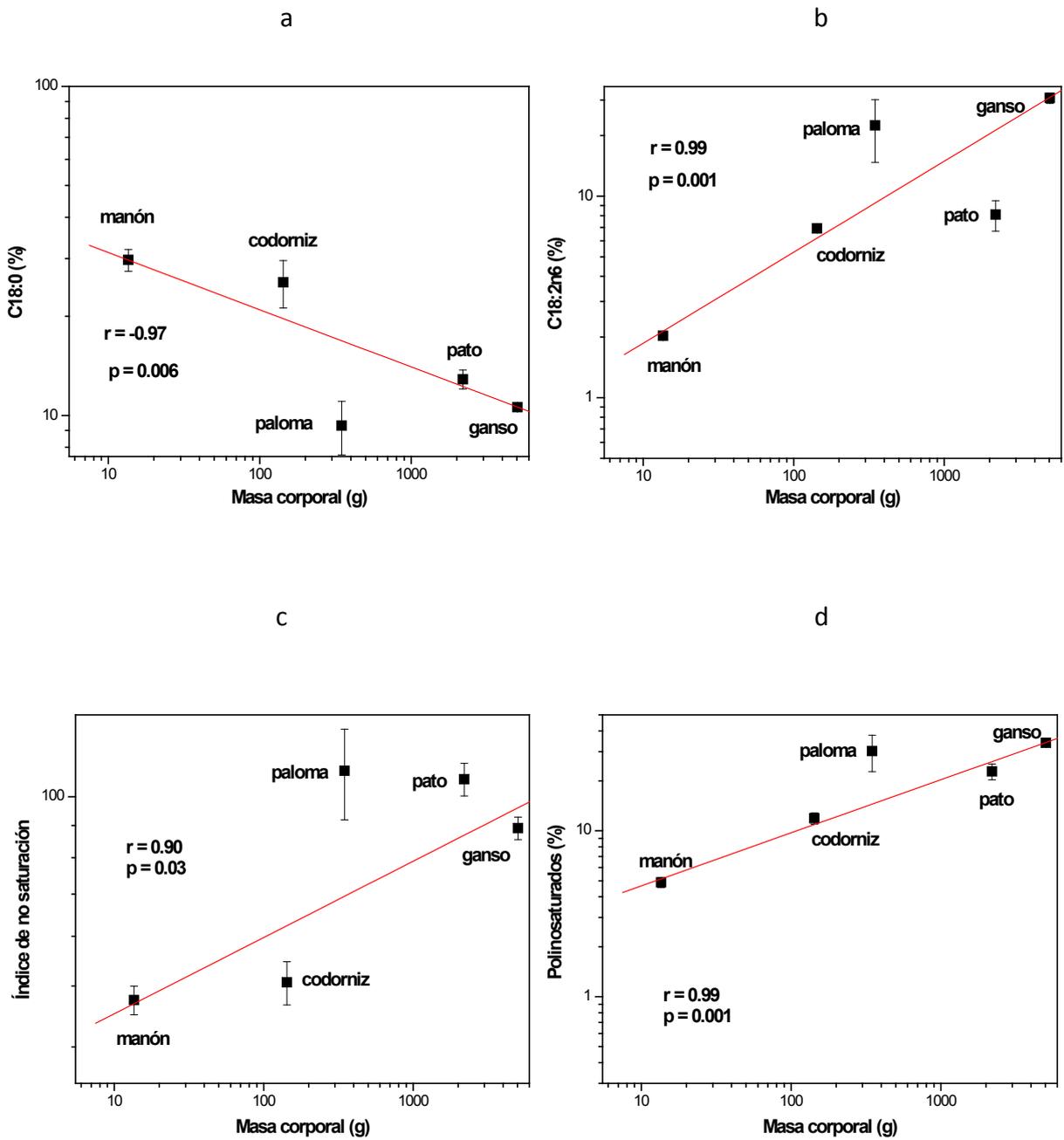


Figura IX.3. Relación alométrica entre la masa corporal y el porcentaje de C18:0, C18:2n6, poliinsaturados y UI en microsomas de corazón. Los datos fueron analizados a través de las siguientes ecuaciones. a: $y = 1.67 - 0.17 x$; b: $y = -0.18 + 0.45 x$; c: $y = 1.53 + 0.12 x$; d: $y = 0.35 + 0.32 x$.

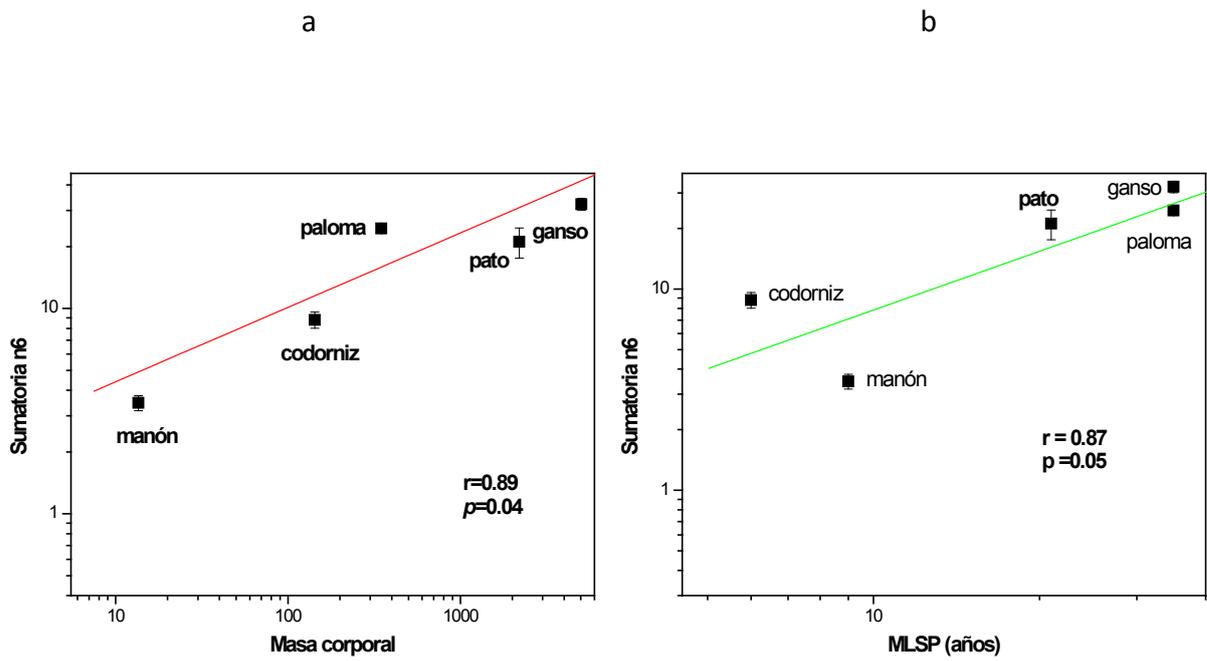


Figura IX.4. Relación entre la sumatoria n6, la masa corporal y el máximo de vida (MLSP) en microsomas de corazón. a- $y = 0.28 + 0.36x$; b- $y = -0.07 + 0.97x$.

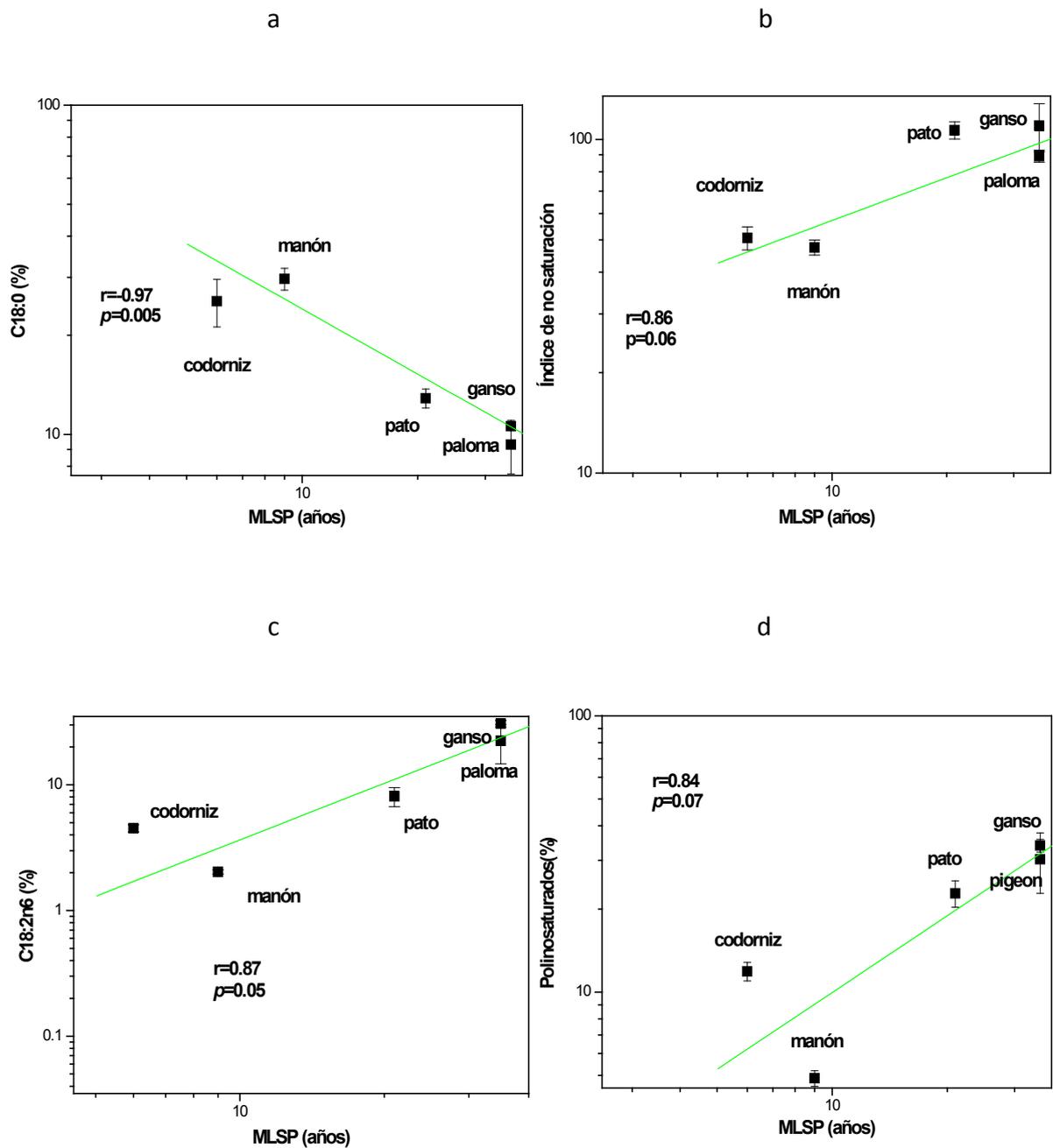


Figura IX. 5. Relación alométrica entre MLSP, el porcentaje de C 18:0 y 18:2 n6, poliinsaturados y UI en microsomas de corazón. Los datos fueron analizados a través de ecuaciones de regresión lineal.

a- $y = 2.04 - 0.66x$; b- $y = 1.33 + 0.42x$; c- $y = -0.93 + 1.49x$; d- $y = 0.07 + 0.92x$

IX 2.3. Comparación de la peroxidación lipídica en mitocondrias y microsomas de corazón aislados de diferentes especies de aves

La emisión de luz de las organelas de corazón no fue estadísticamente significativa cuando las muestras controles y peroxidadas fueron comparadas (Figura IX. 6). El perfil de ácidos grasos y el índice de no saturación de las mitocondrias y microsomas de corazón no fueron modificados después de la peroxidación lipídica (Tablas IX. 2-3). Las mitocondrias de pato fueron las únicas afectadas por la peroxidación lipídica, siendo los ácidos grasos poliinsaturados C20:4n6 y C22:6n3 los más dañados (Tabla IX. 2)

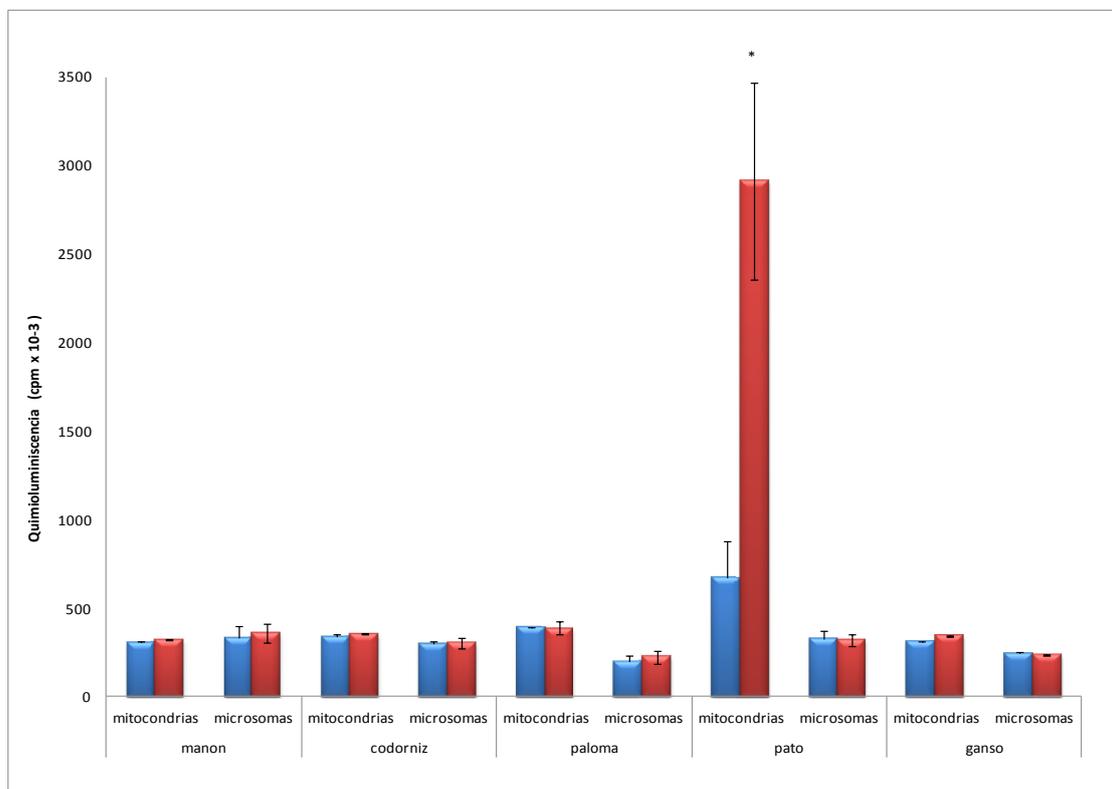


Figura IX.6. Quimioluminiscencia total producida por mitocondrias y microsomas aisladas del corazón de diferentes especies de aves (expresada como cpm/mg de proteína). Los datos son expresados como la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticas entre las muestras controles y peroxidadas fueron indicadas por * $p < 0.0001$.

IX.3. DISCUSIÓN

En este Capítulo se describen las tendencias alométricas entre el tamaño corporal, máximo de vida, composición de ácidos grasos y sensibilidad a la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas aislados de corazón de diferentes especies de aves. Los ácidos grasos presentes en ambas organelas de corazón mostraron un pequeño número de importantes tendencias alométricas. El exponente alométrico que describe la masa corporal relacionada con la variación de la masa del corazón fue de 0.65. Este parámetro significa que el aumento de la masa del corazón no es proporcional al aumento de la masa corporal y muestra la tendencia de que las aves más grandes poseen corazones más pequeños (6% frente a 0,7%). El valor más bajo fue similar a los obtenidos por Turner y col. (2006) y Szabó y col. (2006). Sin embargo, estos autores mencionados dan como valor máximo 1.5% frente al 6% obtenido en nuestro estudio. Estas diferencias podrían atribuirse a que las aves utilizadas en nuestro laboratorio presentaron una amplia variación de tamaño corporal.

Las mitocondrias de corazón de las especies de aves más grandes presentaron un alto porcentaje de C16:1n7, el cual se correlacionó positivamente con la masa corporal. Este resultado está en concordancia con investigaciones previas de Szabó y col. (2006). Tanto las mitocondrias y microsomas de corazón de las aves de mayor tamaño poseen un menor contenido de C18:0. Sin embargo, estos resultados no modifican el total de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Así, las especies que tienen un menor porcentaje de 18:0 y altos porcentajes de C16:1n7 en sus membranas son más resistentes al daño oxidativo que las especies que poseen proporcionalmente más ácidos grasos poliinsaturados. El contenido total de ácidos grasos poliinsaturados de las mitocondrias no mostró relación con la masa corporal. En microsomas de corazón de las aves estudiadas hemos encontrado relaciones alométricas positivas con respecto al tamaño corporal para el ácido graso C18:2n6, poliinsaturados y UI. El aumento de los índices generales de los ácidos grasos en las aves de mayor tamaño se debe a un aumento significativo del contenido de C18:2n6 y no al de C20:4n6 y C22:6n3. Como ya hemos mencionado en varias oportunidades la susceptibilidad de los ácidos grasos al daño producido por los ROS aumenta de forma exponencial en función del número de dobles enlaces por molécula de ácido graso. El C18:2n6 es relativamente más estable a la oxidación que el ácido graso altamente no saturado C22:6n3

(Laganiere y Yu, 1990; Kobayashi y col., 1996). En los microsomas pero no en las mitocondrias los ácidos grasos de la serie n6 mostraron correlación con el tamaño corporal. Resultados similares fueron hallados en diferentes tejidos de mamíferos y músculo pectoral de aves (Hulbert y col., 2002a, b). En ambas organelas el total de ácidos grasos n3 y específicamente el contenido de C22:6n3 no cambió significativamente con la masa corporal. Nuestros resultados no concuerdan con lo observado en trabajos previos (Turner y col., 2006; Szabó y col., 2006), en los cuales el porcentaje del C22:6n3 aumenta con la masa corporal. Sin embargo, en uno de los documentos mencionados anteriormente (Turner y col., 2006), los autores explican que la gran variación alométrica del contenido de C22:6n3 relacionada con el tamaño del cuerpo es una sobre estimación, debido al número limitado de especies examinadas. Estudios preliminares realizados por Pamplona y col. (1999a, b) demostraron que los corazones de las cotorritas australianas y canarios poseían ácidos grasos con bajo número de dobles ligaduras con respecto a los ratones. Lo mismo ocurrió en las mitocondrias de hígado de paloma cuando se las comparó con las de rata (Pamplona y col., 1996; Gutiérrez et al., 2000). Este hecho protegería a los tejidos de la peroxidación y disminuirían los productos de peroxidación lipídica. A diferencia de lo obtenido en nuestro trabajo resultados de una investigación previa (Szabó et al., 2006) encuentran una perceptible correlación alométrica negativa entre la peroxidación lipídica y el tamaño corporal. La explicación de esta discrepancia se debe, en parte, a los diferentes sistemas de análisis utilizados. En nuestro caso, el ensayo de peroxidación fue por producción de radicales libres en un sistema típico de Fe^{+2} - ascorbato mientras que los otros autores utilizan la producción de malondialdehído (MDA). La sensibilidad del ensayo de quimioluminiscencia (utilizado en nuestro estudio) es mucho más alta y específica que la del ensayo del MDA. Algunos investigadores han informado que la medición del MDA a través de la determinación de la concentración de sustancias sensibles al ácido tiobarbitúrico (TBARS) no sería la mejor reacción para determinar los componentes de la degradación de lípidos (Ichinose y col., 1989; Kosugi y col., 1989).

En conclusión, nuestros resultados muestran ausencia de correlación entre la sensibilidad a la peroxidación lipídica de las mitocondrias y microsomas de corazón con el tamaño corporal y el máximo de vida. La oxidación lipídica es una de las consecuencias naturales de la vida aeróbica. Los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la

membrana celular son altamente vulnerables a la peroxidación lipídica. Este proceso es autocatalítico. Por estos motivos, y para el mantenimiento de otras propiedades fisiológicas, un bajo grado de no saturación en los ácidos grasos de las membranas celulares puede ser ventajoso para disminuir la sensibilidad a la peroxidación de los lípidos (Pamplona, 2008). El ácido graso C18:2n6 y el total de n6 de los microsomas de corazón se correlacionaron positivamente con la masa corporal y MLSP.

Se ha demostrado que las especies animales de larga vida poseen ácidos grasos con menor número de dobles ligaduras lo que es acompañado por una baja sensibilidad a la peroxidación lipídica tanto *in vivo* como *in vitro* en las membranas de órganos como el músculo esquelético, corazón, hígado y cerebro (Pamplona 2008: Pamplona et al, 1999a, b). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio en organelas de diferentes tejidos procedentes de codorniz (ave de corta vida), mostraron que tienen ácidos grasos con bajo grado de no saturación similar a la observado en las aves de larga vida (Gutiérrez et al., 2006).

El hallazgo más interesante de este Capítulo es que, independientemente del tamaño del cuerpo y del máximo de vida, los corazones de todas las aves examinadas mostraron una alta resistencia a la peroxidación lipídica. Este comportamiento contribuye en la preservación de la función cardíaca.

CAPITULO X

Relación entre la composición de ácidos grasos, lipoperoxidación y máximo de vida en mitocondrias y microsomas de cerebro de aves de diferente tamaño corporal

X.1. INTRODUCCIÓN

Los fosfolípidos de los tejidos de los pequeños mamíferos poseen un mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados que las especies de mamíferos de mayor tamaño, predominando en estos últimos los monoinsaturados. Esta relación está presente en diversos tejidos, excepto en cerebro (Couture y Hulbert, 1995; Hulbert y col., 2002b). La mayoría de los estudios se han realizado en mamíferos y muy pocos trabajos se conocen sobre aves (Finch, 1990; Barja y col., 1994b; Holmes y Austad 1995; Holmes y Ottinger, 2003; Holmes y col., 2001; Austad, 1997, 2001; Barja, 1998; Ogburn y col., 2001; Hulbert y col., 2007; Pamplona y Barja, 2007; Pamplona y col., 2002). Investigaciones preliminares de Pamplona y col. (1996, 1999 a, b) y recientes investigaciones de nuestro laboratorio con aves passeriformes y no passeriformes (Gutiérrez et al. 2000, 2002, 2004, 2006) demuestran que las membranas mitocondriales de diferentes tejidos de aves en comparación con mamíferos de similar tamaño corporal poseen ácidos grasos con bajo grado de no saturación y son más resistentes a la peroxidación lipídica. Sin embargo, la relación entre sensibilidad a la peroxidación de lípidos y el tamaño corporal es aún desconocida.

El objetivo de este Capítulo fue estudiar la relación entre el tamaño corporal, la composición de ácidos grasos, el máximo de vida y la sensibilidad a la peroxidación lipídica en mitocondrias y microsomas aisladas de cerebro de las siguientes aves: manón, codorniz, paloma, pato y ganso.

X.2. RESULTADOS

El peso del cuerpo y del cerebro de las aves analizadas en este estudio se muestra en la Tabla X.1. El porcentaje relativo del cerebro (peso del cerebro / masa corporal) muestra cambios importantes desde el ave más pequeña (manón) a la más grande (ganso), con valores que oscilan entre 2.65 y 0.22 g respectivamente, lo que representa un rango de 12 veces.

Tabla X.1. Peso del cuerpo y del cerebro de las aves

Nombre vulgar	Nombre científico	Máx.de vida (años)	Peso corporal (g)	Peso del cerebro (g)	Porcentaje relativo
Manon	Lonchura striata	9	13.55 ± 0.50	0.36 ± 0.05	2.65
Codorniz	Coturnix coturnix var japonica)	6	142.88 ±15.20	0.78 ± 0.08	0.54
Paloma	Columba livia	35	347.50 ± 3.50	1.41 ± 0.26	0.40
Pato	Cairina moschata	21	2200.00 ± 2.80	5.90 ± 0.36	0.26
Ganso	Anser anser	35	5040.00 ± 1.90	11.16 ± 0.09	0.22

Los datos son expresados como la media ± SD

X.2.1. Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas de cerebro

Los principales ácidos grasos saturados de cadena larga de las mitocondrias y microsomas de cerebro de las aves estudiadas fueron el C16:0 y C18:0. En ambas organelas el ácido graso no saturado predominante fue el C18:1n9 excepto en mitocondrias de ganso donde el ácido graso más relevante fue el C18:2n6.

Los valores de UI y PI de ambas organelas en las especies de aves estudiadas fueron similares.

Tabla X.2. Composición de ácidos grasos de mitocondrias de cerebro de diferentes especies de aves

Ácidos grasos	manón		codorniz		paloma		pato		ganso	
	control	peroxidado	control	peroxidado	control	peroxidado	control	peroxidado	control	peroxidado
C16:0	19.99 ± 0.21	21.65 ± 0.46	28.49 ± 0.49	28.75 ± 0.67	24.67 ± 1.14	35.47 ± 0.93	24.85 ± 0.32	24.69 ± 3.26	20.61 ± 0.57	26.43 ± 1.01
C16:1 n7	2.02 ± 0.36	2.83 ± 0.58	-	-	1.13 ± 0.07	1.54 ± 0.27	0.78 ± 0.30	8.53 ± 1.07***	2.41 ± 0.22	2.55 ± 0.60
C18:0	19.86 ± 0.39	20.27 ± 0.16	23.36 ± 1.02	23.76 ± 0.81	28.04 ± 2.32	29.17 ± 2.24	20.42 ± 1.73	21.98 ± 0.51	18.19 ± 0.48	19.80 ± 1.04
C18:1 n9	29.33 ± 0.38	27.73 ± 0.69	24.89 ± 1.73	25.33 ± 2.23	21.19 ± 1.75	23.92 ± 2.28	21.78 ± 1.16	22.97 ± 1.80	13.79 ± 1.16	15.52 ± 0.25
C18:2 n6	12.49 ± 0.69	13.00 ± 1.78	2.36 ± 0.07	2.53 ± 0.65	0.60 ± 0.13	0.61 ± 0.15	1.80 ± 0.18	1.74 ± 0.52	31.53 ± 0.89	30.03 ± 0.21
C18:3 n3	0.73 ± 0.04	0.78 ± 0.06	-	-	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.04	-	-	0.30 ± 0.01	0.27 ± 0.01
C20:4 n6	6.52 ± 0.23	2.10 ± 0.56***	7.31 ± 0.40	2.71 ± 0.72**	8.83 ± 1.83	4.62 ± 0.70*	9.12 ± 0.45	5.86 ± 0.68**	6.65 ± 0.20	0.75 ± 0.08***
C22:6 n3	7.84 ± 0.58	2.53 ± 0.33***	8.98 ± 0.68	0.77 ± 0.08**	8.46 ± 0.94	2.78 ± 0.91**	14.99 ± 0.74	7.29 ± 0.47**	8.37 ± 0.08	2.15 ± 0.12***
SFA	39.85 ± 0.60	41.92 ± 0.38	51.85 ± 1.25	52.51 ± 0.92	52.71 ± 1.18	64.64 ± 2.59**	45.27 ± 1.43	46.66 ± 3.74	38.81 ± 0.26	46.03 ± 1.47**
MUFA	31.35 ± 0.39	30.56 ± 0.60	24.60 ± 1.73	25.33 ± 2.23	22.32 ± 1.68	25.46 ± 2.54	22.56 ± 1.14	31.50 ± 2.86*	16.20 ± 1.01	18.07 ± 0.73
PUFAs	27.59 ± 1.07	18.40 ± 1.84**	18.65 ± 0.08	6.06 ± 1.34**	18.02 ± 2.48	8.14 ± 1.73**	25.91 ± 0.69	14.89 ± 1.50***	46.85 ± 0.93	33.20 ± 0.26***
UFA	58.94 ± 0.72	48.96 ± 2.36**	43.54 ± 2.44	31.39 ± 0.92**	40.33 ± 3.98	36.60 ± 4.14	48.47 ± 1.76	46.39 ± 3.46	63.05 ± 0.21	51.27 ± 0.89***
UI	131.67 ± 3.87	82.44 ± 4.95***	112.72 ± 6.14	45.95 ± 1.84**	109.98 ± 13.09	62.24 ± 10.67**	152.58 ± 5.13	102.15 ± 10.32**	157.00 ± 1.21	94.86 ± 1.38***
PI	114.62 ± 10.84	43.92 ± 5.52***	104.04 ± 6.07	20.23 ± 3.23**	102.98 ± 14.19	42.25 ± 12.37**	158.76 ± 7.19	84.26 ± 16.11**	126.12 ± 2.04	51.25 ± 1.08***

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias significativas entre el grupo control y peroxidado están indicadas por * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Tabla X.3. Composición de ácidos grasos de microsomas de cerebro de diferentes especies de aves

Ácidos grasos	manón		codorniz		pato		ganso	
	control	peroxidado	control	peroxidado	control	peroxidado	control	peroxidado
C16:0	34.71 ± 2.51	35.21 ± 0.95	21.73 ± 0.34	24.37 ± 0.78	31.77 ± 3.29	27.08 ± 1.04	20.57 ± 1.60	23.09 ± 1.11
C16:1 n7	2.23 ± 0.30	1.99 ± 0.18	2.19 ± 0.28	2.38 ± 0.31	6.52 ± 0.27	5.28 ± 0.76	3.21 ± 0.62	3.55 ± 1.12
C18:0	38.33 ± 3.58	34.87 ± 4.47	24.25 ± 0.89	22.72 ± 1.61	22.69 ± 2.41	22.48 ± 1.75	14.42 ± 0.85	12.56 ± 0.50
C18:1 n9	18.82 ± 1.46	19.01 ± 1.11	20.16 ± 0.58	20.11 ± 0.33	20.98 ± 1.61	23.60 ± 3.14	13.23 ± 1.49	12.97 ± 2.36
C18:2 n6	2.97 ± 0.25	3.99 ± 0.29	6.66 ± 0.46	6.58 ± 0.29	7.42 ± 1.79	5.36 ± 0.12	32.20 ± 0.65	34.15 ± 0.47
C18:3 n3	0.76 ± 0.16	0.59 ± 0.14	0.91 ± 0.06	0.99 ± 0.23	0.52 ± 0.17	0.41 ± 0.07	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.03
C20:4 n6	2.40 ± 0.58	1.98 ± 0.22	5.64 ± 0.19	4.97 ± 0.51	3.50 ± 0.60	2.75 ± 0.19	4.24 ± 0.16	4.39 ± 0.35
C22:6 n3	3.70 ± 0.17	3.83 ± 0.19	6.93 ± 0.12	7.04 ± 0.05	5.07 ± 0.10	5.03 ± 0.05	10.73 ± 0.45	10.37 ± 1.06
SFA	73.03 ± 6.04	70.08 ± 3.68	45.99 ± 0.52	47.09 ± 1.56	54.46 ± 3.55	49.55 ± 1.34	34.99 ± 2.44	33.65 ± 0.79
MUFA	21.04 ± 1.20	21.00 ± 1.28	22.35 ± 0.49	22.49 ± 0.13	27.50 ± 1.83	28.87 ± 2.47	16.44 ± 1.82	16.52 ± 2.40
PUFAs	9.84 ± 0.47	10.40 ± 0.51	20.14 ± 0.24	19.58 ± 0.61	16.51 ± 2.03	13.56 ± 0.39	47.45 ± 0.44	49.19 ± 1.57
UFA	30.88 ± 1.23	31.40 ± 1.51	42.49 ± 0.61	42.07 ± 0.58	44.02 ± 3.15	42.43 ± 2.67	63.89 ± 2.12	65.71 ± 2.84
UI	61.10 ± 2.24	61.69 ± 3.10	102.54 ± 1.24	100.75 ± 2.08	88.35 ± 5.70	82.02 ± 3.18	163.03 ± 4.21	165.45 ± 7.85
PI	44.25 ± 3.15	43.76 ± 2.90	87.04 ± 1.49	85.32 ± 2.51	63.52 ± 3.31	57.81 ± 1.15	135.96 ± 4.23	135.67 ± 12.24

Los datos son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes

X.2.2. Relación entre la masa corporal y la composición de ácidos grasos

Los ácidos grasos presentes en las organelas de cerebro de las diferentes especies de aves analizadas muestran una significación alométrica. En mitocondrias el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados fue significativamente más bajo en las aves de gran tamaño ($r = -0.96$) (Figura X.1).

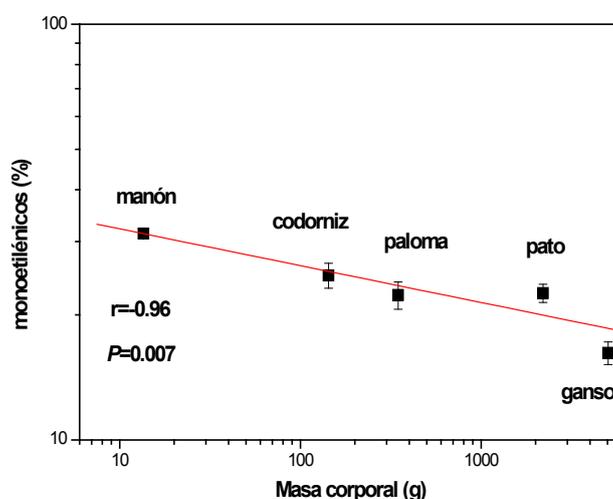


Figura X.1. Relación alométrica entre la masa corporal y el porcentaje de ácidos grasos de las mitocondrias de cerebro de las diferentes especies de aves. Los datos fueron analizados a través de la siguiente ecuación $y = 1.60 - 0.09 x$.

Aunque el contenido total de ácidos grasos saturados no mostró diferencias significativas en las organelas estudiadas, el contenido de C18:0 en los microsomas de cerebro fue significativamente menor ($r = -0.95$) en las aves de mayor tamaño (Figura X.2a). También en microsomas de cerebro de las aves más grandes se observó un aumento significativo del C18:2n6 ($r = 0.98$), de los poliinsaturados ($r = 0.99$) y del total de no saturados ($r = 0.97$), no hallándose variaciones alométricas significativas en los ácidos grasos aislados de las mitocondrias (Tablas X.2-4; Figura X. 2b, c y d). El UI y PI de las organelas de cerebro no mostraron correlaciones significativas con el tamaño corporal (Tabla X. 4).

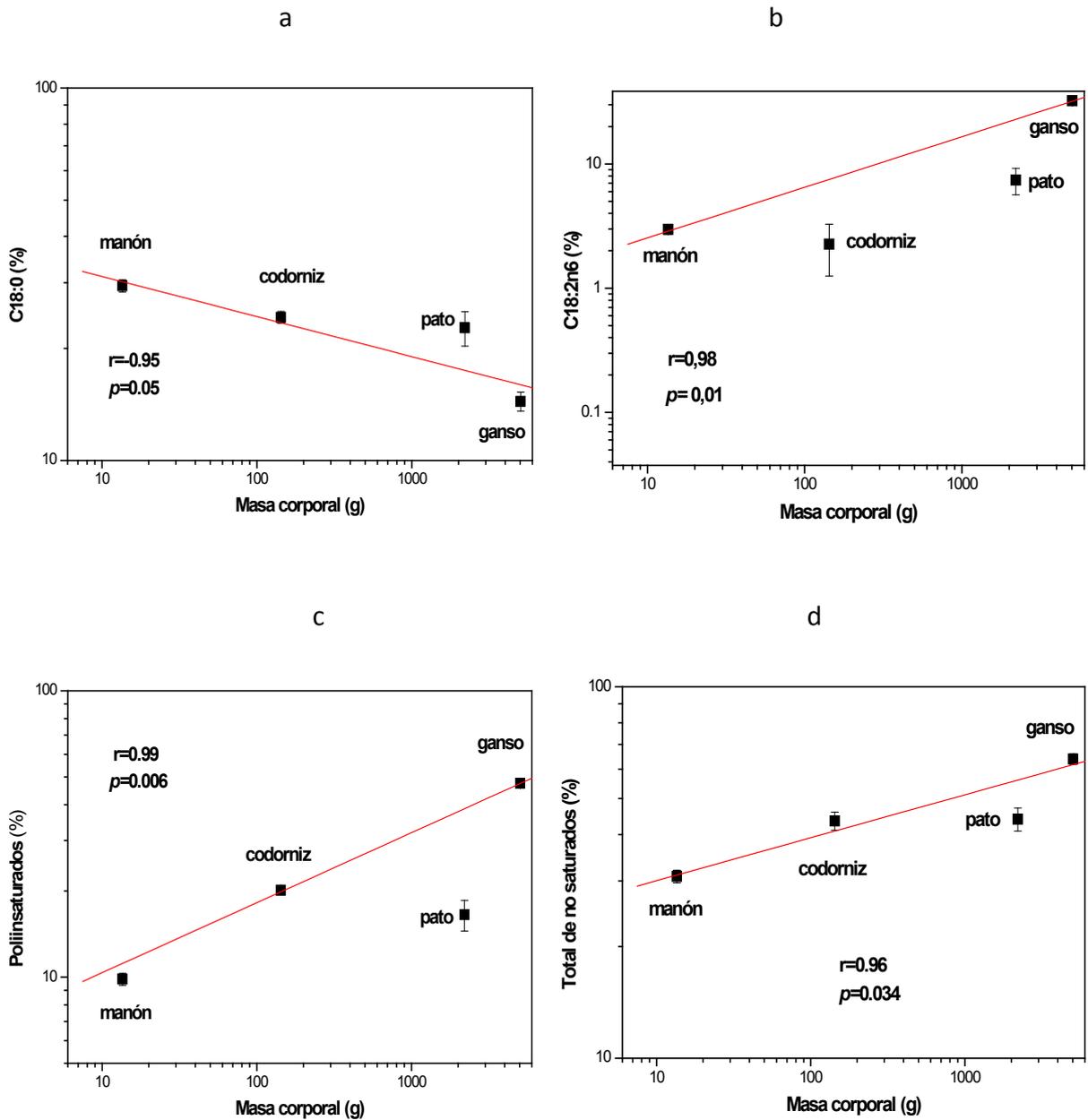


Figura X.2. Relación alométrica entre la masa corporal y el porcentaje de ácidos grasos de los microsomas de cerebro de las diferentes especies de aves. a: C18:0; b: C18:2n6; c: Poliinsaturados; d: Total de no saturados. Los datos fueron analizados a través de ecuaciones de regresión lineal. a: $y = 1.60 - 0.11 x$; b: $y = -0.001 + 0.41 x$; c: $y = 0.77 + 0.24 x$; d: $y = 1.36 + 0.11 x$.

X.2.3. Relación entre la composición de ácidos grasos y máximo de vida en mitocondrias y microsomas

El contenido de ácidos grasos monoetilénicos en los mitocondrias de cerebro fue significativamente menor ($r = -0.96$) en las aves más longevas. Los microsomas de las aves con mayor máximo de vida presentaron una disminución significativa del C18:0 ($r = -0.95$) y un aumento del C18:2n6 ($r = 0.98$), de los poliinsaturados ($r = 0.99$) y del total de no saturados ($r = 0.96$) (Tabla X.5)

X.2.4. Comparación entre el efecto de la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas y el tamaño corporal

La quimioluminiscencia fue estadísticamente significativa en mitocondrias, pero no en microsomas (Figura X. 3 y 4). Cuando se compararon las mitocondrias controles con las peroxidadas, se observó una disminución significativa del C20:4n6 y C22:6n3 (Tabla X. 2). Sin embargo, la composición de ácidos grasos de los microsomas no cambió (Tabla X. 3). Los ácidos grasos presentes en las muestras peroxidadas de ambas organelas de cerebro no mostraron tendencias significativas alométricas (Tabla X. 4). No se hallaron diferencias alométricas entre quimioluminiscencia obtenida de las fracciones subcelulares de cerebro y masa corporal de las diferentes especies de aves estudiadas (Figura X. 5 y 6).

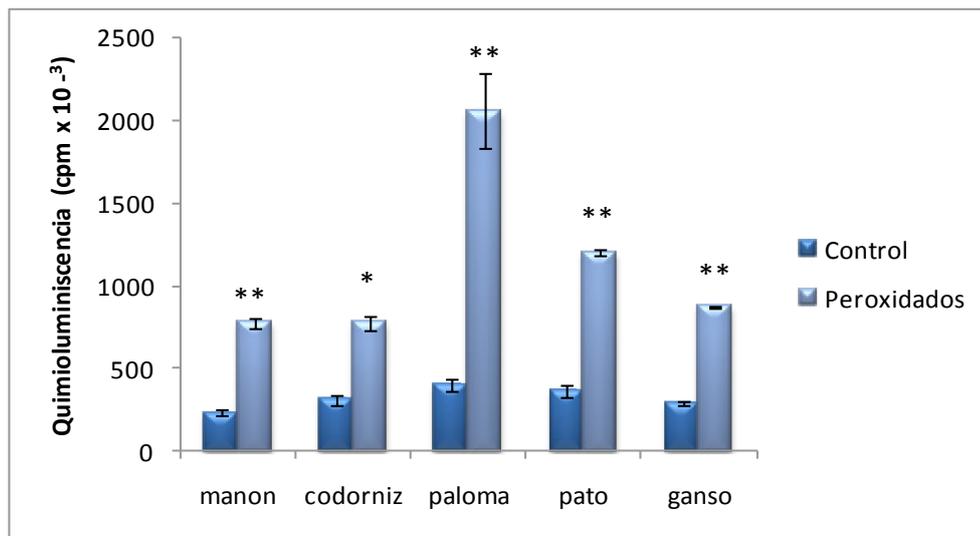


Figura X.3. Quimioluminescencia total producida por mitocondrias de cerebro (expresada como cpm/mg de proteína) de diferentes especies de aves. Los datos son expresados como la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticas entre las muestras controles y peroxidadas fueron indicadas por * $p < 0.001$; ** $p < 0.0001$.

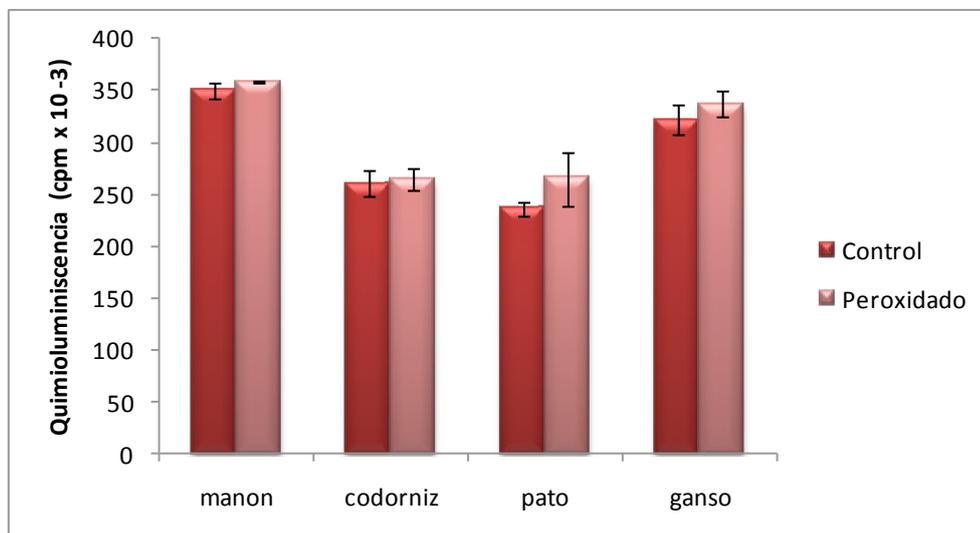


Figura X.4. Quimioluminescencia total producida por microsomas de cerebro (expresada como cpm/mg de proteína) de diferentes especies de aves. Los datos son expresados como la media \pm SD de 3 experimentos independientes.

Tabla X. 4. Resumen de las correlaciones entre la masa corporal y la composición de ácidos grasos (área %) e índices de los ácidos grasos de las mitocondrias y microsomas de cerebro de las especies de aves estudiadas

Acidos graso	Mitocondrias				Microsomas			
	control		peroxidado		control		peroxidado	
	r	p	r	p	r	p	r	P
C16:0	0.58	0.31	0.65	0.23	-0.30	0.70	-0.79	0.20
C16:1 n7	0.54	0.46	0.49	0.51	0.89	0.11	0.90	0.10
C18:0	-0.34	0.58	0.59	0.30	-0.95	0.05	-0.87	0.12
C18:1 n9	-0.78	0.12	-0.78	0.47	-0.53	0.47	0.14	0.86
C18:2 n6	0.66	0.22	0.59	0.30	0.98	0.01	0.66	0.33
C18:3 n3	-0.95	0.21	-0.96	0.17	-0.91	0.08	-0.82	0.18
C20:4 n6	0.26	0.67	0.41	0.49	-0.79	0.21	0.39	0.61
C22:6 n3	-0.12	0.84	0.33	0.58	0.11	0.89	-0.78	0.22
SFA	-0.39	0.52	0.67	0.22	-0.48	0.52	-0.78	0.22
MUFA	-0.96	0.01	-0.87	0.12	0.31	0.69	-0.43	0.57
PUFAs	0.62	0.26	0.69	0.20	0.99	0.01	-0.70	0.30
UFA	0.55	0.34	0.65	0.23	0.96	0.03	-0.92	0.08
UI	0.86	0.06	0.70	0.20	0.92	0.08	0.58	0.42
PI	0.39	0.51	0.52	0.37	0.70	0.30	-0.22	0.77

Tabla X. 5. Resumen de las correlaciones entre el máximo de vida y la composición de ácidos grasos (área %) e índices de los ácidos grasos de mitocondrias y microsomas de cerebro de las especies de aves estudiadas

Ácido graso	Mitocondrias				Microsomas			
	control		peroxidado		control		peroxidado	
	r	p	r	p	r	p	r	p
C16:0	0.58	0.31	0.65	0.24	-0.30	0.70	-0.80	0.20
C16:1n7	0.54	0.46	0.49	0.51	0.89	0.11	0.90	0.10
C18:0	-0.34	0.58	0.59	0.30	-0.95	0.05	-0.87	0.12
C18:1n9	-0.78	0.12	-0.78	0.43	-0.53	0.47	0.14	0.86
C18:2n6	0.66	0.22	0.59	0.30	0.98	0.01	0.66	0.33
C18:3n3	-0.95	0.21	-0.96	0.17	-0.92	0.08	-0.82	0.18
C20:4n6	0.26	0.68	0.41	0.49	-0.79	0.21	0.39	0.61
C22:6n3	-0.12	0.84	0.33	0.58	0.11	0.89	-0.78	0.22
SFA	-0.39	0.52	0.67	0.22	-0.48	0.52	-0.78	0.22
MUFA	-0.96	0.01	-0.87	0.12	0.31	0.69	0.43	0.57
PUFAs	0.62	0.26	0.70	0.20	0.99	0.01	0.70	0.30
UFA	0.55	0.34	0.65	0.23	0.96	0.03	0.92	0.08
UI	0.86	0.06	0.69	0.20	0.92	0.08	0.58	0.42
PI	0.39	0.51	0.52	0.37	0.70	0.30	-0.22	0.77

r: coeficiente de correlación lineal de Pearson; p: significación estadística. Los números estadísticamente significativos se indican en negrita.

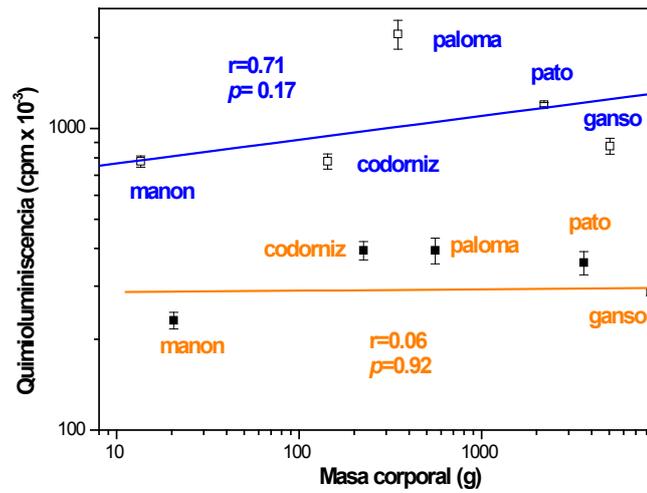


Figura X.5. Relación alométrica entre quimioluminiscencia obtenida de mitocondrias de cerebro y masa corporal de de las diferentes especies de aves estudiadas. Los datos fueron analizados a través de ecuaciones de regresión lineal. Control — $y = 2.46 + 0.004 x$; Peroxidado — $y = 2.80 + 0.08 x$

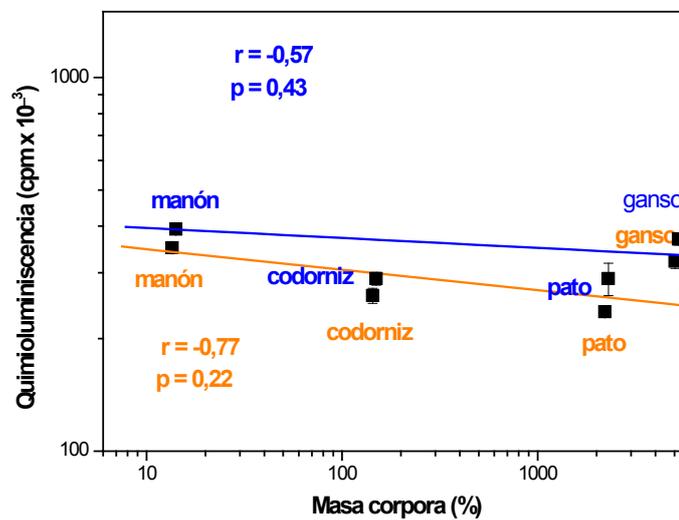


Figura X.6. Relación alométrica entre quimioluminiscencia obtenida de microsomas de cerebro y masa corporal de de las diferentes especies de aves estudiadas. Los datos fueron analizados a través de ecuaciones de regresión lineal. Control — $y = 2.59 - 0.054 x$; Peroxidado — $y = -2.58 - 0.03 x$

X.2.5. Comparación entre el efecto de la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas de cerebro y el máximo de vida

En mitocondrias (Figura X. 7) y en microsomas (los datos no se muestran) de cerebro no hubo correlación significativa entre el PI y el máximo de vida.

La relación entre sensibilidad a la peroxidación lipídica y el máximo de vida en mitocondrias no fue significativa (Figura X .7).

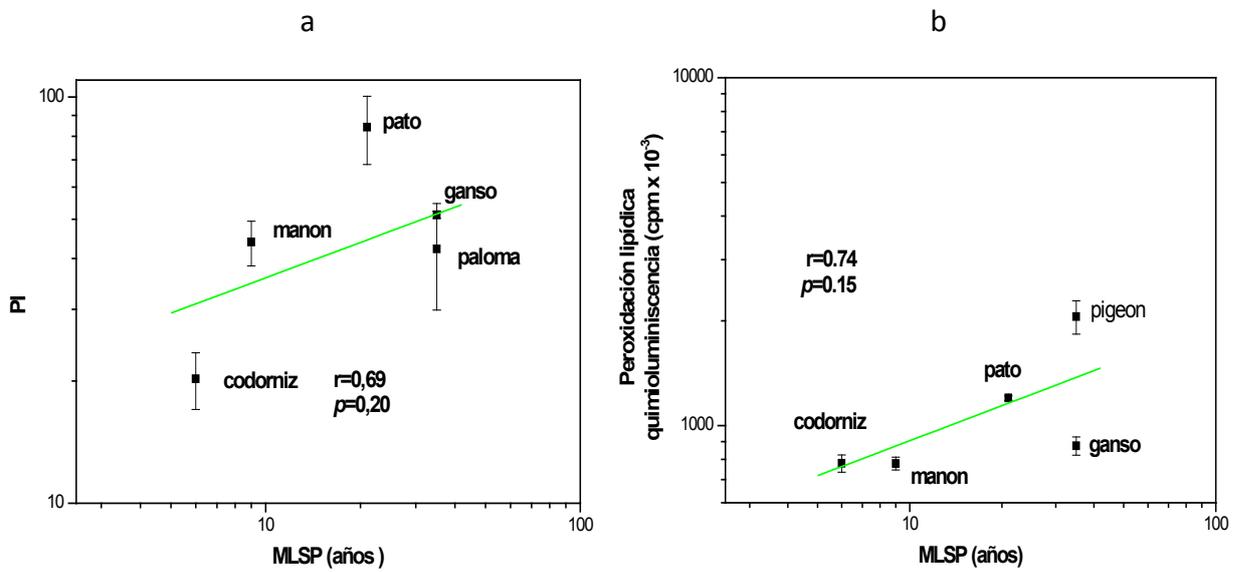


Figura X.7. Relación alométrica entre el máximo de vida (MLSP) y el índice de peroxidabilidad (PI, a) y la sensibilidad a la peroxidación lipídica (b) en mitocondrias de cerebro de diferentes especies de aves. Los datos fueron analizados a través de ecuaciones de regresión lineal. a: $y = 1.26 - 0,29 x$; b: $y = -2,62 + 0.33 x$

X.3. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que en estas cinco especies de aves, la sensibilidad a la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas de cerebro no se correlaciona con el tamaño corporal. Las organelas de cerebro de las especies de aves examinadas, al igual que las de otros vertebrados poseen altos niveles de ácido docosahexaenoico, lo que indica una alta especificidad tisular.

En mitocondrias sólo se observó una disminución significativa en el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados al aumentar el tamaño corporal. En microsomas se halló una disminución alométrica significativa del C18:0 y aumentos significativos en el C18:2n6, poliinsaturados y total de no saturados cuando aumenta el tamaño corporal. No se observaron relaciones alométricas significativas entre el contenido de C20:4n6 y C22:6n3 de mitocondrias y microsomas y la masa corporal. El análisis del MLSP y los ácidos grasos mostró que las aves más longevas poseen un perfil de ácidos grasos similar al de las aves de mayor tamaño, datos coincidentes con los hallados por otros autores (Pamplona y Barja, 2003; Pamplona y col., 1998). Por otra parte, las organelas de cerebro de todas las especies estudiadas poseen grandes cantidades de C22:6n3, siendo la concentración de este ácido graso mayor que la observada en otros tejidos (Gutiérrez y col., 2002, 2004, 2006).

A pesar de que entre los vertebrados existen pequeñas diferencias en la composición de ácidos grasos, es evidente que hay una específica y funcional necesidad de altas concentraciones de C22:6n3. De hecho, el C22:6n3 parece ser predominante en el cerebro de la mayoría de los vertebrados (Farkas y col., 2000; Turner y col., 2005a; Gutiérrez y col., 2002, 2004, 2006). A pesar de todos los cambios genómicos ocurridos en más de 500 millones años, la conservación de dicha molécula da testimonio de una exclusividad en el cerebro (Crawford, 2006). El consenso actual indica que los fosfolípidos que contienen C22:6n3 imparten fluidez y permeabilidad a las membranas de las células neuronales, por lo tanto permiten la acción de las proteínas de membrana que participan en el mecanismo de transmisión neuronal (Salem y col., 2001).

Nuestros resultados están de acuerdo con previas investigaciones realizadas en mamíferos (Couture y Hulbert, 1995) y en aves (Turner y col., 2005b; Hulbert y col., 2007) y han sido asociados con un requerimiento específico funcional del cerebro. La peroxidación

lipídica puede alterar la estructura celular de membranas modificando la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos.

La peroxidación lipídica ha adquirido una renovada atención, cada vez más pruebas muestran su participación en el envejecimiento. Es difícil la evaluación de los niveles de peroxidación lipídica *in vivo*. Esto es debido en parte a que los lípidos son oxidados por diferentes oxidantes y mecanismos y dan una variedad de productos versátiles, que pueden sufrir metabolismo y reacciones secundarias (Yoshida y col, 2007).

La quimioluminiscencia ha sido ampliamente utilizada como un indicador de formación de ROS en las células y órganos enteros, permitiendo el estudio de una serie de condiciones fisiopatológicas relacionadas con el estrés oxidativo (Roda y col., 2000).

Otro hallazgo interesante de este Capítulo es que las mitocondrias de cerebro de todas las especies de aves examinadas en un rango de 372 veces la masa corporal, exhibieron una similar sensibilidad a la peroxidación lipídica. La emisión de luz y la composición de ácidos grasos de los microsomas de cerebro no fueron afectadas por la peroxidación lipídica. Esta falta de sensibilidad observada en microsomas podría ser debido al bajo contenido de C20:4n6 y C22:6n3 y a un mayor contenido de C18:2n6 y menor índice de no saturación en comparación con las mitocondrias. Estas características hacen que los microsomas sean menos vulnerables al daño oxidativo. Una disminución de la relación C20:4 n6/C18:2n6 en microsomas también indica una actividad limitada de las enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasa.

La teoría de "marcapasos de la membrana", considerada como una extensión de la teoría del "estrés oxidativo", enfatiza la importancia de la composición de ácidos grasos de las membranas y su modificación por la peroxidación como factores determinantes del envejecimiento y del máximo de vida (Hulbert y col., 2007). Sin embargo, esta aseveración no es válida para todos los tejidos.

En este estudio hemos demostrado que las organelas de cerebro de todas las aves examinadas presentan similar contenido de C22:6n3, reforzando de esta manera evidencias anteriores acerca de una similar composición de ácidos grasos en el cerebro de los vertebrados homeotermos.

Varios estudios han evaluado la relación entre el estrés oxidativo y MLSP en diferentes especies de vertebrados. Existen evidencias que indican que hay por lo menos dos

principales características de las especies longevas: una alta tasa de reparación del ADN y una baja producción de ROS. En el presente Capítulo se observó que el PI del cerebro de las especies de aves analizadas no se correlacionó con el tamaño corporal ni con MLSP. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que el grado de no saturación es independiente de la masa corporal y del máximo de vida. Esto podría explicar el mantenimiento estructural y la integridad funcional del cerebro de las aves.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES

En esta sección se resumen las principales conclusiones extraídas de los resultados del trabajo.

Observaciones en los distintos órganos utilizados en el estudio

1. Hígado

a. Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas

Los principales ácidos grasos saturados de cadena larga fueron el C16:0 y C18:0. El ácido graso monoetilénico predominante fue el C18:1n9 y los ácidos grasos poliinsaturados mayoritarios fueron el ácido C18:2n6 y C20:4n6.

b. Relación entre la masa corporal y la composición de ácidos grasos

En mitocondrias el porcentaje de ácidos grasos saturados fue significativamente menor en las aves de mayor tamaño, el ácido graso C16:1n7 mostró la misma tendencia sin alcanzar significación estadística. Por el contrario, los ácidos grasos C18:1n9, C18:2n6, 18:3n3 así como el total de no saturados aumentaron significativamente con el tamaño. En microsomas el resultado sobresaliente fue que el ácido graso palmitoleico disminuyó significativamente mientras que el linoleico aumentó con el aumento de la masa corporal.

El UI y el PI de las organelas de hígado no mostraron relaciones significativas con la masa corporal

c. Relación entre la composición de ácidos grasos y máximo de vida (MLSP)

En cuanto a la composición de ácidos grasos y MLSP, observamos que las aves más longevas poseen mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados especialmente C18:2n6. Sin embargo, no hallamos ninguna correlación entre el PI y MLSP.

d. Susceptibilidad a la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas

Las mitocondrias y microsomas de manón, paloma y pato fueron afectadas por el proceso de peroxidación observándose en las mitocondrias peroxidadas una disminución significativa del C20:4n6 y C22:6n3. Sin embargo, las mitocondrias y microsomas de hígado

de codorniz y ganso no fueron afectadas por el proceso de lipoperoxidación consecuentemente el perfil de ácidos grasos, UI y PI no fueron modificados.

e. Relación entre peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas con el tamaño corporal y MLSP

En nuestro estudio, si bien la mayoría de las aves fueron afectadas por el proceso de lipoperoxidación, no observamos diferencias significativas en la relación quimioluminiscencia vs tamaño corporal, ni entre la quimioluminiscencia y el máximo de vida.

2. Corazón

a. Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas

En mitocondrias y microsomas, los ácidos grasos saturados de cadena larga fueron principalmente el C16:0 y el C18:0. Los ácidos grasos no saturados predominantes fueron el C18:1n9 y el C18:2n6.

b. Relación entre masa corporal y composición de ácidos grasos

Las mitocondrias de corazón de las especies de aves de mayor tamaño presentaron un mayor porcentaje de C16:1n7, indicando una correlación positiva entre ambas variables. En mitocondrias y también en microsomas el contenido C18:0 mostró una correlación negativa con la masa corporal, presentando las aves de mayor tamaño un menor contenido del ácido graso mencionado. El contenido total de ácidos grasos poliinsaturados en mitocondrias no mostró relación con la masa corporal pero sí fue evidente en los microsomas. En esta preparación también encontramos que el contenido del ácido graso C18:2n6, así como el total de ácidos grasos n6 y el UI mostraron relaciones alométricas positivas con respecto al tamaño corporal. El total de ácidos grasos n3 y específicamente el contenido de C22:6n3 de mitocondrias y microsomas no mostraron cambios significativos con respecto a la masa corporal.

c. Relación entre composición de ácidos grasos y MLSP

Encontramos correlaciones positivas entre el contenido de C16:1n7 de mitocondrias y el contenido C18:2n6 y los poliinsaturados n6 de microsomas, mostrando las aves más

longevas mayores porcentajes de dichos ácidos grasos. Una correlación negativa fue hallada tanto en mitocondrias como en microsomas con respecto al contenido de C18:0, el cual disminuyó al aumentar la MLSP.

d. Relación entre peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas con el tamaño corporal y el MLSP

Las mitocondrias y microsomas de corazón no fueron afectadas por el proceso de lipoperoxidación. El hallazgo más interesante de nuestro estudio fue que, independientemente del tamaño corporal y del máximo de vida, el corazón de todas las aves examinadas mostró una alta resistencia a la peroxidación lipídica. Este comportamiento podría estar contribuyendo a la preservación de la función cardíaca.

3. Cerebro

a. Composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas

Los principales ácidos grasos saturados fueron el C16:0 y el C18:0. El ácido monoetilénico predominante fue el C18:1n9 y los ácidos grasos poliinsaturados mayoritarios fueron el C20:4n6 y el C22:6n3. Es de destacar que, al igual que en otros vertebrados, el cerebro de todas las aves aquí examinadas poseen altos niveles de C22:6n3, siendo la concentración de este ácido graso mayor que la observada en otros tejidos. Estos resultados indican que este ácido graso contribuye en el mantenimiento de la fluidez y permeabilidad de la membrana neuronal condiciones necesarias para cumplir adecuadamente con la transmisión de los impulsos eléctricos.

b. Relación entre masa corporal y composición de ácidos grasos

En mitocondrias, sólo se observó una disminución significativa en el porcentaje de ácidos grasos monoetilénicos al aumentar el tamaño corporal. En microsomas se observaron aumentos significativos en el C18:2n6, poliinsaturados y total de no saturados con el aumento el tamaño corporal. En mitocondrias y en microsomas el contenido de C20:4 n6, C22:6n3, UI y PI no mostraron cambios significativos con el aumento de la masa corporal.

c. Relación entre composición de ácidos grasos y MLSP

El análisis del MLSP y la composición de los ácidos grasos muestran que las aves más longevas poseen un perfil de ácidos grasos similar al de las aves de mayor tamaño.

d. Susceptibilidad a la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas

Las mitocondrias de cerebro de todas las aves examinadas en este estudio fueron susceptibles a la lipoperoxidación, efecto que puede atribuirse al alto contenido de C20:4n6 y C22:6n3. Sin embargo, los microsomas de cerebro no fueron afectados por la peroxidación lipídica. Esta falta de sensibilidad podría ser debido al bajo contenido de C20:4n6 y C22:6n3, y a un mayor contenido de C18:2n6 y menor UI. Estas características harían que los microsomas sean menos vulnerables al daño oxidativo.

e. Relación entre peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas con el tamaño corporal y MLSP

La sensibilidad a la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas de cerebro no se correlaciona con el tamaño corporal ni con el MLSP. Por lo tanto, nuestros resultados ponen en evidencia que el alto grado de no saturación predominante en el cerebro es independiente de la masa corporal y del MLSP, lo que podría explicar el mantenimiento estructural y la integridad funcional del cerebro en todas las aves.

CONCLUSIONES GENERALES SOBRE LAS AVES ESTUDIADAS

- ✓ Los ácidos grasos saturados predominantes fueron el C16:0 y C18:0 y los no saturados mayoritarios fueron el C18:1n9, C18:2n6 y C20:4n6. Hubo un predominio de los PUFAs n6 sobre los n3.
- ✓ Aunque el porcentaje total de ácidos grasos no saturados fue similar en todos los órganos estudiados, la contribución de cada uno fue diferente. Es así que en hígado y corazón prevalecieron los ácidos grasos con bajo grado de no saturación por sobre los altamente no saturados como el C22:6n3. Sin embargo, en cerebro, hubo predominio de este ácido graso, lo que estaría en relación con su rol específico en las células excitables.

- ✓ Por otro lado, sólo algunos de los ácidos grasos mostraron tendencias alométricas. En las aves de mayor tamaño hallamos un menor contenido del ácido graso C18:0 y un mayor contenido de C18:2n6.
- ✓ El análisis del MLSP y la composición de los ácidos grasos muestran que las aves más longevas poseen un perfil de ácidos grasos similar al de las aves de mayor tamaño.
- ✓ La sensibilidad a la peroxidación lipídica no se correlaciona con el tamaño corporal ni con el MLSP.
- ✓ De las relaciones anteriores surge que el ácido graso C18:2n6 sería muy importante en las aves y estaría cumpliendo un papel protector contra la peroxidación lipídica.

Bibliografia

Ames, B.N., Hollstein, M.C., Cathcart, R. (1982) Lipid peroxidation and oxidative damage to DNA, in : K. Yagi (ed), *Lipid peroxides in Biology and Medicine*, Academic Press, New York, pp. 339

Ames, B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221: 1256-1264.

Andziak, B., O'Connor, T.P.; Buffenstein, R. (2005). Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Mech. Ageing Dev.* 126:1206-1212.

Andziak, B., Buffenstein, R. (2006) Disparate patterns of age-related changes in lipid peroxidation in long-lived naked mole-rats and shorter-lived mice. *Aging Cell.* 5: 525–532.

Aruoma, O.I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 32:671-683.

Austad, S.N. (1997). Birds as models of aging in biomedical research. *ILAR J.* 38: 137-141.

Austad, S.N. (2001). Exceptional cellular resistance to oxidative damage in long-lived birds requires active gene expression. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 56:B468-B474

Babior, B.M. (1978). Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 298: 659-668.

Barja, G., Cadenas, S., Rojas, C., López-Torres, M., Pérez-Campo, R. (1994 a). A decrease of free radical production near critical targets as a cause of maximum longevity in animals. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 108: 501-512.

Barja, G., Cadenas, S., Roja, C., Pérez-Campo, R., López-Torres, M. (1994 b). Low mitochondrial free radicals production per unit O₂ consumption can explain the

simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Rad. Res.* 21: 317-328.

Barja, G. (1998). Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 854: 224–238.

Barja, G. (2004). Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 79: 235–251.

Benedict, F.G. (1938). *Vital Energetics: A Study in Comparative Basal Metabolism.* Washington, DC: Carnegie Institute of Washington.

Bielsky, B.H., Gebieki, J.M. (1977). Application of radiation chemistry to biology. *Free radicals in biology.* P.W.A., Academic Press. 3: 1-19.

Brand, M.D., Turner, N., Ocloo, A.; Else, P.L., Hulbert, A.J. (2003). Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem. J.* 376: 741–748.

Bonorden, W.R., Pariza, M.W. (1994). Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In F. N. Kotsonis (Ed.), *Nutrition toxicology* (pp. 19–45). Raven Press.

Boveris, A., Costa, L.E., Cadenas, E., Poderoso, J.J. (1999). Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen and nitric oxide. *Methods Enzymol.* 301: 188-198.

Brenner, R.R. (1984). Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics. *Progr. Lipid. Res.* 23: 69-96.

Brown G.C., Borutaite V. (2012). There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion.* 12(1):1-4.

Buffenstein, R., Edrey, Y.H., Yang, T. Mele, IJ. (2008). The oxidative stress theory of aging: Embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. *Age (Dordr)* 30:99-109.

Buffenstein, R. (2008). Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. *J. Comp. Physiol. B* 178: 439-445.

Calder, W.A. (1985). The comparative biology of longevity and lifetime energetics. *Exp. Gerontol.* 20: 161-170.

Calder, W.A. (1996). *Size, Function, and Life History*. New York: Dover.

Carey, J.R, Judge, D.S. (2000). *Longevity Records*. Odense, Denmark: Odense Univ. Press.

Catalá, A., Arcemis, C., Cerruti, A. (1994) Interaction of rat liver microsomes containing saturated and unsaturated fatty acids with fatty acid binding protein: peroxidation effect. *Mol. Cell. Biochem.* 137: 135-139.

Catalá, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. Review. *Chem. Phys. Lipids* 157: 1-11.

Catalá, A.: (2010). A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. *Biochem. Biophys Res Commun* 399: 318-323.

Catalá, A. (2011). Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina Invited Review Special Issue, Elite Edition, Eye and oxidation stress. *Front. Biosci.* S3, 52-60.

Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49(3): 588-603.

Comporti, M. (1985) Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.* 53: 599-623.

Cohen, A.A., McGraw, K.J. Wiersma, P. Williams, J.B., Robinson, W.D., Robinson, T.R., Brawn, J. D , Ricklefs, R. E. (2008). Interspecific associations between circulating antioxidant levels and life-history variation in birds. *Am. Nat.* 172:178–193

Coon, M.J. (2003). Multiple oxidants and multiple mechanisms in cytochrome P450 catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312:163-168.

Couture, P., Hulbert, A.J. (1995). Membrane fatty acid composition is related to body mass in mammals. *J. Membr. Biol.* 148: 27-39.

Crawford, M.A. (2006). Docosahexaenoic acid in neural signaling systems. *Nutr. Health* 18: 263-276.

Cutler, R.G. (1985). Peroxide-producing potential of tissues: inverse correlation with longevity of mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4798-4802.

Davies K. J, Quintanilha A. T., Brooks G.A., Packer L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31: 107(4):1198-205.

Deno, P.C. (1982). Free radical mechanisms involved in the formation of sequence-dependent bristanded DNA lesions by the antitumor antibiotics bleomycin. *Chem. Res. Toxicol.* 5(3): 311-332.

Dmitriev, L.F., (2001). Activity of key enzymes in microsomal and mitochondrial membranes depends on the redox reactions involving lipid radicals. *Membr. Cell Biol.* 14: 649-662.

Doroshov, J. and Hochstein, P. (1982). Redox cycling and the mechanism of action of

antibiotics in neoplastic diseases. *Pathology of Oxygen*. New York, Academic Press: 245-253.

Else, P. L., Wu, B.J. (1999). What role for membranes in determining the higher sodium pump molecular activity of mammals compared to ectotherms. *J.Comp. Physiol. B* 169: 296-302.

Else, P.L., Hulbert, A.J. (1985). Mammals: an allometric study of metabolism at tissue and mitochondrial level. *Am. J. Physiol .Regul. Integr. Comp. Physiol.* 248: R415–R421.

Enoch, H.G., Catalá, A, Strittmatter, P. (1976) Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J. Biol .Chem.* 251: 5095-5103.

Farkas, T., Kitajka, K., Fodor, E., Csengeri, I., Lahdes, E., Yeo, Y.K., Krasznai, Z., Halver, J.E. (2000). Docosahexaenoic acid-containing phospholipid molecular species in brains of vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 6362–6366.

Fenton, H.J. (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 65: 899-910.

Finch, C.A. (1990). Longevity, Senescence and the Genome. *University of Chicago Press*, Chicago II.

Folch, J., Lees, N., Sloane Stanley, G.A. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.

Freeman, B.A., Crapo, J. (1982). Biology of disease: Free radicals and tissue injure. *Lab. Invest* 47: 412-426.

Frei, B. (1994). Reactive oxygen species antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am. J. Med.* 97(3A): 5S-13S.

Fridovich, I. (1986). Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. Free radicals in biology. 1. Pryor W.A. (ed) New York, Academic Press: 239-246.

Galis, F., Van Der Sluijs, I., Van Dooren, T.J., Metz, J.A., Nussbaumer, M. (2007). Do large dogs die young? *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 308B: 119-126.

Gill, F.B. (2007) *Ornithology, 3rd ed. New York: W. H. Freeman and Co.*

Gudbjarnarson, S.B., Doell, G., Oskardottir, G., Hallgrimsson, J. (1978). Modification of cardiac phospholipids and catecholamine stress tolerance in *C. de Duve and O. Hayaishi, eds. Tocopherol, Oxygen and Biomembranes. Elsevier, Amsterdam.* pp. 297-310

Guéraud, F., Paris, A. (1997). Hepatic microsomal membrane lipidic composition and growth hormone effect in adult male rat: evidence for a "feminization" process of total phospholipid fatty acid pattern. *Biochim. Biophys. Acta* 1329: 97-110.

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Arcemis, C.J., Catalá, A. (2000). Nonenzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria isolated from liver and heart of pigeon and rat. *Int. J. Biochem. Cell Biochem.* 32:73-79.

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Catalá, A. (2002). Fatty acid profiles and lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from liver, heart and brain of *Cairina moschata*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34:605-612.

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Mosca, S.M., Catalá, A. (2004). Fatty acid composition and lipid peroxidation induced by ascorbate-Fe²⁺ in different organs of goose (*Anser anser*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 137:123-132.

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Mosca, S.M., Catalá, A. (2006). A low degree of fatty acid unsaturation leads to high resistance to lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of different organs of quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Mol. Cell. Biochem.* 282:109-115.

Haber, F., Weiss, J. (1934). The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London.* 147:332-351.

Hackett, S.J., R.T., Kimball, S., Reddy, R.C., Bowie, K., Braun, E.L. , Braun, M.J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K.L., Harshman, J., Huddleston, C. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F.H., Steadman, D. W., Witt, C. C., Yuri, T. (2008). A Phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320, 1763 (2008); DOI: 10.1126/science.1157704.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.

Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Commun.* 9:1–32.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?. *Lancet* 344: 721-724.

Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16: 33-50.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free radicals in biology and medicine*, 3rd edn. Oxford, UK: Oxford University Press.

Halliwell, B, Gutteridge, J.M. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine (3rd ed.)*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press.

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11: 298–300.

Harman, D. (2001). Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci.* 928:1-21.

- Hemmingsen, A.M. (1960). Energy metabolism as related to body size and respiratory surfaces and its evolution. *Rept. Steno Meml. Hosp. Nord. Insulin Lab.* 9: 1-110.
- Hill, R.W., Whyse, G.A., Anderson, M. (2006) *Fisiología Animal. Ed. Médica Panamericana*.pp. 1038.
- Hsieh, R.J., Kinsella, J.E. (1989). Oxidation of polyunsaturated fatty acids: Mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. *Adv. Food Nutr. Res.* 33: 233-241.
- Hoch, F.L. (1992). Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim. Biophys. Acta* 1113: 71-133.
- Holloszy, J.O.; Smith, E.K.; Vining, M., Adams, S. (1985). Effect of voluntary exercise on longevity of rats. *J. Appl. Physiol.* 59: 826–831.
- Holman, R.T. (1954). Autoxidation of fats and related substances. In: *Holman, R.T., Lundberg, W. O., Malkin, T. (Eds.), Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids*, vol. 2. Pergamon Press, London, pp. 51- 98.
- Holmes, D. J., Austad S. N. (1995a). Birds as animal models for the comparative biology of aging: A prospectus. *J. Gerontol. A* 50: B59-B66.
- Holmes, D. J., Austad, S. N. (1995b). The evolution of avian senescence patterns: Implications for understanding primary aging processes. *Amer. Zool.* 35:307-317.
- Holmes, D.J, Flückiger, R., Austad, S. (2001). Comparative biology of aging in birds: an update. *Exp. Gerontol.* 36: 869-883.
- Holmes, D.J., Ottinger, M.A. (2003). Birds as long-lived animal models for the study of aging. *Exp. Gerontol.* 38: 1365–1375.

- Holmes, D., Martin, K. (2009). A Bird's-eye View of Aging: What's in It for Ornithologists? *Auk* 126(1):1-23.
- Hsieh, R.J., Kinsella, J.E. (1989). Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanism, products, and inhibition with emphasis on fish. *Adv. Food Nutr. Res.* 33: 233-241.
- Hulbert, A.J., Else, P.L. (1999). Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J. Theor. Biol.* 199: 257–274.
- Hulbert, A.J., Else, P.L. (2000). Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Annu. Rev. Physiol.* 62: 207-235.
- Hulbert, A.J., Faulks, S., Buttemer, W.A., Else, P.L. (2002a) Acyl composition of muscle membranes varies with body size in birds. *J. Exp. Biol.* 205: 3561-3569.
- Hulbert, A.J., Rana, T., Couture, P. (2002b). The acyl composition of mammalian phospholipids: an allometric analysis. *Comp. Biochem. Physiol. B* 132:515-527.
- Hulbert, A.J. (2005a). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.* 234: 277-288.
- Hulbert, A.J., Else, P.L. (2005b). Membranes and the setting of energy demand. *J. Exp. Biol.* 208: 1593-1599.
- Hulbert, A.J., Turner, N., Storlien, L.H., Else, P.L. (2005c) Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev* 80: 155-169.
- Hulbert, A.J., Faulks, S.C., Harper, J.M, Miller, R.A., Buffenstein, R. (2006a). Extended longevity of wild-derived mice is associated with peroxidation-resistant membranes. *Mech. Ageing. Dev.* 127:653-7.

Hulbert, A.J., Faulks, S.C.; Buffenstein, R. (2006b). Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 61:1009 -1018.

Hulbert, A.J. (2007a) Membrane fatty acids as pacemakers of animal metabolism. *Lipids* 42(9):811-819.

Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R., Buttemer, W.A. (2007b). Life and death: metabolic rate, membrane composition and life span of animals. *Physiol. Rev.* 87:1175-213.

Hulbert, A.J. (2010). Metabolism and longevity: Is there a role for membrane fatty acids? *Integr. Comp. Biol.* 1-10.

Hulbert, A.J., Kelly, M.A., Abbott, S.K. (2014). Polyunsaturated fats, membrane lipids and animal longevity. *J. Comp. Physiol. B* 184:149–166.

Ichinose, T., Miller, M.G., Shibamoto, T. (1989). Gas chromatographic analysis of free and bound malonaldehyde in rat liver homogenates. *Lipids* 24: 895-898.

Jaensch, S., Cullen, L., Morton, L., Raidal, S. R. (2001). Normobaric hyperoxic stress in budgerigars: Non-enzymic antioxidants. *Comp. Biochem. Physiol. C* 128:181-187.

Jimenez, A.G., Cooper-Mullin, C., Calhoon, E. A. Williams, J. B. (2014). Physiological underpinnings associated with differences in pace of life and metabolic rate in north temperate and Neotropical birds. *J Comp Physiol B* 184:545–561

Kensler, T.W., Trush, M.A. (1984). Role of oxygen radicals in tumor promotion, *Environ. Mutagen.* 6: 593-616.

King, J.R., Farner, D.S. (1961) .Energy metabolism, thermoregulation and body temperature. In: *Biology and Comparative Physiology of Birds*, edited by Marshall AJ. New York: Academic

pp.215-288.

Kleiber, M. (1961). *The Fire of Life. New York: John Wiley and Sons.*

Kobayashi, T., Shimizugawa, T., Fukamizu, Y., Huang, M.Z., Watanabe, S., Okuyama, H.(1996). Assessment of the possible adverse effects of oils enriched with n-3 fatty acids in rats; peroxisomal proliferation, mitochondrial dysfunctions and apoplexy. *J. Nutr. Biochem.* 7: 542-548.

Kosugi, H., Kojima, T., Kikugawa, K. (1989). Thiobarbituric acid-reactive substances from peroxidized lipids. *Lipids* 24: 873-881.

Ku, H.H., Brunk, U.T., Sohal. (1993). Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad. Biol. Med.* 15:621-627.

Ku, H., Sohal, R.S. (1993). Comparison of mitochondrial prooxidant generation and antioxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. *Mech Ageing Dev.* 72: 67-76.

Laganier, S., Yu, B.P., 1990. Studies on membrane lipid peroxidation in omega-3 fatty acidified autoimmune mice: effect of vitamin E supplementation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 262:95-102.

Lambert, A. J., Boysen, H. M., Buckingham, J. A., Yang, T., Podlutzky, A., Austad, S. N., Kunz, T. H., Buffenstein, R., Brand, M. D. (2007). Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell.* 6:607-618.

Lasiewski, R.C., Dawson, W.R. (1967). A re-examination of the relation between standard metabolic rate and body weight in birds. *Condor* 69: 13-23.

Lee, I.M.; Hsieh, C.C.; Paffenbarger, R.S. (1995). Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study. *J. Am. Med. Assoc.* 273: 1179-1184.

Liang, H., Masoro, E.J., Nelson, J.F., Strong, R., McMahan, C.A., Richardson, A. (2003). Genetic mouse models of extended lifespan. *Exp. Gerontol.* 38: 1353-1364.

Lindstedt, S.L., Calder, W.A. (1976). Body size and longevity in birds. *Condor* 78: 91-145.

López-Torres, M., Pérez-Campo R, Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G. (1993). Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H₂O₂, basal and maximum aerobic capacity. *Mech. Ageing Dev.* 70: 177-199.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

McCormack, J.E, Harvey, M.G., Faircloth, B.C, Crawford, N.G., Glenn, T.C., et al. (2013) A Phylogeny of Birds Based on Over 1,500 Loci Collected by Target Enrichment and High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 8(1): e54848. doi:10.1371/journal.pone.0054848.

McKechnie, A.E., Wolf, B.O. (2004) .The allometry of avian basal metabolic rate: good predictions need good data. *Physiol. Biochem. Zool.* 77: 502-521.

Mason, R. P. (1982). Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. *Free radicals biology.* W. A. Pryor. New York, Academic Press: 262-165.

Masoro, E.J. (2002). Caloric Restriction: A Key to Understanding and Modulating Aging. Amsterdam: Elsevier.

Masoro, B., Austad. S.N., (2005). (eds). *Handbook of the Biology of Aging*, Sixth Edition

(Handbooks of Aging) (Hardcover). Academic Press.

Miller, R.A., Harper, J.M., Dysko, R.C., Durkee, S.J., Austad, S.N. (2002). Longer life spans and delayed maturation in wild-derived mice. *Exp. Biol. Med.* 227:500–508.

Nakamura, M. T., Naran, T. Y. (2003). Essential fatty acid its regulation in mammals. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 68: 145-150.

Mitchell, T.W.; Buffenstein, R.; Hulbert, A.J. (2007). Membrane phospholipid composition may contribute to exceptional longevity of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): a comparative study using shotgun lipidomics. *Exp. Gerontol.* 42:1053–1062.

Montgomery, M.K., Hulbert, A.J., Buttemer, W.A. (2011) The Long Life of Birds: The Rat-Pigeon Comparison *Revisited*. *PLoS ONE* 6(8): e24138. doi:10.1371/journal.pone.0024138

Montgomery, M.K., Hulbert, A.J., Buttemer, W.A. (2012). Metabolic rate and membrane fatty acid composition in birds: a comparison between long-living parrots and short-living fowl. *J. Comp. Physiol. B* 182:127–137

Moreau, R., Nguyen, B.T., Doneanu, C.E., Hagen, T.M. (2005). Reversal by aminoguanidine of the age-related increase in glycoxidation and lipoxidation in the cardiovascular system of Fischer 344 rats. *Biochem. Pharmacol.* 69: 29-40.

Morrison, W.R. Smith, L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid. Res.* 5:600-608

Ogburn, C.E., Carlberg, K., Ottinger, M.A., Holmes, D.J., Martín, G.M., Austad, S.N. (2001). Exceptional cellular resistance to oxidative damage in long-lived birds requires active gene expression. *J. Gerontol., Ser. A, Biol. Sci. Med. Sci.* 56: B468-B474.

Ottinger, M.A. (1991). Neuroendocrine and behavioral determinants of reproductive aging.

Crit. Rev. Poultry Biol. 3: 131-142.

Ottinger, M.A. (2001). Quail and other short-lived birds. *Exp. Gerontol.* 36: 859-868.

Ozgoval, S., Hermanek, J., Gut, I. (2003). Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochem. Pharmacol.* 66:1127-1137.

Pamplona, R., Prat, J., Cadenas, S., Rojas, C., Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., Barja, G. (1996). Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and the human case. *Mech. Ageing Dev.* 86:53-66. 1996

Pamplona, R.; Portero-Otin, M.; Riba, D.; Ruiz, C., Prat, J., Bellmunt, M.J.; Barja, G. (1998). Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J. Lipid Res.* 39:1989-1994.

Pamplona, R., Portero-Otin, M., Riba, D., Ledo, F., Gredilla, R., Herrero, A., Barja, G. (1999 a). Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, aging rate are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Aging Clin. Exp. Res.* 11: 44-49.

Pamplona, R., Portero-Otin, M., Requena, J.R., Thorpe, S.R., Herrero, A., Barja, G. (1999b). A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech. Ageing Dev.* 106: 283-296. 1999b.

Pamplona, R., Portero-Otin, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A., Barja, G. (1999 c). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech. Ageing Dev.* 112: 169-183.

Pamplona, R. M., Portero-Otín, M., Riba, D., Requena, J.R., Thorpe, S.R., López-Torres, M., Barja, G. (2000). Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative

modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55:B286-291

Pamplona, R., Barja, G., Portero-Otin, M., 2002. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span. A homeoviscous-longevity adaptation?. *Ann. NY Acad. Sci.* 959:475–490.

Pamplona, R., Barja, G. (2003). Aging rate, free radical production, constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from comparative studies. In: *Biology of Aging and Its Modulation Series. Aging at the Molecular Level*, edited by T. von Zglinicki. Dordrecht, Netherlands: Kluwer. vol. 1, pp. 47-64.

Pamplona, R., Barja, G. (2007). Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res. Rev.* 6:189-210.

Patronek, G.J., Waters, D.J., Glickman, L.T. (1997) Comparative longevity of pet dogs and humans: implications for gerontology research. *J. Gerontol.* 52: B171-B178.

Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G. (1994). Longevity and antioxidant enzymes, non-enzymatic antioxidants and oxidative stress in the vertebrate lung: a comparative study. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 163: 682-689.

Pérez-Campo, R.M., Lopez-Torres, S., Cadenas, C., Rojas, Barja, G. (1998). The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: Evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B* 168:149-158.

Pérez Zaballo, J., Díaz, J.A., García Moreno, A. (2009). Modelos adaptativos en Zoología (Manual de prácticas) Tamaño, forma y alometría. *Reduca (Biología). Serie Zoología.* 2 (2): 20-30.

Porter, R.K., Hulbert, A.J., Brand, M.D. (1996). Allometry of mitochondrial proton leak:

influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 271:R1550-R1 560.

Poulos, A. (1995). Very long chain fatty acids in higher animals—A 1062 review. *Lipids*. 30: 1-14.

Reynolds, P.S., Lee, R.M. (1996). Phylogenetic analysis of avian energetics: passerines and non-passerines do not differ. *Am. Nat.* 147: 735-759.

Ricklefs, R. E. 2008. The evolution of senescence from a comparative perspective. *Funct. Ecol.* 22:379-392.

Roda, A., Pasini, P., Guardigli, M., Baraldini, M., Musiani, M., Mirasoli, M. (2000). Bio and chemiluminescence in bioanalysis. *J. Anal. Chem.* 366:752-759.

Rubner, M. (1908). *Das Problem der Lebensdauer*. Munich: Oldenburg.

Rubner, M. (1883) Uber den Einfluss der Korpergrosse auf stoff- und kraft-wechsel. *Z Biol* 19: 535-562.

Salem, N., Litman, Jr., Kim, H.Y., Gawrisch K., (2001). Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36: 945-959.

Sanz A., Pamplona R., Barja G., (2006). Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid. Redox Signal* 8: 582-99. Review.

Sastre, J., Rodriguez, J.V., Pallardo, F.V., Gasco, E., Asensi, M., Ferrer, J.V., Miquel, J., Vina, J. (1992). Effect of aging on metabolic zonation in rat liver: acinar distribution of GSH metabolism. *Mech. Ageing Dev.* 62(2): 181-90.

Schmidt-Nielsen, K. (1984). *Scaling: Why is Animal Size so Important?* Cambridge: Cambridge

University Press. pp. 241.

Schmidt-Nielsen K. *Animal Physiology: (1990). Adaptation and Environment (4th ed.)*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.

Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem.* 25: 1058-1071.

Simic, M. G. and Taylor, K. A. (1988). Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. *Oxygen radicals in biology and medicine*. M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag, Ed. Plenum Press.

Slater, T F. (1984). Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem. J.* 222: 1-15.

Sohal, R.S., Svensson, I., Sohal, B.H., Brunk, U.T. (1989). Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech. Ageing Dev.* 49:129-135.

Sohal, R.S., Svensson, I., Brunk, U.T. (1990). Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species. *Mech. Ageing Dev.* 53: 209-215.

Speakman, J.R., van Acker, A., Harper, E.J. (2003). Age-related changes in metabolism and body composition of three dog breeds and their relationship to life expectancy. *Aging Cell* 2: 265-275.

Speakman, J.R., Talbot, D.A., Selman, C., Snart, S., McLaren, J.S, Redman, P., Krol, E., Jackson, D.M., Johnson, M.S., Brand, M.D. (2004). Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell* 3: 87-95.

Speakman, J. R. (2005) Body size, energy metabolism and lifespan. *J. Exp. Biol.* 208: 1717-1730.

Spector, A. A. (1999). Essentiality of fatty acids. *Lipids*, 34, S1-S3.

- Svingen, B.A, Buege, J.A, O'Neal, F.O, Aust, S.D. (1979). The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 254:5892-5899.
- Tanger, O., Jonsson, J., Orrenius, S. (1973). Isolation of rat liver microsomes by gel filtration. *Anal. Biochem.* 54: 597-603.
- Turner, N., Haga, K.L., Hulbert, A.J., Else, P.L. (2005a). Relationship between body size, Na⁺-K⁺-ATPase activity, and membrane lipid composition in mammal and bird kidney. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288:R301–R310.
- Turner, N., Else, P. L., Hulbert, A.J. (2005b). An allometric comparison of microsomal membrane lipid composition and sodium pump molecular activity in the brain of mammals and birds. *J. Exp. Biol.* 208: 371-381.
- Turner, N., Haga, K., Else, P., Hulbert, A. (2006). Scaling of Na, K-ATPase Molecular Activity and Membrane Fatty Acid Composition in Mammalian and Avian Hearts. *Physiol. Biochem. Zool.* 79(3): 522-533
- Vaca, C.E., Wilhem, J., Harms- Ringdahl, M. (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. *Mutat. Res.* 195: 137-149.
- Vigh, L., Los, D.A., Horvath, Muirata, N. (1993). The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the desA gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA.* 90: 9090-9094.
- Vladimirov, Y. A., Olenev, V. I., Suslova, T. B. and Cheremisina, Z. P. (1980). Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lip. Res.* 17: 173-249.

U.S. Public Health Service, (1985). U.S. Public Health Service, Guide to the care and use of laboratory animals. *National Institutes of Health, Bethesda, M.D.* 85–123.

White, C.R., Seymour, R.S. (2003). Mammalian basal metabolic rate is proportional to body mass^{2/3}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4046-4049.

Wolff, S.P., Dean, R.T. (1986). Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem. J.* 1; 234(2):399-403.

Wright, J.R., Rumbaugh, R.C., Colb, H.D., Miles, P.R. (1979). The relationship between chemiluminescence and lipid peroxidation in rat hepatic microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 192: 344-351.

Yoshida, Y., Saito, Y., Hayakawa, M., Imai, Y., Niki, E. (2007). Levels of lipid peroxidation in human plasma and erythrocytes: comparison between fatty acids and cholesterol. *Lipids* 42: 439-449.

Zimniak, P. (2011). Relationship of electrophilic stress to aging. *Free Radic. Biol. Med.* 51: 1087-1105. Review.