

EL ACEITE DE OLIVA DISMINUYE LA LIPOPEROXIDACIÓN EN EL RIÑÓN DE LA RATA

ROBERTO CHARLES C.¹, SEBASTIÁN LARRAÍN C.², CRISTIÁN GUICHARD T.³,
PATRICIO HENRÍQUEZ H.⁴, DR. RAMÓN RODRIGO S.⁵, DRA. JULIA ARAYA A.⁶

OLIVE OIL IS RELATED WITH LIPID PEROXIDATION DECREASEMENT IN RAT KIDNEY

Background: Olive oil (OO) contains antioxidant compounds (polyphenols) that may protect biologic membranes from oxidative stress in vulnerable organs such as the kidney. The aim of this study was to determinate whether OO has antioxidant effects in the rat kidney.

Materials and Methods: Wistar male rats fed a diet containing 10% (w/w) OO, for a period of 6 weeks. The control group was given sunflower oil (SO). Blood samples were used to determine the plasma antioxidant capacity (FRAP, ferric reducing ability of plasma). The activity of antioxidant enzymes (catalase, CAT; superoxide dismutase, SOD; glutathione peroxidase, GSH-Px) and lipid peroxidation (MDA, malondialdehyde) were assessed in the kidneys.

Results: In the kidney, the treatment with OO caused a 33% diminution of lipid peroxidation and a 16% increase GSH-Px activity, whereas the activity of SOD and CAT showed no changes. These effects were accompanied by a 25% increase in FRAP.

Conclusions: OO treatment reduces lipid peroxidation in the kidney and enhances the antioxidant capacity of plasma. It could be suggested that these effects be due to a modulation of GSH-Px activity and the presence of polyphenols in plasma, following long-term exposure to a OO rich diet.

Key words: Lipid peroxidation, Olive oil, Kidney, antioxidant enzymes, glutathione peroxidase.

INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva es uno de los constituyentes de la dieta mediterránea, a la cual se ha atribuido un papel en la baja mortalidad y elevados niveles en la expectativa de vida en comparación con el resto de la población europea (1). Los componentes químicos de esta dieta que pueden contribuir a los efectos beneficiosos para la salud humana incluyen a los antioxidantes de gran abundancia en alimentos como frutas, verduras, vino, té y aceite de oliva (2).

Así se ha sugerido que el descenso en la prevalencia de enfermedades crónicas asociadas a un aumento de lipoperoxidación, tales como, ateromatosis, hipertensión arterial, cáncer, entre

otras; puede ser explicado por la disminución de estrés oxidativo que inducen los antioxidantes(3).

Entre los antioxidantes del aceite de oliva se encuentran tocoferoles, hidroxitirosol, tirosol, oleuropeína, fitosteroles, rutina, escualeno, entre otros (4), los cuales se ha demostrado tienen una muy buena absorción a nivel intestinal (5). Además del efecto antioxidante de estos componentes se ha comprobado que el aceite de oliva, al igual que otros aceites con alto contenido de ácido oleico, pueden modular las enzimas antioxidantes aumentando su actividad (6,7). Finalmente el ácido oleico por ser un ácido graso monoinsaturado, al esterificarse para formar fosfolípidos de membranas puede conferir una mayor estabilidad a estos compuestos frente a los desafíos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que potencialmente pueden llevar a un

¹ ² ³ ⁴ Estudiante 4º año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ⁵ Químico Farmacéutico, Profesor Asociado, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ⁶ Químico Farmacéutico, Profesor Titular, Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

aumento de la lipoperoxidación (8). Los tejidos con mayor abundancia de ácidos grasos polinsaturados, como el riñón, presentan una mayor vulnerabilidad frente al daño lipoperoxidativo y al mismo tiempo ofrecen un modelo con que se puede analizar con mayor sensibilidad la respuesta biológica a la exposición de una sustancia cuya actividad antilipoperoxidativa se quiere probar. Previamente se ha demostrado que el vino tinto, al igual que el aceite de oliva, posee gran abundancia de antioxidantes polifenólicos. Cuando se administra vino tinto en forma crónica a ratas, se observa un efecto protector sobre el riñón contra la injuria provocada por estrés oxidativo (9,10), efecto que también se logra con la administración de resveratrol, uno de los polifenoles presentes en el vino. (11).

Por lo tanto, resulta razonable suponer un efecto similar para el tratamiento crónico con aceite de oliva.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los efectos del tratamiento crónico con aceite de oliva sobre el sistema antioxidante en el plasma y riñón de la rata, con el fin de comprobar que este tratamiento disminuye la lipoperoxidación.

MATERIALES Y METODOS

Diseño

El diseño corresponde a un estudio prospectivo experimental, definiéndose dos grupos de análisis: control (aceite de maravilla) y caso (aceite de oliva), los que fueron seguidos por un tiempo determinado, al final del cual se compararon respecto a parámetros bioquímicos. En este caso la exposición fue controlada y se utilizó la aleatorización como método de asignación.

Animales

Ratas Wistar macho (200-250g) suministradas por el Bioterio del Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, fueron colocadas en jaulas individuales y aclimatadas a 24° C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se separaron en 2 grupos de 6 animales cada uno y se alimentaron durante 6 semanas con una dieta nutricionalmente balanceada (Tabla 1) donde la fuente lipídica de un grupo consistió en aceite de oliva de producción chilena y el grupo control recibió aceite de maravilla.

Tabla 1. Composición de la dieta experimental (g/kg dieta)

Caseína	200
DL-metionina	3
Almidón de maíz	297
Sucrosa	225
Aceite de maravilla/oliva*	100
Almidón de papa	25
Vitaminas hidrosolubles†	30
Vitaminas liposolubles‡	20
Minerales mixtos	50
Fibra	50
Energía (mJ/Kg)	16-3

*Aceite de maravilla u oliva según grupo correspondiente

†La composición de vitaminas hidrosolubles (g/Kg dieta): cloruro de colina 0,945; ácido p-aminobenzoico 0,473; inositol 0,094; niacina 0,047; pantonato de calcio 0,024; riboflavina 0,024; clorhidrato de tiamina 0,019; clorhidrato de piridoxina 0,005; ácido fólico 0,005; biotina 0,001; cianocobalamina 0,0005

‡La composición de vitaminas liposolubles fue (por kg. de dieta): acetato de DL- α -tocoferol 66 mg; *todo-trans*-retinil acetato 2,5 mg; (7000 UI), menadiona 60 μ gr.; colecalciferol 7-5 μ gr.

|| La composición mineral fue (por Kg de dieta): CaCO₃ 15,75 g; CaH₂PO₄·2H₂O 3,35 g; K₂HPO₄ 16-40 g; NaCl 8,52 g; MgSO₄·7H₂O 5,18 g; citrato de hierro 0,51 g; MnSO₄·H₂O 0,25 g; CuSO₄·5H₂O 25,3 mg; ZnCl₂ 5,0 mg; KI 1-2 mg; selenito de sodio 5,0 mg; NaF 5,0 mg.

Todas las ratas tuvieron libre acceso al agua. A la sexta semana las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/kg, intraperitoneal). Después de extraer muestras de sangre, se practicó una perfusión con solución (fría) de KCl 1.15% (40 ml/kg peso corporal/min), se extrajeron los riñones y fueron rápidamente congelados y almacenados en freezer a -80°C hasta practicar las determinaciones bioquímicas en un tiempo no mayor de 10 días posteriores al sacrificio del animal.

Ensayos bioquímicos

La capacidad antioxidante total del plasma (FRAP) fue medida a través de la habilidad de los componentes reductores del plasma de convertir el hierro férrico en hierro ferroso, el cual participa en una reacción colorimétrica y permite su determinación cuantitativa por espectrofotometría.

La actividad de las enzimas antioxidantes fue medida en homogenizados de corteza renal preparados en sacarosa 0.25 M, para la determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y en 1.15% de KCl 0.01 M Tris pH 7.40, para la determinación de catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px). La cuantificación de SOD se basó en la medición del aumento de la tasa de autooxidación de 5,6,6a,11b - tetrahidro - 3,9,10 trihidroxi benzo(e)fluoreno en solución acuosa alcalina la que produce un cromóforo con una absorbancia máxima a 525 nm (13). La unidad (U) de SOD fue definida como la actividad que dobla la autooxidación basal. Los resultados fueron expresados en U/mg de proteínas. La actividad de la CAT se midió en el sobrenadante de 2400 g mediante la cinética de degradación del peróxido de hidrógeno a 240 nm catalizada por el sobrenadante de 2400 g (14) y fue expresada basándose en la constante de la reacción de primer orden (k) /mg de proteína. La actividad de la GSH-Px fue medida en la fracción citosólica (sobrenadante de 100.000 g) por un método espectrofotométrico basado en la reducción de glutatión disulfuro acoplada a la oxidación NADPH por glutatión reductasa (15). La unidad de actividad de la GSH-Px fue definida como la actividad que oxida un μmol de NADPH por minuto. La actividad de la GSH-Px fue expresada en U/mg de proteína.

Lipoperoxidación

La peroxidación de los fosfolípidos de las membranas celulares se determinó espectrofotométricamente a 532 nm por la reacción del ácido tiobarbitúrico a pH 3.5, seguida

de una extracción con una mezcla de n-butanol / piridina (15/1, v/v) (16). Se utilizó tetrametoxipropano como estándar y el nivel de peróxidos de lípidos fue expresado como nmol de malondialdehído (MDA)/mg de proteínas

Glutatión

Las concentraciones tisulares de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) fueron medidas en un fluorímetro. El resultado está expresado como $\mu\text{mol/g}$ tejido (17). Luego se determinó la relación GSH/GSSH.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como promedios \pm SE (error estándar) para el número de ratas indicado. La fuente de las variaciones para las comparaciones múltiples fue establecida por el análisis de varianza unidireccional (ANOVA), complementado por el test de comparaciones de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un $p < 0.05$.

Materiales

Los reactivos fueron adquiridos de la compañía Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Alemania) y Riedel - de Haen (Alemania), y fueron de la más alta calidad disponible en el comercio.

Aspectos éticos

Este protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El manejo de las ratas en todo momento fue realizado de acuerdo a las normas éticas aceptadas internacionalmente.

RESULTADOS

La ganancia de peso corporal y la ingesta diaria de alimento, aceite y agua de las ratas durante el experimento no mostró diferencias significativas entre los dos grupos (Tabla 2).

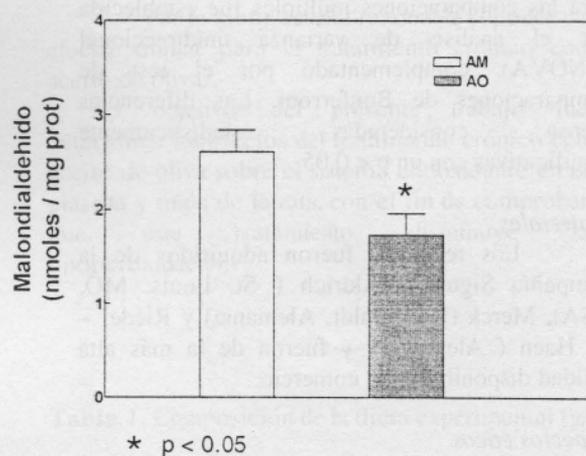
El tratamiento con aceite de oliva resultó en una elevación significativa de los niveles plasmáticos de FRAP (expresado en μM : 232.8 ± 8.1 (n = 6) vs. 291.0 ± 10.3 (n = 6) para los grupos AM y AO, respectivamente $p < 0.05$). La lipoperoxidación, expresada como producción de MDA (nmoles/mg proteína) en el tejido renal del grupo AO fue 33% menor que la del grupo AM ($p < 0.05$) (Fig. 1).

Tabla 2. Consumo energético diario y ganancia de peso

Variables	AM	AO
Ganancia de peso (g/día/100g rata)	3,6 ± 0,3	3,9 ± 0,2
Consumo de dieta (g/día/100g rata)	5,8 ± 0,4	5,7 ± 0,6
Consumo de aceite (kJ/día/100g rata)	8,4 ± 1,3	8,0 ± 2,0
Ingesta de líquido (ml/día/100g rata)	8,5 ± 1,0	7,9 ± 0,8

Los resultados están expresados como promedio ± error estándar de la media
AM, aceite de maravilla; AO, aceite de oliva

Figura 1. Concentración de malondialdehído (umoles/mg proteína), tejido renal, grupo de ratas tratadas con aceite de oliva v/s grupo de ratas tratadas con aceite de maravilla.



En la Fig. 2 se muestran los valores de actividad de las 3 enzimas antioxidantes que fueron determinadas. Las actividades de SOD y CAT no mostraron diferencias significativas entre los grupos AO y AM (Fig. 2); en cambio, la actividad de GSH-Px del grupo AO fue 12% mayor que la del grupo AM ($p < 0.05$) (Fig. 2). La relación GSH/GSSG en el riñón no resultó modificada por el tratamiento con aceite de oliva (Fig. 3).

Figura 2. Actividad de enzimas antioxidantes en tejido renal: Catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa (umoles/mg proteína), grupo de ratas tratadas con aceite de oliva v/s grupo de ratas tratadas con aceite de maravilla.

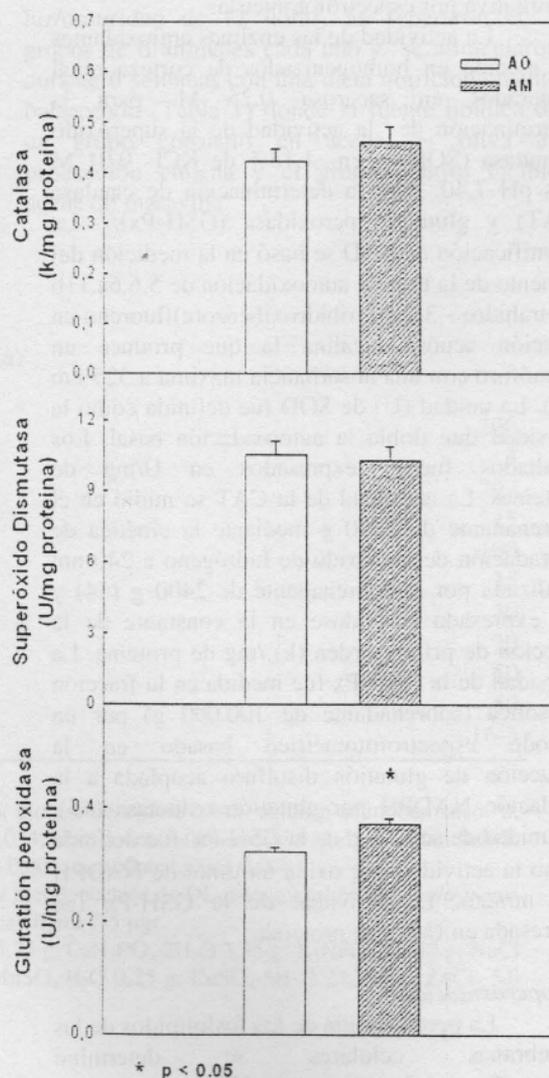
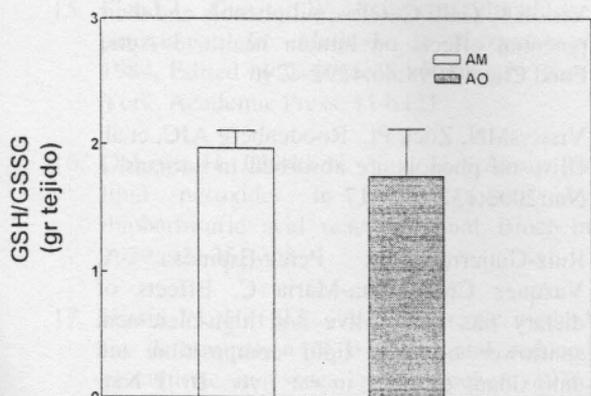


Figura 3. Relación entre glutatión reducido y glutatión oxidado, tejido renal, grupo de ratas tratadas con aceite de oliva v/s grupo de ratas tratadas con aceite de maravilla.



DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación proveen evidencia de que el tratamiento crónico con aceite de oliva disminuye la lipoperoxidación del riñón de la rata en comparación a lo observado con aceite de maravilla. También se observó que el aceite de oliva eleva la capacidad antioxidante total del plasma y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en el tejido renal, en tanto que la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa no se ve afectada. Un efecto similar se había observado previamente en el eritrocito de la rata (18), en el cual el consumo crónico de aceite de oliva y de pescado disminuye la concentración tisular de malondialdehído, un marcador de estrés oxidativo.

La elevación de la capacidad antioxidante total del plasma (FRAP) encontrada en las ratas tratadas con aceite de oliva, podría explicarse por la presencia en el plasma de los polifenoles que forman parte de los componentes de este aceite. Aunque no se practicaron determinaciones de niveles plasmáticos de polifenoles, se sabe que estos compuestos presentan una buena absorción intestinal y elevada vida media en la sangre (5), un efecto que podría contribuir a favorecer las defensas antioxidantes en forma sistémica. Estos resultados son concordantes con datos obtenidos en vino tinto, donde se demostró que las sustancias antioxidantes presentes son capaces de proteger al riñón contra el estrés oxidativo (9).

La ganancia de peso corporal, similar en ambos grupos, se correlacionó con la ingesta de aceite, lo que demuestra que el aceite de oliva no altera el peso corporal en comparación con el aceite de maravilla, dando lugar a la interpretación de que los cambios observados en este diseño experimental no podrían ser explicados sobre la base de un diferente aporte energético. Probablemente las propiedades de los polifenoles, de mayor abundancia en el aceite de oliva, podrían contribuir a explicar una mayor actividad de glutatión peroxidasa y capacidad antioxidante del plasma en el grupo que recibió dieta con este aceite.

Los antioxidantes se comportan como agentes reductores que permiten amortiguar el efecto de una eventual elevación de la tasa de producción de radicales libres, que de otra manera podrían producir un ataque a biomoléculas que forman parte de las estructuras celulares. Los ácidos grasos poliinsaturados, particularmente abundantes en el riñón, son blancos de los radicales libres, haciendo del riñón un órgano vulnerable al estrés oxidativo. Sin embargo, debido a que el aceite de oliva contiene ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado, que podría esterificarse para pasar a constituir fosfolípidos de membranas, se podría esperar que esto confiriera una mayor resistencia a las membranas ante la injuria oxidativa ejercida por los radicales libres.

Queda por explicar el mecanismo por el cual el aceite de oliva eleva la actividad de la glutatión peroxidasa, lo que no se podría determinar con los resultados aquí obtenidos. Se ha comprobado que los aceites con alto contenido de ácido oleico, como el aceite de oliva, pueden modular las enzimas antioxidantes aumentando su actividad en el hígado de la rata (6,7). Por otro lado se sugiere que este efecto resulte de una "upregulation" de la enzima por la unión de los compuestos polifenólicos contenidos en el aceite de oliva a proteínas, activando la transcripción génica dependiente de un elemento de respuesta a los antioxidantes (19). De hecho, se ha demostrado previamente que los compuestos fenólicos activan la transcripción de los genes que codifican otras enzimas similares, tales como glutatión s-transferasa y NADPH: quinona reductasa a través de este elemento de respuesta (20, 21). En el caso del vino tinto la presencia del alcohol parece ser determinante en su efecto sobre las enzimas antioxidantes, observándose que la actividad enzimática no experimenta cambios cuando se realiza tratamiento crónico con vino desalcoholizado, a diferencia de lo que ocurría con el vino tinto nativo (9). Probablemente se deben

recolectar más datos para tener una idea más clara al respecto.

Se concluye que el aceite de oliva disminuye la lipoperoxidación renal en la rata, lo que se asocia a un aumento del FRAP y de la actividad de la enzima antioxidante GSH-Px. Estos efectos podrían atribuirse a las sustancias antioxidantes contenidas en el aceite de oliva.

RESUMEN

Antecedentes: El aceite de oliva (AO) contiene antioxidantes (polifenoles), que pueden proteger del estrés oxidativo a las membranas celulares en órganos como el riñón. El objetivo fue determinar si el AO tiene efectos antioxidantes sobre el riñón de la rata.

Materiales y método: Un grupo de Ratas Wistar machos recibió durante seis semanas, una dieta que contenía 10% de AO y el control, aceite de maravilla (AM). Se midió la capacidad antioxidante del plasma (FRAP) y en los riñones, lipoperoxidación (MDA), glutatión oxidado/glutatión reducido y actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, y glutatión peroxidasa.

Resultados: El grupo AO mostró una lipoperoxidación 33% menor que el grupo AM. La actividad de glutatión peroxidasa y el valor de FRAP del grupo AO fueron 16% y 25% mayores, respectivamente, que los valores controles.

Conclusiones: AO disminuye la lipoperoxidación renal en la rata, asociado a un aumento del FRAP y de la actividad de la glutatión peroxidasa. Esto podría atribuirse a los antioxidantes contenidos en este aceite.

Palabras clave: Lipoperoxidación, Aceite de Oliva, Riñón, Enzimas antioxidantes, Glutatión peroxidasa.

REFERENCIAS

1. Trichopolou A, Vasilopou E. Mediterranean diet and longevity. *Br J Nutr* 2000;84:205-209
2. Stark AH, Madar Z. Ph.D. Olive oil as a functional food: Epidemiology and Nutritional Approaches. *Nutrition Reviews* 2002; 60(6):170-176
3. Tuck KL, Hayball PJ. Major Phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *J Nutr Biochem* 2002 Nov;13(11):636-644
4. Visioli F, Galli C. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J Agric Food Chem* 1998;46:4292-4296
5. VissersMN, Zoek PL, Roodenberg AJC, et al. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr*2002;132:409-417
6. Ruiz-Gutierrez V, Perez-Espinosa A, Vazquez CM, Santa-Maria C. Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br J Nutr* 1999 Sep;82(3):233-241
7. Ruiz-Gutierrez V, Vazquez CM, Santa-Maria C. Liver lipid composition and antioxidant enzyme activities of spontaneously hypertensive rats after ingestion of dietary fat (fish, olive and high-oleic sunflower oils). *Biosci Rep* 2001 Jun;21(3):271-285
8. Visioli, F, Galli C. Olive oil: more than just oleic acid. *Am J Clin Nutr* 2000;835:872
9. Rodrigo R, Rivera G, Orellana M, Araya J, Bosco C. Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. *Life Sciences* Jul 2002 71:2881-2895
10. Stefanovic V, Savic V, Vlahovic P, Cvetkovic T, Najman S. Reversal of experiment myoglobinuric acute renal failure with bioflavonoids from seed of grape. *Renal Failure* 2000;22:255-256
11. Giovannini, L.; Migliori, M.; Longoni, B. M. Resveratrol, a polyphenol found in wine, reducing ischemia reperfusion injury in rat kidneys *J Cardio. Pharma.*
12. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 1996;239:70-76
13. Nebot C, Moutet M, Huet P et al. Spectrophotometric assay of superoxide dismutase based activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Anal Biochem* 1993; 214: 442-451

14. Aebi H. Catalase. In: Methods in Enzymatic Analisis 1974. Edited by Bergmeyer HU. New York. Academic Press. 29thed. 673-678
15. Flohé L, Günzler W. Assays of glutathione peroxidase. In: Methods in Enzymology 1984. Edited by Colowic S., Kaplan N. New York, Academic Press. 114-121
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95: 351-358
17. Hissin PJ, Hilf RA. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Anal Biochem 1976; 74: 214-226
18. Xiao Y, Yan S, Wang J, Liang X. Effects of olive oil and fish oil on serum lipids and lipid peroxidation in rats. Wei Sheng Yan Jiu 2001; 30(4): 211-212
19. Wassermann WW, Fahl WE. Comprehensive analysis of protein which interacts with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. Arch Biochem Biophys 1997; 344: 387-396
20. Li Y, Jaiswal AK. Regulation of human NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene. Role of API binding site contained within human antioxidant responsive element. J Biol Chem 1992; 267: 15097-15104
21. Nguyen T, Pickett CB. Regulation of rat glutathione-S-transferase Y a subunit gene expression DNA-protein interaction at the antioxidant responsive element. J Biol Chem 1992; 267: 13535-13539

AGRADECIMIENTOS

La Investigación fue financiada por el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONDECYT).

Agradecemos la asistencia técnica de Diego Soto Humeres.

Correspondencia:

Roberto Charles Carrasco
rochurrasco@hotmail.com