

Estudio comparativo de la concentración del glutati6n reducido y actividades de gammaglutamiltransferasa y transferasa de glutati6n en h6gado y ri6n6n de pollos y ratas

Comparative study of the concentration of reduced glutathione and the activity of gamma-glutamyl-transferase and glutathione transferase in liver and kidneys of broilers and rats

Te6dulo Quezada Trist6n*
Fernando Jaramillo Ju6rez**
Arturo Valdivia Flores*
Jos6 Luis Reyes S6nchez***
Ra6l Ortiz Mart6nez*
Mar6a Luisa Rodr6guez V6zquez**

Abstract

The objective of this study was to compare protein concentration (PC), adenosine 5'-triphosphate (ATP) and reduced glutathione (GSH), as well as the specific enzymatic activities of transferase of glutathione (SEA-TG), and gamma-glutamyl-transferase (SEA-GGT) in liver and kidney homogenates of broilers and rats. Due to the fact that these processes are involved in the detoxification process of the cells, twenty-five four-week-old broilers, and twenty-five 35 day-old rats were divided at random in five groups. Animals were weighed, anesthetized, and perfused using chicken buffer solution, and their liver and kidneys were removed. Samples from both tissues were taken and homogenized in a buffer solution (4°C). Aliquots were made and stored at -25°C until analyzed. Protein concentration (mg/g of tissue), ATP (ng/mg of tissue), and GSH (Mol/mg of tissue) were determined. AEE-TG and AEE-GGT were measured. Data was analyzed by the analysis of variance (ANOVA), and the multiple comparison means was obtained through the Tukey test. ATP and GSH, as well as SEA-GGT and SEA-TG concentrations were significant among species and tissues ($P < 0.01$). PC among species in both tissues did not show significant differences ($P > 0.05$), while that among the tissues of the same species proved to be different ($P < 0.01$). Results of the comparison of the studied species suggest, in general, discrepancy between species, and the possible difference of response of cellular detoxification mechanisms in presence of xenobiotics.

Key words: CHICKENS, RATS, GSH, SEA-TG, SEA-GGT, ATP, PROTEIN.

Resumen

El objetivo de este estudio fue comparar la concentraci6n de prote6nas (CP), trifosfato de adenosina (ATP) y el glutati6n reducido (GSH), as6 como las actividades enzim6ticas espec6ficas de transferasa de glutati6n (AEE-

Recibido el 2 de julio de 2001 y aceptado el 15 de noviembre de 2001.

* Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Aut6noma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Aguascalientes, Aguascalientes, M6xico.

** Centro de Ciencias B6sicas, Universidad Aut6noma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Aguascalientes, Aguascalientes, M6xico.

*** Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Polit6cnico Nacional, Unidad Profesional Zacatenco, Av. Instituto Polit6cnico Nacional y Av. Ticom6n, M6xico, D.F.

TG) y gammaglutamiltransferasa (AEE-GGT), en homogeneizados de hígado y riñón de pollos y ratas. Debido a que estos procesos se encuentran involucrados en los procesos de detoxificación de las células, se seleccionaron 25 pollos de cuatro semanas de edad y 25 ratas de 35 días de edad, que fueron repartidos al azar en cinco grupos. Después de que se les pesó, se anestesiaron y se les aplicó solución amortiguada; el hígado y los riñones fueron removidos para obtener las muestras de ambos tejidos, los cuales se homogeneizaron en Tris-HCl 200 mM. Se hicieron alícuotas y se almacenaron a -25°C hasta su uso. Se determinó la concentración de proteínas (mg/g de tejido), el ATP (ng/mg de proteína) y el GSH (Mol/mg de tejido). Se midieron las AEE-TG y AEE-GGT. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de diferencia de medias por medio del método Tukey. La concentración del ATP y el GSH, así como las AEE-GGT y AEE-TG fueron significativas entre las especies y los tejidos ($P < 0.01$). Las CP entre las especies en ambos tejidos no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$), mientras que entre los tejidos de las mismas especies sí los hubo ($P < 0.01$). Los resultados obtenidos en esta comparación de las especies bajo estudio sugieren, en general, diferencias entre ellas, lo que a su vez también indica la posible diversidad en la respuesta de los mecanismos de detoxificación celular en presencia de xenobióticos.

Palabras clave: POLLOS, RATAS, GSH, AEE-TG, AEE-GGT, ATP, PROTEÍNA.

Introduction

The liver is the largest gland in the organism, between 2% to 5% of the bodyweight; while the kidneys only represent between 0.05% and 0.01%. Nevertheless, the biotransformation of toxic substances and their excretion as a protection mechanism of the body constitutes the most important metabolic function that these two organs do as a group.¹

The substances within the portal system, which include metabolites and toxic materials, are received by macrophages and the hepatocytes in order to be metabolically processed and later returned to the vascular system to be picked up by the kidneys where they can then be reprocessed and excreted.¹

Xenobiotics are biotransformed by cytochrome P-450 (CYP450) of the hepatic mono-oxygenase system to produce highly reactive compounds,^{2,3} which have a powerful electrophilic attraction towards deoxyribonucleic acid (DNA), albumin and other macromolecules.^{2,4} The elimination pathway is the glutathione transferase (GT) which catalyzes the conjugation with GSH⁵ and is then excreted as a non-toxic form of mercapturic acid in bile.^{6,7} GSH represents the most abundant endogenous antioxidant involved in numerous vital functions of the cell.^{8,9} Cysteine is the main amino acid for GSH synthesis, which is a reaction catalyzed by gamma glutamyl-cysteine-synthetase (GGCs) and is considered of limiting velocity in GSH synthesis.¹⁰ The levels of intracellular cysteine can be influenced by high levels of gamma-glutamyl-cysteine,¹¹ or by an amino acid transport system like the gamma-glutamyl cycle.¹² If the levels of GSH are maintained, cell damage tends to be less because the activity of the reactive species produced by a xenobiotic can be reduced.¹³ In

Introducción

El hígado es la glándula de mayor tamaño en el organismo, entre 2% y 5% del peso corporal; mientras que el riñón sólo representa entre 0.05% y 0.1%. Sin embargo, la biotransformación de sustancias tóxicas y su excreción como un mecanismo de protección para el organismo constituye la función metabólica más importante que realizan estos dos órganos en su conjunto.¹

Las sustancias dentro del sistema portal, que incluyen metabolitos y materiales tóxicos, son recibidas por los macrófagos y los hepatocitos para ser procesados metabólicamente y ser vertidos a la circulación para llegar al riñón y ahí ser nuevamente procesadas y excretadas.¹

Los xenobióticos son biotransformados por el citocromo P-450 (CYP450) del sistema de monooxigenasas hepáticas a compuestos altamente reactivos,^{2,3} con poderosa atracción electrofílica hacia el ácido desoxirribonucleico (ADN), albúmina y otras macromoléculas.^{2,4} La vía de eliminación es la transferasa de glutatión (TG), catalizadora de la conjugación con el GSH⁵ y eliminada como un compuesto no tóxico en forma de ácido mercaptúrico en la bilis.^{6,7} El GSH representa el más abundante antioxidante endógeno involucrado en numerosas funciones vitales de la célula.^{8,9} La cisteína es el principal aminoácido para la síntesis de GSH, la cual es catalizada por la gammaglutamil-cisteína-sintetasa (GGCs) y es considerada de velocidad limitada en la síntesis de GSH.¹⁰ Los niveles de cisteína intracelular pueden ser influidos por altos valores de gammaglutamil-cisteína,¹¹ o por un sistema de transportación de aminoácidos como el ciclo gamma-glutamilo.¹² Si los niveles de GSH se mantienen, el daño celular tiende a

mammals, the liver is the central organ for GSH metabolism, which is usually found in high concentrations, and could provide GSH to other organs by inter-organ circulation.^{8,11} Nevertheless, in chickens hepatic GSH represents only 25% to 50% of the amount found in mammals.^{14,15} The low GSH concentrations and their increase in relation to age are unique to chickens, or characteristic of birds in general, and are not altogether well known.¹⁶

Although the elimination of xenobiotics by conjugation with GSH represents an irreversible loss of endogenous GSH, studies in chickens¹⁷ and rats^{18,19} have demonstrated that the hepatic level of GSH increases in response to treatment with some toxic substances (for example aflatoxins). The changes in hepatic and renal GSH concentrations in domestic birds as a consequence of treatment with certain toxic substances has been little studied.²⁰

Considering the information mentioned above, the present work was done with the main objective of characterizing, and comparing GSH concentrations and the specific enzymatic activities of glutathione transferase (SEA-GT) and gamma-glutamyl-transferase (SEA-GGT) in liver and kidney homogenates of Avian and Farm broiler breeds and Wistar rats.

Materials and methods

The present work was done in the Zootechnical Post of the Agricultural and Livestock Science Center of the Autonomous University of Aguascalientes, which is located to the northwest of Aguascalientes City. It is located at 21° 57' 40" latitude and 102° 22' 30" longitude, 9 km out, in a rural area, at 1936 mmsl. The climatic conditions are dry-temperate, with an average annual temperature of 16.9 °C and 475 mm of mean annual rainfall.

For this study we used 25 four-week-old male broilers of the Avian and Farm breeds, and 25 male wistar rats of 35 days of age. The average weight was of 750 ± 11.2 g and 152.9 ± 9.20 g, respectively. In order to evaluate the group effect on the animals, they were distributed at random into five groups (five per group). The chickens were vaccinated against Marek, Newcastle, Bronchitis and Gumboro, in accordance with the immunization calendar of the region. The rats were not vaccinated.

The chickens were kept in a natural environment pen with cement floors, wood shaving bedding, and conventional initiation and finishing equipment, while the rats were kept in cages. The feed of the chickens was based on the requirements established by the NRC²¹ tables with 22% protein and 2 900 (Kcal/Kg) of metabolic energy. The rats were fed a commercially available feed* specially formulated for laboratory

ser menor porque la actividad de las especies reactivas producidas por un xenobiótico podría reducirse.¹³ En mamíferos, el hígado constituye el órgano central para el metabolismo de GSH, que se encuentra generalmente en altas concentraciones, y podría proveer GSH a otros tejidos vía circulación interórganos.^{8,11} En pollos, sin embargo, el GSH hepático representa sólo del 25% al 50% del que se encuentra en mamíferos.^{14,15} Las bajas concentraciones de GSH y el incremento relacionado con la edad son únicos en los pollos, o característico de las aves en general, y no son del todo bien conocidas.¹⁶

Aunque la eliminación de xenobióticos por conjugación con GSH representa una pérdida irreversible de GSH endógeno, estudios en pollos¹⁷ y ratas^{18,19} han mostrado que el nivel de GSH hepático se incrementa en respuesta al tratamiento con algunos tóxicos (por ejemplo, aflatoxinas). Los cambios en la concentración de GSH hepático y renal en aves domésticas, como consecuencia del tratamiento con ciertos tóxicos, han sido poco estudiados.²⁰

Considerando la información anterior, el presente trabajo fue realizado con el objetivo principal de caracterizar y comparar la concentración de GSH y las actividades enzimáticas específicas de la transferasa de glutatión (AEE-TG) y de la gammaglutamiltransferasa (AEE-GGT), en homogeneizados de hígado y riñón de pollos de raza Avian y Farm, y ratas de raza Wistar.

Material y métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en la Posta Zootécnica del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, que se encuentra al noroeste de la ciudad de Aguascalientes, a una latitud 21° 57' 40" y longitud 102° 22' 30", a 9 km, en un área rural y 1 936 msnm, bajo condiciones de clima templado-seco, la temperatura media anual es de 16.9°C, con 475 mm de precipitación media anual.

Para la realización de este trabajo se utilizaron 25 pollos machos de estirpe Avian y Farm, de cuatro semanas de edad, y 25 ratas macho de la raza Wistar, de 35 días de edad, con peso promedio de 750 ± 11.2 g y 152.9 ± 9.20 g de peso, respectivamente. Para evaluar el efecto de grupo los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos (cinco por grupo). Los pollos se vacunaron contra Marek, New Castle, bronquitis y gumboro, de acuerdo con el calendario de la región, mientras que las ratas no se vacunaron.

Las aves se alojaron en una caseta de ambiente natural, en pisos de cemento con cama de aserrín con equipo convencional de iniciación y finalización, mientras que las ratas fueron alojadas en jaulas. La alimentación de las aves fue con base en los requerimientos establecidos por las tablas del NRC²¹ con 22% de proteína y 2 900 (Kcal/kg) de energía metabolizable y las ratas con alimento comer-

animals with 23% protein and 3% fat. The animals were provided with free access to food and water.

All of the chickens and rats from the five groups were weighed and anesthetized with sodium pentobarbital (25 mg/kg of live weight, I.V) and inhaled ether, respectively. Once all of the animals were slaughtered, in both species an incision was made in the ventral medial area of the abdomen in order to locate the liver and kidneys, as well as an incision in the thoracic region to expose the heart. Ringer pH 7.4 solution was applied through the left auricle for ten minutes; afterwards the organs were thoroughly cleaned with the same solution at 4 °C.

Tissue samples were obtained and they were homogenized with a Tris-HCl 200 mM 1:10 (p/v) pH 7.4 buffer solution; aliquots were prepared and frozen at -25 °C until they were to be used. Later the data of the absolute and relative weights of the organs, and the levels of PC, ATP and GSH, as well as SEA-GT and SEA-GGT were obtained.

The PC determinations were done according to the method described by Lowry et al.,²² as modified by Peterson²³ using a UV-visible spectrometer,** bovine serum albumin (BSA) was used as a standard for the protein measurements at a 750 nm absorption. The ATP concentration was determined using the spectrometer method described by Adams,²⁴ and the GSH concentration was determined using the spectrofluorometric method recommended by Cohn & Lyle.²⁵ For measuring GSH concentration, orthohtaldehyde (OHT) was used as an indicator, at an excitation absorption wavelength of 350 to 420-nm with a luminescence spectrofluorometer.*** SEA-GT level was obtained by using the spectrometer method described by Habig²⁶ using 2,4 dichloronitro-bencene (CDNB) at a 340-nm absorption. SEA-GGT level was determined by using the spectrometer method described by Glossman & Neville²⁷ using paranitronalide (pNA) as indicator at a 410-nm absorption.

The data obtained for each variable was analyzed through variance analysis (ANOVA) according to a completely random design and Tukey's multiple comparison means, by using a statistical analysis system (SAS) on a personal computer.²⁸

Results

The protein concentrations in hepatic and renal tissues did not show significant differences between both species ($P > 0.05$), but there were significant statistical differences between organs of the same species in both animal groups ($P < 0.01$). On the other hand, the total protein in the hepatic tissue in the chickens was 20% greater than that of the rats.

The values obtained for ATP in hepatic and renal tissues of both species were significantly different be-

cial* especial para animales de laboratorio con 23% de proteína y 3% de grasa. El alimento y el agua de bebida fueron proporcionados a libre acceso.

Todos los pollos y ratas de los cinco grupos fueron pesados y anestesiados con pentobarbital sódico (25 mg/kg de peso i.v.) y éter por inhalación, respectivamente. Una vez sacrificados todos los animales se realizó un corte en la parte media ventral del abdomen para localizar el hígado y los riñones, así como de la región torácica para exponer el corazón en ambas especies; por vía aurícula cardiaca izquierda se aplicaron soluciones Ringer pH 7.4 durante diez minutos; posteriormente se lavaron los órganos minuciosamente con las mismas soluciones (a 4 °C).

Se obtuvieron muestras de tejidos y se homogeneizaron con solución amortiguada Tris-HCl 200 mM 1:10 (p/v) pH 7.4; se prepararon alícuotas y se congelaron a -25°C hasta su uso. Posteriormente se obtuvieron los datos de los pesos absolutos y relativos para ambos órganos, las CP, ATP y GSH, así como las AEE-TG y AEE-GGT.

Las determinaciones de CP se obtuvieron de acuerdo con el método descrito por Lowry *et al.*,²² modificado por Peterson²³ con un espectrómetro UV-visible,** la albúmina sérica bovina (ASB) se usó como estándar para las mediciones de proteínas a una absorción de 750 nm; la concentración del ATP se determinó mediante el método espectrométrico descrito por Adams;²⁴ la concentración del GSH se determinó aplicando el método espectrofluorométrico que recomiendan Cohn y Lyle,²⁵ para medir la concentración de GSH se utilizó el ortohtaldehído (OFT) como indicador, a una longitud de onda de absorción de excitación de 350 y de 420 nm de emisión con un espectrofluorómetro de luminiscencia;*** la AEE-TG se obtuvo mediante el método espectrométrico de Habig,²⁶ usando el 2,4-dicloronitrobenzeno (CDNB) a absorción de 340 nm; la AEE-GGT se determinó mediante la aplicación del método espectrométrico descrito por Glossman y Neville,²⁷ utilizando la paranitroanilida (pNA) como indicadora, a una absorción de 410 nm.

A los datos obtenidos de cada variable en el estudio se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) conforme a un diseño completamente aleatorio, y pruebas de medias de comparación múltiple de Tukey mediante un sistema de análisis estadístico (SAS) en una computadora personal.²⁸

Resultados

La concentración de proteínas en tejido hepático y renal no mostró diferencias significativas entre ambas

* Purina.

* Varian brand, DMS 80 model.

** Perkin Elmer brand, LS50B model.

tween both organs ($P < 0.01$) (Figure 1 A and B). The livers of the rats showed 236% more ATP concentration with respect to the value found in the liver of the chickens ($P < 0.001$). On the other hand, the ATP concentration value in the kidneys of rats was 140% greater than that observed in chickens ($P < 0.001$). The concentration of ATP in the hepatic tissue of the rats was 5% greater than in the kidneys, different from what was observed in chickens in which the ATP concentration of the renal tissue was 33% greater with respect to that found in the liver ($P < 0.05$).

The GSH concentrations found in the hepatic and renal tissue of both species were significantly different between both organs ($P < 0.05$) (Figure 2 A and B). The GSH concentration in the liver tissue of rats and chickens did not show significant differences ($P > 0.05$). On the other hand, in the kidneys of the rats the GSH concentration was found to be 22.22% greater than that of the kidneys of the chickens ($P < 0.01$). While in the rats the GSH concentrations in the hepatic tissue was

especies ($P > 0.05$), pero sí se observó diferencia estadística significativa entre órganos de la misma especie para ambos grupos de animales ($P < 0.01$). Por otra parte, la proteína total del tejido hepático en los pollos fue 20% mayor que el de las ratas.

Los valores obtenidos de ATP en tejido hepático y renal de ambas especies fueron significativamente diferentes entre ambos órganos ($P < 0.01$) (Figura 1 A y B). Los hígados de las ratas mostraron 236% más de la concentración de ATP con respecto al encontrado en el hígado de pollo ($P < 0.001$). Por otra parte, en el riñón de las ratas el valor de la concentración del ATP fue 140% mayor que el observado en los pollos ($P < 0.001$). La concentración del ATP en tejido hepático de rata fue 5% mayor con respecto al riñón, a diferencia de lo que se observó en pollos, en los cuales la concentración del ATP en tejido renal fue mayor en 33%, con respecto al encontrado en el hígado ($P < 0.05$).

Las concentraciones obtenidas de GSH en tejido hepático y renal de ambas especies fueron significati-

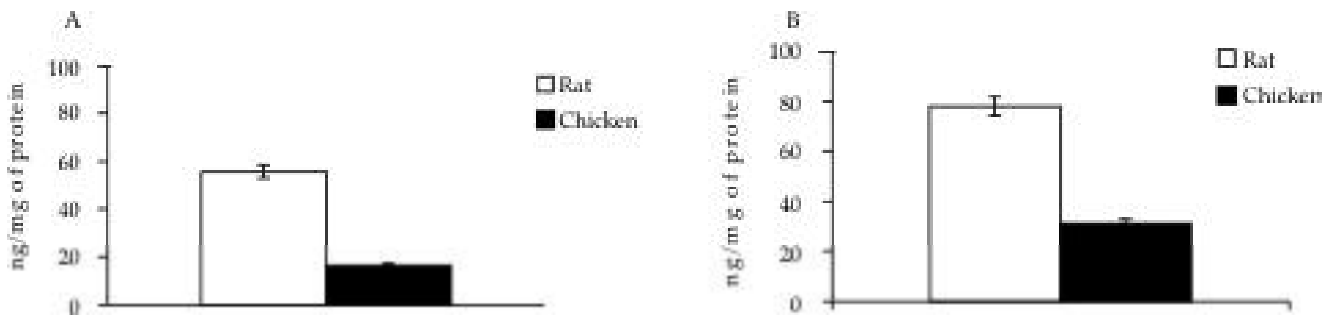


Figura 1. Concentración de trifosfato de adenosina (ATP) en homogeneizados de tejido hepático (Figura 1 A) y renal (Figura 1 B) de ratas de 35 días de edad (□) y pollos de engorda de cuatro semanas de edad (■) (ng/mg de proteína) ($P < 0.001$). Medias y error estándar de la media (EEM) de los cinco grupos de animales ($n = 5$ /grupo). Comparación de medias por el método Tukey.

Adenosine triphosphate concentration (ATP) in hepatic tissue (Figure 1 A) and renal tissue (Figure 1 B) homogenates in 35 day old rats (□) and four week old broilers (■) (ng/mg de protein) ($P < 0.001$). Means and standard deviations from the mean (SDM) of the five animal groups ($n = 5$ /group). Tukey's multiple mean comparison.

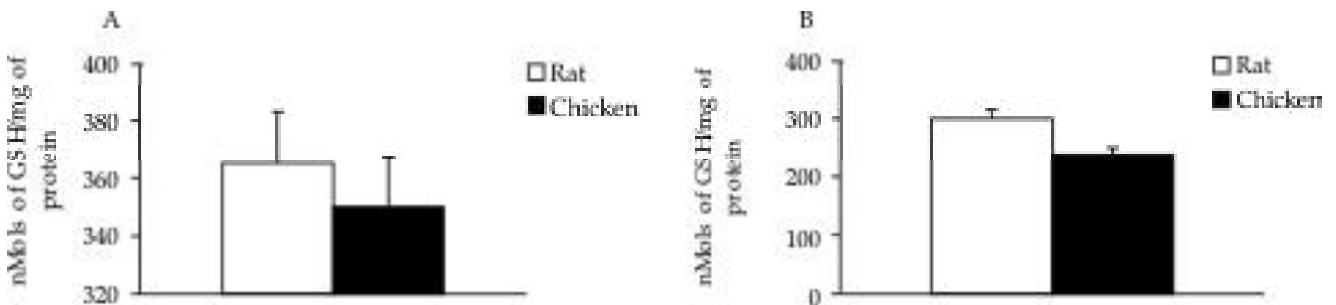


Figura 2. Concentración de glutatión reducido (GSH) en homogeneizados de tejido hepático (Figura 2 A) ($P > 0.05$) y renal (Figura 2 B) ($P < 0.05$) de ratas de 35 días de edad (□) y pollos de engorda de cuatro semanas de edad (■) (nMoles/mg de proteína). Medias y error estándar de la media (EEM) de los cinco grupos de animales ($n = 5$ /grupo). Comparación de medias por el método Tukey.

Reduced glutathione (GSH) in hepatic tissue (Figure 2 A) ($P > 0.05$) and renal tissue (Figure 2 B) ($P < 0.05$) homogenates in 35 day old rats (□) and four week old broilers (■) (nMols/mg de protein). Means and standard deviations from the mean (SDM) of the five animal groups ($n = 5$ /group). Tukey's multiple mean comparison.

471.42% greater in respect to that found in the kidneys ($P < 0.01$). Furthermore, in the chickens the GSH concentration in liver homogenate was 563.33% greater than the amount found in the kidney homogenate ($P < 0.01$).

For SEA-GT, significant statistical differences were found between the liver and kidney tissues of chickens and rats ($P < 0.01$) (Figure 3 A and B). In chickens the SEA-GT in hepatic tissue was 22.22% greater than that found in the kidney ($P < 0.05$), while in the rats we found the contrary given that the SEA-GT in renal tissue was 56.25% greater than the amount found in hepatic tissue ($P < 0.01$). On the other hand, the SEA-GT of the hepatic and renal tissue was found to be greater in chickens than in rats, with 243.75% and 80% respectively ($P < 0.01$).

The SEA-GGT level in rat kidneys was statistically greater than in the liver (401.15%) (Figure 4 A and B). While in the chickens the SEA-GGT level was found to be 420% greater in the liver than in the kidneys ($P < 0.01$). Furthermore the SEA-GGT level in hepatic tissue was found to be greater in the chickens (73.33%) with respect to that of the rats ($P < 0.01$). While in the renal tissue the SEA-GGT in rats was 1,400% greater in respect to the amount found in chickens ($P < 0.01$).

Discussion

In order to evaluate the functionality of the selected tissues, tests for determining protein concentrations were carried out. Quezada *et al.*,²⁹ report that the protein values for liver and kidney homogenates of chicken and rat are within an 18% to 20% and 14% to 16% range respectively. In this study, the values for the liver and kidney were found to be $18.5 \pm 1.3\%$ and $15 \pm 0.7\%$ for rats and chickens respectively. These data suggest that

vamente diferentes entre ambos órganos ($P < 0.05$) (Figura 2 A y B). La concentración del GSH en tejido hepático de las ratas y los pollos no mostró diferencias ($P > 0.05$). Por otro lado, en el riñón de las ratas esta concentración de GSH se encontró con un incremento de 22.22% respecto del riñón de los pollos ($P < 0.01$). Mientras que en las ratas la concentración de GSH en tejido hepático fue 471.42% mayor con respecto al encontrado en riñón ($P < 0.01$). Por otro lado, en los pollos la concentración de GSH en homogeneizado de riñón fue 563.33% mayor con respecto al homogeneizado de riñón ($P < 0.01$).

Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tejidos hepático y renal de los pollos y ratas ($P < 0.01$) (Figura 3 A y B), en pollos la AEE-TG en tejido hepático fue 22.22% mayor que la encontrada en riñón ($P < 0.05$), mientras que en las ratas se encontró lo contrario, dado que la AEE-TG en tejido renal fue 56.25% mayor con respecto al tejido hepático ($P < 0.01$). Por otro lado, la AEE-TG del hígado y el riñón mostró ser mayor en los pollos que en las ratas, con 243.75% y 80%, respectivamente ($P < 0.01$).

La AEE-GGT en riñón de las ratas se mostró mayor estadísticamente con respecto al hígado (401.15%) (Figura 4 A y B). Mientras que en los pollos se encontró que la AEE-GGT del hígado fue mayor 420% con respecto al riñón ($P < 0.01$). Por otra parte, la AEE-GGT en tejido hepático se mostró mayor en los pollos (73.33%) con respecto al de las ratas ($P < 0.01$). Mientras que en el tejido renal la AEE-GGT en ratas fue mayor 1 400% con respecto a la encontrada en los pollos ($P < 0.001$).

Discusión

Para valorar la funcionalidad de los tejidos seleccionados, se realizaron pruebas para determinar la concen-

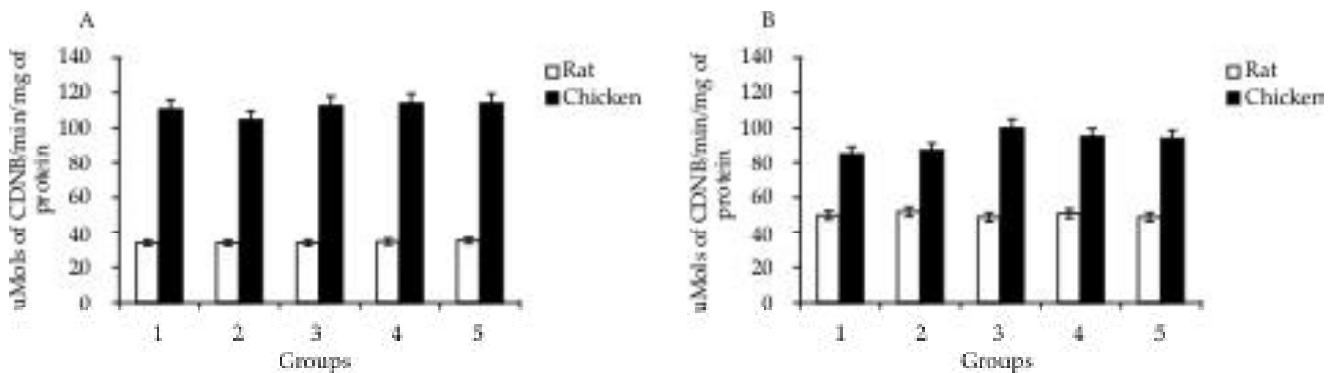


Figura 3. Actividad enzimática específica de la transferasa de glutación (AEE-TG) en homogeneizados de tejido hepático (Figura 3 A) y renal (Figura 3 B) de pollos de engorda de cuatro semanas de edad (■) y ratas de 35 días de edad (□) (mMoles de CDNB/min/mg de proteína) ($P < 0.001$). Medias y error estándar de la media (EEM) de cinco grupos de animales ($n = 5$ /grupo). Comparación de medias por el método Tukey. Specific enzymatic activity of glutathione transferase (SEA-GT) in hepatic tissue (Figure 3 A) and renal tissue (Figure 3 B) homogenates in four week old broilers (■) and 35 day old rats (□) (mMols of CDNB/min/mg of protein) ($P < 0.001$). Means and standard deviations from the mean (SDM) of the five animal groups ($n = 5$ /group). Tukey's multiple mean comparison.

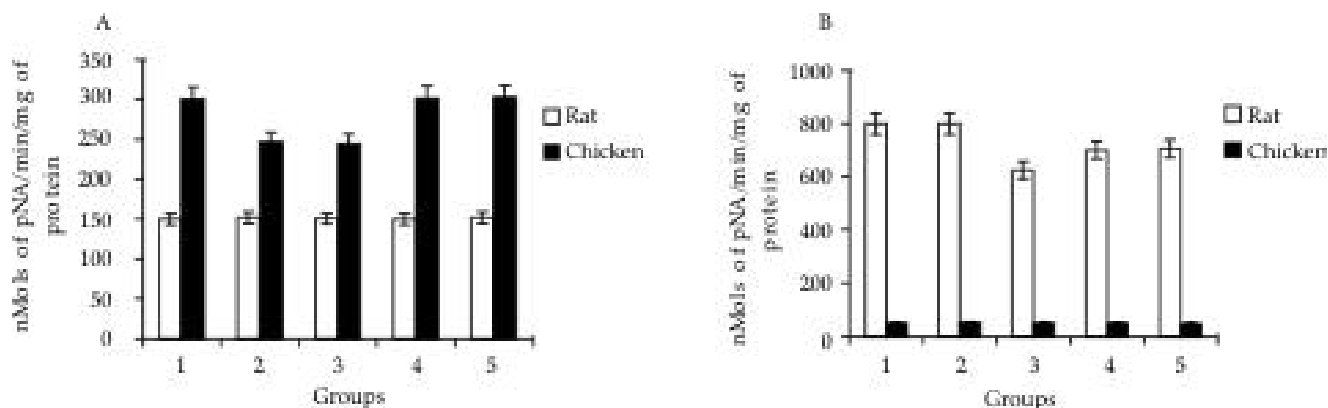


Figura 4. Actividad enzimática específica de gamma-glutamyltranspeptidasa (AEE-GGT), en homogeneizados de tejido hepático (Figura 4 A) y renal (Figura 4 B) de pollos de engorda de cuatro semanas de edad (■) y ratas de 35 días de edad (□) (Panel B) (nMols de pNA/min/mg de proteína) ($P < 0.001$). Medias y error estándar de la media (EEM) de cinco grupos de animales ($n = 5$ /grupo). Comparación de medias por el método Tukey.

Specific enzymatic activity of gamma-glutamyltranspeptidase (SEA-GGT) in hepatic tissue (Figure 4 A) and renal tissue (Figure 4 B) homogenates in four week old broilers (■) and 35 day old rats (□) (Panel B) (nMols of pNA/min/mg of protein) ($P < 0.001$). Means and standard deviations from the mean (SDM) of the five animal groups ($n = 5$ /group). Tukey's multiple mean comparison.

the integrity of the tissues was maintained throughout the study and that the changes observed in all of the other variables measured could be considered as a normal function of the studied species and organs.

Given that two ATP dependant enzymes synthesize GSH,³⁰ the ATP concentrations were measured in order to characterize the GSH values. In rats, the ATP value registered was of 1.45 Mol/mg of hepatic tissue.³¹ The results of the present study differ from those of said authors due to the fact that the values observed in hepatic tissue were of 9.75 in rats, while in chickens there were 2.75 ng/mg of tissue, value that had not been registered up to now. Furthermore, in renal tissue the values were observed in the 12.0 and 5.0 $\mu\text{g/g}$ range for rats and chickens respectively. For both species the ATP values were greater in renal tissue than in hepatic tissue ($P < 0.05$). Considering that the synthesis of GSH depends on two enzymes that depend upon ATP it is possible to assume that the renal tissue has better conditions in order to synthesize GSH. These results also indicate that there are differences among species and tissues because the values were greater in rats than in chicken ($P < 0.05$). These data suggest that the kidney of the rat could have a greater capacity to produce ATP than that of the chickens; therefore it is possible to suppose that the detoxification activity of the kidney could be more efficient in rats than in chickens.

Although GSH is the main tiolic tripeptide compound in cells from mammals and other animal species, it has not been fully studied in birds.¹⁴ Its general function includes the protection of cells against free radicals (FR), reactive oxygen species (ROS) and endogenous and exogenous toxic compounds. Xenobiotics are compounds that cause harm and produce FR,^{8,32}

tracción de proteínas. Quezada *et al.*²⁹ informan que los valores de proteínas para los homogeneizados de hígado y riñón en pollos y ratas se encuentran en un rango de 18% a 20% y de 14% a 16%, respectivamente. En este estudio, los valores del hígado y riñón fueron de $18.5 \pm 1.3\%$ y $15 \pm 0.7\%$ para las ratas y los pollos, respectivamente. Estos datos sugieren que la integridad de los tejidos se mantuvo a través del ensayo y que los cambios observados en las otras variables medidas pudieran ser consideradas como una función normal de las especies y órganos estudiados.

Debido a que el GSH es sintetizado por dos enzimas dependientes de ATP,³⁰ se midieron las concentraciones de ATP para caracterizar los valores de GSH. En ratas, el valor de ATP registrado fue de 1.45 Mol/mg de tejido hepático en ratas.³¹ Los resultados del presente trabajo difieren de los de estos autores, ya que los valores observados en tejido hepático fueron de 9.75 en ratas, mientras que en pollos fue de 2.75 ng/mg de tejido, valor que no ha sido registrado a la fecha. Por otra parte, en tejido renal estos valores fueron observados en rangos de 12.0 y 5.0 $\mu\text{g/g}$ de tejido en ratas y pollos, respectivamente. Para ambas especies los valores de ATP fueron superiores en tejido renal que en el hepático ($P < 0.05$), considerando que la síntesis de GSH depende de dos enzimas donde interviene el ATP, es posible suponer que el tejido renal tiene mejores condiciones para llevar a cabo la síntesis del GSH. Estos resultados también indican que existen diferencias entre especies y tejidos, ya que los valores fueron mayores en ratas que en pollos ($P < 0.05$). Estos datos sugieren que el riñón de la rata podría tener una mayor capacidad para producir ATP que los pollos; por tanto, es posible suponer que la actividad de detoxificación del riñón podría ser más eficiente en ratas.

which react with nucleophilic compounds or conjugate with GSH and are later on metabolized or excreted by way of the mercapturic acid pathway in mammals.³³ These same GSH conjugates have been detected in chickens under oxidative stress and are used as a detoxification method.^{34,35} The normal amounts of GSH in hepatic tissue of chickens range from 1.26 to 4.19 Mol/mg of tissue.^{16,35,36} Nevertheless, in rats, the normal hepatic GSH values have been registered in ranges of 4 to 10 Mol/mg of tissue.^{37,38} The data obtained for GSH in hepatic tissue in the present study were very similar to those registered by these authors.

Furthermore, renal concentrations of GSH have been found to be in the range of 0.20 to 2.5 Mol/mg of tissue for rats,^{38,39} but not so in chickens, data that corresponds to that of the present study. Nevertheless, in chickens, GSH values for renal tissue are not well known. GSH values obtained from renal tissue were less (1.8 and 2.1 nMol/g of protein) than those from the liver (11.94 and 12.00 nMol/g of protein), results that correspond to those found by other authors. However, the values for renal tissue of chickens are also not well known. GSH concentration decreases due to the presence of xenobiotics, therefore intracellular GSH is fundamental for giving necessary resistance against these xenobiotics.⁴⁰ The differences observed between these two species suggest a different behavior between mammals and birds in the presence of a xenobiotic, and as a consequence, a different degree of susceptibility to the presence of a toxic substance.

Various studies have been done to determine the presence of different GT isoenzymes in the cytosol of the liver of several mammals.⁴¹⁻⁴³ In the present study we have compared the enzymatic activity of GT in hepatic and renal tissue homogenates of rats and chickens.

The results of the present study for chicken hepatic tissue homogenates showed a 248.75% greater SEA-GGT level than in rats. (Figure 4 A). We also detected that this activity is 23% greater than that of renal tissue homogenates of the same chickens. Nevertheless, the rat renal tissue homogenates (Figure 4 B) behaved differently from those of chickens because the activity instead of being less was greater by 30% with respect to that which was found in the hepatic tissue of the rat. Said peculiarities between these two species could explain, to a great extent, the differences found in susceptibility and capacity of GSH to conjugate with toxic compounds or their metabolites, products of bio activation by the monooxygenase system. In consequence they clarify the differences between species at reducing or decreasing the cellular damage due to oxidative stress caused by the toxic substance.

In the present study, the differences in enzymatic activity of GGT between the two species show that this enzyme is more active in the liver than in the kidneys

Aunque el GSH es el principal compuesto tripéptido tiólico en células de mamíferos y otras especies animales, no ha sido ampliamente estudiado en las aves.¹⁴ Su función general incluye la protección de las células contra los radicales libres (RL), especies reactivas de oxígeno (ERO) y compuestos tóxicos de origen exógeno y endógeno. Los xenobióticos son compuestos que causan daño y producen RL,^{8,32} los cuales reaccionan con compuestos nucleofílicos o se conjugan con el GSH, que son posteriormente metabolizados o excretados por la vía de ácido mercaptúrico en los mamíferos.³³ Estos mismos conjugados con GSH se han detectado bajo estrés oxidativo en pollos, como mecanismo de detoxificación.^{34,35} Las cantidades de GSH normal de tejido hepático en pollos van desde valores de 1.26 a 4.19 Mol/mg de tejido.^{16,35,36} Sin embargo, en ratas los valores normales de GSH en tejido hepático se han registrado en rangos que van desde 4 a 10 Mol/mg de tejido.^{37,38} Los datos obtenidos de GSH en el presente estudio en tejido hepático fueron muy similares con respecto a los registrados por estos autores.

Por otra parte, la concentración de GSH renal se ha encontrado en rangos de 0.20 a 2.5 Mol/mg de tejido en las ratas,^{38,39} pero no en pollos, datos que concuerdan con los del presente trabajo. Sin embargo, en pollos, los valores del GSH, para tejido renal, no son bien conocidos. Los valores de GSH, obtenidos en tejido renal, fueron menores (1.8 y 2.1 nMol/g de proteína) que en el hígado (11.94 y 12.00 nMol/g de proteína) estos resultados concuerdan con los datos registrados por otros autores. Sin embargo, los valores de tejido renal en pollos tampoco son bien conocidos. La concentración de GSH decrece debido a la presencia de xenobióticos; por tanto, el GSH intracelular es fundamental para proporcionar la resistencia necesaria contra estos xenobióticos.⁴⁰ Las diferencias observadas entre estas dos especies sugieren un comportamiento diferente de los mamíferos y aves en presencia de algún xenobiótico; y en consecuencia un diferente grado de susceptibilidad ante la presencia de un tóxico.

Se han hecho numerosos estudios para determinar la presencia de diferentes isoenzimas de TG en el citosol del hígado de varios mamíferos.⁴¹⁻⁴³ En el presente trabajo se ha comparado la actividad enzimática de la TG en homogeneizados de tejido hepático y renal de ratas y pollos.

Los resultados de este estudio en homogeneizados de tejido hepático de pollos mostraron una mayor AEE-TG que en las ratas en 248.75% (Figura 4 A). También se detectó que esta actividad es mayor que en homogeneizados de tejido renal en los mismos pollos en 23%. Sin embargo, los homogeneizados de tejido renal de las ratas (Figura 4 B) se comportaron de forma diferente que en los pollos, ya que la actividad en vez de ser menor fue mayor en 30% con respecto al encontrado en tejido hepático de la rata. Dichas peculiaridades entre estas dos especies podrían explicar, en gran parte, las diferencias encontradas en cuanto a la susceptibilidad y capacidad para que el

of chickens. Nevertheless, in rats the enzymatic activity of GGT showed a different behavior because it was more active in the kidney than in the liver. It is noteworthy that in the results obtained the activity was greater in the liver of chickens than in that of the rats. This data suggests that the liver of chickens has a greater responsibility in the detoxification and elimination processes of xenobiotics than the kidneys. However, in rats this function could be done with the joint participation of both organs involved in the detoxification and elimination of toxic substances (liver and kidney). These results support the hypothesis that the difference in concentrations and activity of the endogenous components between the species and their organs could have different response mechanisms for detoxification and elimination of xenobiotics. It is also important to note that it is necessary to continue doing research oriented to gain more knowledge about these processes that are so important in biotransformation and elimination of compounds that damage the cells or that produce oxidative stress.

The importance of GSH and the participation of the gamma-glutamyl-transferase and glutathione transferase in the processes of cellular protection against the presence of xenobiotics and their metabolites, as well as the differences that were found in these two species studied, indicate in general the possible diversity in which these detoxification mechanisms could respond to the presence of a xenobiotic within the cell. With this perspective, we can postulate the hypothesis for carrying out studies with chickens exposed to a xenobiotic of interest for this species.

Acknowledgements

The development of this study was supported with funds from the Autonomous University of Aguascalientes (Project PIP/PT-97-4), with contribution of the Miguel Hidalgo Regional System for Research (Conacyt-SIHGO) (Project ALIM-8/9) and by the personnel of the Zootechnical Post of the Agricultural and Livestock Science Center of the Autonomous University of Aguascalientes. We also acknowledge the advice received from Dr. Andres Quintanar Estephano, the laboratory technician Maria Guadalupe Espino and MVZ Armando Martinez de Anda.

GSH pueda conjugarse con los compuestos tóxicos o sus metabolitos, productos de la bioactivación por el sistema de monooxigenasas y, por consiguiente, aclarar las diferencias entre especies para reducir o aminorar el daño celular por el estrés oxidativo provocado por el tóxico.

En este estudio, las diferencias en las actividades enzimáticas de GGT entre las dos especies muestran que esta enzima es más activa en hígado que en riñón de pollos. Sin embargo, en las ratas la actividad enzimática de GGT mostró un comportamiento diferente, ya que fue más activa en riñón que en hígado. Podría mencionarse también que en los resultados obtenidos la actividad fue mayor en el hígado de los pollos que en el de las ratas. Estos datos sugieren que en pollos, el hígado podría tener una mayor responsabilidad en los procesos de detoxificación y eliminación de los xenobióticos que el riñón. Sin embargo, en ratas esta función podría estar implicada por la participación de los dos órganos involucrados en el proceso de detoxificación y eliminación de sustancias tóxicas (hígado y riñón). Estos resultados soportan la hipótesis de que la diferencia en la concentración y actividades de los componentes endógenos entre las especies y sus órganos, podrían tener diferentes respuestas en los mecanismos de detoxificación y eliminación de xenobióticos. También es importante mencionar que hace falta seguir realizando estudios orientados a conocer más de estos procesos tan importantes en la biotransformación y eliminación de compuestos que dañan las células o producen estrés oxidativo.

Considerando la importancia del GSH y la participación de las enzimas gammaglutamiltransferasa y transferasa de glutatión en los procesos de protección celular, contra la presencia de xenobióticos y sus metabolitos, así como las diferencias que se encontraron entre estas dos especies bajo estudio indican, en general, la posible diversidad en la manera en que estos mecanismos de detoxificación podrían responder a la presencia de algún xenobiótico en el interior de la célula. Bajo esta perspectiva, se puede plantear la hipótesis de realizar estudios en pollos con exposiciones a algún xenobiótico de interés en esta especie.

Agradecimientos

El desarrollo de este estudio fue apoyado con recursos de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Proyecto PIP/PT-97-4), con la contribución del Sistema Regional de Investigación Miguel Hidalgo (Conacyt-SIHGO) (Proyecto ALIM-8/9) y del personal de la Posta Zootécnica del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Se agradece también la asesoría recibida por parte del Dr. Andrés Quintanar Estephano, a la técnica laboratorista María Guadalupe Espino y al MVZ Armando Martínez de Anda.

References

1. McCormick ChC. Symposium: liver metabolism in the chicken (Introduction). *Poultry Sci* 1990;69:1182.
2. Lin JK, Miller JA, Miller EC. 2,3-dihydro-2(N⁷-guanyl)-(guanyl-7)-3hydroxy-aflatoxin B₁, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B-DNA of ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome-mediated reactions and in the rat liver *in vivo*. *Cancer Lett* 1977;24:241-250.
3. Shoental R. Hepatotoxic activity of retrosine, senkirikine and hydroxysenkirikine in newborn rats, and the role of epoxides in carcinogenesis by pyrrolizidine alkaloids and aflatoxins. *Nature* 1970;221:401-402.
4. Essigmann JM, Croy RG, Bennett RA, Wogan GN. Metabolic activation of aflatoxin B₁: patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. *Drug Metab Rev* 1982;13:581-602.
5. Degen GH, Neumann HG. The major metabolite of aflatoxin B₁ in the rat is a glutathione conjugate. *Chem Biol Interact* 1978;22:239-255.
6. Boyland E, Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol* 1969;32:173-219.
7. Wirth PJ, Thorgeirsson SS. Glutathione synthesis and degradation in fetal and adult rat liver and Novikoff hepatoma. *Cancer Res* 1976;38:2861-2865.
8. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983;52:711-760.
9. Shan X, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther* 1990;47:61-71.
10. Meister A. New aspects of glutathione biochemistry and transport: selective alteration of glutathione metabolism. *Fed Proc* 1984;43:3031-3042.
11. Anderson ME, Meister A. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1983;80:707-711.
12. Bannai S, Tateishi N. Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J Memb Biol* 1986;89:1-8.
13. Mgbodile MUK, Holscher M, Neal RA. A possible protective role for reduced glutathione in aflatoxin B₁ toxicity: effect of pretreatment of rats with phenobarbital and 3-methylcholanthrene on aflatoxin toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;43:128-142.
14. Beers KW, Nejad H, Bottje WG. Aflatoxin and glutathione in domestic fowl (*Gallus domesticus*) I. Glutathione elevation and attenuation by high dietary methionine. *Comp Biochem Physiol* 1992b;101C:239-244.
15. Enkvetchakul B, Bottje WG, Anthony N, Moore R, Huff W. Compromised antioxidant status associated with ascites in broilers. *Poultry Sci* 1993;72:2272-2280.
16. Enkvetchakul B, Anthony NB, Bottje WG. Liver and blood glutathione in male broiler chickens, turkeys, and quail. *Poultry Sci* 1995;74:885-889.
17. Veltmann JR Jr, Wyatt RD, Voight MN, Shamsuddin Z. Influence of dietary sulfur amino acid levels on performance, free amino acids and biochemical parameters in plasma and hepatic glutathione of broiler chicks fed aflatoxin. *J Poultry Sci* 1983;62:1518-1519.
18. Emerole GO, Neskovic N, Dixon RL. The detoxification of aflatoxin B₁ with glutathione in the rat. *Xenobiotica* 1979;9:737-743.
19. Mainigi KD, Campbell TC. Effects of low dietary protein and dietary aflatoxin on hepatic glutathione levels in F-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981;59:196-203.
20. Beers KW, Glahn RP, Bottje WG, Huff WE. Aflatoxin and glutathione in domestic fowl (*Gallus domesticus*) II. Effects on hepatic blood flow. *Comp Biochem Physiol* 1992a;101C:463-467.
21. National Research Council. Nutrient requirements of poultry. 8th ed. Washington (DC): National Academy Press, 1984.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
23. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977;83:346-356.
24. Adams H. Adenosine 5'-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 1963:539-543.
25. Cohn VH, Lyle J. A fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem* 1966;14:434-440.
26. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130-7139.
27. Glossman H, Neville DM Jr. γ -glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *Feb Lett* 1972;19:340-344.
28. SAS/STAT. Guide for personal computers. 6th ed. Cary (NC): SAS Institute Inc., 1985.
29. Quezada TT, Rebollar SE, Cuéllar PL, Martínez AA, Valdivia FA. Secuencia de los efectos de la aflatoxina B₁ sobre el riñón e hígado de pollos en desarrollo. *Memorias de la XVIII Convención Nacional de la ANECA*; 5-9 mayo 1993; Cancún (Q. Roo). México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, A.C., 1993:226-231.
30. Orłowski M, Meister A. The γ -glutamyl cycle; a possible transport system for amino acids. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1970;67:1248-1255.
31. Strubelt O, Kremer J, Tilse A, Keogh J, Pentz R, Younes M. Comparative studies on the toxicity of mercury, cadmium, and copper toward the isolated perfused rat liver. *J Toxicol Environ Health* 1996;47:267-283.
32. Larsson A, Orrenius S, Holmgren A. Functions of glutathione: biochemical, physiological, toxicological, and clinical aspects. New York: Raven Press, 1983.
33. Sies HK. Glutathione conjugation: its mechanism and biological significance. London (UK): Academic Press, 1988.
34. Larsen C, Erlich M, Discoll C, Gross WB. Aflatoxin-antioxidant effects on growth of young chicks. *J Poultry Sci* 1985;64:2287-2291.
35. Wang SY, Bottje W, Maynard P, Dibner J, Shermer W. Effect of santonin and oxidized fat on liver and intestinal glutathione in broilers. *J Poultry Sci* 1997;76:961-967.
36. Beers K, Nejad H, Bottje W. Indomethacin attenuation of celiac blood flow hyperemia following glutathione depletion. *Biochem Pharmacol* 1990;40:2331-2335.
37. Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, Shiozaki H, Sakamoto Y. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr* 1977;107:51-60.
38. Chanda S, Mehendale MH. Role of nutrition in the survival after hepatotoxic injury. *Toxicology* 1996;111:163-178.

39. Maynard PM, Graupner GW, Bottje WG. Effect of glutathione depletion on tissue and plasma prostacyclin and thromboxane in rats. *Biochem Pharmacol* 1992;43:1043-1051.
40. Meijer C, Mulder NH, Hospers GAP, Uges DRA, Decries EGE. The role of glutathione in resistance to cisplatin in a human small cell lung cancer cell line. *Br J Cancer* 1990;62:72-77.
41. Quinn BA, Crane TL, Kocal TE, Best SJ, Cameron RG, Tushmore TH *et al.* Protective activity of different hepatic cytosolic glutathione-S-transferases against DNA-binding metabolites of aflatoxin B₁. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;105:351-363.
42. Ramsdell HS, Eaton DL. Mouse liver glutathione-S-transferase isoenzyme activity toward aflatoxin B₁-8-9-epoxide and benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;105:216-225.
43. Raney KD, Meyer DJ, Ketterer B, Harris TM, Guengerich FP. Glutathione conjugation of aflatoxin B₁ exo and endo-epoxides by rat and human glutathione-S-transferases. *Chem Res Toxicol* 1992;5:470-478.