

DEPARTAMENTO INTERFACULTATIVO DE BIOQUIMICA

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO Y DE LA CONGELACION-DESCONGELACIÓN SOBRE LA COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANAS DE ERITROCITO Y MICROSOMAS HEPATICOS DE RATA

J.L. Periago, S. Molina, C. De-Lucchi y M.D. Suárez

RESUMEN

Se ha determinado el porcentaje en ácidos grasos presentes en fosfolípidos de membranas de eritrocito y microsomas hepáticos de rata y el efecto que el tiempo de conservación a -36°C y la congelación-descongelación de las muestras tienen sobre la composición ácida. Así mismo, se compara la influencia del tampón hipotónico usado en la obtención de membranas de eritrocito, sobre la estabilidad a la oxidación de las mismas. Los resultados revelan la estabilidad de los microsomas a la oxidación, así como la conveniencia de utilizar un tampón Tris hipotónico en la obtención de membranas de eritrocito, al conferirles una mayor estabilidad.

SUMMARY

Fatty acid composition in rat red blood cell membranes and hepatic microsomes was determined, as well as the effect that a storage time at -36°C and freezing and thawing have had on the acidic composition of samples. Likewise, the influence that two different hypotonic buffer, used in obtaining red blood cell membranes, have had on stability against oxidation of fatty acids has been studied. Our results demonstrate a higher stability of fatty acid microsomes than of red blood cell membranes, as well as showing that it is advisable to use a hypotonic Tris buffer instead of a Phosphate buffer when preparing red blood cell membranes.

INTRODUCCION

Es un hecho comprobado que la composición en ácidos grasos de los lípidos de depósito y estructurales se modifica por la composición en ácidos grasos de los lípidos de la dieta.

Esta modificación es importante tanto en función de la prevención de las enfermedades coronarias como en los cambios que pueda experimentar la "fluidez" de membranas celulares.

Los estudios comparativos entre distintas dietas suelen hacerse en plasma, membranas de eritrocito y microsomas hepáticos (1). El plasma es quizás el que está sujeto a mayores fluctuaciones en la composición ácida de las fracciones lipídicas, siendo por tanto, las membranas de eritrocito, dada la facilidad y el escaso riesgo que presenta su obtención, unos indicadores fiables, en tanto, que pueden ser un fiel reflejo de la composición ácida de los lípidos de otras membranas celulares. La elección de microsomas hepáticos radica en que es en el retículo endoplásmico en donde tienen lugar las reacciones de elongación y desaturación de moléculas en ácidos grasos, ya sean de síntesis endógena o de procedencia dietaria.

La obtención y lavado de las membranas eritrocitarias se realiza, normalmente, con tampón Tris hipotónico; sin embargo, ha sido descrito recientemente por Burton y col. (2) que membranas de eritrocitos podrían obtenerse, prácticamente exentas de hemoglobina (factor altamente oxidante), con tampón Fosfato hipotónico de concentraciones molares decrecientes. Para comprobar la validez de este método en ratas, se han obtenido estas membranas alternativamente con las dos soluciones tampón, comprobándose su estabilidad frente a reacciones de oxidación que tienen lugar durante el almacenamiento prolongado (3). Se ha estudiado la influencia que este almacenamiento, así como los procesos de congelación-descongelación pueden tener tanto sobre microsomas como membranas de eritrocitos, en la medida en que pueden inducir errores en la interpretación de los resultados.

MATERIAL Y METODOS

El estudio ha sido realizado en ratas macho de la raza Wistar de 150 g. de peso aproximadamente.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la aorta abdominal con una jeringuilla heparinizada, extrayéndose rápidamente el hígado y conservándolo en solución salina al 0,9 % en frío.

Para la obtención de microsomas hepáticos se ha seguido el método descrito por Phillip y Shapiro (4) y para obtener las membranas de eritrocitos se han seguido alternativamente los métodos de Hanahan y Ekholm (5) empleando tampón Tris y de Burton e Ingold (2) que emplea tampón Fosfato.

Una vez obtenidas las muestras se separaron cuatro alícuotas de cada una de ellas que permanecieron congeladas a -36°C hasta el momento de ser analizadas: la 1.^a alícuota al día siguiente, la 2.^a a los cuatro meses y la 3.^a a los diez meses de su obtención. La 4.^a alícuota fue la que sufrió el proceso de congelación-descongelación repetido, efectuado dos meses antes de cada período escogido para su análisis.

En la extracción lipídica el método empleado ha sido el descrito por Haan y col. (6). La separación de fosfolípidos del extracto lipídico se ha realizado por cromatografía en capa fina (7), obteniéndose posteriormente los ésteres metílicos de los ácidos grasos de esta fracción (8) que fueron analizados por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5880A

dotado con detector de ionización de llama y conectado a un ordenador HP5880 serie GC terminal. La columna utilizada, rellena con una fase estacionaria de SP2330 al 10 % sobre Chromosorb WAW 100/120 mesh, tenía unas dimensiones de 4 m. de longitud y 2 mm. de diámetro interior.

Las condiciones de trabajo fueron perfectamente controladas, fijándose los flujos de nitrógeno e hidrógeno en 30 ml/min. y el de aire en 400 ml/min. El programa de T.^a empleado fue el siguiente: T.^a inicial de 185°C durante 10 minutos, aumento a razón de 5°C/min. hasta alcanzar los 240°C, donde se mantiene durante 10 minutos.

En el tratamiento estadístico, los test de significación empleados corresponden a la t-student, considerándose valores significativos a partir de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Microsomas

La composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de microsomas hepáticos queda reflejada en la tabla I.

Acido graso	t ₀ (1 día)	t ₁ (4 meses)	t ₂ (10 meses)	d ₁	d ₂
16:0	16.52 ± 0.97	16.41 ± 0.94	18.14 ± 0.89	16.58 ± 0.98	19.62 ± 0.86
16:1w7	0.99 ± 0.14	0.97 ± 0.17	0.99 ± 0.18	0.99 ± 0.12	1.25 ± 0.18
18:0	32.50 ± 0.61	32.42 ± 0.56	32.57 ± 0.70	32.92 ± 0.70	31.45 ± 0.56
18:1w9	7.07 ± 0.42	6.80 ± 0.49	7.17 ± 0.42	7.04 ± 0.53	9.17 ± 0.87
18:2w6	8.80 ± 0.31	8.77 ± 0.54	8.94 ± 0.42	8.81 ± 0.50	8.59 ± 0.29
20:3w6	1.13 ± 0.18	1.13 ± 0.18	0.85 ± 0.16	1.13 ± 0.19	0.85 ± 0.12
22:4w6	0.50 ± 0.04	0.50 ± 0.03	0.34 ± 0.04 (a ₁ ,b ₁)	0.49 ± 0.03	0.31 ± 0.02 (a ₂ ,c ₂)
22:5w6	0.93 ± 0.04	0.99 ± 0.05	0.82 ± 0.04 (b ₁)	0.96 ± 0.07	0.80 ± 0.05
22:5w3	0.62 ± 0.04	0.63 ± 0.06	0.45 ± 0.04 (a ₁ ,b ₁)	0.57 ± 0.05	0.40 ± 0.04 (a ₁ ,c ₁)
22:6w3	4.79 ± 0.42	4.96 ± 0.48	4.70 ± 0.41	4.67 ± 0.47	4.02 ± 0.32

TABLA I.- Composición en ácidos grasos de microsomas hepáticos. Los resultados se expresan como la medida del porcentaje de cuatro determinaciones + SD. Siendo: a, nivel de significación respecto a t₀; b, nivel de significación respecto a t₁; c, nivel de significación respecto a d₁; d, nivel de significación respecto a t₂. El subíndice 1 corresponde a un valor de $p < 0.05$, el 2 a un valor de $p < 0.01$ y el 3 a un valor de $p < 0.001$.

Muestras analizadas a los cuatro meses que han sufrido una descongelación-congelación a los dos meses.

Muestras analizadas a los 10 meses que han sufrido dos descongelaciones-congelaciones, una a los dos meses y otra a los ocho.

Los resultados revelan la estabilidad de los microsomas a la autooxidación. La congelación-descongelación les afecta negativamente, pero en menor grado que a las membranas de eritrocito.

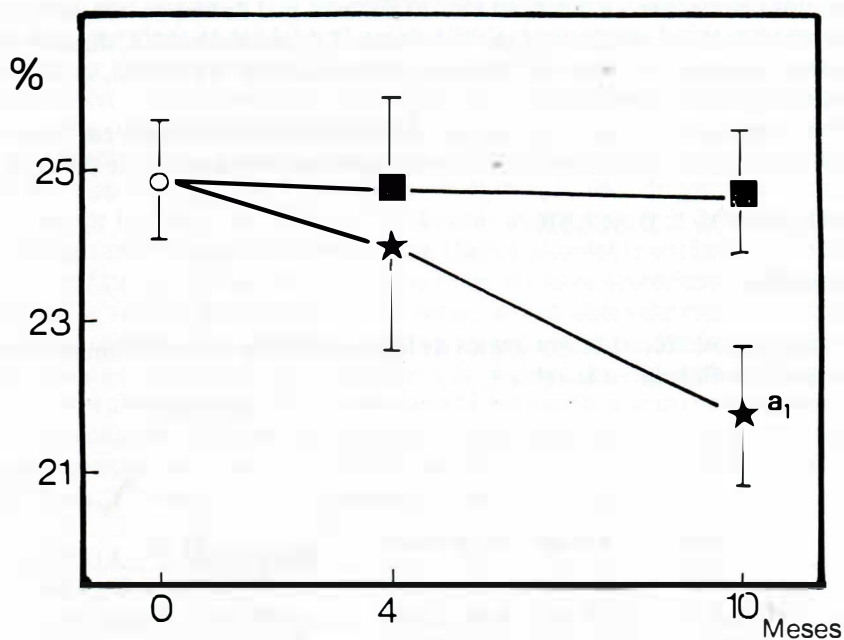


Fig. 1.- Variación en el % de ácido araquidónico (20:4w6) en fosfolípidos de microsomas hepáticos con respecto al tiempo de almacenamiento.
 □ — alicuotas mantenidas a -36°C .
 * — alicuotas mantenidas a -36°C sometidas a un proceso de congelación-descongelación.

El ácido 20:4w6 (Fig. 1) presenta al igual que los demás ácidos grasos una estabilidad frente a las reacciones de autooxidación, cuando las muestras son almacenadas a -36°C durante un largo periodo de tiempo. Frente a los procesos de congelación-descongelación experimenta un proceso significativo en sus niveles.

Por lo tanto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la composición en ácidos grasos de los microsomas no se ve afectada por el tiempo de almacenamiento y siempre que las muestras permanezcan a -36°C .

La congelación-descongelación afecta negativamente a la estabilidad de los microsomas, aunque en menor cuantía que a las membranas de eritrocitos, por lo que debe evitarse en todo momento.

Membranas de Eritrocito.

La composición en ácidos grasos de fosfolípidos de membranas de eritrocito obtenidas con tampón Fosfato y tampón Tris, quedan reflejadas en las tablas II y III.

Ácido graso	T ₀ (1 día)	T ₁ (4 meses)	T ₂ (10 meses)	d ₁	d ₂
16:0	29.28 ± 0.74	28.142 ± 1.16	33.00 ± 0.32 (a ₂ ,b ₁)	27.94 ± 0.27	37.53 ± 3.25 (c ₁)
16:1w7	0.81 ± 0.02	0.772 ± 0.22	0.48 ± 0.25	0.48 ± 0.10	0.52 ± 0.27
18:0	18.46 ± 1.51	17.792 ± 0.60	21.75 ± 0.73 (b ₁)	18.10 ± 0.67	23.91 ± 2.37
18:1w9	11.10 ± 0.68	13.142 ± 0.73	12.86 ± 0.14	12.26 ± 0.92	11.92 ± 0.77
18:2w6	8.73 ± 0.69	8.372 ± 0.46	9.13 ± 0.73	8.93 ± 0.57	0.08 ± 0.86
20:3w6	0.80 ± 0.05	1.082 ± 0.21	1.14 ± 0.13	1.36 ± 0.24	0.67 ± 0.34
22:4w6	1.53 ± 0.20	1.962 ± 0.17	1.28 ± 0.06 (b ₁)	2.27 ± 0.12 (a ₁)	0.86 ± 0.43 (c ₁)
22:5w6	1.02 ± 0.15	1.732 ± 0.29	0.76 ± 0.13 (b ₁)	1.45 ± 0.13	0.49 ± 0.25 (c ₁)
22:6w3	1.04 ± 0.21	1.502 ± 0.16	0.79 ± 0.08 (b ₁)	1.68 ± 0.21	0.49 ± 0.25 (c ₁)
22:4w6	0.50 ± 0.04	0.502 ± 0.03	0.34 ± 0.04 (a ₁)	0.49 ± 0.03	0.31 ± 0.02 (a ₂)

TABLA II.- Composición en ácidos grasos de membranas de eritrocito obtenidas con tampón Fosfato. Los resultados se expresan como la medida del porcentaje de tres determinaciones + SD. Siendo: a, nivel de significación respecto a t₀; b, nivel de significación respecto a t₁; c, nivel de significación respecto a d₁; d, nivel de significación respecto a d₂. El subíndice 1 corresponde a un valor de p = 0.05, el 2 a un valor de p = 0.01 y el 3 a un valor de p = 0.001.

Muestras analizadas a los cuatro meses que han sufrido una descongelación-congelación a los dos meses.

Muestras analizadas a los diez meses que han sufrido dos descongelaciones-congelaciones, una a los dos meses y otra a los ocho.

Ácido graso	T ₀ (1 día)	T ₁ (4 meses)	T ₂ (10 meses)	d ₁	d ₂
16:0	31.02 ± 0.50	27.522 ± 0.75 (1)	31.71 ± 0.60 (b ₁)	27.52 ± 1.50	33.59 ± 0.89 (c ₁)
16:1w7	0.82 ± 0.06	0.872 ± 0.09	0.64 ± 0.04	1.03 ± 0.07	0.63 ± 0.04 (c ₂)
18:0	17.68 ± 0.56	17.082 ± 0.51	20.07 ± 0.63 (a ₁ ,b ₁)	17.26 ± 0.37	21.31 ± 0.12 (a ₂ ,c ₃)
18:1w9	11.22 ± 0.45	12.112 ± 0.10	12.04 ± 0.14	12.01 ± 0.32	11.95 ± 0.21
18:2w6	9.10 ± 0.23	8.932 ± 0.08	9.91 ± 0.71	9.04 ± 0.37	8.72 ± 0.23
20:3w6	0.75 ± 0.04	1.122 ± 0.07 (a ₁)	1.65 ± 0.46	1.23 ± 0.16 (a ₁)	0.91 ± 0.30
22:4w6	1.59 ± 0.10	2.482 ± 0.14 (a ₂)	1.53 ± 0.15 (b ₁)	2.40 ± 0.18 (a ₁)	1.61 ± 0.21 (c ₁)
22:5w6	0.95 ± 0.09	1.422 ± 0.08 (a ₁)	0.79 ± 0.08 (b ₂)	1.36 ± 0.06 (a ₁)	0.87 ± 0.06 (c ₂)
22:6w3	0.95 ± 0.11	1.662 ± 0.08 (a ₂)	1.11 ± 0.28	1.65 ± 0.12 (a ₁)	0.77 ± 0.13 (c ₂)

TABLA III.- Composición en ácidos grasos de membranas de eritrocito obtenidas con tampón Tris. Los resultados se expresan como la medida del porcentaje de tres determinaciones + SD. Siendo: a, nivel de significación respecto a t₀; b, nivel de significación respecto a t₁; c, nivel de significación respecto a d₁; d, nivel de significación respecto a t₂. El subíndice 1 corresponde a un valor de p < 0.05, el 2 a un valor de p < 0.01 y el 3 a un valor de p < 0.001.

Muestras analizadas a los cuatro meses que han sufrido una descongelación-congelación a los dos meses.

Muestras analizadas a los diez meses que han sufrido dos descongelaciones-congelaciones, una a los dos meses y otra a los ocho.

Es de interés comprobar cómo los ácidos grasos saturados mayoritarios C16:0 y C18:0, y más concretamente su suma, se eleva a los 10 meses de su almacenamiento desde un 48 % a un 54 % (tampón Fosfato) y un 51 % (tampón Tris). La congelación-descongelación conlleva, para el mismo tiempo, un aumento desde un 48 % a un 61 % (tampón Fosfato) y un 55 % (tampón Tris).

El porcentaje de ácido araquidónico, 20:4w6, ácido graso poliinsaturado mayoritario, nos da una idea directa de las reacciones de autooxidación que se hayan podido producir durante el periodo de almacenamiento. Se observa que a los 10 meses de la obtención de membranas, los niveles de este ácido graso poliinsaturado disminuyen, siendo este descenso más acusado en las membranas obtenidas con tampón Fosfato (Fig. 2 y 3).

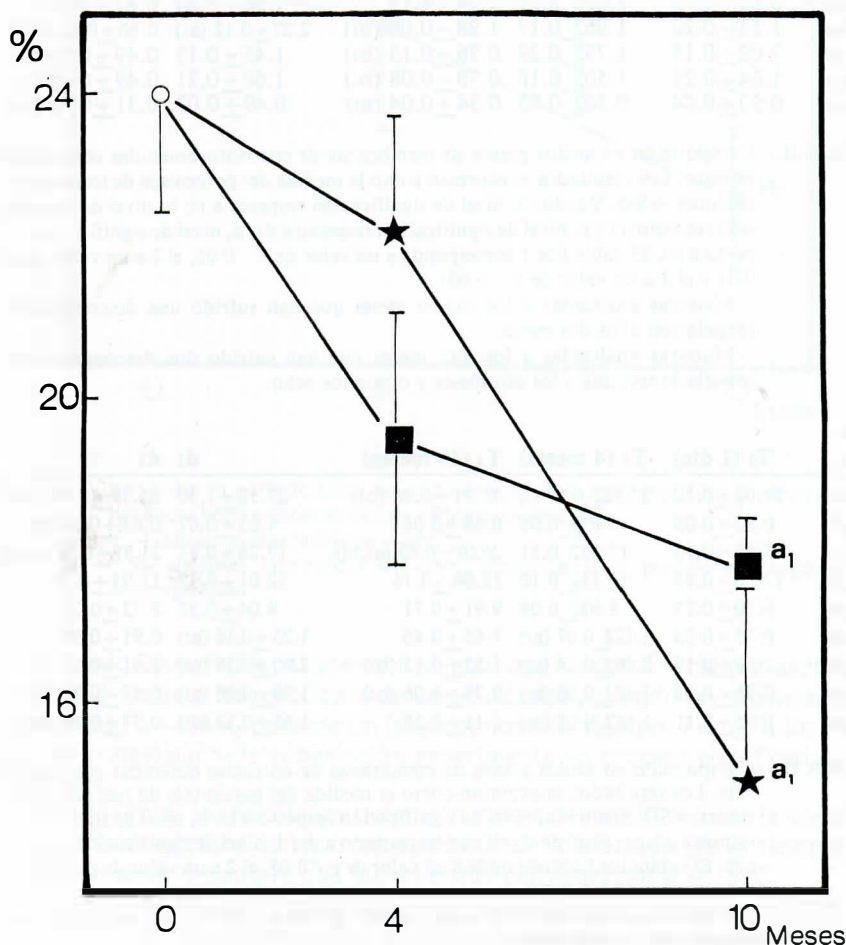


Fig. 2.- Variación con respecto al tiempo en el % de ácido araquidónico (20:4w6) en fosfolípidos de membranas de eritrocito obtenida con tampón Fosfato.
 □ — alicuotas mantenidas a -36°C .
 * — alicuotas mantenidas a -36°C sometidas a un proceso de congelación-descongelación.

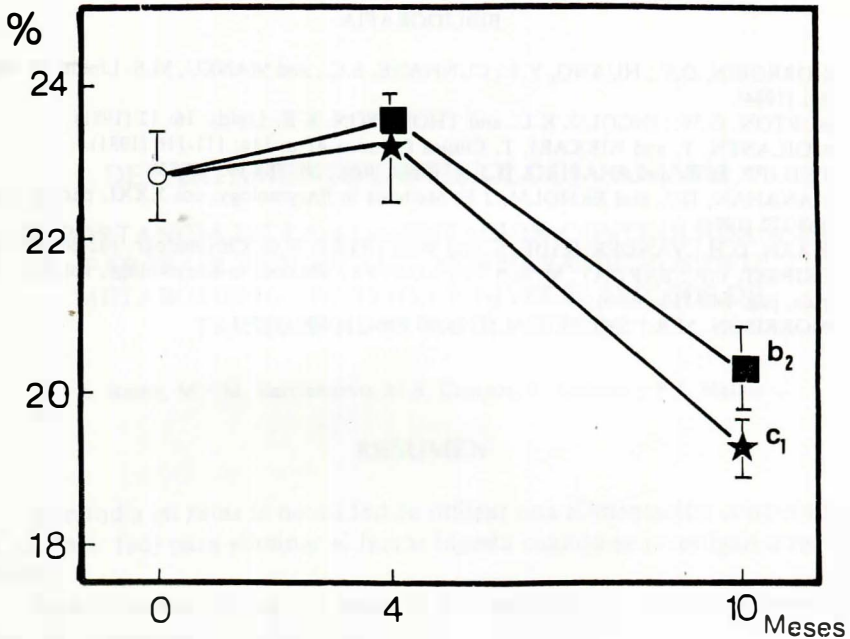


Fig. 3.- Variación con respecto al tiempo en el % de ácido araquidónico (20:4w6) en fosfolípidos de membranas de eritrocito obtenidas con tampón Tris.
 □ — alicuotas mantenidas a -36°C .
 * — alicuotas mantenidas a -36°C sometidas a un proceso de congelación-descongelación.

Puesto que los valores de los ácidos grasos se expresan como %, el incremento experimentado por los ácidos grasos saturados mayoritarios están en relación inversa con la disminución que sufren el 20:4w6 como consecuencia de las reacciones de autooxidación.

Los resultados ponen de manifiesto la conveniencia de utilizar un tampón Tris hipotónico en la obtención de membranas de eritrocito, así como efectuar el análisis cromatográfico de las fracciones lipídicas en un tiempo no superior a los 4 meses.

Así mismo, la congelación-descongelación de las muestras incide negativamente sobre la estabilidad de las mismas, por lo que debe evitarse.

El diferente comportamiento que experimentan las membranas de eritrocito, según su modo de obtención, puede ser explicado en base a la existencia de una mayor cantidad de hemoglobina en aquéllas obtenidas con tampón Fosfato que conduciría a una rápida oxidación de las muestras así preparadas.

BIBLIOGRAFIA

1. HORROBIN, D.F.; HUANG, Y.S.; CUNNANE, S.C., and MANKU, M.S. *Lipids*, 19: 806-811 (1984).
2. BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. and THOMPSON, K.E. *Lipids*, 16: 12 (1981).
3. MOILANEN, T. and NIKKARI, T. *Clínica Chimica Acta*, 114: 111-116 (1981).
4. PHILIPP, B.W. and SHAPIRO, D.J. *J. Lipid. Res.*, 20: 588-593 (1973).
5. HANAHAN, D.J. and EKHOLM, J.E. *Methods in Enzymology*, vol XXXI, part A, pág. 168-172 (1974).
6. HAAN, G.H.; VANDERHEIDE, S. and WOLTEERS, R.G. *Chromatogr.* 162-261 (1979).
7. SKIPSKI, V.P.; BARDAY, M. and THIN-LAYER. *Methods in Enzymology*, vol XIV, *Lipids*, pág. 548-550 (1969).
8. MORRISON, M.R.; SMITH, L.M. *J. Lipid Res.*, 5: 600 (1964).